



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
Y MICROBIOLOGÍA

Regulación de las Respuestas a la Luz en el
Hongo *Mucor circinelloides*

Dña. Fátima Silva Franco
2013

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Ante todo darle las gracias a mis directores, Víctor y Santiago, por ofrecerme la oportunidad de formarme como investigadora y por tener la paciencia necesaria para lidiar conmigo. Sus ánimos y apoyo continuo han hecho posible este proyecto. Muchas gracias a ambos por haber estado siempre ahí, en todos los pasos de esta tesis.

También agradecer a mis compañeros del laboratorio, por hacer más que llevaderas las horas de trabajo y esas largas tardes de viernes, por la conversación, la compañía, la música y los chistes malos. El ambiente en nuestro laboratorio es algo que damos por sentado, pero no todo el mundo ha sido tan afortunado. A mi familia y a mis amigos, por soportarme y no dejar de preguntar por la tesis a pesar de los sonidos guturales a modo de respuesta. Ambos han sufrido mis altos y bajos, pero siempre me han acompañado con cariño y mucha fe. A mis profesores y compañeros del máster de bioinformática, por un año inolvidable y por abrir otras rutas. Y a mis nuevos compañeros también, de trabajo y de casa, que han tenido que aguantar los últimos coletazos y se han ocupado de separarme del portátil para darme sustento (anímico y material) siempre que empezaba a fusionarme con la silla.

A todos ellos les debo el haber terminado la redacción de esta tesis y el haber decidido seguir por el camino de la investigación. Gracias gracias gracias.

“Of course I'm sane, when trees start talking to me, I don't talk back”

Terry Pratchett, *The Light Fantastic*

“Make your mistakes, next year and forever”

Neil Gaiman

Contenidos

1	Introducción	1
1.1	<i>Mucor circinelloides</i>	1
1.1.1	Características generales	1
1.1.2	Ciclos de vida	1
1.1.3	Dimorfismo	2
1.1.4	<i>M. circinelloides</i> como modelo de estudio	4
1.2	La luz como fuente de información ambiental	5
1.3	Fotorreceptores	8
1.3.1	Luz azul: criptocromos y dominios LOV	8
1.3.2	Luz roja: fitocromos	13
1.3.3	Luz verde: rodopsinas	13
1.4	Los genes <i>white-collar</i>	14
1.4.1	Los genes <i>white-collar</i> de <i>Neurospora crassa</i>	14
1.4.2	Genes regulados por la luz y el complejo WC	16
1.4.3	La regulación del ritmo circadiano	18
1.4.4	Vivid	19
1.4.5	El dominio LOV	20
1.4.6	Genes <i>wc-1</i> en otros hongos	24
1.5	Fotocarotenogénesis en hongos	25
1.5.1	Funciones de los carotenos	26
1.5.2	Regulación de la síntesis de carotenoides	27
1.6	Fototropismo en hongos	30
1.7	El gen <i>crgA</i>	32
1.7.1	Características generales	32
1.7.2	Funciones de CrgA	33
1.7.3	Dominio RING-finger	34
1.7.4	Otros dominios presentes en CrgA	35
1.7.5	Homólogos del gen <i>crgA</i>	36
1.8	Ubiquitilación no degradativa	37
1.9	Objetivos de la tesis	39

2	Materiales y Métodos	41
2.1	Estirpes y plásmidos	41
2.1.1	Estirpes de <i>Mucor circinelloides</i>	41
2.1.2	Estirpes de <i>Escherichia coli</i>	41
2.1.3	Plásmidos	42
2.2	Medios y condiciones de crecimiento	42
2.2.1	Medios de crecimiento	42
2.2.2	Condiciones de crecimiento de <i>M. circinelloides</i>	45
2.3	Tampones y reactivos	47
2.3.1	Manipulación del DNA	47
2.3.2	Manipulación del RNA	48
2.3.3	Manipulación de proteínas	48
2.3.4	Transformación de <i>Mucor circinelloides</i>	51
2.3.5	Hibridaciones	51
2.3.6	Extracción del DNA de <i>M. circinelloides</i>	52
2.3.7	Extracción del RNA de <i>M. circinelloides</i>	52
2.3.8	Genoteca en el fago λ	53
2.4	Transformaciones	53
2.4.1	Transformación de <i>Escherichia coli</i> con plásmidos bacterianos	53
2.4.2	Transformación de <i>M. circinelloides</i>	54
2.5	Análisis de carotenos	54
2.6	Manipulación de DNA	55
2.6.1	Aislamiento de DNA de <i>M. circinelloides</i>	55
2.6.2	Aislamiento de DNA plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	55
2.6.3	Tratamientos con enzimas	55
2.6.4	Técnicas electroforéticas	56
2.6.5	Amplificación de DNA por PCR	56
2.6.6	Marcado de fragmentos de DNA para hibridaciones	57
2.6.7	Hibridación de DNA fijado a un soporte	57
2.6.8	Secuenciación del DNA	58
2.7	Manipulación de RNA	58
2.7.1	Aislamiento de RNA total de <i>M. circinelloides</i>	58
2.7.2	Hibridación de RNA total fijado a un soporte	58
2.8	Manipulación de proteínas	59
2.8.1	Extractos de proteínas de <i>M. circinelloides</i> para western	59
2.8.2	Extractos de proteínas de <i>E. coli</i>	59
2.8.3	Electroforesis de proteínas	59
2.8.4	Transferencia de proteínas a membranas	60

2.8.5	Revelado de las membranas por inmunodetección (<i>western</i>)	60
2.8.6	Anticuerpos	61
2.8.7	Análisis de la N-glicosilación de Mcwc-1b	61
2.8.8	Análisis de la fosforilación de Mcwc-1b	62
2.8.9	Inmunoprecipitación y análisis de la ubiquitilación de Mcwc-1b .	62
2.8.10	Co-inmunoprecipitación de Mcwc-1b y CrgA	63
2.9	Rastros genoteca en el fago λ	63
2.9.1	Titulación de la genoteca	63
2.9.2	Transferencia de los fagos a membrana	63
2.9.3	Aislamiento de clones positivos tras la hibridación	63
2.9.4	Aislamiento de DNA del fago λ	64
2.10	Análisis bioinformáticos	64
2.11	Cebadores y sondas	67
2.11.1	Sondas	67
2.11.2	Cebadores	67
3	Resultados	71
3.1	Fototropismo y fotocarotenogénesis en <i>M. circinelloides</i>	71
3.1.1	Fotocarotenogénesis	71
3.1.2	Fototropismo	72
3.2	Aislamiento de los genes <i>wc-1</i> de <i>M. circinelloides</i>	73
3.2.1	Rastreo de la genoteca de <i>M. circinelloides</i> en el fago λ	73
3.2.2	Caracterización de los fagos positivos	73
3.2.3	Subclonación de los genes <i>mcwc-1</i>	74
3.3	Descripción de los genes <i>mcwc-1</i>	77
3.3.1	Estructura de los genes <i>mcwc-1</i>	77
3.3.2	Descripción de las proteínas Mcwc-1	84
3.3.3	Parecido entre las proteínas Mcwc-1 y otras proteínas tipo Wc-1	88
3.3.4	Relaciones de sintenia de los genes <i>mcwc-1</i> en cigomicetos . . .	88
3.3.5	Análisis filogenético de las proteínas Mcwc-1	90
3.4	Expresión de los genes <i>mcwc-1</i>	92
3.5	Generación de mutantes simples <i>mcwc-1</i> Δ	93
3.5.1	Aislamiento de mutantes homocariontes	93
3.5.2	Comprobación de las interrupciones mediante <i>Southern</i>	93
3.6	Fenotipos de los mutantes <i>mcwc-1</i> Δ	98
3.6.1	La delección de <i>mcwc-1c</i> afecta a la fotocarotenogénesis	98
3.6.2	La delección de <i>mcwc-1a</i> provoca la pérdida del fototropismo . .	100
3.7	Regulación de la expresión génica por la luz en los mutantes simples <i>mcwc-1</i> Δ	103

3.8	Generación de mutantes dobles <i>mcwc-1Δ crgAΔ</i>	105
3.8.1	Aislamiento de mutantes homocariontes	106
3.8.2	Comprobación de las interrupciones mediante <i>Southern</i>	106
3.9	Fotocarotenogénesis en los mutantes dobles <i>mcwc-1Δ crgAΔ</i>	106
3.9.1	Genes <i>mcwc-1a</i> y <i>mcwc-1c</i> en la regulación de <i>crgA</i>	106
3.9.2	El gen <i>mcwc-1b</i> en la regulación de <i>crgA</i>	108
3.10	Regulación por luz en los mutantes <i>mcwc-1Δ crgAΔ</i>	114
3.10.1	Expresión de los genes <i>carB</i> y <i>carRP</i>	114
3.10.2	Expresión del gen <i>mcwc-1c</i> en los mutantes <i>mcwc-1Δ crgAΔ</i>	115
3.11	Regulación de la expresión de <i>mcwc-1b</i> por <i>crgA</i>	116
3.11.1	Análisis de la regulación a nivel transcripcional	116
3.11.2	Análisis de la regulación a nivel post-transcripcional	116
3.11.3	Modificaciones post-traduccionales de Mcwc-1b	118
3.11.4	Análisis de la interacción entre Mcwc-1b y CrgA	121
4	Discusión	123
4.1	Genes <i>mcwc-1</i> y sus homólogos en otros cigomicetos	123
4.2	Características estructurales de los productos de los genes <i>mcwc-1</i>	125
4.3	Funciones de los genes <i>mcwc-1</i>	127
4.3.1	Control del fototropismo: <i>mcwc-1a</i>	127
4.3.2	Regulación de la síntesis de carotenos por la luz: <i>mcwc-1c</i>	130
4.3.3	Control de la carotenogénesis independiente de la luz	133
4.4	Posibles funciones de la ruta Mcwc-1b/CrgA	136
4.5	Regulación de la ruta CrgA/Mcwc-1b	139
5	Conclusiones	141
6	Anexo	143
	Bibliografía	145

Figuras

1.1	Ciclo de vida de <i>Mucor circinelloides</i>	3
1.2	Principales fotorreceptores y cromóforos	9
1.3	Genes de fotorreceptores en hongos	11
1.4	Esquema de las proteínas Wc y Vvd de <i>N. crassa</i>	15
1.5	Resumen de genes regulados por la luz en <i>N. crassa</i>	17
1.6	Esquema simplificado del reloj circadiano en <i>N. crassa</i>	19
1.7	Topología del dominio LOV	21
1.8	Cambios inducidos por luz en la estructura de Vvd	22
1.9	Alineamiento de dominios LOV tipo Wc-1/ZTL	23
1.10	Proteínas Wc-1 en <i>Zygomycota</i>	26
1.11	Ruta de síntesis de carotenoides en <i>M. circinelloides</i>	28
1.12	Regulación de la carotenogénesis en <i>P. blakesleeanus</i>	29
2.1	Esquema de las sondas de los genes <i>mcwc-1</i>	68
3.1	Acumulación de β -caroteno bajo diferentes luces en <i>M. circinelloides</i>	71
3.2	Fototropismo en <i>M. circinelloides</i>	72
3.3	Esquema del plásmido pMAT1125	74
3.4	Southern de los fagos C-E	75
3.5	Esquema del plásmido pMAT1110	75
3.6	Southern de los fagos 1-10	76
3.7	Esquema del plásmido pMAT1118	76
3.8	Esquema del plásmido pMAT1130	77
3.9	Secuencias del gen <i>mcwc-1a</i> y de la proteína Mcwc-1a	79
3.10	Secuencias del gen <i>mcwc-1b</i> y de la proteína Mcwc-1b	81
3.11	Secuencias del gen <i>mcwc-1c</i> y de la proteína Mcwc-1c	83
3.12	Arquitectura de las proteínas Wc-1 de hongos	85
3.13	Alineamiento de los dominios LOV de Wc-1 de hongos	86
3.14	Alineamiento HHPred de Mcwc-1b y 4gat	88
3.15	Filogenia de las proteínas tipo Wc-1 en hongos	91
3.16	Expresión de los genes <i>mcwc-1</i> , <i>carB</i> y <i>carRP</i> en fondo silvestre	92
3.17	Esquemas de la interrupción de <i>mcwc-1a</i>	95

3.18	Hibridación tipo <i>Southern</i> del mutante <i>mcwc-1a</i> Δ	95
3.19	Esquemas de la interrupción de <i>mcwc-1b</i>	96
3.20	Hibridación tipo <i>Southern</i> de los mutantes <i>mcwc-1b</i> Δ	96
3.21	Esquemas de la interrupción <i>mcwc-1c</i>	97
3.22	Hibridación tipo <i>Southern</i> de los mutantes <i>mcwc-1c</i> Δ	97
3.23	Contenido en β -caroteno de los mutantes <i>mcwc-1</i> Δ	98
3.24	Esquema del plásmido pMAT1131	99
3.25	Hibridación tipo <i>Southern</i> del mutante <i>mcwc-1c</i> Δ complementado . . .	100
3.26	Contenido en β -caroteno del mutante <i>mcwc-1c</i> Δ complementado	101
3.27	Fototropismo en los mutantes <i>mcwc-1c</i> Δ	102
3.28	Hibridación tipo <i>Southern</i> del mutante <i>mcwc-1a</i> Δ complementado . . .	103
3.29	Esquema del plásmido pMAT1133	104
3.30	Expresión de los genes <i>mcwc-1</i> , <i>carB</i> y <i>carRP</i> en los mutantes <i>mcwc-1</i> Δ	105
3.31	Hibridación tipo <i>Southern</i> de los mutantes <i>mcwc-1a</i> Δ <i>crgA</i> Δ	107
3.32	Hibridación tipo <i>Southern</i> de los dobles mutantes <i>mcwc-1b</i> Δ <i>crgA</i> Δ . .	107
3.33	Hibridación tipo <i>Southern</i> de los mutantes <i>mcwc-1c</i> Δ <i>crgA</i> Δ	108
3.34	Contenido de β -caroteno en los mutantes <i>mcwc-1</i> Δ <i>crgA</i> Δ	109
3.35	Hibridación tipo <i>Southern</i> del mutante supresor MU256	110
3.36	Amplificación del gen <i>mcwc-1b</i> en las estirpes MU256 y MU223	110
3.37	Esquema del plásmido pMAT1148	111
3.38	Acumulación de carotenos en transformantes MU256 complementados .	112
3.39	Amplificación del gen <i>mcwc-1b</i> en los transformantes T1 y T2	112
3.40	Secuencia del gen <i>mcwc-1b</i> en el mutante supresor MU256	113
3.41	<i>Northern</i> dobles mutantes <i>mcwc-1</i> Δ <i>crgA</i> Δ	115
3.42	Expresión del gen <i>mcwc-1b</i> en el mutante simple <i>crgA</i> Δ	116
3.43	La proteína Mcwc-1b en la estirpe silvestre y en el mutante <i>crgA</i> Δ . . .	117
3.44	Análisis del estado de N-glicosilación de Mcwc-1b	119
3.45	Análisis del estado de fosforilación de Mcwc-1b	120
3.46	Análisis del estado de ubiquitilación de Mcwc-1b	120
3.47	Co-inmunoprecipitación de Mcwc-1b y CrgA	122
4.1	Alineamiento de dominios GATA-ZnF de Wc-1	128
4.2	Modelo de regulación propuesto para Mcwc-1s y CrgA	132

Tablas

1.1	Ejemplos de respuestas a la luz en hongos	6
2.1	Resumen de estirpes de <i>E. coli</i> utilizadas	41
2.2	Resumen de estirpes de <i>M. circinelloides</i> utilizadas	43
2.3	Resumen de los plásmidos utilizados	44
2.4	Resumen de estirpes y medios utilizados en los análisis de expresión génica	46
2.5	Vectores y fragmentos usados en la generación de los mutantes <i>mcwc-1</i> Δ .	54
2.6	Resumen de los anticuerpos utilizados	61
2.7	Secuencias utilizadas en los análisis bioinformáticos	66
2.8	Resumen de las sondas usadas en los experimentos de hibridación	68
2.9	Resumen de los cebadores utilizados	69
3.1	Similitud e identidad de las proteínas Mcwc-1 con otras proteínas de hongos	89
3.2	Genes en sintenia con los genes <i>wc-1</i> de cigomicetos	89
3.3	Fragmentos esperados y obtenidos en las hibridaciones tipo <i>Southern</i> de los mutantes <i>mcwc-1</i> Δ	94

1 Introducción

1.1. *Mucor circinelloides*

1.1.1. Características generales

Mucor circinelloides es un hongo filamentosos de amplia distribución que crece en la capa superior del suelo, normalmente sobre sustratos orgánicos en descomposición. Pertenecce a la clase parafilética de los *Zygomycetes* [146], caracterizada por un micelio generalmente cenocítico (sin tabiques transversales), reproducción sexual por fusión de gametangios y esporas aflageladas e inmóviles.

La clasificación filogenética de los hongos ha sufrido importantes reordenaciones en los últimos años debido al aumento de las secuencias disponibles. Los grupos basales del reino de los hongos, *Zygomycota* y *Chytridiomycota*, establecidos principalmente en base a características morfológicas y considerados durante muchos años como polifiléticos, están siendo reestructurados mediante análisis filogenéticos de mayor resolución. En la clasificación propuesta por Hibbett et al. (2007) [129], integrada solo por grupos con respaldo monofilético, el phylum *Chytridiomycota* se ha reducido, separándose algunos de sus grupos en nuevos phyla. Por otra parte, el phylum *Zygomycota* desaparece provisionalmente, en espera de un mayor consenso en la clasificación interna, y sus integrantes se han distribuido entre *Glomeromycota* y otros subphyla sin phylum parental asignado (*incertae sedis*). Entre estos últimos se encuentra *Mucormycotina*, al que pertenece *Mucor* [129, 336].

Dentro del subphylum *Mucormycotina*, *M. circinelloides* se incluye en el orden *Mucorales*, con esporas vegetativas que se desarrollan de forma endógena en esporangios, y en la familia *Mucoraceae*, por aparecer el esporangio separado del resto del esporangióforo mediante un septo (columela). El género *Mucor*, que da nombre a la familia y al orden, presenta esporangios globosos y esporangióforos ramificados en forma de racimos o cimas.

1.1.2. Ciclos de vida

Las especies del género *Mucor* son heterotálicas, con dos tipos sexuales, '+' y '-', morfológicamente idénticos a excepción del tamaño de las esporas asexuales, que en el

tipo ‘-’ son de mayor tamaño que en el tipo ‘+’ [179]. Este hongo presenta dos ciclos de vida (Figura 1.1):

- Ciclo asexual o vegetativo: caracterizado por la formación de esporas vegetativas, uninucleadas o multinucleadas, que maduran en el esporangio, situado en el extremo del esporangióforo. Al germinar, las esporas se hinchan produciendo uno o más tubos germinativos. Las hifas crecen por el ápice, ramificándose para formar un micelio generalmente cenocítico, o dando lugar a esporangióforos [107].
- Ciclo sexual: puede iniciarse si crecen en proximidad dos micelios de diferente tipo sexual. En este caso, se inhibe la formación de las estructuras reproductoras asexuales (esporangióforos), y se inducen las sexuales (cigóforos), acumulándose además β -caroteno. Los cigóforos se fusionan por pares, generalmente por el ápice, y generan progametangios, con septos que los separan del resto de la hifa sexual [107]. En la cigospora se produce la fusión de los núcleos de distinto tipo sexual (cariogamia), degenerando la mayor parte de los núcleos englobados. De los cuatro productos meióticos posibles, solo uno sobrevive. Tras un período de latencia, variable según la especie, la cigospora germina dando lugar a un germosporangio que contiene los productos de la meiosis (germosporas). Lamentablemente, en el caso de *M. circinelloides* no se ha conseguido germinar cigosporas en ningún laboratorio, incluyendo el nuestro.

1.1.3. Dimorfismo

A diferencia de otros *Zygomycotina*, *M. circinelloides* puede crecer como hongo filamentoso y también como levadura, formando células esféricas y multipolares [199,235]. En la mayoría de hongos con dimorfismo, la fase de levadura suele ser unicelular y uninucleada, mientras que la filamentosa es multinucleada. Sin embargo, en el caso de *M. circinelloides*, ambas fases son multinucleadas [338]. La capacidad de generar mucormicosis, una enfermedad que afecta a la piel y al sistema respiratorio en humanos inmunodeprimidos y que presenta altas tasas de mortalidad, parece depender de la forma del hongo (levadura o hifa), siendo normalmente la hifa la morfología asociada con la enfermedad [143, 255, 257]. El estudio del dimorfismo en hongos tiene, por lo tanto, interés clínico, estando relacionado con el desarrollo de tratamientos quimioterapéuticos efectivos.

La transición morfológica de levadura a hifa depende de las condiciones ambientales, entre ellas, la composición del medio, la temperatura y la presencia de oxígeno [17, 175, 208]. Normalmente, la ausencia de oxígeno y la disponibilidad de hexosas fermentables favorecen la forma de levadura, y el crecimiento aeróbico y la limitación de nutrientes la filamentosa. La transición levadura-hifa depende también del nivel de actividad de la

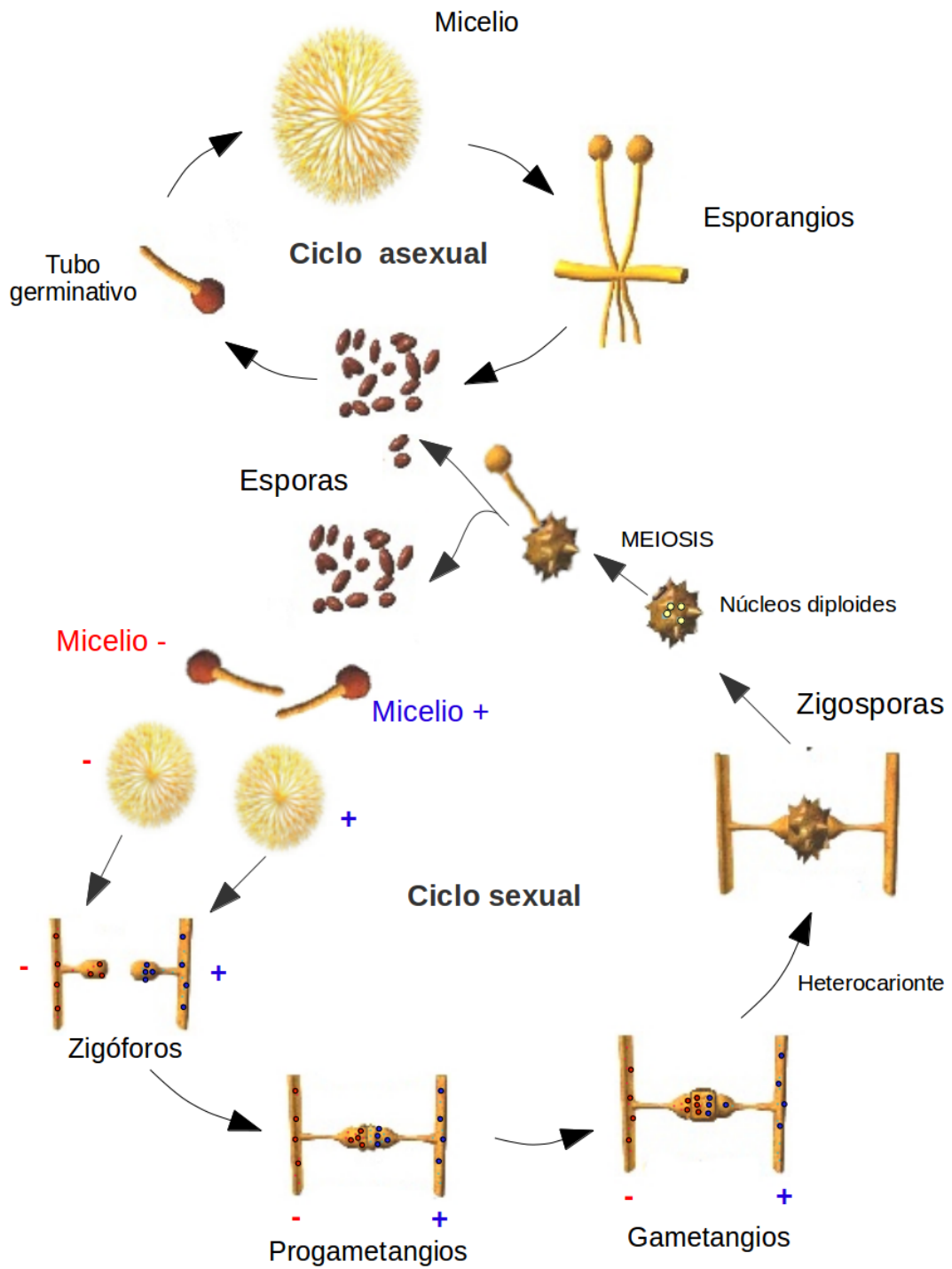


Figura 1.1. Ciclo de vida de *Mucor circinelloides*

proteína PKA, que regula tanto el momento de emergencia del tubo germinal, como el tamaño de la célula [232,233]. De hecho, la concentración de cAMP correlaciona con el estado levadura/filamento, siendo aproximadamente tres veces superior en levaduras que en células filamentosas [338].

1.1.4. *M. circinelloides* como modelo de estudio

Los hongos forman uno de los principales reinos del árbol de la vida, el más cercano a los animales dentro de los eucariotas [302]. Existen múltiples razones para utilizarlos como modelos de estudio, especialmente en la transducción de señales ambientales, ya que poseen rutas de señalización relativamente simples comparadas con organismos como plantas y animales. Además, estas vías se encuentran conservadas evolutivamente y son, en muchos casos y salvando las distancias, equivalentes a las presentes en eucariotas superiores multicitulares. A diferencia de los animales, los hongos tienen pocos tipos celulares especializados, lo que reduce la complejidad de los modelos a describir.

Su análisis es particularmente importante cuando se trata de hongos patógenos, tanto aquellos que infectan al ser humano como los que causan daños en otros animales y plantas. Aunque pueden ocasionar problemas si proliferan incontroladamente, también son fuente de soluciones. En la naturaleza, los hongos tienen un papel central en los ciclos de reciclaje de nutrientes. Por otro lado, se usan cada vez más en la industria biotecnológica, como fuente de alimentos, compuestos farmacéuticos, cosméticos, en el reciclaje y también en la generación de energía [13, 136].

M. circinelloides es un buen modelo para el estudio de procesos tan distintos como la síntesis de metabolitos secundarios, las respuestas a la luz [228, 270, 294], el silenciamiento génico [42, 74, 77, 180, 225–227], la síntesis de lípidos [253, 259, 298, 341], producción de biodiésel [327,328] y el dimorfismo [17, 143,232,233,338]. *M. circinelloides* posee un genoma pequeño, de 36,6 Mb, con cerca de 12.000 genes (*M. circinelloides* CBS277.49 [148]), es de fácil manejo y tiene un crecimiento rápido en el laboratorio. Pero quizás su principal ventaja es que posee un buen sistema de transformación genética, lo que permite introducir DNA exógeno [320,321]. La técnica de transformación ha sido mejorada recientemente mediante el uso de la electroporación, para facilitar la introducción del DNA en los protoplastos, lo que ha supuesto una mejora en la frecuencia de aparición de transformantes y, sobre todo, en la reproducibilidad del sistema [115]. Se han desarrollado además vectores autorreplicativos, capaces de complementar mutaciones auxotróficas presentes en distintas estirpes de *M. circinelloides* [4, 22, 264]. También se han diseñado procedimientos para la integración, por recombinación homóloga, de fragmentos lineales de DNA, permitiendo la generación de mutantes nulos por reemplazamiento génico o la integración de un gen en un punto concreto del genoma [115,218,231].

En este sentido, recientemente se ha conseguido integrar de forma dirigida (en un locus específico) genes modificados y controlados por el promotor fuerte *zrt1*, consiguiéndose una sobreexpresión constitutiva del gen de interés [259]. Finalmente, la existencia de mecanismos de silenciamiento en *M. circinelloides* [227] permite el estudio de la función génica sin necesidad de generar mutantes nulos [224].

Por todo ello, a pesar de la imposibilidad actual de realizar cruzamientos, *M. circinelloides* es el cigomiceto con el mayor repertorio de recursos moleculares para el análisis de la función génica. Todas estas herramientas y, sobre todo, su posible utilización para la producción de biocarburantes [327,328], influyó en la aprobación, por parte del *Joint Genome Institute* (JGI), del proyecto de secuenciación de *M. circinelloides* liderado por nuestro grupo de investigación. La disponibilidad de la secuencia genómica ha acelerado las investigaciones en este organismo, simplificando procedimientos experimentales y permitiendo la realización de análisis genómicos, transcriptómicos y proteómicos.

1.2. La luz como fuente de información ambiental

La luz es una de las principales señales ambientales para los seres vivos. La reproducción sexual y asexual, el desarrollo vegetativo, el reloj circadiano y la producción de pigmentos son procesos esenciales y dependientes de la luz en hongos (Tabla 1.1) [13]. De entre todas las longitudes de onda, la luz azul controla la mayoría de procesos identificados en hongos [50,190]. Las respuestas a distintas longitudes de onda en hongos se describen con más detalle en el apartado 1.3 de esta memoria.

La señal luminosa proporciona información vital sobre el ambiente que rodea al organismo. La capacidad de percibir la luz apareció tempranamente en la historia evolutiva, probablemente como parte de un mecanismo de protección frente a la radiación UV. Sin embargo, la gran variedad de proteínas fotorreceptoras existente en procariotas y arqueas apunta hacia una diversificación de funciones ya en esos reinos [162].

La luz permitiría a un cigomiceto como *M. circinelloides* ‘detectar’ si se encuentra en el interior de un animal [136], o si está creciendo en una superficie óptima para la dispersión de las esporas, pudiendo dirigir las hacia zonas con mayores probabilidades de supervivencia [69,247]. Además, las principales transiciones en los ciclos de vida de los hongos están, en mayor o menor medida, reguladas por la luz, como es el caso de la germinación y la dispersión de esporas, la extensión y ramificación de las hifas o la formación de las estructuras reproductoras [68]. La capacidad de percibir cambios en la iluminación se habría seleccionado por las mejoras en la supervivencia, en la capacidad

Tabla 1.1. Ejemplos de respuestas a la luz en hongos

Especie	phyla	Respuestas	Referencia
<i>Allomyces reticulatus</i>	<i>Chytridiomycota</i>	Fototaxis de las zoosporas	Saranak y Foster, 1997
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	<i>Zygomycota, Mucormycotina</i>	Fototropismo de los esporangióforos, inhibición de los microesporangióforos y del desarrollo sexual, inducción de macroesporangióforos y síntesis de carotenos.	Cerdá-Olmedo, 2001
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Basidiomycota, Agaricomycotina</i>	Inhibición del apareamiento y de la fructificación haploide	Idnurm y Heitman, 2005
<i>Schizophyllum commune</i>	<i>Basidiomycota, Agaricomycotina</i>	Formación de cuerpos fructíferos	Yli-Mattila, 1985
<i>Coprinus cinereus</i>	<i>Basidiomycota, Agaricomycotina</i>	Formación de cuerpos fructíferos	Terashima <i>et al.</i> 2005
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Ascomycota, Pezizomycotina</i>	Inducción de la conidiación por luz azul y roja. Represión del desarrollo sexual por luz roja.	Mooney y Yager 1990; Blumenstein <i>et al.</i> 2005
<i>Neurospora crassa</i>	<i>Ascomycota, Pezizomycotina</i>	Formación de esporas asexuales y de los cuerpos fructíferos, síntesis de carotenos, inducción del crecimiento micelial y sincronización del ritmo circadiano	Liu <i>et al.</i> 2003
<i>Trichoderma atroviride</i>	<i>Ascomycota, Pezizomycotina</i>	Inducción de la conidiación	Casas-Flores <i>et al.</i> 2004
<i>Mucor circinelloides</i>	<i>Zygomycota, Mucormycotina</i>	Fototropismo de los esporangióforos por luz azul y verde, fotocarotenogénesis por luz azul e inducción de la esporulación	Este trabajo; Nicolas <i>et al.</i> 2008

de dispersión y/o en el éxito reproductivo. Por todo ello, a pesar de no realizar fotosíntesis, organismos sésiles como los hongos también dependen en gran medida de la luz para su crecimiento y supervivencia.

Pero no todo son ventajas. Como fuente de energía que es, la radiación lumínica también tiene su lado ‘oscuro’, siendo el espectro UV muy perjudicial para los organismos. Tanto las radiaciones UVB (280-315nm) como las UVA (315-400nm) pueden ocasionar daños en las proteínas, en los lípidos y en el DNA. El tercer tipo de radiación UV, la UVC (200-280nm), de alta energía y muy nociva, es filtrada por el ozono y el O₂ de la atmósfera, lo que impide su llegada a la superficie [292].

La defensa contra la luz UV es especialmente importante para organismos sésiles, ya que no pueden desplazarse hacia zonas con menor exposición solar. Los mecanismos de prevención y reparación aparecen pronto en el repertorio evolutivo, y los hongos no son una excepción a la regla [32, 127]. En el ascomiceto *Trichoderma harzianum* se ha estudiado el gen de la fotoliasa Phr1, una enzima que utiliza la energía de la luz para reparar dímeros de pirimidina tipo ciclobutano (CPD) en el DNA. El gen *phr1* pertenece al grupo de inducción temprana por luz, expresándose a los pocos minutos de la iluminación. En el modelo propuesto, la luz azul actuaría como señal de aviso frente a daño inminente por UV, sintetizándose Phr1 que quedaría disponible para la célula en caso de lesiones [26, 27].

Por otro lado, existe una gran cantidad de metabolitos secundarios capaces de absorber en el espectro UV. Algunos de ellos se postulan como agentes protectores contra el UV, aunque esta función no se haya comprobado en muchos de los casos. Ejemplos de compuestos de defensa contra el UV son las melaninas (típicas de animales y también de hongos), los fenilpropanoides y flavonoides (plantas), las escitoneminas (cianobacterias) y las micosporinas (hongos y organismos marinos) [102, 103, 292]. En microorganismos, considerando el tamaño de la célula, suele ser necesaria una gran cantidad de pigmento para conceder protección, lo que supone un alto coste energético [103]. No es de extrañar, por tanto, que su producción esté regulada por luz, sintetizándose solo cuando son necesarios.

Otros compuestos secundarios no absorben mayoritariamente en el ultravioleta, pero confieren resistencia a la luz UV igualmente. Los carotenos, por ejemplo, se cree que actúan de forma indirecta, ya que son muy eficientes neutralizando compuestos fotosensibilizados [94, 163, 210]. En *Neurospora crassa* y en las levaduras *Sporobolomyces ruberrimus*, *Cystofilobasidium capitatum* y *Rhodotorula mucilaginosa*, las estirpes sin carotenos son más sensibles a la radiación UVB, por lo que estos compuestos sí parecen tener función protectora en hongos [207, 210, 211]. *M. circinelloides* y *P. blakesleeanus* también producen β -carotenos en respuesta a la luz (ver Apartado 1.5).

1.3. Fotorreceptores

Aunque existe una gran variedad de procesos regulados por la luz en la biosfera, los tipos de cromóforos que intervienen en las reacciones fotoquímicas son relativamente limitados. El retinal, los tetrapirroles y las flavinas forman los tres grupos principales de cromóforos conocidos hasta ahora. Estos compuestos se asocian a apoproteínas para formar los fotorreceptores [127].

Las proteínas fotosensoras estudiadas hasta el momento pueden dividirse en seis familias: rodopsinas, fitocromos, proteínas PYP (xantopsinas), criptocromos, proteínas con dominio LOV (tipo LOV) y proteínas BLUF (Figura 1.2). Las tres últimas clases unen cromóforos de tipo flavina [319] y una de ellas, la tipo LOV, regula la mayoría de respuestas a la luz en hongos [247]. Muy recientemente se ha descrito una nueva familia de proteínas fotorreceptoras que regulan la expresión génica explotando la capacidad de la vitamina B12 para responder a la luz, revelando así una nueva faceta funcional de esta vitamina como cromóforo [236].

El modo general de acción de los fotorreceptores se basa en cambios en la estructura del cromóforo tras la recepción de la luz. Estas modificaciones afectarían a los residuos de la zona de contacto de la apoproteína, provocando otros cambios conformacionales y modulando las interacciones con componentes aguas abajo de la cascada de transducción, o liberando inhibiciones en los dominios de señalización [343]. La recepción del estímulo luminoso por el fotorreceptor genera un fotociclo, o secuencia de cambios estructurales, pasando de un estado inactivo a activo y retornando a la forma en reposo después de un periodo de tiempo variable según el fotorreceptor.

Dependiendo del rango de luz que detectan, los fotorreceptores pueden dividirse en tres grupos: sensores de luz azul, de luz roja y de luz verde.

1.3.1. Luz azul: criptocromos y dominios LOV

Los sensores de luz azul de eucariotas contienen flavinas como cromóforos, bien FMN o FAD (flavin mononucleótido y dinucleótido, respectivamente). Existen dos tipos principales, los criptocromos y las proteínas con dominios LOV [56].

Fotorreceptores tipo LOV

En eucariotas, actualmente se distinguen cuatro grupos de fotorreceptores basados en dominios LOV: fototropinas de plantas, tipo ZTL/ADO de plantas, Wc-1/Vvd de hongos y los aureocromos de Stramenopiles fotosintéticos [162]. A continuación se describen las características básicas de cada uno de estos fotorreceptores, mientras que las características del dominio LOV se describen en el Apartado 1.4.5.

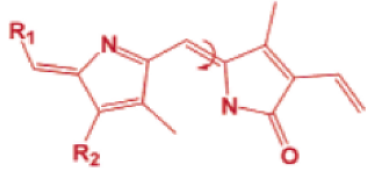
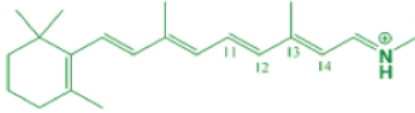
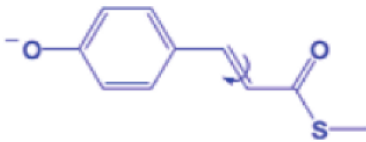
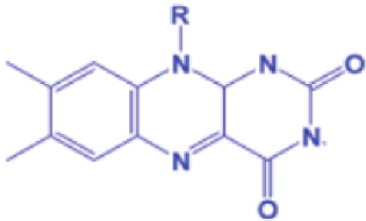
Cromóforo	Elemento fotosensible	Tipo de fotorreceptor
Tetrapirroles		Fitocromo
Retinal		Rhodopsina
Ácido 4-hidroxicinámico		PYP
Flavina		Criptocromo LOV BLUF

Figura 1.2. Principales fotorreceptores y cromóforos.

Se indican los 6 grupos de fotorreceptores mejor estudiados, el tipo de cromóforo que utilizan y un ejemplo del elemento clave en la recepción de luz. Basado en van der Horst y Hellingwerf, 2004 [319].

- Fototropinas de plantas:

Son quinasas reguladas directamente por luz que median el fototropismo, el movimiento de cloroplastos y la apertura de estomas y hojas. Contienen dominios LOV ligeramente distintos de los de hongos, asociados a dominios quinasa de serina y treonina en el extremo C-terminal [36, 62]. Unen FMN como cromóforo.

- Proteínas LOV implicadas en los ritmos circadianos:

Este grupo engloba a las familias ZTL/ADO y Wc-1/Vvd. El dominio LOV de estas proteínas contiene una inserción de 9-11 residuos con respecto a las fototropinas, necesaria para la unión de FAD como cromóforo, de mayor tamaño que el FMN [73, 344] (véase el Apartado 1.4.5).

Wc-1 es el fotorreceptor más importante en hongos, ya que, además de controlar el

reloj biológico, regula directamente la mayoría de las respuestas a la luz descritas en estos organismos. Estos fotorreceptores forman complejos, denominados WCC (*White-Collar Complex*), con los factores los transcripcionales Wc-2. Ascomicetos, basidiomicetos, cigomicetos y quitridios utilizan estos complejos para la recepción de la luz, lo que sugiere su presencia en un antecesor común a estos cuatro grupos de hongos [68]. En *N. crassa*, estos complejos, junto a la proteína FRQ, forman parte del oscilador central del reloj circadiano [57], mientras que Vvd, la otra proteína de hongos con dominio LOV, es responsable de la fotoadaptación (véase el Apartado 1.4).

Sin embargo, a pesar de compartir el complejo *White-collar*, cada clase de hongos contiene diferentes conjuntos de fotorreceptores en sus genomas. Por un lado, ascomicetos y basidiomicetos presentan una única copia del gen *wc-1*, acompañada de un completo repertorio de posibles fotorreceptores, mientras que los cigomicetos presentan tres genes *wc-1*, varias copias de *wc-2* y solo una copia de un gen *cry-DASH* (Figura 1.3) [69, 139].

- La familia ZTL/ADO:

Caracterizada en *Arabidopsis*, es una familia típica de plantas. Está compuesta por las proteínas ZTL/ADO (Zeitlupe o Adagio), FKF1 (Proteína de unión a flavina, con repeticiones kelch y F-box1), y LKP2 (Lov Kelch Protein 2). Estas tres proteínas unen FAD como cromóforo y contienen un dominio LOV, un dominio F-box, típico de ligasas E3, y 6 repeticiones de tipo kelch implicadas en interacciones proteína-proteína. Las tres actúan regulando los niveles de proteínas asociadas con la regulación del reloj circadiano y con la floración dependiente de estación [16, 56, 60, 286].

- Aureocromos:

Identificados en Stramenopiles (o Heterokontos) fotosintéticos, donde son necesarios para la fotomorfogénesis. Están compuestos por un dominio LOV y un dominio bZIP, funcionando como factores transcripcionales regulados por luz azul [306].

Criptocromos

Son proteínas similares en secuencia a las fotoliasas pero sin capacidad de reparación del DNA. Pueden percibir luz azul y UVA. Según su origen filogenético, suelen dividirse en 3 grupos: los de animales, los de plantas y las proteínas CRY-DASH [183, 343].

Los criptocromos de animales y plantas regulan la puesta en hora del reloj circadiano. Además, en plantas regulan la fotomorfogénesis mediada por luz azul y UVA, y en animales ejercen funciones independientes de la luz al formar parte del oscilador central

	White collar 1	White collar 2	Vivid	Cryptochrome	Opsin	Opsin-related protein	Phytochrome	
<i>Neurospora crassa</i>	1	1	1	1	1	1	2	
<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>Microsporum 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	
<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				
<i>Rhizopus oryzae</i>	3	5		1				
<i>Mucor circinelloides</i>	3	4		1				
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>								
<i>Batrachomyces dendrobatidis</i>								
<i>Spizelomyces punctatus</i>	2	2					1	

Figura 1.3. Genes de fotorreceptores en el reino de los hongos.

Resumen de genes similares a fotorreceptores presentes en los diferentes grupos de hongos. Los términos *Zygomycetes* y *Chytrids* no representan clases monofiléticas. No se consideran los criptocromos de clase CPD-fotoliasa, ni las opsinas tipo II. El gen *wc-2* se incluye por formar parte del complejo WC. Tomada de Idnurm *et al.* 2010 [139].

del reloj circadiano, bien como integrantes del bucle de retroalimentación negativo en mamíferos o inhibiéndolo como ocurre en insectos [47, 183].

Los criptocromos presentes en hongos son de tipo CRY-DASH. En *N. crassa*, la proteína CRY une FAD y MTHF (5,10-Metilenetetrahidrofolato) como cromóforos, conservando también los residuos necesarios para la interacción con dímeros de pirimidina tipo ciclobutano (CPDs) [95]. Existen proteínas de este tipo en ascomicetos, basidiomicetos y cigomicetos, aunque todavía no se les ha asignado ninguna función fotosensora clara en estos organismos [139]. En *N. crassa* el gen *cry* está regulado por la luz de forma dependiente de *wc-1*, siguiendo igualmente oscilaciones circadianas en oscuridad. Sin embargo, el único fenotipo observado en el mutante nulo es un ligero desfase en el ritmo circadiano [95]. De hecho, comparando el transcriptoma del mutante *cry* Δ respecto al silvestre no se detectan diferencias tras la inducción por luz [95]. Sin embargo, el análisis de los patrones de expresión del gen *con-10*, implicado en conidiación, sugiere un papel de CRY como modulador del complejo WC [234]. En *Sclerotinia sclerotiorum*, otro ascomiceto, el gen *cry1* se induce solo tras iluminación con luz UVA y los mutantes *cry1* Δ exhiben ligeras variaciones en morfología únicamente tras tratamientos con luz UVA, desarrollándose de forma normal en otras condiciones de laboratorio [326].

Aunque formalmente los criptocromos de tipo CRY-DASH se caracterizan por la ausencia de la actividad fotoliasa, recientemente se ha demostrado que las proteínas CRY-DASH de *Vibrio cholerae* poseen capacidad fotoliasa sobre DNA de cadena sencilla, sin embargo su función biológica se desconoce [290]. Esta capacidad de reparación del DNA no se ha descrito en los criptocromos de hongos.

Además de en eucariotas, en bacterias se han descrito otros receptores de luz azul, como los de tipo PYP (xantopsinas) y varias familias de proteínas con dominios LOV (LOV-HK, LOV-STAS, etc.) [73, 101, 162, 343]. Por ejemplo, la proteína PYP (Photoactive Yellow Protein) de *Halorhodospira halophila*, que fue el primer fotorreceptor de luz azul que se identificó, utiliza un dominio PAS (Per/Arnt/Sim) distinto a los LOV para unir el cromóforo 4-hidroxicinámico (Figura 1.2) [31, 157, 343]. Funciones conocidas de las proteínas LOV de bacterias son la regulación de la virulencia, de la adhesión celular o de respuestas al estrés [83, 126, 135, 304] y aunque en la mayoría de los casos no se les haya asignado roles, se ha sugerido que puedan actuar como fotorreceptores para fototaxis y/o como moduladores de la maquinaria de reparación del DNA o de los sistemas fotosintéticos [73].

1.3.2. Luz roja: fitocromos

Las plantas utilizan fitocromos para detectar las variaciones en luz roja, controlando procesos como la germinación de semillas o el fotoperiodo. El fitocromo une el cromóforo (un tetrapirrol) en el módulo fotosensor N-terminal, mientras que en el otro extremo (C-terminal) posee un módulo regulador, normalmente constituido por una combinación de dominios HKRDs (*Histidine Kinase Related Domains*) y PAS, por donde interacciona con otros componentes de la ruta de señalización [319]. Los fitocromos de hongos y bacterias conservan esta estructura básica, aunque los componentes del módulo regulador son distintos: un dominio HKD (*Histidine Kinase Domain*) y un dominio RR o 'Regulador de la Respuesta' [247].

Los fitocromos de hongos también median respuestas a la luz roja, siendo *A. nidulans* uno de los ejemplos mejor estudiados, donde la luz roja decide entre el desarrollo de estructuras reproductoras asexuales o sexuales [209]. Se han identificado fitocromos en otros ascomicetos y basidiomicetos, pero en la mayoría de los casos su función es desconocida. Aunque en *N. crassa* no se conocen respuestas a la luz roja, y mutantes nulos en los genes para fitocromos *phyl* y *phy2* no presentan ningún fenotipo visible [97], se ha propuesto un papel represor del fitocromo PHY-2 sobre el complejo WC [234].

1.3.3. Luz verde: rodopsinas

Las rodopsinas son proteínas compuestas por 7 dominios transmembranales cuyo cromóforo es el retinal. Se encuentran en animales, donde actúan como fotosensores en la retina, pero también en muchos otros organismos, incluyendo eubacterias, hongos, algas y arqueas. Además de como fotorreceptores, pueden funcionar como bombas de iones (H^+ y Cl^-), canales de iones y fotoisomerasas [159].

Las rodopsinas se clasifican en dos grupos según la configuración que adopta el retinal. Las de animales pertenecen al tipo II, mientras que las de la mayoría de hongos y microorganismos son de tipo I. Ambas comparten una estructura común pero la similitud a nivel de secuencia es mínima, de hecho, son ejemplos habituales de evolución convergente [13,291]. Su origen filogenético en hongos no está claro ya que se había propuesto su transferencia horizontal desde arqueas pero, recientemente, se han identificado en algunos quitridios, apuntando hacia una transferencia vertical [139].

Un ejemplo de rodopsina en hongos es la proteína NOP-1 de *N. crassa*, que absorbe luz verde y realiza un fotociclo de tipo lento, lo que la descarta como bomba de iones y apunta más bien hacia un papel en señalización [39]. Aunque el mutante en el gen *nop-1* no presenta ningún fenotipo evidente tiene alterados los patrones de expresión de genes inducidos durante la conidiación, como *al-2* (carotenogénesis), *con-10* y *con-13*

(conidiación) [28,29]. Por ello, se ha sugerido un rol auxiliar para *nop-1* en la fase tardía de la conidiación y se ha propuesto que actúe modulando al complejo WC a través de un represor [234].

El ascomiceto *Fusarium fujikuroi* contiene 3 genes parecidos a opsinas en su genoma: *opsA*, *carO* y *hspO*. El gen *hspO* es similar a chaperonas de choque térmico de *Saccharomyces cerevisiae* y de otros hongos, por lo que no se cree que actúe como fotorreceptor. El gen *opsA* se ha propuesto como ortólogo de *nop-1*, y *carO* parece ser característico de *Fusarium*, localizándose en el cluster de los genes carotenogénicos. Mutantes en el gen *opsA* presentan patrones de expresión alterados en los genes carotenogénicos *carB* y *carRA*, pero la producción de carotenos es normal y ninguno de los dos mutantes, *opsA*Δ o *carO*Δ, presenta otros fenotipos visibles [89,244].

Otras opsinas de hongos estudiadas son el gen *ops* de *Leptosphaeria macularis*, que parece funcionar como bomba de protones [303,330], y el gen *ops1* de *Cryptococcus neoformans*, cuyos mutantes tampoco presentan fenotipo visible [136].

En resumen, a pesar de la prevalencia de fotorreceptores que unen flavina, los hongos también poseen cromóforos de otros tipos (Figura 1.3). Por ejemplo, *N. crassa* presenta un gen para rodopsina (*nop-1*), dos para fitocromos (*phyl* y *phy2*) y varios para proteínas que unen flavinas (genes *phr1*, *cry*, *wc-1* y *vvd*) [32]. Sin embargo, la mayoría de respuestas a la luz conocidas de *N. crassa*, exceptuando el rol de Vvd en la fotoadaptación, dependen de Wc-1 [190]. Como hemos visto, otros fotorreceptores podrían ser moduladores del complejo WC en ascomicetos, aunque los mecanismos moleculares concretos se desconozcan.

Por otro lado, los genomas de los cigomicetos secuenciados hasta el momento, como *P. blakesleeanus* o *M. circinelloides*, no contienen fitocromos ni opsinas. Aparte de las tres proteínas Wc-1, el único gen identificado similar a un fotorreceptor es de tipo CRY-DASH y su función aún no se conoce [139].

1.4. Los genes *white-collar*

1.4.1. Los genes *white-collar* de *Neurospora crassa*

En *N. crassa*, *wc-1* y *wc-2* son elementos centrales de la ruta de transducción de la luz, siendo los mutantes *wc-1*Δ y *wc-2*Δ ciegos para la carotenogénesis, la regulación del ritmo circadiano, la conidiación, el desarrollo de las estructuras sexuales y el fototropismo [78,119,184]. Las proteínas Wc-1 y Wc-2 son factores transcripcionales que se asocian formando el complejo White-collar (WCC). Tras la iluminación, se unen al DNA en los elementos de respuesta a la luz (LREs) y regulan positivamente la mayoría

de comportamientos dependientes de la luz azul [54, 96, 190]. El complejo WC también es necesario en la oscuridad, tanto para el funcionamiento del reloj circadiano como para su sincronización por la luz [58].

La arquitectura de las proteínas Wc-1 y Wc-2 se muestra en la Figura 1.4. Ambas contienen dominios de tipo PAS, tres en Wc-1 (LOV, PAS-B y PAS-C), y uno en Wc-2. Este último y el dominio PAS-C de Wc-1 están relacionados con la formación del WCC [14, 15, 57, 58, 96, 122, 185]. El dominio PAS-B de Wc-1 es esencial para su función, tanto en la luz como en la oscuridad, pero no se conoce su papel concreto [58]. Además, poseen un dominio dedo de zinc tipo GATA, de unión a DNA, en el extremo C-terminal [15, 185].

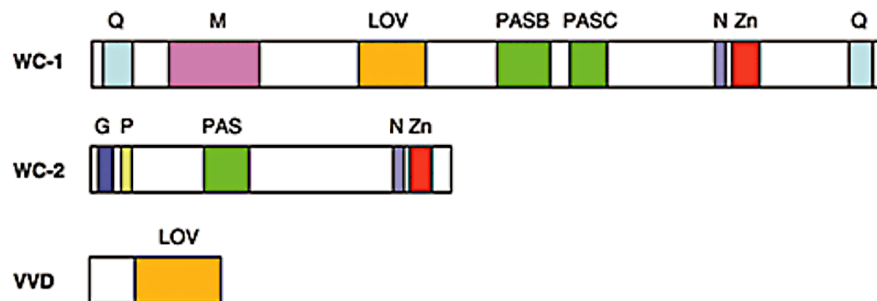


Figura 1.4. Esquema de las proteínas Wc y Vvd de *N. crassa*.

Véase el Apartado 1.4.1 para una explicación de los diferentes dominios. Tomado de Brunner y Káldi, 2008 [40]

El dominio PAS cercano al extremo N-terminal de Wc-1 es un dominio LOV que une FAD como cromóforo y actúa como receptor de la luz azul [96, 122] (véase Apartado 1.4.5, más adelante).

Además, la proteína Wc-1 posee dos regiones ricas en glutaminas (Q) en sus extremos C- y N-terminal. Estas regiones forman parte del dominio de activación de algunos factores transcripcionales (FTs), siendo necesarias para una respuesta completa del FT. Normalmente no tienen una estructura 3D definida, pero pueden interactuar con regiones ricas en glutamina de otras proteínas, lo que suele aumentar el nivel de activación del FT [10, 70, 87, 316]. La proteína Wc-2 contiene una región rica en prolina (P) y otra ácida, descritas también en otros FTs [316]. Asimismo, se han identificado señales de localización nuclear (N) en ambas proteínas, aguas abajo del último dominio PAS (Figura 1.4) [15, 185].

Tanto el dominio dedo de zinc tipo GATA como la señal de localización nuclear de Wc-1 son necesarias para el funcionamiento del reloj circadiano en la oscuridad. Sin embargo, estas regiones no intervienen en la regulación transcripcional por la luz [58]. Por su parte, el dominio dedo de zinc tipo GATA de Wc-2 sí es necesario para la inducción de los genes regulados por luz y también para la regulación en oscuridad de *frq* (*frequency*, regulador principal del reloj circadiano), pero no para su inducción por luz [57, 65, 185].

La proteína Wc-2 es más abundante que Wc-1 y su expresión no oscila de forma circadiana, estando regulada por Wc-1 de forma independiente de la luz [58]. Por otro lado, la expresión de *wc-1* está regulada por luz y por el gen *frq*. Además, la proteína Wc-1 necesita unirse con Wc-2 para mantener sus niveles en la célula [57, 79], habiéndose observado dos complejos con distinta composición, denominados L-WCC (*Light-WCC*) y D-WCC (*Dark-WCC*). El de menor tamaño, D-WCC, es un heterodímero de Wc-1 y Wc-2 que contiene la mayor parte de la proteína Wc-1 presente en la célula. Este complejo se asocia con la activación de *frq* y otros genes en la oscuridad [58, 79, 122]. El complejo L-WC es de mayor tamaño y se cree que está constituido por una copia de Wc-2 y varias de Wc-1. Regula las respuestas a la luz y se asocia a los LREs de *frq* de forma dependiente de la luz [58, 96, 123].

1.4.2. Genes regulados por la luz y el complejo WC

La recepción de la luz por el cromóforo de Wc-1 provoca cambios conformacionales en la proteína e induce la formación del complejo L-WC. Éste se unirá de forma transitoria a secuencias ELRE (elementos de regulación temprana por luz), controlando la expresión de los genes de respuesta temprana a la luz [35, 55, 96, 122]. El fotociclo del complejo WC, el tiempo que tarda la proteína Wc-1 en volver a la conformación no excitada tras la activación por la luz, es de tipo lento y su vida media se estima en varias horas (véase el Apartado 1.4.5) [123].

Análisis globales de expresión, utilizando microarrays, han demostrado que al menos el 5,6 % de los genes de *N. crassa* están regulados directa o indirectamente por la luz (314 de los 5.588 genes analizados mediante *clustering*; 152 genes considerando un incremento en la expresión del 2.2x y un FDR (*false discovery rate*) del 10 %), principalmente a través del complejo WC. Se distinguen dos grupos de genes, los de respuesta temprana (ELRGs, 45 % de los genes regulados, pico de inducción entre 15 y 45 minutos tras la iluminación) y los de respuesta tardía (LLRGs, 55 %, máxima expresión entre 45 y 90 minutos). En cada grupo se observan elementos reguladores característicos: los ya mencionados ELRE en los genes de respuesta temprana y los LLRE en los genes de respuesta tardía [55].

En la Figura 1.5 se muestra la clasificación de los genes identificados según su función biológica. En los ELRGs se detecta enriquecimiento en genes de síntesis de pigmentos fotoprotectores (7,1 % de los ELRGs), procesamiento y reparación del DNA (6,3 %), señalización celular (5,5 %) y síntesis de vitaminas, cofactores y grupos prostéticos (4,7 %). Entre los LLRGs hay enriquecimiento en genes implicados en metabolismo de carbohidratos (20 %), detoxificación de ROS y otros radicales (2,5 %) y oxidación de ácidos grasos (1,9 %).

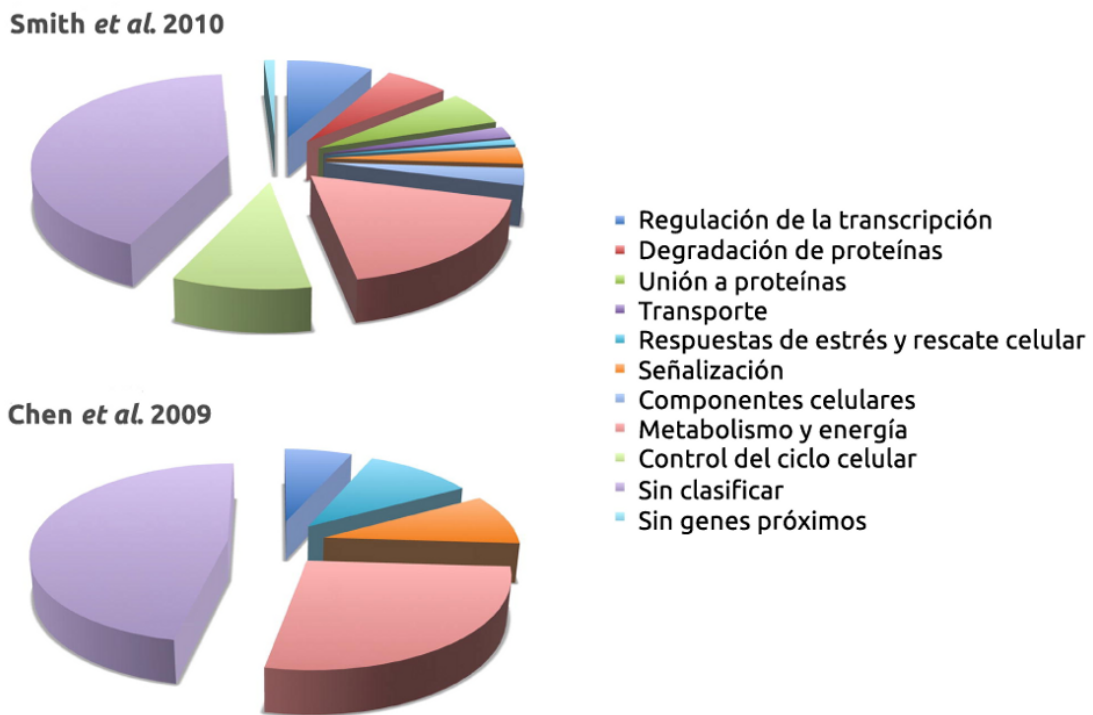


Figura 1.5. Resumen de genes regulados por luz en *N. crassa*. Tomado de Schafmeier y Diernfellner, 2011 [281].

Según datos recientes de *ChIPSeq*, tras la iluminación, el complejo WC se une a más de 400 sitios diana en el genoma, de ellos, más de 200 están cerca de uno o varios genes y aproximadamente el 15 % se localiza entre genes que se transcriben de forma divergente [295]. En la Figura 1.5 se resumen las funciones biológicas más representadas en los genes identificados (Smith *et al.* 2010).

Entre los ELRGs se encuentran bastantes factores transcripcionales (FTs). El complejo WC controla directamente la expresión de 26 genes de FTs, lo que supone dirigir un entramado transcripcional que regula aproximadamente el 20 % de todos los genes de *N.*

crassa. Entre ellos, 9 FTs están implicados en fases del desarrollo dependientes de la luz y 6 son reguladores del metabolismo o de respuestas a estrés. Los otros 11 hipotéticos FTs no tienen funciones conocidas, aunque contienen dominios de unión a DNA [295].

Según los datos de Chen et al. 2009 [55], otros reguladores importantes son Vvd, que modula mayoritariamente respuestas tardías a la luz, y el factor transcripcional Sub-1, inducido por luz y esencial para la expresión de muchos de los genes de respuesta tardía. También se aprecia una respuesta residual a la luz en mutantes *wc-1Δ*, lo que sugiere la existencia de mecanismos de respuesta basados en otros fotorreceptores de *N. crassa* [55].

1.4.3. La regulación del ritmo circadiano

Los ritmos circadianos permiten una mejor adaptación al medio, siguiendo las transiciones día-noche del planeta. Están dirigidos por los denominados relojes circadianos, que son sistemas oscilatorios que modulan la expresión rítmica de un grupo de genes en ciclos de 24 horas. Estos sistemas operan de forma autónoma, pudiendo ser sincronizados por señales ambientales como la luz o la temperatura. En eucariotas, los sistemas oscilatorios producen ritmos de actividad diarios en un complejo de factores transcripcionales circadianos, mediante mecanismos de control transcripcional, post-transcripcional, traduccional y post-traduccional. Según el modelo actualmente aceptado, este complejo de factores transcripcionales controla directa o indirectamente la expresión de un gran número de genes, generando así el potencial necesario para modular los procesos fisiológicos de una forma circadiana [21, 40, 84].

El reloj de *N. crassa* es de los sistemas mejor caracterizados a nivel molecular. Sus elementos principales son las proteínas Wc-1, Wc-2, Frq y Vivid. Su funcionamiento depende de bucles de retroalimentación entre WCC y la proteína Frq, manteniéndose de forma autónoma en ausencia de luz (Figura 1.6).

Al inicio de la noche, D-WCC se encuentra hipofosforilado, siendo capaz de inducir la transcripción de *frq* y la acumulación de proteína Frq, que se irá fosforilando lentamente [281, 288]. Al mediodía, la expresión del gen *frq* alcanza un pico mientras que los niveles de la proteína Frq son máximos unas 4-5 horas después. Su forma hiperfosforilada es ubiquitilada y degradada por el proteosoma por lo que, sin síntesis *de novo*, los niveles de Frq van a disminuir [121, 191].

Frq actúa como regulador negativo del reloj, reduciendo su propia transcripción al inducir la inactivación del complejo WC mediante fosforilación independiente de la luz [40, 84, 124, 282, 317]. Tras la hiperfosforilación de WCC, Wc-2 se disocia del promotor de *frq* y la cromatina se compacta de manera dependiente de Csw-1 (una proteína

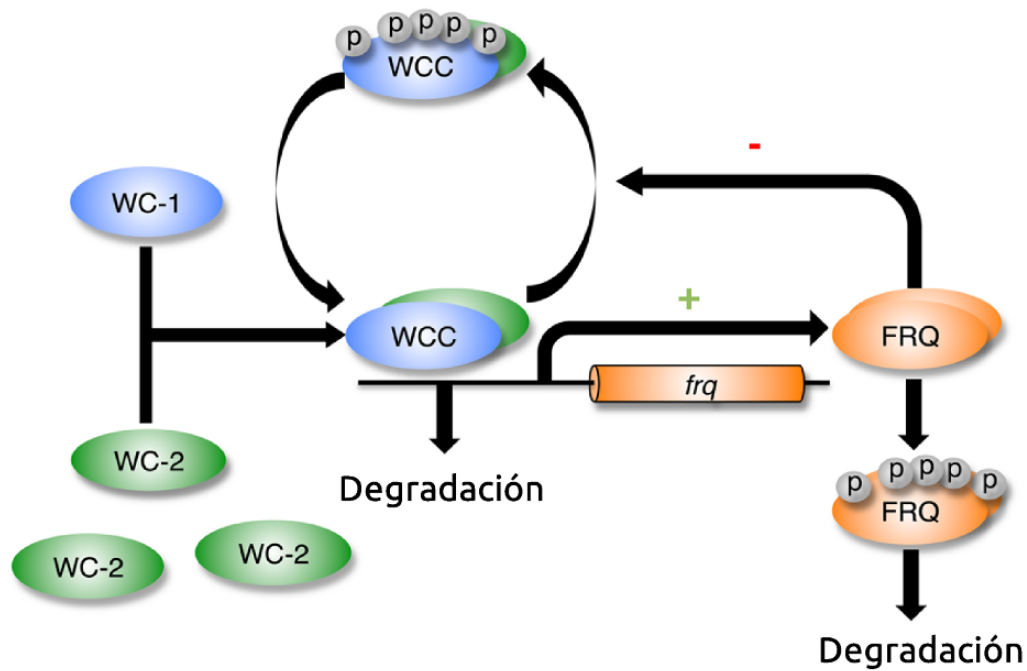


Figura 1.6. Esquema simplificado del reloj circadiano en *N. crassa*.
Tomado de Tseng *et al.* 2012 [317].

implicada en la heterocromatinización) [20]. Esta forma fosforilada, aunque inactiva, es más estable y permite la acumulación de WCC a lo largo del día [282]. Sin embargo, es necesaria una acción sostenida de Frq para mantener el estado fosforilado de WCC, ya que el complejo es continuamente desfosforilado de forma dependiente de la proteína PP2A [282]. A medida que Frq desaparece aumenta la forma hipofosforilada de WCC, activándose de nuevo la transcripción de *frq* y cerrándose el bucle.

1.4.4. Vivid

Vivid (o Vvd) es una proteína de pequeño tamaño, constituida por un dominio LOV y una extensión N-terminal de 70 aminoácidos (Ncap) que está implicada en la dimerización de Vvd [342, 344]. Vvd puede dimerizar de forma inestable y dependiente de la luz, consigo misma y con el complejo WC [53, 134, 342].

En *N. crassa* esta proteína es necesaria para la fotoadaptación y para la sincronización del reloj circadiano, especialmente en las transiciones del amanecer y del atardecer [86, 125, 134, 288]. La cantidad de Vvd disponible al inicio de la noche correlaciona con la intensidad de la luz recibida a lo largo del día. Durante la noche (o en la oscuridad), Vvd se degrada gradualmente [201].

La expresión del gen *vvd* está bajo el control del reloj circadiano pero, tras la iluminación, también es inducida por WCC de forma rápida y transitoria [125,288]. Después de la activación de la transcripción por luz, la proteína Vvd recién sintetizada parece actuar como represor del complejo WC, compitiendo en la formación de heterodímeros WCC-Vvd y también regulando su fosforilación de forma dependiente de Frh (una helicasa compañera de Frq) [134,201,282]. Además de su papel en los ritmos circadianos, Vvd regula respuestas tardías a la luz [55] y reduce la sensibilidad del reloj circadiano a los cambios de temperatura [133].

El estudio de esta proteína es importante para la comprensión del mecanismo molecular que conecta la percepción de un fotón de luz con una respuesta fisiológica [344].

1.4.5. El dominio LOV

El dominio LOV pertenece a la familia PAS (PER-ARNT-SIM), de funciones muy diversas, mayormente asociadas con la transducción de señales [309]. Concretamente, los dominios PAS/LOV están especializados en la recepción de luz. Fueron inicialmente identificados en fototropinas de plantas, denominándose LOV por su parecido a dominios sensores de luz, oxígeno y voltaje presentes en otros eucariotas y procariotas [61]. El uso del término 'LOV' se reserva para los dominios PAS fotosensibles que unen flavina como cromóforo (FAD o FMN) [73]. Se encuentran en proteínas fotosensoras de bacterias, plantas, microalgas y hongos [162], asociados a múltiples dominios efectores, como quinasas, fosfodiesterasas, dominios F-box, STAS (*Sulphate Transporter and AntiSigma factor antagonist*) y dedos de zinc [73]. En un estudio reciente, se identificaron dominios LOV en el 3,5 % de los genomas de bacterias secuenciados (115 especies/3.254 genomas secuenciados) [162].

La estructura característica de los dominios LOV consiste en una hoja- β , formada por 5 láminas- β en orden 2-1-5-4-3, con hélices- α intercaladas y *caps* en los extremos N- y/o C-terminales (Figura 1.7) [71,194]. Esta estructura, así como los 11 residuos clave para la interacción con el cromóforo, se encuentran conservados en los dominios LOV de plantas y hongos [56].

Las fototropinas unen FMN como cromóforo, mientras que las proteínas Wc-1 unen FAD. De hecho, en los dominios LOV de tipo Wc-1 y ZLT/ADO existe una inserción de 9-11 residuos entre las hélices E α y F α que permite acomodar al FAD, de mayor tamaño que el FMN.

Tanto en eucariotas como en procariotas la construcción de nuevos diseños por reordenamiento genético de dominios permite una mejor adaptación a ambientes complejos,

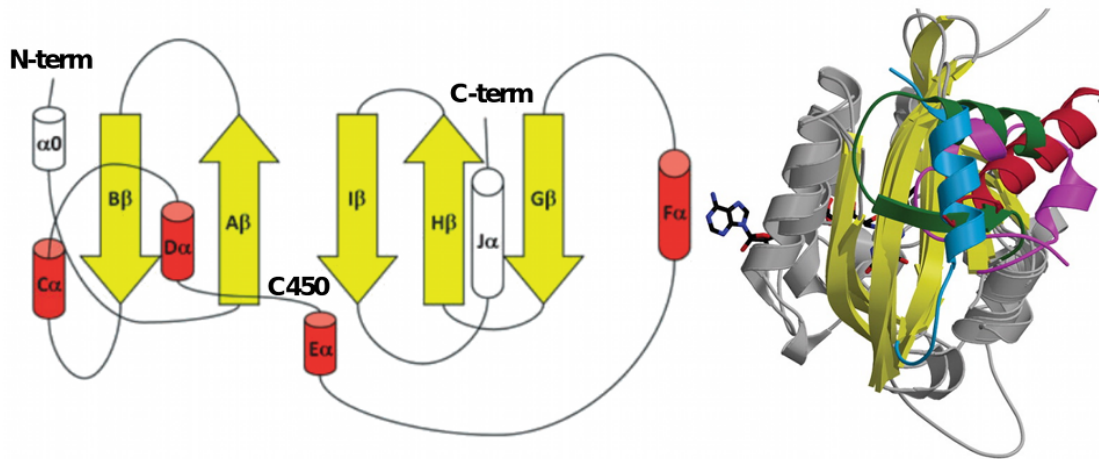


Figura 1.7. Topología del dominio LOV.

Izquierda: Esquema de la estructura secundaria de un dominio LOV. Las flechas representan láminas- β , los cilindros hélices- α . Los tamaños no están a escala. Los caps N- y C-terminales se indican en blanco (α_0 también se denomina $a\alpha$).

Derecha: Superposición de dominios PAS. Todos comparten el armazón- β (amarillo), las hélices intercaladas (gris) y la hélice variable (de Vvd en verde, del dominio LOV2 de la fototropina 1 de *A. sativa* en azul, de PYP en magenta y de la proteína PER de *Drosophila* en rojo).

Tomadas de Losi y Gärtner, 2011 y Zoltowski *et al.* 2007 [194, 344].

siendo muy típica de proteínas implicadas en la transducción de señales [181]. Siguiendo los mismos principios, los dominios LOV se acoplan a diferentes dominios efectores. Por ejemplo, en fototropinas aparece un dominio Ser/Thr quinasa aguas abajo de dos dominios LOV, mientras que las proteínas Wc-1 poseen dominios PAS (interacción con proteínas) y Zn-Finger (unión a DNA).

Fotociclo del dominio LOV

A pesar de conocerse la estructura de dominios LOV de fototropinas, bacterias y hongos, se sabe relativamente poco de los mecanismos de transducción de la señal [72, 120, 128, 344]. En estudios realizados con el dominio LOV2 de la fototropina 1 de *Avena sativa* (residuos 404 a 560, que contienen los elementos centrales del dominio LOV y la extensión C-terminal de 40 aminoácidos), se ha observado que, tras la recepción de la luz, se forma un enlace covalente entre el carbono C4a del cromóforo y el grupo tiol de la cisteína del motivo conservado GXNCRFLQG [61, 273]. La formación del aducto C4a-Cys provoca un cambio conformacional, desencadenando la pérdida de un 30 % de la estructura de hélice- α en la región N-terminal del dominio LOV. De esta forma, la hélice $J\alpha$, que está empaquetada en un armazón de cadenas β en la oscuridad, termina desplegándose fuera del dominio LOV. Se cree que este cambio conformacional provoca la activación del dominio efector en las fototropinas, al retirarse la inhibición estérica del

dominio LOV2 sobre el sitio de activación de la quinasa [67, 120, 243].

La dinámica es parecida en el dominio LOV1 de fototropinas, sin embargo su fotociclo es mucho más lento y no se conoce ni su función ni su modo de señalización, habiéndose propuesto como sitio para la dimerización del propio fotorreceptor o para la unión con proteínas de anclaje [62, 274].

En Vvd el aducto cisteína-flavina induce cambios conformacionales similares, pero en este caso, en una estructura en forma de tapa del extremo N-terminal (*Ncap*). Esta región se encuentra asociada en oscuridad al armazón de cadenas- β , de forma similar a lo que ocurre con la hélice $J\alpha$ en el dominio phot1-LOV2 de *Avena sativa*, y, tras recibir la luz, se despliega alejándose del resto de la proteína (Figura 1.8). Este fotociclo es de tipo lento (~ 3 horas) [344].

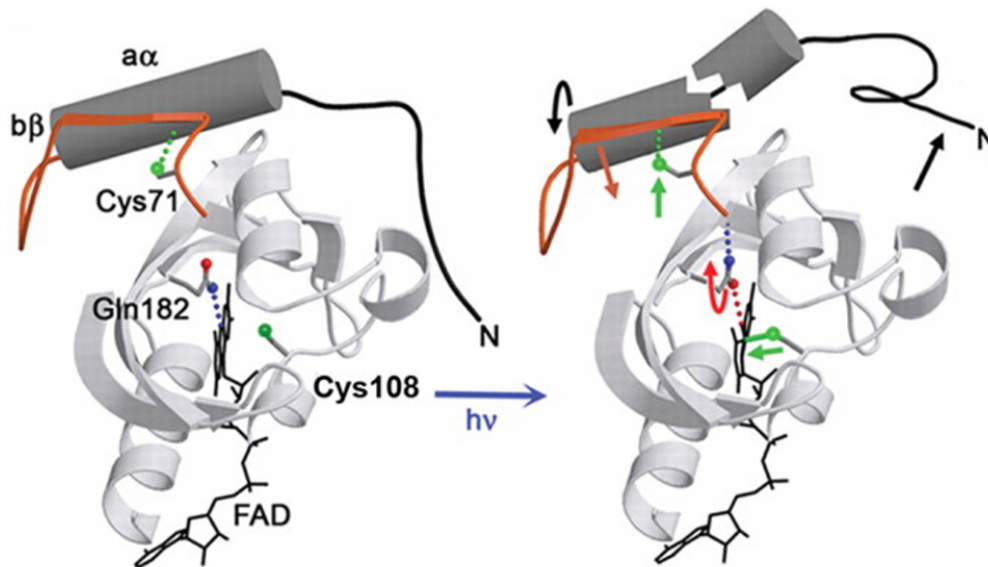


Figura 1.8. Modelo de los cambios inducidos por la luz en la estructura de Vvd. Tomadas de Zoltowski *et al.* 2007 [344].

Además de la cisteína que forma el aducto con el cromóforo, se han identificado otros residuos importantes en diversas proteínas LOV. Uno de ellos es una glutamina conservada en la lámina $I\beta$ (Q575 en el dominio LOV2 de la fototropina 1 de *A. thaliana*, Q182 en Vvd). Este residuo forma puentes de hidrógeno con el cromóforo a través del nitrógeno 5 (N5) de la flavina. Tras la formación del aducto, el N5 se protona y la glutamina gira para mantener el enlace, afectando a la región bisagra que conecta la zona central

del dominio LOV con el *Ncap* (en Vvd) y la hélice J α (en el dominio LOV2 de la fototropina 1) [72, 344]. Esta glutamina es importante para la propia reacción fotoquímica, pero también en la transducción de la señal, afectando a la capacidad de dimerización dependiente de luz [150, 194, 217, 344]. Otra cisteína cercana al cromóforo (Cys71 en Vvd), es esencial para los cambios conformacionales que llevan al despliegue del *Ncap*, se cree que afectando a las uniones por puentes de oxígeno entre éste y el centro del dominio LOV [242, 344].

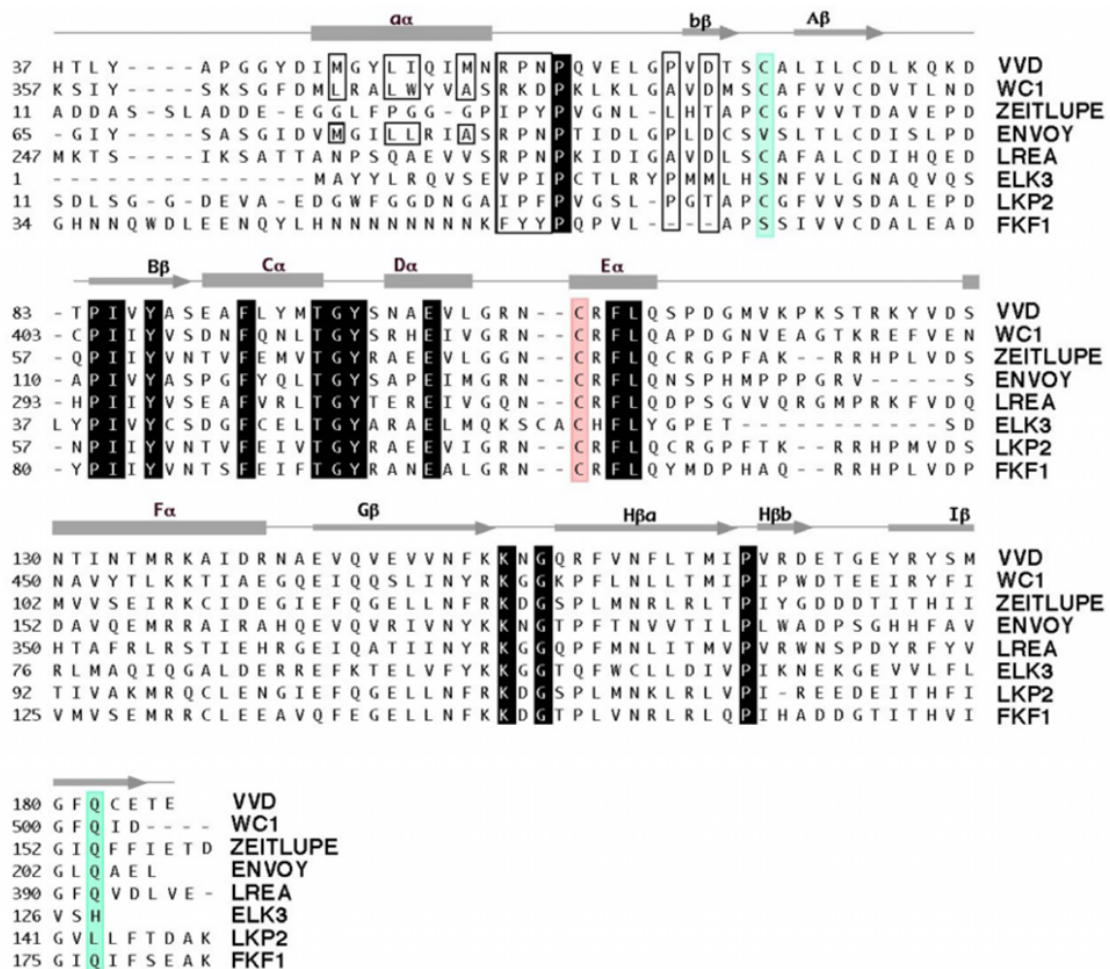


Figura 1.9. Alineamiento de dominios LOV tipo Wc-1/ZTL.

Dominios LOV de Wc-1, ZEITLUPE (*A. thaliana*); ENVOY (*Hypocrea jecorina*), LREA (*Aspergillus fumigatus*), ELK3 (*Danio rerio*, no fotosensible), LKP2 (*A. thaliana*, proteína F-Box) y FKF1 (*Mesembryanthemum crystallinum*). Se muestra la estructura secundaria correspondiente, los residuos totalmente conservados (negro), la cisteína que forma el aducto con el FAD (rojo), y otros dos residuos importantes para el despliegue del *Ncap* en Vvd (verde, Gln182 y Cys71 en Vvd). Residuos recuadrados en el *Ncap* indican conservación dentro del lazo $\alpha\beta$ y presencia en la cara hidrofóbica de la hélice $\alpha\alpha$. Tomado de Zoltowski *et al.* 2007. [344].

Como hemos visto, la cinética y la estructura del dominio LOV están relativamente conservadas entre phot1-LOV2 y Vvd [67, 120, 243, 344]. Teniendo en cuenta que los dominios LOV de Vvd y Wc-1 son mucho más parecidos (Figura 1.9), es de suponer que su cinética también sea muy similar. En el caso de Vvd, al estar constituida únicamente por el dominio LOV y sin dominios efectores acoplados, el cambio de conformación afectaría a su relación con otras proteínas, regulando la unión o desencadenando cambios conformacionales en las proteínas con las que interacciona. De hecho, la tendencia de Vvd a dimerizar a través de la hoja- β del dominio LOV es mayor tras la iluminación con luz [172, 342, 344].

Respecto a la vuelta al estado de reposo, recientemente se ha comprobado que la duración del fotociclo depende, entre otros factores, del estado protonado del N5 del anillo de la flavina. Además de con el pH, el estado protonado del N5 probablemente varíe con el grado de accesibilidad al solvente, ya que mutaciones en varios residuos, afectando a lo se propone como un canal para el solvente, modifican la vida media del aducto. En Vvd, cambios en dos aminoácidos en particular, Ile85 y Ile74, reducen en cuatro órdenes de magnitud la duración del aducto excitado [345].

1.4.6. Genes *wc-1* en otros hongos

Aparte de en *N. crassa*, se han identificado genes homólogos a *wc-1* y *wc-2* en otros hongos, donde también tienen funciones centrales en la regulación de las respuestas a la luz [68, 69, 192].

Los ascomicetos poseen una o ninguna copia de *wc-1* [136]. En *Trichoderma atroviride* los genes *wc* regulan el crecimiento y son esenciales para la inducción por la luz de la conidiación y del gen *phr1* (fotoliasa) [45]. Mutantes en estos genes presentan fenotipos que los implican también en procesos no regulados por luz, como la inducción de la conidiación por falta de glucosa [46]. En *Fusarium oxysporum* Wc-1 participa en el desarrollo de hifas aéreas, la patogenicidad en mamíferos, la carotenogénesis inducida por luz y la fotorreactivación dependiente de la luz UV [269]; mientras que en *Fusarium fujikuroi*, WcoA (homólogo de Wc-1) está implicada en la regulación del metabolismo secundario y de la conidiación [88].

En basidiomicetos se han estudiado en *Cryptococcus neoformans*, donde son necesarios para la represión del apareamiento dependiente de la luz, influyen en la virulencia y participan en la resistencia a la luz UV [136, 198]; y también en *Coprinus cinereus*, donde los genes *wc* están implicados en el desarrollo de los cuerpos fructíferos inducido por luz [311].

Los basidiomicetos, al igual que los ascomicetos, tienen una copia de los genes *wc-1* y *wc-2*. La proteína Wc-1 de basidiomicetos es similar a la de *N. crassa* pero no presenta el dominio zinc-finger C-terminal, por lo que la unión a los promotores de los genes regulados por luz podría depender exclusivamente del dominio dedo de zinc de Wc-2. De hecho, el dominio dedo de zinc de Wc-1 de *N. crassa* no es necesario para la regulación de las respuestas a la luz [57, 58, 65, 185]. Además, en *Cryptococcus neoformans* el gen *wc-1* no está regulado por la luz, aunque *wc-2* sí lo está [136, 198].

Por su parte, todos los cigomicetos secuenciados hasta el momento poseen tres genes *wc-1* y un número variable de copias de *wc-2*. En *P. blakesleeanus* hay tres genes *wc-1* (*madA*, *wcoA* y *wcoB*) y cuatro homólogos de *wc-2* (*wctA* o *madB* y *wctB-D*), siendo *madA* y *madB* necesarios para el fototropismo, la carotenogénesis y otras respuestas a la luz [50, 138, 279]. Respecto a su regulación, los genes *wcoA* y *wcoB* se inducen por la luz y requieren la presencia de MadA y MadB, mientras que la expresión de *madA* y *madB* presenta una ligera represión [136, 279]. Adicionalmente, mediante estudios de doble híbrido de levadura se ha detectado interacción entre MadA y MadB, aunque no entre ninguna de las otras proteínas Wc-1 o Wc-2 (WcoA, WcoB, WctB, WctC y WctD) [279].

Otros cigomicetos con *wc-1* en sus genomas son *Pilobolus crystallinus* (*pcmada1*, *pcmada2* y *pcmada3*) [164] y *Rhizopus oryzae* (RO3G_16338, RO3G_09997 y RO3G_14273, que en adelante se denominarán *rowc-1a*, *rowc-1b* y *rowc-1c*). Los genes homólogos en *M. circinelloides*, *mcwc-1a*, *mcwc-1b* y *mcwc-1c*, se identificaron, clonaron y caracterizaron en este trabajo [293, 294].

En este grupo de hongos, las proteínas Wc-1 son de menor tamaño que la de *N. crassa* pero conservan una arquitectura de dominios similar, pudiéndose separar en 3 grupos comparando sus secuencias (Figura 1.10). Todas ellas poseen un dominio LOV y dos dominios PAS adicionales (PAS-B y PAS-C). Sin embargo, el dominio zinc-finger de unión a DNA está presente en los grupos 1 y 3, pero no en el 2 (*wcoB*, *pcmada2*, *mcwc-1b* y *rowc-1b*) [69]. Las proteínas de cada grupo son más parecidas a sus ortólogos en las otras especies que a sus parálogos intraespecíficos, lo que apunta a que la triplicación tuvo lugar antes de la divergencia del último ancestro común a los cigomicetos [279]. Los grupos 1 y 3 están más próximos filogenéticamente y en *Phycomyces* comparten un gen MAPK aguas arriba, sugiriendo dos eventos de duplicación, el primero que originó el gen *wcoB* y el segundo que desdobló la otra copia en los grupos 1 y 3 [279].

1.5. Fotocarotenogénesis en hongos

Los carotenoides constituyen uno de los grupos de pigmentos más extendidos en la naturaleza. Se encuentran en la mayoría de los organismos fotosintéticos y dan su color

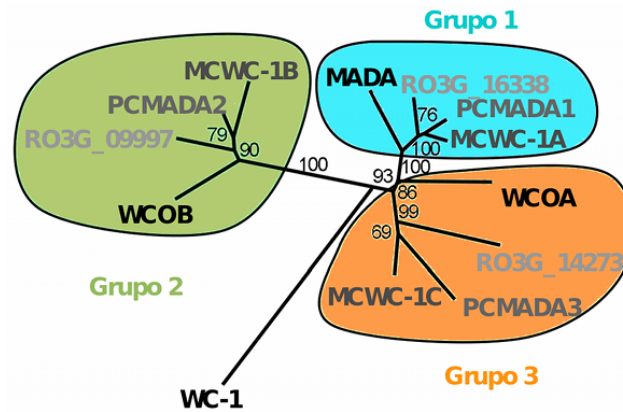


Figura 1.10. Proteínas Wc-1 en *Zygomycota*.

Los homólogos de Wc-1 en *Zygomycota* pueden separarse en 3 grupos según sus relaciones filogenéticas. Ramas proporcionales al número de sustituciones por sitio. En los nodos se indican los valores de bootstrap (%) para 100 replicas. Tomada de Corrochano y Garre, 2010 [69].

característico a muchas bacterias y hongos. Los animales no los pueden sintetizar pero asimilan y utilizan los que ingieren. Son tetraterpenoides, compuestos orgánicos poliinsaturados que contienen 8 unidades de isopreno. La mayoría posee un esqueleto de 40 carbonos con entre 3 y 15 dobles enlaces. Actualmente se conocen las estructuras de unos 600 tipos de carotenoides, que son sintetizados mediante diversas deshidrogenaciones, ciclaciones y oxigenaciones. Los dos grupos principales, xantofilas y carotenos, se diferencian por la presencia (xantofilas) o ausencia (carotenos) de radicales oxigenados [8, 52, 108, 299, 300].

1.5.1. Funciones de los carotenos

En organismos fotosintéticos, se encuentran asociados a proteínas de membrana, formando parte de los complejos antena junto a clorofilas y bacterioclorofilas [38, 169]. Absorben luz entre 400 y 500 nm, transfiriendo su energía a la clorofila y, posteriormente, a los centros de reacción. En organismos no fotosintéticos protegen contra los efectos de la radiación UV, encontrándose en la membrana celular y unidos a proteínas, cristales o fibrillas en el citoplasma [37, 80, 108].

A pesar de que los carotenos absorben mayoritariamente entre 400 y 500 nm se les atribuye un papel protector frente a la radiación UV, de menor longitud de onda (100-400 nm). Aunque no se descartan mecanismos adicionales, se cree que actúan protegiendo contra especies reactivas de oxígeno (ROS), ya que son muy eficientes neutralizando singletes de oxígeno (1O_2), uno de los principales ROS producidos por la luz UV [82, 94, 163, 210, 299, 300].

En mamíferos, los derivados de carotenos tienen funciones esenciales en nutrición (vitamina A), visión (retinol) y desarrollo (ácido retinóico), contribuyendo también a la pigmentación en aves, peces, insectos y crustáceos. En plantas, además de formar parte de los complejos antena, participan en señalización (ácido abscísico) [37]. Por otro lado, en la industria los carotenos se usan en fármacos, como colorantes alimenticios, como suplementos en piensos de animales y como antioxidantes [52, 108].

1.5.2. Regulación de la síntesis de carotenoides

Los pasos de la biosíntesis de carotenoides se resumen en la Figura 1.11. El fitoeno es el primer caroteno de la ruta, absorbiendo luz en el espectro ultravioleta [108]. En hongos y en la mayoría de las eubacterias, una única enzima, la deshidrogenasa de fitoeno, cataliza las cuatro deshidrogenaciones necesarias para convertir el fitoeno en licopeno. El aumento en el número de dobles enlaces, resultado de las deshidrogenaciones, desplaza el espectro de absorción hacia mayores longitudes de onda, dando lugar a coloraciones amarillentas, anaranjadas o rojizas. Las reacciones posteriores (deshidrogenaciones, ciclaciones, metilaciones, glicosilaciones, etc.) producen la amplia variedad de carotenoides que existe en la naturaleza.

La síntesis de carotenoides en hongos está regulada por factores exógenos y endógenos. La interacción sexual entre estirpes de sexo opuesto, la acumulación de producto final, las condiciones de iluminación y la exposición a diversos agentes químicos influyen en la acumulación de carotenoides [48, 145]. Mientras que en algunos organismos la luz es necesaria para que se active la ruta de síntesis, en otros se producen también en la oscuridad [33, 276]. En cigomicetos, la carotenogénesis es activada por luz azul y tanto *P. blakesleeanus* como *M. circinelloides* acumulan β -caroteno tras la iluminación [51, 270].

La regulación de la síntesis de carotenos por la luz en los hongos se ha estudiado principalmente en *N. crassa*, *Fusarium sp.*, *P. blakesleeanus* y *M. circinelloides*. En ellos se han aislado mutantes en cada uno de los pasos de la síntesis de carotenoides, así como en algunos genes reguladores, habiéndose clonado los genes correspondientes [9, 48, 88, 119, 187, 221, 223, 223, 260, 261, 267, 284, 285, 323–325].

N. crassa Los genes estructurales carotenogénicos *al-1*, *al-2* y *al-3* se encuentran entre el 5,6 % de los genes que están regulados por luz [54, 190, 223]. Mutantes en estos loci presentan micelios de color blanco (albinos), en contraste con el color anaranjado de los silvestres. El gen *al-1* cifra la deshidrogenasa de fitoeno [284], el gen *al-2* la enzima bifuncional sintetasa de fitoeno y ciclasa de 3-4 dihidrolicopeno [9, 285], y *al-3* corresponde a la geranilgeranil pirofosfato sintetasa [44, 223, 277]. Los tres están regulados por la luz y pertenecen al grupo de genes de respuesta temprana: su expresión es muy baja en oscuridad y aumenta rápidamente tras la iluminación (luz azul), alcanzándose el pico

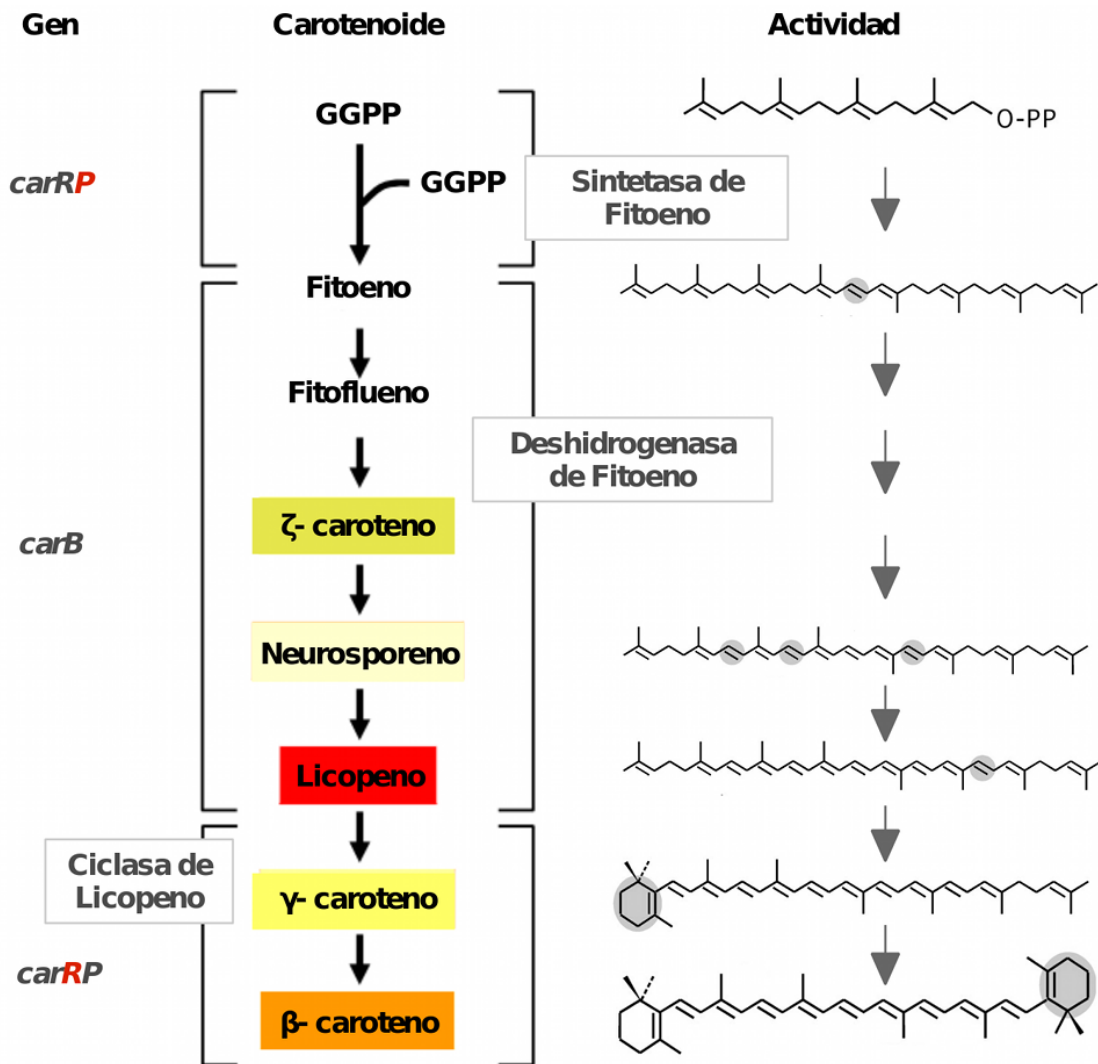


Figura 1.11. Ruta de síntesis de carotenoides en *M. circinelloides*

En pasos previos, el isopentenilpirofosfato (IPP, C5), derivado del ácido mevalónico, y su isómero, el dimetilpirofosfato (DMPP, C5), se condensan para dar lugar al geranilpirofosfato (GPP, C10). La adición consecutiva de otras dos moléculas de IPP produce farnesilpirofosfato (FPP, C15) y, finalmente, geranilgeranilpirofosfato (GGPP, C20). La unión de dos moléculas de GGPP, catalizada por la enzima CarRP, es la primera reacción específica de la ruta de síntesis de carotenos y origina un intermediario inestable, el prefitoeno pirofosfato (PPPP, C40), que se transforma en fitoeno [108]. Las reacciones posteriores, en las que intervienen CarRP y CarB, van a dar lugar al β-caroteno, acumulado por *M. circinelloides* en su micelio. Los cambios en cada paso se señalan en gris sobre la estructura del compuesto.

La enzima bifuncional CarRP tiene actividad sintetasa de fitoeno y ciclasa de licopeno. Estructuras basadas en Estrada y Avalos, 2009 [89]

de inducción en 20-30 minutos [184, 223]. La activación de la transcripción de los genes *al-1*, *al-2* y *al-3* por la luz depende de *wc-1* y *wc-2* [186, 223, 307]

P. blakesleeanus En este organismo se han identificado y clonado los genes equivalentes: *carB*, el gen de la enzima deshidrogenasa de fitoeno, y *carRA*, que codifica la enzima bifuncional responsable de las actividades ciclasa de licopeno y sintetasa de fitoeno. Los dos genes, *carB* y *carRA*, están estrechamente ligados y se transcriben de forma divergente a partir de una zona reguladora común. En esta región, de 1381 pb, es probable que se encuentren secuencias implicadas en la regulación por la luz, similares a las que existen en *N. crassa* [9, 43, 267, 278, 280].

Se han aislado mutantes en la carotenogénesis, afectados en la respuesta a la luz y en otras rutas, que han permitido localizar varios genes reguladores [34, 49, 145]. El modelo general propuesto se resume la Figura 1.12 [1].

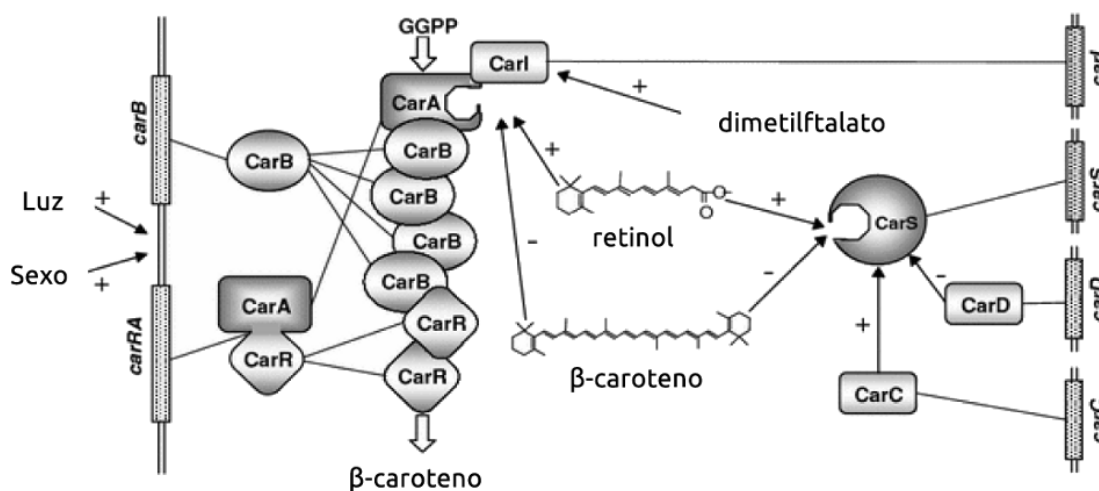


Figura 1.12. Regulación de la carotenogénesis en *P. blakesleeanus*

A la izquierda se representan los genes estructurales, en el centro el complejo enzimático propuesto, a la derecha los genes reguladores. Se indican las señales de estimulación e inhibición (+ o -). Tomado de Almeida y Cerdá-Olmedo, 2008 [1]

Además de los genes estructurales *carB* y *carRA*, se han identificado otros componentes de la ruta de síntesis de β -caroteno en *P. blakesleeanus*. Los genes *carS* y *carD* participan en la regulación por producto final [19, 272]. Sus mutantes acumulan mayor cantidad de carotenos, tanto en luz como oscuridad, aunque siguen respondiendo a la inducción por luz [48, 214, 237]. Por otro lado, los mutantes en el gen *carF* presentan el mismo fenotipo superamarillo, pero no responden a la iluminación con luz azul. CarF

no parece estar implicado en la regulación por producto final, y sus mutaciones ejercen un efecto sinérgico junto con las de *carS* [203]. Adicionalmente, la pérdida de función de los genes *carC*, *carI*, *picA*, *picB* y *pim-3* inhibe la síntesis de carotenos por la luz en mayor o menor grado [50]. De todos estos genes solo se ha caracterizado molecularmente *carS*, que cifra una oxigenasa que corta el β -caroteno produciendo apocarotenoides, algunos de los cuales deben ser capaces de inhibir la síntesis de carotenos (inhibición por producto final) [305].

A la lista anterior hay que añadir los mutantes en los genes *madA* y *madB*, los homólogos de *wc-1* y *wc-2*, que son deficientes en la inducción de la fotocarotenogénesis. *P. blakesleeanus* posee tres copias de genes *wc-1* (*madA*, *wcoA* y *wcoB*), pero todas las respuestas a la luz estudiadas por el momento dependen solo de *madA* [138, 279].

En la zona reguladora común de los genes *carB* y *carRA*, se ha observado la unión de un complejo en la oscuridad, denominado HMC, cuya formación depende, directa o indirectamente, de las proteínas CarB, CarRA y CarS. Se trataría de un complejo represor de la carotenogénesis dependiente de producto final, desvinculado de la luz, ya que las proteínas MadA y MadB, no son necesarias para su constitución [278].

M. circinelloides Se han clonado los genes estructurales: *carB*, que codifica la deshidrogenasa de fitoeno, y *carRP*, el gen de la enzima bifuncional. Ambos muestran alta homología con los ortólogos de *P. blakesleeanus*, siendo su organización genómica similar, aunque la región promotora común es de solo 446 pb en *M. circinelloides* [323, 324]. Esta disposición también se encuentra en el cigomiceto *Blakeslea tripora* [262], por lo que parece exclusiva de cigomicetos, ya que en otros hongos, como *N. crassa* o *Fusarium fujikuroi*, los genes homólogos se disponen en un mismo cromosoma pero, o son continuos (en la misma orientación) o están separados por otros genes [187].

En este organismo también se han aislado mutantes para la síntesis de carotenos [221, 228, 325] y además, en nuestro laboratorio se ha identificado el gen *crgA* (*carotenogenic regulatory gene*), un represor de la carotenogénesis cuyos mutantes sobreacumulan carotenos en luz y en oscuridad, pero que son capaces de responder a la luz igualmente [218, 220]. La proteína CrgA se describe en el apartado 1.7, y sus relaciones con las proteínas Wc-1 se analizan en este trabajo.

1.6. Fototropismo en hongos

Aunque la mayoría de estudios moleculares sobre el fototropismo se ha realizado en plantas, los estudios en hongos también han contribuido al conocimiento de las bases fisiológicas y moleculares de esta respuesta a la luz. En este sentido, los esporangióforos del cigomiceto *P. blakesleeanus*, que consisten en una sola célula cilíndrica que puede

llegar a alcanzar hasta 10 cm de longitud, se han utilizado como modelo de fototropismo desde los años 30 debido a su gran tamaño [23]. Además de responder a la luz, los esporangióforos también reaccionan a otras señales, como la gravedad, el contacto y la presencia de objetos cercanos [50].

En este hongo, la respuesta fototrópica se aprecia en tan solo 5 minutos, abarcando intensidades de luz desde 10^{-9} a 10 W/m^2 [98]. La luz azul y el UV cercano producen fototropismo positivo (curvatura hacia la luz), mientras que el UV lejano provoca fototropismo negativo. Por otro lado, la luz roja por encima de 600 nm no genera ningún fototropismo, pero puede modular la respuesta a la luz azul [99].

Cuando los esporangióforos crecen en la oscuridad se aprecian dos fases, una temprana y otra tardía, con distintos periodos de latencia y cinéticas, que dependen de la intensidad de luz utilizada (alta o baja) [100]. Ambas respuestas se diferencian también en las longitudes de onda a las que son sensibles y en sus cinéticas de adaptación. Debido a estas y otras observaciones, se postuló la necesidad de, al menos, dos fotosistemas, uno sensible a bajas intensidades (por debajo de 10^{-6} W/m^2) y otro a altas (por encima de los 10^{-6} W/m^2) [100].

En los años sesenta se aislaron diez mutantes en *P. blakesleeanus* afectados en el fototropismo (*madA-madJ*) [24]. En base a las respuestas que presentaban estos mutantes se sugirió que los genes *madA*, *madB* y *madC* formaban parte de uno o varios complejos fotorreceptores primarios [50]. Los productos de los genes *madD-madJ* se cree que corresponden a proteínas implicadas en pasos aguas abajo de la cascada de transducción o a moduladores de los fotorreceptores [50]. Ninguno de los genes *mad* ha sido caracterizado molecularmente, a excepción de los ya mencionados genes *madA* y *madB*, que corresponden a un gen *wc-1* y a un gen *wc-2* respectivamente [138, 279].

El fototropismo en plantas, estudiado principalmente en tallos de plántulas y en raíces primarias de *Avena sativa* y *Arabidopsis thaliana*, está regulado por complejas interacciones entre varios fotosistemas distintos, con las fototropinas en los roles principales [241]. Sin embargo, a pesar de utilizar el mismo dominio sensor que Wc-1 (dominio LOV), las fototropinas poseen un dominio efector de tipo Ser/Thr quinasa, mientras que las proteínas Wc-1 presentan dominios zinc-finger. Debido a ello, es probable que los pasos aguas abajo en la cascada de transducción sean diferentes. Más aún, el tallo de las plantas es una estructura multicelular, mientras que el esporangióforo en *Phycomyces* está formado por una sola célula multinucleada [136]. Sin embargo, la complejidad de las respuestas observadas en el esporangióforo de *P. blakesleeanus* apoya la existencia de una regulación basada en interacciones entre varios fotorreceptores distintos, de manera similar a lo que se observa en plantas [50, 100].

Además de en *P. blakesleeanus*, también se ha estudiado el fototropismo en otro cigomiceto, *Pilobolus crystallinus*, en el que los esporangióforos presentan fototropismo positivo bajo luz azul [238] y negativo bajo luz UVB [166], modificándose el comportamiento tras la irradiación con luz azul [165]. En este caso la respuesta también es compleja y apoya la presencia de varios fotosistemas interrelacionados [165, 166].

1.7. El gen *crgA*

1.7.1. Características generales

El gen *crgA* actúa como regulador negativo de la fotocarotenogénesis en *M. circinelloides*. Es una proteína soluble con dos dominios RING-finger en el extremo N-terminal, el segundo de los cuales es de tipo canónico, con un perfil (CX₂CX₁₁CXHX₂CX₂CX₉CX₂C) [220]. El primer RING-finger no se ajusta a este motivo pero se identifica igualmente mediante HMMs (Hidden Markov Models, por ejemplo en SMART [178]). Aguas abajo de estos dominios se detectan dos regiones acídicas y un dominio LON interrumpido por tres regiones ricas en prolinas y glutaminas, típicas en reguladores transcripcionales [220]. A continuación posee una señal de localización nuclear bipartita (RRR.../...RRKR) [220] y en el extremo C-terminal contiene una secuencia CCIS, involucrada en la isoprenilación de proteínas en eucariotas [220] (véase más adelante para una explicación de los dominios).

CrgA se identificó en nuestro laboratorio en un rastreo de genes implicados en la ruta fotocarotenogénica. La transformación de la estirpe silvestre con versiones truncadas de CrgA por sus extremos N- o C-terminal, o con ciertas mutaciones en los dominios RING-finger o LON, provocaba la acumulación de carotenos en la oscuridad, generando un fenotipo constitutivo, con micelios superamarillos tanto en la oscuridad como en la luz, sugiriendo así una dominancia de las versiones mutantes sobre la silvestre [193, 213, 220]. Sorprendentemente, los mutantes nulos para *crgA* presentaban el mismo fenotipo superamarillo en la oscuridad y en la luz, apuntando así a un posible papel represor de CrgA. La paradoja se resolvió cuando se comprobó, posteriormente, que el fenotipo constitutivo observado en los transformantes con transgenes mutados se debía a la existencia de un mecanismo de silenciamiento génico mediado por RNA, que actuaba en respuesta a la introducción de los transgenes, provocando la falta de expresión tanto del transgén como del correspondiente gen endógeno [227].

La expresión del gen *crgA* está controlada por la luz, con un patrón de acumulación de mRNA similar al de otros genes regulados por la luz en *M. circinelloides*, como *carB*, *carRP* o *carG*, presentando una inducción rápida tras la iluminación pero que se mantiene durante poco tiempo (pico en 20-30 minutos) [218, 220, 323, 324].

Los niveles de la proteína CrgA son muy bajos, por lo que se cree que es extremadamente inestable [193]. No obstante, los niveles de CrgA han podido estudiarse en cultivos líquidos, donde bajo iluminación se detectan cantidades constantes y cuatro veces superiores a las detectadas en la oscuridad [193,218]. El gen *crgA* tiene un codón de inicio de la traducción no convencional (GUG). En eucariotas superiores, el inicio de la traducción en codones no-AUG está asociado con la regulación de la expresión de protooncogenes y de factores transcripcionales [91, 216]. La traducción de genes con codones no-AUG normalmente es menos eficiente, ocasionando niveles muy bajos de estas proteínas [161], probablemente como parte de su regulación. Sin embargo la sustitución del triplete GUG por AUG no se traduce en un aumento en los niveles de la proteína CrgA en *M. circinelloides* [213], sugiriendo la existencia de otros mecanismos que mantienen la proteína a niveles bajos.

1.7.2. Funciones de CrgA

El fenotipo de los mutantes *crgA* Δ se denominó ‘constitutivo’, ya que los micelios parecen estar respondiendo a la luz de forma continua, debido a la falta de represión de los genes carotenogénicos en estos mutantes. En *P. blakesleeanus* se han aislado mutantes con un fenotipo similar de sobreacumulación de carotenos en la oscuridad. Sin embargo, los genes responsables, *carD* y *carS*, están implicados en el control por producto final [19,272], mientras que en *M. circinelloides* no parece que exista esa regulación [325], por lo que *crgA* tendría que actuar en una ruta distinta a la de los genes *carD* y *carS* de *Phycomyces*.

Por su expresión tras la iluminación y su papel como represor en la carotenogénesis, se propuso que *crgA* actuase de forma similar a lo que ocurre en *Myxococcus Xanthus*, donde en la oscuridad la proteína CarR reprime al activador de la carotenogénesis CarQ (secuestrándolo en la membrana en este caso). En la luz, la proteína CarR es degradada, permitiendo a CarQ ejercer su función. Al igual que *crgA*, la expresión de *carR* también se induce por luz, a pesar de ejercer su función en la oscuridad (secuestrar a carQ) [109, 130]. De forma similar, CrgA podría estar secuestrando o inactivando en la oscuridad a un activador de la carotenogénesis y perder su efectividad o ser degradado tras la iluminación, lo que permitiría la transcripción de los genes carotenogénicos [212].

Los mutantes *crgA*⁻ son, además, deficientes en la formación de hifas aéreas y en la esporulación. Este fenotipo no es consecuencia de la sobreacumulación de carotenos, ya que mutantes *crgA* Δ albinos, por silenciamiento del gen *carB*, muestran el mismo fenotipo [227].

Además de los genes carotenogénicos, *crgA* también reprime la expresión de *cigA*, un gen que se encuentra aguas abajo de *crgA* y que está implicado en el crecimiento

vegetativo [251]. El gen *cigA* se induce tras la iluminación, como los genes *crgA*, *carB* y *carRP*, aunque su pico de expresión se produce antes que en estos genes, a unos 5-15 minutos, dándose un segundo pico a los 40 minutos [251]. Los dos picos en la inducción de *cigA* apuntan la existencia de dos respuestas, una rápida y otra posterior más lenta (en los genes *carB* y *carRP* también se han observado dos picos de expresión bajo ciertas condiciones [323, 324]).

CigA es similar a proteínas de membrana tipo II. Contiene una secuencia de anclaje a membrana y su extremo C-terminal parece una secuencia extracelular. Presenta homología con las GDP-fucosa O-fucosiltransferasas de ratón y humanos (33 % y 31,7 % de similitud respectivamente) [251]. Estas proteínas añaden O-fucosa en las ‘repeticiones similares al factor de crecimiento epitelial (EGF)’, que son típicas de factores de crecimiento y receptores. Por ejemplo, la O-fucosilación del receptor Notch, central en la señalización intracelular en metazoos, es esencial para su correcta activación [251]. De acuerdo con las características estructurales de CigA, los mutantes en este gen presentan un retraso en el crecimiento que es independiente de la luz, sugiriendo que *crgA* controla procesos que no están regulados por la luz, ya que la luz tampoco influye ni en la velocidad de crecimiento ni en el grado de ramificación en *M. circinelloides* [251].

El débil efecto de la mutación sobre el crecimiento y la posibilidad de conseguir mutantes nulos para este gen podría deberse a la existencia de redundancia con los otros genes *cig*, ya que se han identificado 6 genes similares en el genoma de *Mucor circinelloides* [251]. El gen *cigC*, por ejemplo, se induce por luz con una dinámica parecida a la de *crgA* [249].

CrgA también regula genes de función desconocida y no regulados por la luz [249], lo que junto a los resultados anteriores apunta hacia un papel como represor en varias funciones celulares. Actualmente se está analizando el transcriptoma y el proteoma de los mutantes *crgA*Δ, con lo que pronto se dispondrá de nuevos datos sobre las rutas controladas por CrgA.

El efecto de *crgA* sobre la expresión de *cigA* y sobre la esporulación sugiere que regula otros procesos celulares además de la carotenogénesis [251].

1.7.3. Dominio RING-finger

Los dominios RING-finger (RF) combinan cisteínas e histidinas en una conformación capaz de unir dos átomos de zinc. Aunque el motivo canónico se definió como Cys-X₂-Cys-X₍₉₋₃₉₎-Cys-X₍₁₋₃₎-His-X₍₂₋₃₎-Cys-X₂-Cys-X₍₄₋₄₈₎-Cys-X₂-Cys [30], los modelos actuales también tienen en cuenta aminoácidos en posiciones menos conservadas. Son típicos de eucariotas y están implicados en interacciones proteína-proteína y en la

formación de complejos multiprotéicos, estando asociados a la regulación de múltiples procesos y enfermedades [188, 248].

Los dominios RF son capaces de unir proteínas E2 (conjugadora de ubiquitina) y catalizar la transferencia de la ubiquitina a los sustratos específicos, por lo que se sospecha que muchas de las proteínas que los contienen son ligasas de ubiquitina [81]. De hecho, estos dominios definen una familia de ligasas E3, una de las más amplias en humanos, formada por más de 600 miembros. Las ligasas E3 son las responsables de la especificidad en la ubiquitilación, mediando la transferencia de ubiquitina desde la enzima E2 al sustrato. En las proteínas estudiadas no todos los dominios RF poseen actividad E3, pero en esos casos el dominio RING suele interactuar con otra proteína RF que sí tiene actividad E3 [81]. Las ligasas E3 normalmente actúan marcando proteínas para su degradación por el proteosoma, por lo que aunque no se conoce el modo de acción de CrgA, la presencia de dominios RF ha llevado a proponer que podría ejercer su papel como represor marcando activadores transcripcionales para su degradación por el proteosoma [213].

Los dominios RF de CrgA son necesarios para su función [193, 213], ya que mutaciones puntuales en residuos esenciales para la unión a zinc, en cualquiera de los dos dominios RF, provocan la pérdida de su función en la carotenogénesis.

1.7.4. Otros dominios presentes en CrgA

Como se ha indicado anteriormente, además de los dominios RF, la proteína CrgA posee regiones ricas en glutamina, una señal de localización nuclear, un dominio LON y un dominio terminal de isoprenilación. Las **regiones ricas en glutamina**, o ‘poliQs’, se encuentran en muchos factores transcripcionales, donde participan en las interacciones con la maquinaria de transcripción [316]. En CrgA, la delección de la región de poliglutaminas más alejada del extremo C-terminal provoca la pérdida de su función en la carotenogénesis, mientras que la delección de las otras dos regiones también afecta su función, aunque el efecto es menor [193].

Algunas proteínas, como los factores de apareamiento de hongos o las proteínas Ras, requieren estar preniladas para activarse. La **prenilación** es una modificación lipídica que consiste en la unión covalente de farnesil (15C) o geranylgeranil (20C) a residuos de cisteína C-terminales. Se cree que esta modificación aumenta o posibilita la unión de la proteína a membrana, quizás mediando en las interacciones lípido-proteína. El motivo más habitual suele ser CAAC (A, cualquier aminoácido alifático), pero en algunas proteínas similares a las Ras se han descrito secuencias CC, CCXX o CXC (con X normalmente metionina o serina) [220]. Mutaciones en el hipotético motivo de isoprenilación de CrgA afectaron solo ligeramente a su función [193].

No se sabe si CrgA es una proteína nuclear ya que, aunque se ha identificado una posible **señal de localización nuclear** en su secuencia, su mutación no afectó a la capacidad de CrgA para reprimir la carotenogénesis [193]. El **dominio LON** se encuentra en el extremo N-terminal de las proteasas dependientes de ATP de la familia LON [254]. En estas proteínas es esencial para la actividad proteolítica, pero no es el dominio catalítico. Se cree que es importante en la interacción con las proteínas diana, aunque su función no está clara [265]. Se ha visto que es capaz de interactuar con DNA de doble cadena en bacterias y con DNA de una cadena y RNA en eucariotas [189, 197]. En estos organismos las proteasas LON participan en respuestas al estrés y de defensa frente a daño en el DNA. En eucariotas las proteínas LON se encuentran en la mitocondria y se ha propuesto que se unan a las zonas de control de la transcripción y la replicación del DNA mitocondrial, acercándose de este modo la proteasa a las proteínas a degradar, que estarían unidas en las proximidades, como factores transcripcionales y sus complejos [189, 197].

En CrgA el dominio LON es esencial para su función [193, 213] y contiene las regiones ricas en glutaminas. Aunque CrgA no es una proteasa LON, al carecer de los dominios ATPasa y proteolítico de estas proteasas, el dominio LON podría actuar de forma similar, permitiendo la unión a RNA o DNA y acercando CrgA a los promotores, donde se encontrarían las proteínas a marcar con ubiquitina, pudiendo actuar además como superficie de interacción con estas proteínas.

1.7.5. Homólogos del gen *crgA*

En *M. circinelloides* existen otros tres genes parálogos a *crgA*, denominados *crgB*, *crgC* y *crgD*. El gen *crgB* se induce fuertemente por luz y probablemente es esencial para la supervivencia, ya que no se ha conseguido generar mutantes nulos [116].

P. blakesleeanus también posee cuatro genes *crg*, todos ellos fotoinducibles de forma dependiente del complejo Mad. Los genes *crgA*, *crgC* y *crgD* son de inducción temprana, con un pico a los 15 minutos tras la iluminación, mientras que *crgB* tarda unos 30 minutos en alcanzar su expresión máxima [104].

En el ascomiceto *Fusarium oxysporum* se ha clonado un gen similar a *crgA*, identificado como el responsable del fenotipo de los mutantes sobreproductores de carotenos en oscuridad. Este gen, denominado *carS*, posee un dominio RING-Finger en el extremo N-terminal y un dominio LON no interrumpido. Los mutantes *carS* sobreexpresan los genes *carB* y *carRA* en la oscuridad y son capaces de responder a la luz incrementando su transcripción, pero al contrario que los mutantes *crgA* de *M. circinelloides* no se produce el correspondiente incremento en carotenos tras la iluminación [260, 261].

Fuera del reino de los hongos, aparecen genes de tipo *crgA* en prácticamente todos los eucariotas. En humanos existen 3 genes con arquitectura similar, dos RFs en el extremo N-terminal y un dominio LON en el extremo C-terminal, denominados *lonrfl*-3. Aunque su función se desconoce, uno de estos genes está sobreexpresado en neuroblastoma [59]. Otro eucariota en el que se ha observado sobreexpresión de genes tipo *crgA* es el pez cebra (*Danio rerio*). Recientemente se ha estudiado el transcriptoma dependiente de la luz en este organismo, identificándose dos genes *lonrfl* que se sobreexpresan tras la iluminación. De hecho, uno de los genes *lonrfl* es el gen que más se induce tras la iluminación en algunos de los tejidos. El pez cebra se está utilizando como modelo de estudio de los ritmos circadianos y la regulación por luz debido a que muchos de sus órganos y líneas celulares son capaces de responder directamente a la iluminación [332]. Sorprendentemente, parece que las rutas de regulación por luz de peces están conservadas en mamíferos, a pesar de que en estos últimos no se reciba luz en los tejidos y los relojes periféricos ya no respondan a ella directamente. Por ejemplo, se ha conseguido recuperar esta capacidad en fibroblastos transfectando con melanopsina [245], y los promotores de *per2* de mamíferos son regulados por la luz cuando se introducen en células de pez cebra [322].

1.8. Ubiquitilación no degradativa

La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos, muy conservada desde levaduras a humanos, que se añade al grupo ϵ -amino de una lisina (K) o al extremo aminoterminal de un polipéptido como una forma de modificación post-traducciona. En el proceso de unión de moléculas de ubiquitina a proteínas, denominado ubiquitilación, participan tres tipos de proteínas: las E1s, encargadas de la activación de la ubiquitina, las E2, que ayudan en la transferencia de la ubiquitina desde la E1, y las E3 (o ligasas de ubiquitina), que son las responsables de la especificidad del sistema al mediar el reconocimiento de los sustratos. Aunque la ubiquitilación se suele relacionar con el marcaje para degradación por el proteosoma, esta modificación puede tener diferentes efectos. Además, al igual que la fosforilación, la ubiquitilación es un proceso reversible, lo que aumenta la versatilidad de este mecanismo de regulación.

Mediante ubiquitilación no solo se regula la estabilidad de una proteína (o su vida media), sino también su localización celular, la posibilidad de interacción con otras proteínas, etc [66]. El efecto de la ubiquitilación depende tanto de la longitud de las cadenas como del tipo de enlaces que las forman. Normalmente para marcaje degradativo se requiere una cadena de, al menos, cuatro ubiquitinas unidas por la lisina 48. Sin embargo, cadenas unidas mediante otros enlaces, o la adición de mono-, bi- o tri-ubiquitinas, están

implicadas en mecanismos de regulación independientes de proteólisis, en procesos como la defensa al daño del DNA, la transducción de señales, la regulación de la transcripción, la activación de quinasas, la endocitosis y la compartimentalización [66, 117, 333].

Por ejemplo, la adición de ubiquitinas puede modular la actividad de un factor transcripcional, como ocurre con Smad3, cuya mono-ubiquitinación en múltiples residuos afecta a su capacidad de unión al DNA [142]. La adición de ubiquitinas también puede actuar impidiendo la formación de multímeros en proteínas que forman parte de complejos. A veces esta ubiquitilación está inhibida por otras modificaciones post-traduccionales, o a la inversa, solo producirse tras la modificación en ciertos residuos [313].

Recientemente se ha observado la ubiquitilación de la fototropina 1 (Phot1) en *Arabidopsis*. Esta proteína, que se encuentra en la membrana plasmática y es un fotorreceptor de luz azul implicado en el fototropismo en plantas, sufre mono-, oligo- y poliubiquitilación. Aunque la poliubiquitilación lleva a la degradación de la fototropina, la mono- y oligo-ubiquitilación son importantes en la regulación de su función, probablemente siendo necesarias para su internalización desde la membrana [258]. Además, el estado de ubiquitilación de Phot1 varía según la intensidad de la luz, tanto en tipo como en las proteínas de las que depende [258].

En otros casos la ubiquitilación es importante para los dominios de activación de los factores transcripcionales. Normalmente el grado de actividad de un factor transcripcional y su vida media están inversamente correlacionados [206]. De hecho, la forma más estable del complejo WC (fosforilada) es su forma inactiva, mientras que una vez activado (desfosforilado) es degradado rápidamente [282].

1.9. Objetivos de la tesis

El objetivo principal de la tesis era investigar las vías de transducción de la señal luminosa en hongos, concretamente en las respuestas fototrópica y fotocarotenogénica, utilizando *M. circinelloides* como modelo. Este objetivo general se estructuró en los siguientes objetivos específicos:

1. Identificación y aislamiento de los genes *wc-1* de *M. circinelloides*.
2. Caracterización de las respuestas fototrópica y fotocarotenogénica.
3. Generación de mutantes nulos para cada gen *wc-1* de *M. circinelloides* y análisis de sus fenotipos.
4. Generación de mutantes dobles para el gen *crgA* y cada uno de los genes *wc-1* y análisis de sus fenotipos.

2 Materiales y Métodos

2.1. Estirpes y plásmidos

2.1.1. Estirpes de *Mucor circinelloides*

Las estirpes de *M. circinelloides* utilizadas en este trabajo se muestran en la Tabla 2.2. Aquellas con el prefijo MU fueron generadas por nuestro grupo de investigación, directa o indirectamente, a partir de la estirpe R7B [263], silvestre para la carotenogénesis, auxótrofa para la leucina y obtenida por mutagénesis química de la estirpe silvestre CBS.277.49 (*Mucor racemosus* ATCC 1216b) [283]. Las estirpes MU402 [225] y MU223 [193] se generaron por mutagénesis química a partir de R7B y MU221 [218], respectivamente. La estirpe MU241 deriva de R7B, por reemplazamiento del alelo mutante del gen *leuA* por una copia silvestre (Dra. Quiles-Rosillo, Univ. Murcia). Los mutantes simples MU242 a MU248 se obtuvieron en este trabajo por sustitución del gen *mcwc-1* correspondiente por el gen *pyrG*, utilizando como recipiente la estirpe MU402. Los mutantes dobles MU251 a MU255 se generaron, también durante el desarrollo de este trabajo, a partir de MU223, sustituyendo el gen *mcwc-1* indicado por una copia de *pyrG* (Tabla 2.2). Por otro lado, la estirpe MU256 es un mutante espontáneo derivado de MU223.

2.1.2. Estirpes de *Escherichia coli*

En la Tabla 2.1 se muestran las estirpes de *Escherichia coli* utilizadas, su genotipo y su origen.

Tabla 2.1. Resumen de estirpes de *E. coli* utilizadas

Estirpe	Genotipo	Origen/Referencia
BL21 (DE3)	<i>HsdS, gal</i> (λ clts857, <i>ind1, Sam7, nin5, LacUV5-T7 gene1</i>)	Studier y Moffatt, 1986
DH5 α	<i>F-, recA1, endA1, gyrA96, hsdR17(rk-,mk-), supE44, thi-1, relA1, lacZ, λ-</i>	Hanaham, 1983
LE392	<i>F-, hsdR514(rk-, mk-), supE44, supF58, lacY1, galK2, galT22, metB1, trpR55, λ-</i>	Promega

Las características más destacadas de las estirpes de *E. coli* utilizadas se describen a continuación:

DH5 α Empleada en la clonación de plásmidos bacterianos, posee las siguientes características:

- Debido a la mutación *recA*⁻ no permite la recombinación, lo que favorece la estabilidad de los plásmidos.
- Porta una mutación *lacZ* que puede ser complementada por la mayoría de vectores utilizados habitualmente.
- Puede mantenerse congelada en estado competente durante largos periodos de tiempo.

LE392 Se utilizó para la propagación de la genoteca genómica de *M. circinelloides* en el fago λ . Esta estirpe es *rec*⁺ y permisiva a la infección, careciendo del sistema K de restricción de *E. coli*, lo que posibilita el crecimiento de los fagos parentales y recombinantes.

BL21 (DE3) Se utilizó para la expresión de la proteína Mcwc-1b. Esta estirpe porta el gen de la polimerasa T7 bajo el control del promotor *lacUV5*, lo que permite controlar la síntesis de la polimerasa mediante la adición de IPTG.

2.1.3. Plásmidos

En la Tabla 2.3 se presentan los plásmidos empleados en este trabajo, indicando su procedencia y sus características más sobresalientes. Todos los plásmidos construidos en el desarrollo de esta tesis (plásmidos pMAT) resultan de la clonación de fragmentos de los genes *mcwc-1* en el vector pUC18, excepto pMAT1154 que deriva del vector pET15b.

2.2. Medios y condiciones de crecimiento

2.2.1. Medios de crecimiento

Escherichia coli

E. coli se cultivó con agitación a 37°C, en medio nutritivo Luria (LB) [205]. Antes de esterilizar el medio en el autoclave, el pH se ajustó a 7,2-7,4. Para medios sólidos se añadió 15 g/l de agar. Cuando fue necesario, y tras autoclavar, se añadió el antibiótico ampicilina a una concentración de 100 μ g/ml.

Tabla 2.2. Resumen de estirpes de *M. circinelloides* utilizadas

Estirpe	Genotipo	Fenotipo	Parental	Origen/Referencia
R7B	<i>leuA</i> ⁻	Leu ⁻	CBS.277.49	Roncero, 1984
MU221	<i>crgA::leuA</i>	CrgA ⁻	R7B	Navarro <i>et al.</i> , 2001
MU223	<i>crgA::leuA, pyrG</i> ⁻	CrgA ⁻ Ura ⁻	MU221	Lorca-Pascual <i>et al.</i> , 2004
MU241	<i>leuA::leuA</i>	Silvestre	R7B	Dra. Quiles-Rosillo Univ. de Murcia
MU242	<i>mcwc-1a::pyrG, leuA</i> ⁻	Mcwc-1a ⁻ , Leu ⁻	MU402	Este trabajo
MU243	<i>mcwc-1a::pyrG, leuA</i> ⁻	Mcwc-1a ⁻ , Leu ⁻	MU402	Este trabajo
MU244	<i>mcwc-1b::pyrG, leuA</i> ⁻	Mcwc-1b ⁻ , Leu ⁻	MU402	Este trabajo
MU245	<i>mcwc-1b::pyrG, leuA</i> ⁻	Mcwc-1b ⁻ , Leu ⁻	MU402	Este trabajo
MU246	<i>mcwc-1b::pyrG, leuA</i> ⁻	Mcwc-1b ⁻ , Leu ⁻	MU402	Este trabajo
MU247	<i>mcwc-1c::pyrG, leuA</i> ⁻	Mcwc-1c ⁻ , Leu ⁻	MU402	Este trabajo
MU248	<i>mcwc-1c::pyrG, leuA</i> ⁻	Mcwc-1c ⁻ , Leu ⁻	MU402	Este trabajo
MU251	<i>crgA::leuA</i> <i>mcwc-1a::pyrG</i>	CrgA ⁻ , Mcwc-1a ⁻	MU223	Este trabajo
MU252	<i>crgA::leuA</i> <i>mcwc-1b::pyrG</i>	CrgA ⁻ , Mcwc-1b ⁻	MU223	Este trabajo
MU253	<i>crgA::leuA</i> <i>mcwc-1b::pyrG</i>	CrgA ⁻ , Mcwc-1b ⁻	MU223	Este trabajo
MU254	<i>crgA::leuA</i> <i>mcwc-1c::pyrG</i>	CrgA ⁻ , Mcwc-1c ⁻	MU223	Este trabajo
MU255	<i>crgA::leuA</i> <i>mcwc-1c::pyrG</i>	CrgA ⁻ , Mcwc-1c ⁻	MU223	Este trabajo
MU256	<i>crgA::leuA</i> <i>mcwc-1b-pyrG</i> ⁻	CrgA ⁻ , Mcwc-1b ⁻ , Ura ⁻	MU223	Este trabajo
MU402	<i>leuA-pyrG</i> ⁻	Leu ⁻ , Ura ⁻	R7B	Nicolás <i>et al.</i> , 2007

Tabla 2.3. Resumen de los plásmidos utilizados

Plásmido	Características	Origen/Referencia
pLEU4	Amp ^R , <i>leuA</i>	Roncero <i>et al.</i> , 1989
pEPM1	Amp ^R , <i>pyrG</i>	Benito <i>et al.</i> , 1992
pUC18	Amp ^R	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pET15-b	Amp ^R (Vector expresión en <i>E.coli</i>)	Novagen
pMAT1100	Amp ^R , <i>mcwc-1a</i> (Fragmento <i>EcoRI</i> de 4,5 kb)	Este trabajo
pMAT1102	Amp ^R , <i>mcwc-1a</i> (Fragmento <i>SacI</i> de 5,5 kb)	Este trabajo
pMAT1108	Amp ^R , <i>mcwc-1a</i> (Gen <i>mcwc-1a</i> completo)	Este trabajo
pMAT1110	Amp ^R , <i>mcwc-1a</i> (Gen <i>mcwc-1a</i> completo)	Este trabajo
pMAT1113	Amp ^R , <i>mcwc-1a::pyrG</i> (Disrupción gen <i>mcwc-1a</i>)	Este trabajo
pMAT1116	Amp ^R , <i>mcwc-1b</i> (Gen <i>mcwc-1b</i> completo)	Este trabajo
pMAT1117	Amp ^R , <i>mcwc-1b</i> (Fragmento <i>SacI</i> de ~9 kb)	Este trabajo
pMAT1118	Amp ^R , <i>mcwc-1b</i> (Gen <i>mcwc-1b</i> completo)	Este trabajo
pMAT1120	Amp ^R , <i>mcwc-1b::pyrG</i> (Disrupción gen <i>mcwc-1b</i>)	Este trabajo
pMAT1127	Amp ^R , <i>mcwc-1c</i> (Fragmento <i>SacI</i> de ~9 kb)	Este trabajo
pMAT1128	Amp ^R , <i>mcwc-1c::pyrG</i> (Disrupción gen <i>mcwc-1c</i>)	Este trabajo
pMAT1130	Amp ^R , <i>mcwc-1c</i> (Gen <i>mcwc-1c</i> completo)	Este trabajo
pMAT1131	Amp ^R , <i>leuA</i> , <i>mcwc-1c</i> (complementación <i>mcwc-1c</i>)	Este trabajo
pMAT1133	Amp ^R , <i>leuA</i> , <i>mcwc-1a</i> (Complementación <i>mcwc-1a</i>)	Este trabajo
pMAT1145	Amp ^R , <i>mcwc-1b</i> (clonado en pET15b; producción de proteína Mcwc-1b)	Este trabajo
pMAT1148	Amp ^R , <i>pyrG</i> , <i>mcwc-1b</i> (complementación <i>mcwc-1b</i>)	Este trabajo

Mucor circinelloides

M. circinelloides se cultivó a 26°C en medio mínimo YNB [176] o en los medios complejos PDA (Difco), MMC [225] o YPG [17]. Cuando fue necesario el medio mínimo YNB se suplementó, después de autoclavar, con leucina (20 µg/ml), y los medios YNB, MMC e YPG con uridina (200 µg/ml). En los experimentos de transformación se añadió sorbitol (0,5 M) para evitar que la diferencia de presión osmótica provocase la lisis de los protoplastos. Debido al pH ácido de los medios el agar se autoclavó por separado para favorecer su posterior polimerización. El pH se ajustó con NaOH o HCl, siendo de 4,5 o 3,2 cuando se requería un crecimiento micelial extendido o colonial, respectivamente.

En los experimentos de transformación de la estirpe MU402 se utilizó el medio de cultivo MMC, para la auxotrofia a uracilo, pero no para la auxotrofia a leucina [225].

2.2.2. Condiciones de crecimiento de *M. circinelloides*

Obtención de esporas

Se crecieron micelios en cajas de Petri con el medio de cultivo adecuado, bien a partir de suspensiones de esporas ($3,4 \times 10^5$ esporas por caja), o bien a partir de fragmentos de micelio trasplantados con pinzas estériles. Los micelios se incubaron durante un día en oscuridad y un mínimo de dos días en luz. Las esporas se recogieron en condiciones de esterilidad, con un asa de siembra y extendiendo unos 5 ml de agua destilada, conservándose a 4°C cuando su uso fue continuado o a -20°C de forma permanente.

Micelios utilizados en hibridaciones tipo *northern*

Los micelios para la extracción de RNA se obtuvieron cultivando $2,5 \times 10^5$ esporas por caja en el medio sólido adecuado (Tabla 2.4), en el que se había colocado previamente una hoja de celofán para evitar la introducción del micelio en el agar. Tras crecer durante 48 horas en oscuridad a 26°C, los micelios se iluminaron con luz blanca ($4,8 \text{ W/m}^2$) durante los tiempos indicados en las diversas figuras (3.16, 3.30 y 3.41), usando lámparas fluorescentes como fuente de luz (Sylvania, estandar F_{18W/154}, Alemania). Los micelios se congelaron en nitrógeno líquido y fueron utilizados inmediatamente o almacenados a -70°C.

Micelios utilizados en los experimentos de *western*

Para la detección de la proteína Mcwc-1b se sembraron $2,5 \times 10^5$ esporas por caja de la estirpe de interés en medio YNB (pH 4,5), en el que se había colocado previamente una hoja de celofán. Los micelios se crecieron a 26°C durante 18 horas en oscuridad (condiciones oscuridad) o 17 horas en oscuridad y 1h en luz (condiciones de luz; luz

Tabla 2.4. Resumen de estirpes y medios utilizados en los análisis de expresión génica

Northern	Estirpes	Medio (pH 4,5)
Expresión silvestre	R7B (Silvestre)	MMC
Mutantes simples <i>mcwc-1Δ</i>	R7B (Silvestre) MU242 (<i>mcwc-1aΔ</i>) MU244 (<i>mcwc-1bΔ</i>) MU247 (<i>mcwc-1cΔ</i>)	YNB + leucina
Mutantes dobles <i>mcwc-1Δ crgAΔ</i>	MU241 (Silvestre) MU221 (<i>crgAΔ</i>) MU251 (<i>mcwc-1aΔ crgAΔ</i>) MU252 (<i>mcwc-1bΔ crgAΔ</i>) MU255 (<i>mcwc-1cΔ crgAΔ</i>)	YNB
Expresión <i>mcwc-1b</i>	MU241 (Silvestre) y MU221 (<i>crgAΔ</i>)	YNB

blanca 4,8 W/m²). Los micelios se congelaron en nitrógeno líquido y fueron utilizados inmediatamente o almacenados a -70°C.

Análisis de carotenos

El micelio necesario para las medidas de carotenos se obtuvo colocando pequeños trozos de micelio sobre papel de celofán depositado en el medio sólido adecuado. Los tiempos de incubación dependieron de la velocidad de crecimiento de las distintas estirpes sobre medio mínimo (o medio mínimo suplementado) y se indican en los pies de las figuras junto al medio concreto utilizado (Figuras 3.1, 3.23, 3.26, 3.34 y 3.38). En los análisis de la carotenogénesis en la estirpe silvestre (Apartado 3.1.1) se emplearon filtros para conseguir la iluminación con las diferentes longitudes de onda. La luz azul (1,44 W/m²) se obtuvo con el filtro Supergel #83 (Rosco, Stamford, CT), la luz roja (1,26 W/m²) con los filtros Supergel #26 y UV (Rosco, Stamford, CT) y la luz verde (1,28 W/m²) con los filtros Supergel #91 y de UV (Rosco, Stamford, CT). En el resto de experimentos se utilizó luz blanca (4,8 W/m², 1,4 W/m² de componente azul).

En todos los casos los micelios se congelaron en nitrógeno líquido y fueron utilizados inmediatamente o almacenados a -70°C.

Análisis del fototropismo

Los micelios se crecieron sobre medio sólido PDA (Difco) durante 3 días en oscuridad (condiciones de oscuridad) o con iluminación lateral (condiciones de luz). El pH utilizado (3,2 o 4,5) se indica en las figuras correspondientes (3.2 y 3.27). La luz blanca

(20 mW/m²) se consiguió con lámparas fluorescentes (Sylvania, estandar F_{18W/154}, Alemania), las luces de rangos concretos de espectro visible se lograron usando las mismas lámparas y filtros de interferencia. La luz azul (4,8 mW/m²) se obtuvo combinado los filtros Supergel #83 y Supergel #370 (Rosco, Stamford, CT), la luz roja (3,2 mW/m²) con dos filtros Supergel #26 y dos UV (Rosco, Stamford, CT). La luz verde de 500 a 600 nm (2,5 mW/m²) se consiguió con un filtro de banda ancha de 550 nm (Edmun Optics, Barrington, NJ), la de 525 a 540 nm con un filtro de banda estrecha de 532 nm (Newport Corporation, CA).

2.3. Tampones y reactivos

2.3.1. Manipulación del DNA

TE

- Tris-HCl (pH 8,0): 10 mM
- EDTA (pH 8,0): 1 mM

Tampón de ligación 10x

- Tris-HCl (pH 7,8): 300 mM
- MgCl₂: 100 mM
- Ditioneitol (DTT): 100 mM
- ATP: 10 mM

TAE

- Tris-HCl: 40 mM
- Ácido acético: 40 mM
- EDTA: 1 mM

Tampón de carga 10x

- Azul de bromofenol: 0,25 %
- Sacarosa: 40 %

2.3.2. Manipulación del RNA

Tampón MOPS 10x

- MOPS pH 7,0: 200 mM
- Acetato sódico: 50 mM
- EDTA: 10 mM

Tampón de carga de RNA

- MOPS pH 7,0: 1x
- Formamida: 50 %
- Formaldehído: 18 %
- Tampón de carga DNA: 1x

Los tampones utilizados en los experimentos con RNA se trataron con DEPC (dietil-pirocarbonato) al 0,2 % durante 30 minutos a temperatura ambiente, para eliminar las ribonucleasas. El DEPC se eliminó posteriormente mediante autoclavado durante 20 minutos. Las soluciones de Tris se prepararon con agua previamente tratada con DEPC.

2.3.3. Manipulación de proteínas

Tampón de extracción de proteínas

- Tris-HCl (pH 8,0): 10 mM
- NaCl: 0,15 M
- Benzamidina: 0,001 M
- Cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma P-8215): 1:50

Tampón de extracción de proteínas (*Escherichia coli*)

- Tris-HCl (pH 8,0): 50 mM
- NaCl: 50 mM
- Nonidet P-40: 0,1 %
- Glicerol: 5 %
- β -mercaptoetanol: 5 mM
- PMSF: 0,001 M
- Apoproteína A: 0,01 mg/ml

Tampón de lisis para tratamiento con fosfatasa de λ

- Tris-HCl (pH 8,0): 50 mM
- NaCl: 100 mM
- EGTA: 0,1 mM
- DTT: 2 mM
- Brij35: 0,01 %
- Cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma P-8215): 2 %
- pH 7,5

Tampón de lisis de inmunoprecipitación

- Tris-HCl: 50 mM
- NaCl: 150 mM
- Nonidet P40: 1 %
- Sodium deoxycholate: 0,5 %
- Cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma P-8215): 2 %
- pH 7,5

Geles de poliacrilamina

1. Gel separador (7 %, 10 % o 12 %)

- Tris-HCl (pH 8,85): 0,75 M
- SDS: 0,1 %
- Acrilamida/bisacrilamida(37,5:1): 7 %, 10 % o 12 %
- APS: 0,15 %
- TEMED: 0,001 %

2. Gel concentrador (4 %)

- Tris-HCl (pH 6,8): 0,125 M
- SDS: 0,1 %
- Acrilamida/bisacrilamida(37,5:1): 4 %
- APS: 0,15 %

- TEMED: 0,002 %

Tampón de carga 5x

- Tris-HCl (pH 6,8): 0,225 M
- Glicerol: 50 %
- SDS: 5 %
- Azul de bromofenol 0,05 %
- DTT: 0,25 M

Solución de Ponceau S

- Ponceau: 0,2 %
- Ácido tricloro acético: 0,18 M

Tampón de electroforesis

- Tris: 50 mM
- Glicina: 0,192 M
- SDS: 0,1 %
- Ajustar a pH 8,3

Tampón de transferencia

- Tris: 48 mM
- Glicina: 39 mM
- Metanol: 20 %
- SDS: 0,037 %
- pH 8,8

Tampón PBS

- NaCl: 140 mM
- KCl: 3,3 mM
- Na₂HPO₄: 10 mM
- KH₂PO₄: 1,8 mM

Tampón PBST Se obtiene añadiendo 0,05 % de Tween-20 al tampón PBS

2.3.4. Transformación de *Mucor circinelloides*

Tampón fosfato-sorbitol

- Sorbitol: 0,5 M
- Fosfato sódico (pH 6,5): 10 mM

Tampón MOPS-sorbitol

- Sorbitol: 0,5 M
- MOPS (pH 6,3): 10 mM
- CaCl₂: 50 mM

Solución de PEG 4000

- PEG 4000: 40 %
- Disuelto en tampón MOPS-sorbitol

2.3.5. Hibridaciones

Solución de prehibridación NaCl

- NaCl: 0,9 M
- SDS: 1 %
- DNA de esperma de salmón sonicado y desnaturalizado: 50 µg/ml

Solución de hibridación NaCl

- NaCl: 0,9 M
- SDS: 1 %
- DNA de esperma de salmón sonicado y desnaturalizado: 50 µg/ml
- Sulfato de dextrano: 0,1 g/ml

Solución de prehibridación/hibridación Denhardt's

- SSC: 6x
- Denhardt's: 5x
- SDS: 0,5 %
- Sulfato de dextrano: 5 %
- DNA de esperma de salmón sonicado y desnaturalizado: 100 µg/ml

Denhardt's 50x

- BSA: 1 % (P/V)
- Ficoll 400: 1 % (P/V)
- Polivinilpirrolidona (PVP): 1 % (P/V)

20xSSC

- NaCl: 3 M
- Citrato sódico: 300 mM
- pH 7,0

2.3.6. Extracción del DNA de *M. circinelloides*

Solución de extracción de DNA de *M. circinelloides*

- Tris-HCl (pH 8): 200 mM
- EDTA (pH 8): 100 mM
- SDS: 1 %

2.3.7. Extracción del RNA de *M. circinelloides*

Solución de extracción de RNA

- Isocianato de guanidina: 4 M
- Tris-HCl (pH 7,5): 50 mM
- EDTA (pH 8): 10 mM
- Sarcosil: 2 %

Solución de CsCl

- Cloruro de Cesio: 5,7 M
- EDTA (pH 8): 10 mM

2.3.8. Genoteca en el fago λ

Tampón de fagos

- Tris-HCl (pH 7,4): 20 mM
- NaCl: 100 mM
- MgSO₄: 10 mM

Tampón SM

- Tris-HCl (pH 7,5): 50 mM
- NaCl: 100 mM
- MgSO₄: 8 mM
- Gelatina: 0,01 %

Tampón de resuspensión

- Tris-HCl (pH 7,4): 10 mM
- MgSO₄: 10 mM

Tampón TM

- Tris-HCl (pH 7,5): 50 mM
- MgSO₄: 10 mM

2.4. Transformaciones

2.4.1. Transformación de *Escherichia coli* con plásmidos bacterianos

La obtención de células en estado competente, necesario para introducir DNA desnudo en *E. coli*, se realizó por el procedimiento del cloruro cálcico [275], siendo el protocolo de transformación el mismo para DH5 α y BL21 [275].

2.4.2. Transformación de *M. circinelloides*

Se realizó siguiendo básicamente el protocolo descrito por van Heeswijck y Roncero (1984) [321] con ligeras modificaciones [314] y que requiere la eliminación de la pared celular para generar protoplastos, en los que se puede introducir DNA exógeno.

En las interrupciones de los genes, los protoplastos se transformaron con DNA lineal (Tabla 2.5). En todos los casos se sustituyó la secuencia delecionada por el marcador *pyrG*, procedente del plásmido pEPM1 [22] (fragmento *Bam*HI 3,2 Kb). Para más detalles ver los esquemas de las interrupciones (Figuras 3.17, 3.19 y 3.21). Para la generación de los mutantes simples *mcwc-1a*Δ, *mcwc-1b*Δ y *mcwc-1c*Δ los protoplastos se sembraron en cajas de medio MMC pH 3,2 con 0,5 M de sorbitol. Los transformantes que integraron el DNA exógeno se identificaron por su capacidad de crecimiento en el medio selectivo (MMC), gracias a la presencia del gen marcador *pyrG*. La selección de individuos homocariontes se realizó mediante pases en medio selectivo, al menos cuatro, hasta alcanzar un 100 % de colonias con el marcador, indicando que el 100 % de núcleos llevaban el DNA integrado. Los mutantes dobles *mcwc-1*Δ *crgA*Δ se obtuvieron de forma similar, pero utilizando medio mínimo (YNB pH 3,2) como medio selectivo.

Tabla 2.5. Vectores y fragmentos usados en la generación de los mutantes *mcwc-1*Δ

Gen	Plásmido	Tamaño deleción	Fragmento utilizado en la transformación
<i>mcwc-1a</i>	pMAT1113	1,8 kb	[<i>Sph</i> I- <i>Pvu</i> II] 7,5 kb
<i>mcwc-1b</i>	pMAT1120	1,3 kb	[<i>Pvu</i> I- <i>Sac</i> I] 5,6 kb
<i>mcwc-1c</i>	pMAT1132	720 pb	[<i>Sph</i> I- <i>Sac</i> I] 5,7 kb

En las complementaciones de los mutantes *mcwc-1*Δ se utilizaron plásmidos con copias silvestres de los genes *mcwc-1a*, *mcwc-1b* o *mcwc-1c* bajo sus propios promotores, acompañados de los genes marcadores *leuA* o *pyrG*, necesarios para la selección de los transformantes. Los protoplastos se sembraron en medio mínimo (YNB pH 3,2), recojiéndose las esporas de los distintos transformantes tras un sólo pase, lo que reduce la probabilidad de pérdida del plásmido.

2.5. Análisis de carotenos

Los micelios, crecidos como se describe en el Apartado 2.2.2 se trituraron con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino, que se liofilizó durante 24 horas para estable-

cer el peso seco. Los carotenos se extrajeron resuspendiendo 20 mg de micelio liofilizado en 2 ml de metanol, añadiendo 1 volumen de éter de petróleo y mezclando vigorosamente ambas fases. Tras centrifugar durante 5 minutos a 440 xg, se recogió la fase de éter de petróleo en la que son solubles los carotenos. Esta operación, realizada en frío, se repitió varias veces hasta que la fase de metanol perdió toda su coloración [111].

El extracto crudo de carotenos obtenido se midió directamente en un espectrofotómetro. El tipo de carotenos acumulados se determinó analizando el espectro de absorción. Para cuantificar los carotenos se utilizaron los coeficientes de extinción descritos por Davies, 1965 [75].

2.6. Manipulación de DNA

2.6.1. Aislamiento de DNA de *M. circinelloides*

El DNA de *M. circinelloides* se aisló siguiendo el protocolo descrito por Ruiz-Pérez et al, 1995 [268].

En el caso de las PCRs realizadas en la complementación del mutante *mcwc-1b⁻ crgA Δ* (Apartado 3.9; Figura 3.39) se usaron micelios frescos directamente como fuente de DNA molde. Los micelios se obtuvieron a partir de siembras de esporas, crecidas durante 2 días sobre medio mínimo (pH 3,2). Fragmentos de 1 cm² se congelaron en nitrógeno líquido y se trasladaron a tubos eppendorf, donde se trituraron en nitrógeno líquido, utilizando a modo de mano de mortero una punta de micropipeta con el extremo fundido, hasta conseguir un fino polvo que fue disuelto en 50 μ l de DMSO. Alícuotas de esta preparación (1,25 μ l, para un volumen final de 25 μ l) fueron utilizadas directamente como DNA molde en las PCRs [225].

2.6.2. Aislamiento de DNA plasmídico de *Escherichia coli*

El DNA plasmídico de *E. coli* se aisló mediante columnas comerciales de purificación de plásmido (*High Pure Plasmid Isolation Kit*, Roche Applied Science), cuando se requería gran pureza (secuenciación o PCR), o por el procedimiento de hervido rápido en presencia de lisozima [132] en el resto de los casos (digestiones con enzimas de restricción, transformación de *M. circinelloides*, etc.).

2.6.3. Tratamientos con enzimas

Los tratamientos más usuales fueron:

- Digestión con enzimas de restricción (Roche, Amersham Pharmacia Biotech o Fermentas) que se realizó siguiendo las instrucciones del suministrador.

- Desfosforilación del extremo 5' con la enzima fosfatasa alcalina S (SAP, Roche) para evitar autoligación de vectores. Todos los tratamientos se realizaron de acuerdo con las especificaciones del suministrador.
- Reparación de extremos 5' protuberantes para generar extremos romos. El DNA (<math><1\mu\text{g}</math>) se incubó durante 15 minutos a 37°C con 2 unidades del fragmento *Klenow* de la polimerasa I de *E. coli*, empleando tampón de ligación (Roche) y 25 μM de dNTPs [11].
- Reparación de extremos 3' protuberantes para generar extremos romos. El DNA (<math><1\mu\text{g}</math>) se incubó durante 5 minutos a 37°C con 0,5 unidades de la polimerasa de DNA del bacteriofago T4 (Boehringer Mannheim) en presencia de tampón de la polimerasa (Boehringer Mannheim), BSA (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y dNTPs (0,2 mM).
- Ligación de fragmentos de DNA. Se realizó en volúmenes pequeños (20-30 μl) en tampón de ligación con BSA (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y una unidad de la enzima ligasa de T4 (Roche). La ligación intramolecular se favoreció utilizando concentraciones bajas de DNA, normalmente 5 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Las mezclas de ligación se incubaron a 16°C durante un mínimo de 2 a 3 horas. En general, la relación molar de DNA del inserto respecto al vector fue de 2:1. Siempre que fue necesario, la enzima se inactivó mediante calor (65°C durante 15 minutos).

2.6.4. Técnicas electroforéticas

La caracterización de plásmidos, de los fragmentos de restricción o de los productos de PCRs, se realizó mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa (Pronadisa) [76]

La purificación de fragmentos de restricción a partir de geles de agarosa se llevó a cabo con columnas *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche Applied Science), siguiendo las instrucciones del suministrador.

2.6.5. Amplificación de DNA por PCR

El DNA se amplificó con las enzimas *ECOTAQ DNA Polymerase* (Ecogen), *ECOTAQ PLUS DNA Polymerase* (Ecogen) o *PfuUltra Hotstart DNA Polymerase* (Stratagene), siguiendo las indicaciones del suministrador. En cada experimento se utilizó una enzima u otra en función de las características del mismo. Cuando no se requirió alta fiabilidad de copia y los fragmentos a amplificar eran cortos (<math><3\text{ b}</math>) se utilizó *ECOTAQ*, mientras que si eran largos se utilizó *ECOTAQ PLUS*. *PfuUltra* se utilizó cuando se requirió la máxima fidelidad. Las muestras se incubaron durante 3 minutos a 94°C, seguidos de 30 ciclos de desnaturalización (45 segundos a 94°C), rehibridación (1 minuto a la T_m de

los cebadores) y polimerización (1 minuto por kb de producto a amplificar, a 72°C) [76]. Tras el último ciclo, las muestras se incubaron durante 10 minutos a 72°C para permitir que la polimerasa completase las moléculas parcialmente sintetizadas.

Debido a la riqueza en pares G+C de *M. circinelloides*, se añadió DMSO (5 %) en todas las reacciones de PCR para favorecer la amplificación.

2.6.6. Marcado de fragmentos de DNA para hibridaciones

El DNA utilizado como sonda en las hibridaciones se marcó introduciendo el nucleótido dCTP marcado en la posición α con fósforo-32 (^{32}P) (*Easytides Deoxycitydine 5'-Triphosphate*, [α - ^{32}P], Perkin Elmer) [92,93]. El marcaje se realizó con el kit *Ready-To-Go DNA Labelling Beads* (-dCTP)(Amersham), siguiendo las instrucciones del suministrador.

Tras el marcado, se añadieron 50 μl de agua bidestilada para detener la reacción de marcado. La mezcla se pasó a través de una columna de *Sephadex G-50 Fine DNA Grade* (Amersham Pharmacia) para eliminar los nucleótidos no incorporados. Esta columna se centrifugó a 360 xg durante 5 minutos, recogándose el eluido que contenía la sonda.

2.6.7. Hibridación de DNA fijado a un soporte

El DNA genómico (0,5-1,0 μg) se digirió con las restrictasas adecuadas y se sometió a electroforesis en geles de agarosa. A continuación, el gel se incubó durante 20 minutos en una solución de ácido clorhídrico 0,4 N, se lavó con agua bidestilada y se incubó durante 20 minutos en una solución de NaOH 0,4 N para desnaturalizar el DNA. Finalmente, el DNA se transfirió a una membrana de nailon (*Hybond-N⁺*, Amersham Bioscience) mediante transferencia capilar con una solución de NaOH 0,4 N durante un mínimo de 2 horas [275]. Una vez transferido, se secó el filtro a temperatura ambiente para fijar el DNA a la membrana.

La hibridación se realizó con sondas de DNA marcadas radiactivamente (Apartado 2.6.6). Dadas las condiciones de alta homología, se prehibridó a 65°C un mínimo de 4 horas con solución de prehibridación de *Denhardt's*. Tras añadir la sonda desnaturalizada por calor (10 minutos a 100°C y enfriada rápidamente en hielo), se hibridó toda la noche con la solución de hibridación de *Denhardt's* a 65°C.

Después de la hibridación se realizaron tres lavados de 20 minutos cada uno, también a 65°C y en condiciones restrictivas: un primer lavado con 2x SSC en 0,1 % SDS, un segundo con 0,5x SSC en 0,1 % SDS y un tercero con 0,1x SSC en 0,1 % SDS. Seguidamente, los filtros se pusieron en contacto con películas de alta sensibilidad *Kodak BIOMAX MS-1* y se mantuvieron a -70°C hasta su revelado.

2.6.8. Secuenciación del DNA

Los plásmidos portadores de los fragmentos clonados y los productos de PCR a secuenciar se purificaron con columnas *High Pure Isolation Plasmid Kit* y *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche Applied Science), respectivamente. La secuenciación se realizó en el Servicio de Biología Molecular del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia, utilizando secuenciadores automáticos de capilares.

2.7. Manipulación de RNA

2.7.1. Aislamiento de RNA total de *M. circinelloides*

Se siguieron dos procedimientos distintos para el aislamiento del RNA de *M. circinelloides*. En las hibridaciones tipo *northern* con RNA de la estipe silvestre y de los mutantes simples (Apartados 3.4 y 3.7), el RNA se aisló por el método rápido del Trizol (Invitrogen), siguiendo básicamente las instrucciones del suministrador. La extracción se realizó a partir de micelios frescos de las estirpes de interés crecidos en medio sólido (Tabla 2.4). En un mortero rugoso se trituraron 100 mg de micelio, en presencia de nitrógeno líquido, hasta conseguir un polvo fino. El micelio triturado se pasó rápidamente a un tubo tipo falcon con 1,5 ml de Trizol, manteniéndose en hielo y agitándose vigorosamente en un vórtex hasta conseguir una resuspensión completa. A continuación se transfirió a un tubo eppendorf de 2 ml y se centrifugó en una microcentrífuga durante 10 minutos a 13.000 r.p.m. y 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras añadir 300 μ l de cloroformo y agitar durante 15 segundos en un vórtex, se continuó la incubación a temperatura ambiente durante 3 minutos más. Seguidamente, las muestras se centrifugaron en una microcentrífuga durante 15 minutos a 13.000 r.p.m. y 4°C, recuperándose la fase acuosa que contenía el RNA. Éste se precipitó mediante una incubación de 10 minutos en hielo con 750 μ l de isopropanol, y posterior centrifugación de 10 minutos a 13.000 r.p.m. y 4°C en una microcentrífuga. El precipitado se lavó con etanol 70 % y, tras secar a 37°C durante 15 minutos, se resuspendió en 300 μ l de agua bidestilada tratada con DEPC. Las muestras se conservaron congeladas a -70°C.

En el resto de experimentos, el RNA total de *M. circinelloides* se aisló por el método del cloruro de cesio, descrito por Sambrook y Russell (2001) [275], con ligeras modificaciones [76].

2.7.2. Hibridación de RNA total fijado a un soporte

Cada muestra de RNA se preparó en un volumen total de 25 μ l, con 15-50 μ g de RNA y añadiendo 2,5 μ l de 10x MOPS, 4,4 μ l de formaldehído y 12,5 μ l de formamida (tam-

pón de carga de RNA sin azul de bromofenol ni sacarosa). La mezcla se calentó a 65°C durante 10 minutos, para eliminar estructuras secundarias del RNA, y se incubó 5 minutos en hielo. Tras adicionar 2 μ l de tampón de carga de DNA, las muestras se cargaron en un gel de agarosa del 1,2 %-1,5 % con formaldehído (2,2 M), utilizando como tampón de electroforesis 1x MOPS con formaldehído (2,2 M). Al terminar la electroforesis, el gel se lavó durante 1,5 horas con agua bidestilada y se transfirió por capilaridad durante toda la noche a una membrana de nailon cargada positivamente (*Hybond-N⁺*, Amersham Biosciences), usando como tampón 20x SSC. Por último, el RNA se fijó a la membrana mediante radiación ultravioleta (0,120 J/cm²).

La hibridación con la sonda marcada se realizó de la misma manera que para los filtros de DNA (Apartado 2.6.7), pero utilizando las soluciones de prehibridación e hibridación de NaCl y variando el último lavado, que se realizó con 0,5x SSC en 0,1 %SDS.

2.8. Manipulación de proteínas

2.8.1. Extractos de proteínas de *M. circinelloides* para western

La extracción de proteínas de *M. circinelloides* se realizó siguiendo básicamente el protocolo descrito en Murcia-Flores *et al.* (2007) [213], eliminando el Triton X-100 del tampón de lisis.

2.8.2. Extractos de proteínas de *E. coli*

Cultivos de la estirpe BL21 de *E. coli* se crecieron en agitación a 37°C durante una noche hasta alcanzar una D.O. a 600 nm de 0,6 a 0,8. Tras inducir con IPTG durante 90 minutos, incubando en agitación a 30°C, se centrifugaron los cultivos celulares a 6000 r.p.m. (Beckman J2-21) y 4°C durante 10 minutos para precipitar las células. El precipitado se resuspendió en 200 μ l de tampón de lisis por ml de cultivo. Las células se lisaron mediante sonicación en un sonicador automático *Labsonic U* (B. Braun), realizando 4 pulsos de sonicación de 15 segundos, con intervalos de 15 segundos entre cada pulso y manteniendo las muestras en hielo. A continuación, el extracto se pasó varias veces por una aguja de 23 gauges para asegurar la completa fragmentación del DNA bacteriano. Finalmente se centrifugó la muestra durante 15 minutos a 5000 r.p.m. (Beckman J2-21) y 4°C para eliminar los restos celulares.

2.8.3. Electroforesis de proteínas

La separación de las proteínas en función de tamaño se realizó mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE, Pronadisa), siguiendo el método de Laemmli (1970) [170]. Se utilizó el equipo *Mini-PROTEAN 3 Cell* (Bio-Rad)

para geles de 1,00-1,25 mm de grosor, con geles concentradores al 4 % y separadores al 7 %, 10 % o 12 % [76].

Las muestras se prepararon en un volumen total de 20 μ l, a los que se añadieron 5 μ l de tampón de carga 5x. Tras 10 minutos de incubación a 100°C, las muestras se cargaron en el gel, sumergido en el tampón de electroforesis, y se sometieron a electroforesis a 200 V durante 60-90 minutos. Como marcador de tamaño molecular se utilizó *Bench-Mark Prestained Protein Ladder* (GibcoBRL).

2.8.4. Transferencia de proteínas a membranas

Las proteínas separadas en los geles de poliacrilamida se transfirieron a un soporte sólido para ser detectadas por *western* [41, 315]. La transferencia a una membrana de nitrocelulosa (*PROTAN*, Whatman) se realizó mediante un sistema semi-seco, utilizando el equipo *Semi-Dry Electroblotting Unit* (Sigma). Las proteínas se transfirieron durante 45 minutos a 200 mA, utilizando el tampón de transferencia para proteínas.

2.8.5. Revelado de las membranas por inmunodetección (*western*)

Una vez realizada la transferencia, la membrana se sumergió durante una noche en tampón PBST con un 5 % de leche desnatada como agente bloqueante. Al día siguiente, se lavó tres veces con tampón PBST durante 10 minutos y seguidamente se incubó durante dos horas en 7,5 ml de PBST con 5 % de leche desnatada, en presencia del anticuerpo primario diluido apropiadamente (Tabla 2.6). Tras eliminar el exceso de anticuerpo con tres nuevos lavados en PBST, se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario, en 7,5 ml de PBST con 5 % de leche desnatada, siguiendo las instrucciones del suministrador. Los anticuerpos secundarios usados en los *western* fueron anti-IgGs de ratón o conejo, dependiendo del anticuerpo primario, conjugados con fosfatasa alcalina y utilizados siguiendo las recomendaciones del suministrador (Sigma). El exceso de anticuerpo secundario se eliminó mediante otros tres lavados con PBST. Los lavados y las incubaciones con los anticuerpos se llevaron a cabo a temperatura ambiente y con agitación suave y constante.

Para el revelado se utilizó el sistema *Amersham ECL Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del suministrador. Después de añadir el reactivo que contiene el sustrato fluorescente, la membrana se expuso a una película *Amersham Hyperfilm ECL* (GE Healthcare) durante períodos de tiempo que variaron desde 1 minuto a varias horas.

Una vez expuestas a la película, las membranas se tiñeron con una solución de Ponceau S durante unos minutos y se lavaron con agua destilada para visualizar las proteínas totales.

2.8.6. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en los experimentos tipo *western* y en las inmunoprecipitaciones se resumen en la Tabla 2.6.

Los anticuerpos monoespecíficos contra Mcwc-1b los generó la empresa Pacific Immunologic inmunizando 2 conejos con un fragmento de 119 aminoácidos de Mcwc-1b (de I284 a C402), expresado en *E. coli* fusionado a una etiqueta de 6 Histidinas y purificado por cromatografía de afinidad a níquel. A su vez, los anticuerpos fueron purificados por cromatografía de afinidad utilizando el mismo péptido (Pacific Immunologic). La especificidad y sensibilidad del anticuerpo se comprobó en extractos de cultivos de *E. coli* (BL21), que expresaban la proteína completa Mcwc-1b (plásmido pMAT1145).

Tabla 2.6. Resumen de los anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Diana	Mono/Policlonaes	Dilución	Origen/Referencia
anti-Mcwc-1b	Mcwc-1b	Monoclonales	1:5000	Pacific Immunologic, este trabajo
anti-CrgA1	CrgA	Policlonaes	1:1000	Lorca-Pascual <i>et al.</i> , 2004
anti-CrgA2	CrgA	Policlonaes	1:1000	Lorca-Pascual <i>et al.</i> , 2004
anti-CrgA3	CrgA	Monoclonales	1:100	Pacific Immunologic, Murcia-Flores <i>et al.</i> , 2007
anti-Ub	Ubiquitina humana	Policlonaes	1:200	Santa Cruz Biotechnology
anti- α -tubulina	α -Tubulina	Monoclonales	1:5000	Sigma

2.8.7. Análisis de la N-glicosilación de Mcwc-1b

Micelios de las estirpes silvestre (MU241) y mutante *mcwc-1b* Δ (MU244 + pLEU4), crecidos en oscuridad durante 18 horas sobre medio sólido (YNB pH 4,5), se trituraron en un mortero con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino. Las muestras se pasaron a un eppendorf al que se añadieron 500 μ l de 150 mM tampón fosfato, conteniendo 0,001 M benzamidina y una dilución 1:50 del coctel de inhibidores de proteasas (Sigma P8215). A continuación se incubaron en hielo durante 30 minutos, centrifugándose posteriormente durante 30 minutos a 10.000 r.p.m. y 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se

cuantificó la cantidad de proteína total mediante el método de Lowry [196]. Para eliminar la unión de los azúcares a residuos de asparragina, 50 μg de proteínas se incubaron con 0,1 % de SDS durante 10 minutos a 100°C, en un volumen final de 20 μl y, tras dejar enfriar en hielo, se añadió la enzima *N-glicosidasa F* (0,2 unidades/ μl) (Roche), incubando durante toda la noche a 37°C. Para su posterior análisis mediante *western*, se añadió tampón de carga 5x a la mezcla y se separaron las proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 %, comparando el tamaño de las proteínas tratadas con muestras sin tratar.

2.8.8. Análisis de la fosforilación de Mcwc-1b

Micelios de las estirpes silvestre (MU241) y mutante *mcwc-1b* Δ (MU244 + pLEU4), crecidos en oscuridad durante 18 horas sobre medio sólido (YNB pH 4,5), se trituraron en un mortero con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino. El estado de fosforilación de Mcwc-1b se analizó a partir de lisados celulares obtenidos según se describe en Murcia-Flores *et al.* (2007) [213], usando el tampón de reacción de la fosfatasa de λ como tampón de lisis. Las reacciones se iniciaron añadiendo MnCl_2 2 mM y 400 unidades de la fosfatasa de λ (*λ -PPase*, New England BioLabs) a 50 μg de proteínas, en un volumen total de reacción de 50 μl . Las mezclas se incubaron durante 30 minutos a 30°C. Los controles se realizaron en las mismas condiciones, pero sin la fosfatasa o en presencia de uno de sus inhibidores (50 mM EDTA). Los resultados se visualizaron mediante SDS-PAGE y *western*.

2.8.9. Inmunoprecipitación y análisis de la ubiquitilación de Mcwc-1b

Micelios de las estirpes silvestre (MU241) y de los mutantes simples *mcwc-1b* Δ (MU244 + pLEU4) y *crgA* Δ (MU221), crecidos en oscuridad durante 18 horas sobre medio sólido YNB (pH 4,5), se trituraron en un mortero con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino. Mcwc-1b se inmunoprecipitó a partir de lisados celulares según se describe en Murcia-Flores *et al.* (2007) [213], en el tampón de extracción de proteínas. A partir de 20 mg de micelio se obtuvo 1 ml de lisado celular, al que se añadieron 3 μg de anticuerpo monoespecífico anti-Mcwc-1b. La inmunoprecipitación se llevó a cabo incubando durante toda la noche a 4°C bajo agitación y utilizando *proteína A-agarosa* (Sigma) para purificar los complejos, siguiendo las instrucciones del protocolo comercial Cat. N° 11719408 (Roche). Las proteínas inmunoprecipitadas fueron analizadas mediante SDS-PAGE (7 %) y *western*.

La ubiquitina unida a Mcwc-1b se detectó mediante *western*, usando anticuerpos policlonales contra ubiquitina humana (dilución 1:200) (Santa Cruz Biotechnology).

2.8.10. Co-inmunoprecipitación de Mcwc-1b y CrgA

Los experimentos de co-inmunoprecipitación de Mcwc-1b y CrgA se realizaron en las mismas condiciones que en el apartado anterior, variando sólo las concentraciones de NaCl en los tampones, que se redujeron a 100 mM.

Los anticuerpos utilizados para la detección de CrgA en los *western* se describen en Lorca-Pascual *et al.*, 2004 y Murcia-Flores *et al.*, 2007 [193,213].

2.9. Rastreo genoteca en el fago λ

La genoteca genómica que se rastreó para el aislamiento de los genes *mcwc-1* de *M. circinelloides* había sido construida previamente en el vector λ -GEM-11 (Promega), utilizando DNA de la estirpe de *M. circinelloides f. lusitanicus* (CBS 277.49) [249].

2.9.1. Titulación de la genoteca

La estirpe LE392 de *E. coli* se infectó con la genoteca de DNA genómico de *M. circinelloides* siguiendo las recomendaciones del suministrador con ligeras modificaciones (Genomic Cloning Manual, Promega; [76]). Las células se cultivaron en medio LB suplementado con 0,2 % de maltosa y 10 mM MgSO₄ hasta una D.O. a 600 nm de 0,6-0,8. Tras centrifugación (5 minutos a 7.000 r.p.m) y resuspensión de las células en tampón de resuspensión, se mezcló una cantidad fija de células con alícuotas de diluciones seriadas de la genoteca preparadas en tampón de fagos y, a continuación, se sembraron con agar de cobertera sobre cajas con medio LB.

2.9.2. Transferencia de los fagos a membrana

Después de titular la genoteca, se sembraron aproximadamente 10.000 u.f.p, repartidas en 6 cajas de 13,5 cm de diámetro, siguiendo un protocolo similar al descrito en el apartado anterior. Tras la incubación, el DNA de los fagos se transfirió, desnaturalizó y fijó en membranas de nailon (*Colony/Plaque Screen* de 13,2 cm, NEN, Ma), tal como se describe en de Haro, 2010 [76].

2.9.3. Aislamiento de clones positivos tras la hibridación

Las membranas con el DNA de los fagos se hibridaron con sondas de DNA mediante la técnica descrita anteriormente (Apartado 2.6.7). Las calvas con señales positivas se recogieron de la caja de infección, con la parte ancha de una pipeta Pasteur, se colocaron en tubos eppendorf con tampón de fagos y se sometieron a una segunda ronda de hibridación que permitió aislar los clones que daban señal. Para ello, se repitió la infección de la estirpe LE392 de *E. coli* con diluciones apropiadas procedentes de las calvas recortadas.

Una vez obtenidas calvas aisladas, se trasplantaron sobre un césped de *E. coli* LE392 con ayuda de palillos estériles (30-40 calvas por señal) y se incubaron a 37°C durante toda la noche. A la mañana siguiente, el DNA de los fagos se transfirió a una membrana y se hibridó de nuevo con la sonda. Los fagos que volvieron a dar señales positivas se recuperaron de las cajas de infección tal como se ha descrito anteriormente.

2.9.4. Aislamiento de DNA del fago λ

La extracción del DNA de los fagos aislados en el rastreo se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en Sambrook and Russell, 2001 [275].

2.10. Análisis bioinformáticos

Los mapas de restricción se realizaron en el servidor BCM Search Launcher [296]. Para la traducción de las secuencias de nucleótidos a aminoácidos se usó ese mismo servidor y también el portal de anotación del JGI [112]. En la búsqueda de ORFs se utilizó el programa *ORF Finder* del NCBI [334], aunque posteriormente se comprobaron los modelos en el portal de JGI, utilizando sus herramientas para la manipulación de secuencias.

Búsqueda de secuencias homólogas y alineamientos múltiples

Los programas utilizados para la búsqueda de secuencias homólogas fueron *BLAST*, *BLAST2* Y *FASTA* [2,240,308]. Los alineamientos se realizaron con *Muscle* [85], MAFFT [154] y *Tcoffee* [229], utilizando *Tcoffee-Expresso* [7] cuando existían estructuras 3D disponibles para la comparación. En la edición y visualización de los alineamientos múltiples se usaron *Jalview* [64,331] y *Seaview* [110]. En el caso de *Tcoffee Expresso*, las estructuras terciarias que podían servir de ayuda en los alineamientos se identificaron previamente con *HHPred* [297], descargándose las secuencias de la base de datos PDB [25] e incluyéndose en el análisis sólo si mejoraban la calidad de los alineamientos.

Identificación de dominios conservados

Se trabajó con *InterProScan* (EMBL-EBI) [340], Conserve Domain Database (NCBI) [202], Pfam (Sanger Institute) [246], SMART [178] y *HHPred* [297].

HHPred es capaz de comparar dos modelos HMMs (Hidden Markov Models) entre sí. El uso de HMMs permite maximizar la información disponible tanto de la proteína de interés como en las bases de datos. Los dominios descritos en Pfam o SMART están formados por HMMs y se construyen a partir de alineamientos múltiples de las proteínas que los contienen. Estos modelos contienen información sobre las frecuencias de aminoácidos presentes en los dominios, así como datos sobre la presencia de inserciones y

deleciones. Cuando se buscan dominios en Pfam o SMART se utiliza la secuencia aminoacídica, mientras que cuando se utiliza HHPred primero se genera un modelo HMM a partir de la secuencia de la proteína, y es ese modelo el que se va a utilizar para buscar dominios en, por ejemplo, las bases de datos de Pfam o SMART. Además HHPred usa por defecto una base de datos propia (pdb70), generada a partir de las secuencias presentes en PDB y puede incorporar predicciones de estructura secundaria para los HMMs, utilizándolas para mejorar y evaluar los análisis.

Peso molecular y punto isoeléctrico

Ambos se determinaron con el programa *Compute pI/Mw* (ExPasy) [105].

Análisis filogenéticos

Se llevaron a cabo con *PhyML3.0* [114], tras alinear las secuencias y editar los alineamientos manualmente. Como soporte estadístico para los árboles se recurrió a bootstrap con 200 réplicas. Los árboles se representaron con *iTOL* [177].

Medidas de similitud e identidad

Se calcularon con *Needle* [222, 256], utilizando las mismas secuencias que en los análisis filogenéticos.

Sintenia

Las relaciones de sintenia de los genes *mcwc-1* en *P. blakesleeanus* y *R. oryzae* se exploraron con las anotaciones del JGI y del Broad Institute [140, 141, 289], basándose en las comparaciones de dominios disponibles en el JGI, pero también en la inspección manual de las secuencias, ya que algunas proteínas están ausentes en los catálogos automáticos, pero se encuentran en los modelos alternativos de las anotaciones provisionales. Se utilizó el navegador del JGI [112] (*M. circinelloides* y *P. blakesleeanus*) y *Artemis* [271] (*R. Oryzae*).

Visualización y edición de secuencias génicas

Los esquemas de las interrupciones y de las sondas utilizadas en los *southern* se realizaron con *FancyGene* [252]. Los modelos y las secuencias de los genes *mcwc-1* se construyeron sobre el portal de anotación del JGI [112], una vez estuvo disponible.

Tabla 2.7. Secuencias utilizadas en los análisis bioinformáticos

Organismo	Abreviatura del organismo	Id de la proteína ¹	Base de datos	Alias
<i>Mucor circinelloides</i>	mc	104136	JGI	<i>mcwc-1a</i>
<i>Mucor circinelloides</i>	mc	104141	JGI	<i>mcwc-1c</i>
<i>Mucor circinelloides</i>	mc	104135	JGI	<i>mcwc-1b</i>
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	pb	33858	JGI	<i>madA</i>
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	pb	77612	JGI	<i>wcoA</i>
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	pb	76314	JGI	<i>wcoB</i>
<i>Rhizopus oryzae</i>	ro	RO3G_16338	Broad Institute	<i>rowc-1a</i>
<i>Rhizopus oryzae</i>	ro	RO3G_14273*	Broad Institute	<i>rowc-1c</i>
<i>Rhizopus oryzae</i>	ro	RO3G_09997	Broad Institute	<i>rowc-1b</i>
<i>Pilobolus crystallinus</i>	pc	B8YIE3_9FUNG	UniProtKB	<i>pcmadA1</i>
<i>Pilobolus crystallinus</i>	pc	B8YIE5_9FUNG	UniProtKB	<i>pcmadA3</i>
<i>Pilobolus crystallinus</i>	pc	B8YIE4_9FUNG	UniProtKB	<i>pcmadA2</i>
<i>Neurospora crassa</i>	nc	Wc-1_NEUCR	UniProtKB	<i>wc-1</i>
<i>Neurospora crassa</i>	nc	Q9C3Y6_NEUCS	UniProtKB	<i>vvd</i>
<i>Emericella nidulans</i>	en	Q7ZA36_EMEND	UniProtKB	<i>lreA</i>
<i>Ustilago maydis</i>	um	Q4P9N3_USTMA	UniProtKB	<i>umwc-1</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>	cn	Q6DMM2_CRYNE	UniProtKB	<i>cwc-1</i>
<i>Spizellomyces punctatus</i>	sp	SPPG_02644*	Broad Institute	<i>sppg_02644</i>
<i>Spizellomyces punctatus</i>	sp	SPPG_02664	Broad Institute	<i>sppg_02664</i>
<i>Allomyces macrogynus</i>	am	AMAG_13951*	Broad Institute	<i>amag_13951</i>
<i>Microcoleus vaginatus</i>	mv	F5UBU5_9CYAN	UniProtKB	F5UBU5

¹Se indica el identificador (ID) de Uniprot [6] o de los proyectos de secuenciación de los que proviene cada secuencia (JGI [148, 149] y Broad Institute [140, 141]). * Secuencias modificadas respecto a las anotaciones automáticas del Broad Institute (las secuencias corregidas se indican en el Anexo).

Secuencias

Las secuencias utilizadas en las comparaciones con las proteínas Mcwc-1 se descargaron de UniprotKB [7] o de los proyectos de secuenciación del Broad Institute [140, 141] y del JGI [289] y se resumen en la Tabla 2.7.

En algunos casos se corrigieron las secuencias provenientes de proyectos de secuenciación con anotación provisional, cuando podían reconocerse errores de anotación evidentes en los modelos de los genes. Las secuencias modificadas se indican con asteriscos en las figuras y sus secuencias se incluyen en el Anexo.

Análisis densitométricos

Las intensidades de las señales de hibridación en los experimentos tipo *northern* (Apartado 3.4) se estimaron a partir de autoradiogramas, utilizando *Kodak Gel Logic 200 Imaging System* para la adquisición de las imágenes y *ID Image Analysis Software* (Kodak, Rochester, NY) para su análisis. En el caso de las señales en experimentos tipo *western* (Apartado 3.11) se emplearon *Image Scanner II* e *ImageQuant Analysis Software* (GE Healthcare), para adquisición y análisis de las imágenes, respectivamente.

2.11. Cebadores y sondas

2.11.1. Sondas

Las sondas utilizadas en las hibridaciones (rastros, *southern* y *northern*) se indican en las secciones de resultados correspondientes, resumiéndose en la Tabla 2.8 y en las Figuras 3.3 (sonda utilizada en los rastros) y 2.1 (sondas de los genes *mcwc-1* utilizadas en hibridaciones tipo *southern* y *northern*).

2.11.2. Cebadores

Los cebadores utilizados en las PCRs, para la construcción de sondas, fragmentos de disrupción y en la identificación de distintos mutantes se resumen en la Tabla 2.9

Tabla 2.8. Resumen de las sondas usadas en los experimentos de hibridación

Gen	Sonda	Origen	Tamaño de la sonda	Digestión/PCR
<i>mcwc-1a</i>	<i>a</i>	pMAT1110	1,6 kb	[<i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI]
	<i>b</i>		1,8 kb	[<i>Apa</i> I]
<i>mcwc-1b</i>	<i>c</i>	pMAT1118	0,7 kb	[<i>Bam</i> HI]
	<i>d</i>		1 kb	[<i>Eco</i> RV- <i>Apa</i> I]
<i>mcwc-1c</i>	<i>e</i>	pMAT1132	3,2 kb	[<i>Sac</i> I- <i>Sph</i> I]
	<i>f</i>		0,7 kb	[<i>Cl</i> aI]
<i>carB</i>	<i>carB</i>	ADN genómico	2,3 kb	Cebadores <i>carb</i> -1 + <i>carb</i> -2
<i>carRP</i>	<i>carRP</i>	ADN genómico	2,6 kb	Cebadores <i>carrp</i> -1 + <i>carrp</i> -2
<i>crgA</i>	<i>g</i>	pMAT621	1 kb	Cebadores P8 + P18
<i>rRNA 28S</i>	<i>rRNA 28S</i>	pMAT707	0,5 kb	Cebadores T7 + RU

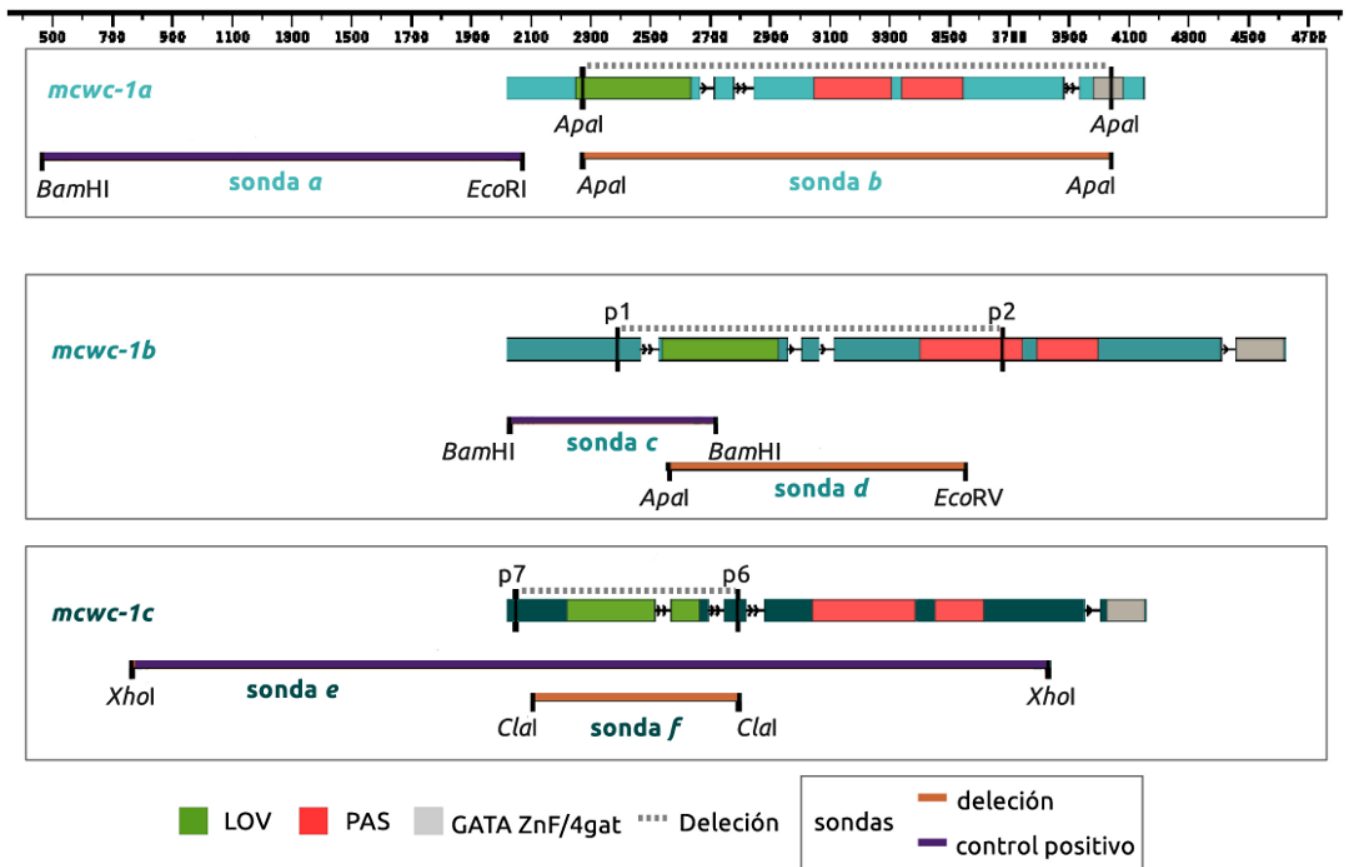


Figura 2.1. Esquema de las sondas de los genes *mcwc-1*.

Sondas utilizadas en las hibridaciones para analizar los genes *mcwc-1*. Para cada una de ellas se indican las zonas del gen *mcwc-1* con las que hibrida, los puntos de corte y cebadores más relevantes, así como las regiones delecionadas en los mutantes. Detalles adicionales de las sondas pueden encontrarse en la Tabla 2.8.

Tabla 2.9. Resumen de los cebadores utilizados

Cebador	Gen	5'-Secuencia-3*
carb-1	<i>carB</i>	TTCCCTTACTTTCTATCC
carb-2	<i>carB</i>	AGTTAAGGGAGTTAGTGCTAG
carrp-1	<i>carRP</i>	TTGGGATGTCT GCTGCTAGG
carrp-2	<i>carRP</i>	AAAAGAGAAAGAGA TAGGG
crgA-p8	<i>crgA</i>	GTCAAGACTCTTTCACGAATAG
crgA-p18	<i>crgA</i>	CCTGGCCAGCAGTATGCGAAGCGAAGGCG
mcwc-1b-p1	<i>mcwc-1b</i>	CCTGAAGATCTATGCATGTCGGCTTGATTGGATGC
mcwc-1b-p2	<i>mcwc-1b</i>	AAGAAAGATCTATGCATGTGGATCGAATGTAGC
mcwc-1b-m1	<i>mcwc-1b</i>	GATAGGCAGAAACTGCCGGTTCCTCCAGGCGC
mcwc-1b-p9	<i>mcwc-1b</i>	GCGAACTGTTGGCGTTGTACG
mcwc-1c-p6	<i>mcwc-1c</i>	AGCACAGATCTGCAGCCATCCCATCGATTGACAGG
mcwc-1c-p7	<i>mcwc-1c</i>	CGTCGAGATCTTAGCGGTCATGGTCGTGTCC
pyrG10	<i>pyrG</i>	GGCAGAAGGGAGGAGGCACACG
pyrGZ	<i>pyrG</i>	GGCATTGGGATGCTGTTGTC

*En color verde se identifican las secuencias de corte *NsiI* (compatible con *PstI*) y en rojo las de *BglII* (compatible con *BamHI*) introducidas para la generación de los fragmentos de reemplazamiento de los genes *mcwc-1b* y *mcwc-1c*.

3 Resultados

3.1. Fototropismo y fotocarotenogénesis en *M. circinelloides*

La caracterización de la fotocarotenogénesis y el fototropismo se llevó a cabo en la estirpe R7B, de la cual derivan todos los mutantes de nuestro laboratorio y que es silvestre para ambas respuestas. Micelios de esta estirpe se iluminaron con diferentes longitudes de onda, correspondientes al rojo, azul, verde y blanco, comparándose las respuestas con micelios mantenidos en la oscuridad. Los detalles concretos de los experimentos se indican en las leyendas de las figuras y en *Materiales y Métodos* (Apartado 2.2.2).

3.1.1. Fotocarotenogénesis

Los resultados de la Figura 3.1 confirman que solo en presencia de luz azul se acumula el pigmento β -caroteno, siendo totalmente ineficaces las luces roja o verde. Estos resultados concuerdan con los datos de inducción del gen *carB* por luz azul [323].

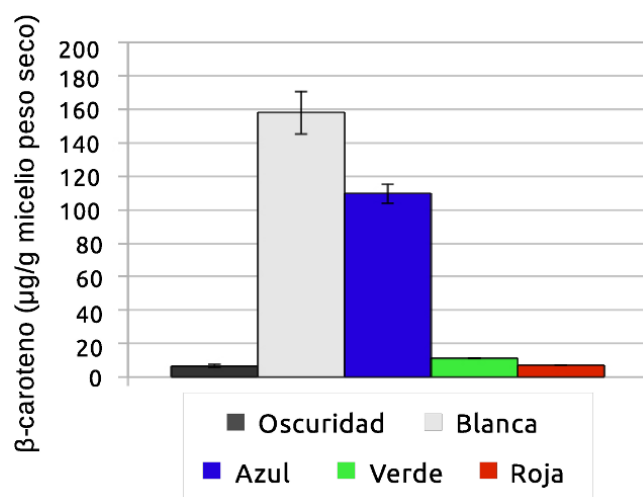


Figura 3.1. Acumulación de β -caroteno bajo diferentes tipos de luces en *M. circinelloides*.

Carotenos extraídos de la estirpe R7B, silvestre para la carotenogénesis, crecida sobre medio sólido (YNB pH 4,5 + leucina), en oscuridad (84 horas) o bajo distintos tipos de luz (60 h oscuridad + 24 h luz). Los valores representan medias \pm errores estándar de cuatro experimentos independientes.

3.1.2. Fototropismo

Cigomicetos como *Phycomyces blakesleeanus* o *Pilobolus crystallinus* presentan fototropismo en sus esporangióforos [23, 165], por lo que se analizó este comportamiento en *M. circinelloides* para ampliar su repertorio conocido de respuestas a la luz.

En los experimentos iniciales, realizados con luz blanca, se observó que los diminutos esporangióforos de *M. circinelloides* mostraban también fototropismo positivo cuando eran iluminados unilateralmente. Al analizar la respuesta frente a distintas longitudes de onda se comprobó que respondían tanto a luz azul como verde, mientras que la luz roja no indujo una respuesta fototrópica, orientándose los esporangióforos al azar de forma similar a como crecen en oscuridad (Figura 3.2).

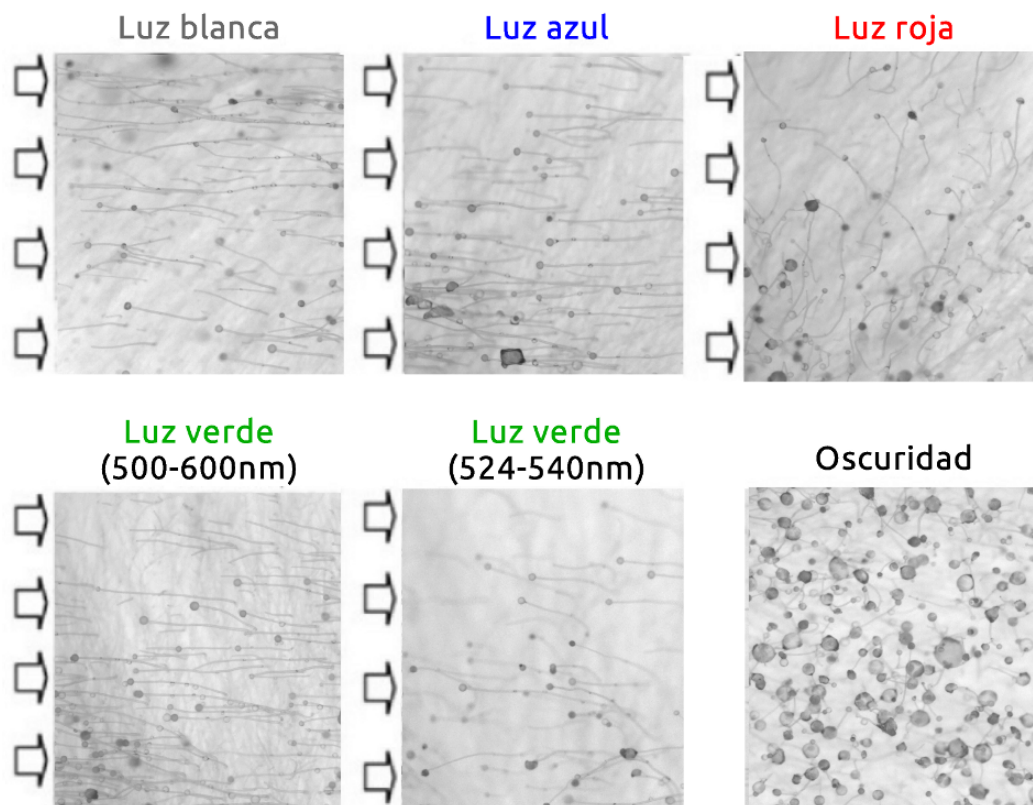


Figura 3.2. Fototropismo en *M. circinelloides*.

Micelios de la estirpe R7B, silvestre para el fototropismo, crecidos durante 3 días sobre medio sólido PDA (pH 4,5), en oscuridad o con iluminación unilateral (indicada por las flechas). Las fotos fueron tomadas perpendicularmente a la superficie del micelio usando un lupa binocular.

La respuesta a la luz verde se estudió con mayor detalle para descartar que fuese debida a la presencia de componente azul en la luz verde. Para eliminar esa posibilidad, se

analizó la respuesta fototrópica a la luz verde en un rango muy estrecho del espectro luminoso (525-540 nm). La iluminación lateral con esta luz de banda estrecha indujo un fototropismo positivo claro, aunque menos intenso que con el filtro verde de banda ancha (500-600 nm), confirmándose que los esporangióforos de *M. circinelloides* son capaces de responder a luz verde.

La existencia de estas dos respuestas a la luz en *M. circinelloides*, con espectros de acción distintos, sugirió la presencia de al menos dos fotorreceptores y dio pie a la búsqueda de sus correspondientes genes.

3.2. Aislamiento de los genes *wc-1* de *M. circinelloides*

La identificación de los genes *wc-1* de *M. circinelloides* se inició en un trabajo previo, con la búsqueda de genes que cifraban proteínas con dominios LOV [116], conservados en todos los fotorreceptores de luz azul descritos en hongos (Apartado 1.4.5). Para ello, se utilizaron cebadores degenerados, correspondientes a aminoácidos conservados en el dominio LOV de fotorreceptores de hongos (GRNCRFLQ), para amplificar por PCR cDNAs que cifrasen proteínas con ese dominio (Figura 1.9). Así, se clonó un cDNA truncado, correspondiente al gen que posteriormente se denominaría *mcwc-1a*, que permitió la identificación de las versiones genómicas de los tres genes *mcwc-1*. En aquel momento no se disponía de la secuencia del genoma de *M. circinelloides*, por lo que lo que ahora lleva minutos fue un experimento de varios meses que requirió rastrear manualmente una genoteca genómica de *M. circinelloides*.

3.2.1. Rastreo de la genoteca de *M. circinelloides* en el fago λ

Con el objetivo de clonar la versión silvestre del gen *mcwc-1a* se rastreó una genoteca genómica de *M. circinelloides* (estirpe CBS277.49), construida utilizando el fago λ GEM-11 [251], usando como sonda el cDNA truncado del gen *mcwc-1a*. Este fragmento de cDNA, de 1,8 kb, comprendía desde el dominio LOV hasta el extremo 3' del gen (Figura 3.3).

Tras dos rastreos consecutivos, con condiciones restrictivas de hibridación, se identificaron 4 clones con señales de hibridación fuertes (1, C, D y E; Figuras 3.4 y 3.6), y 9 clones con señales de menor intensidad (2 al 10; Figura 3.6). Los detalles de los experimentos se indican en *Materiales y Métodos* (Apartado 2.9).

3.2.2. Caracterización de los fagos positivos

El ADN de los fagos seleccionados se aisló y se digirió con diferentes enzimas. Los patrones obtenidos fueron analizados mediante hibridaciones tipo *Southern*, usando la

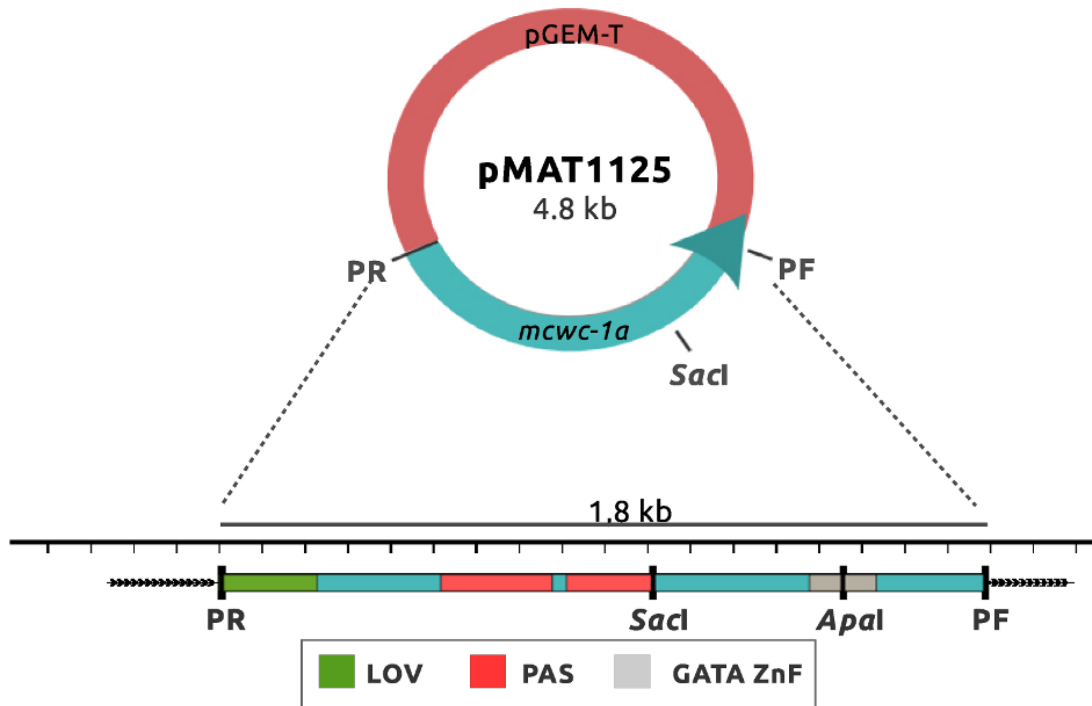


Figura 3.3. Esquema del plásmido pMAT1125.

El plásmido pMAT1125 contiene un cDNA truncado de 1,8 kb del gen *mcwc-1a* de *M. circinelloides*, clonado en pGEM-T (3,0 kb) [116]. Este cDNA se utilizó como sonda en los rastreos y en las hibridaciones tipo *Southern* para clonar los genes *mcwc-1*. Se indican los cebadores PR y PF (*universal reverse* y *universal forward*), los puntos de corte más relevantes y los dominios identificados en el fragmento.

misma sonda que en los rastreos. Los fagos se pudieron agrupar en tres conjuntos, en función de la intensidad de la señal de hibridación y del patrón de fragmentos que hibridaban con la sonda. El primer grupo estaba constituido por los clones con señal de hibridación más fuerte (1, C, D y E), el segundo por los que mostraban una señal de hibridación intermedia (3, 4, 6, 7 y 8) y el último por los que mostraban la señal más débil (2, 5, 9 y 10) (Figuras 3.4 y 3.6).

3.2.3. Subclonación de los genes *mcwc-1*

Fragmentos representativos de los tres grupos de fagos se clonaron el vector pUC18, dando lugar, tras varios pasos intermedios, a los plásmidos pMAT1110, pMAT1118 y pMAT1130 (Figuras 3.5, 3.7 y 3.8). Los fragmentos clonados se secuenciaron con cebadores específicos y universales, identificándose finalmente 3 genes similares al gen *wc-1* de *N. crassa*. Estos genes se denominaron *mcwc-1a*, *mcwc-1b* y *mcwc-1c* (por *Mucor circinelloides wc-1*).

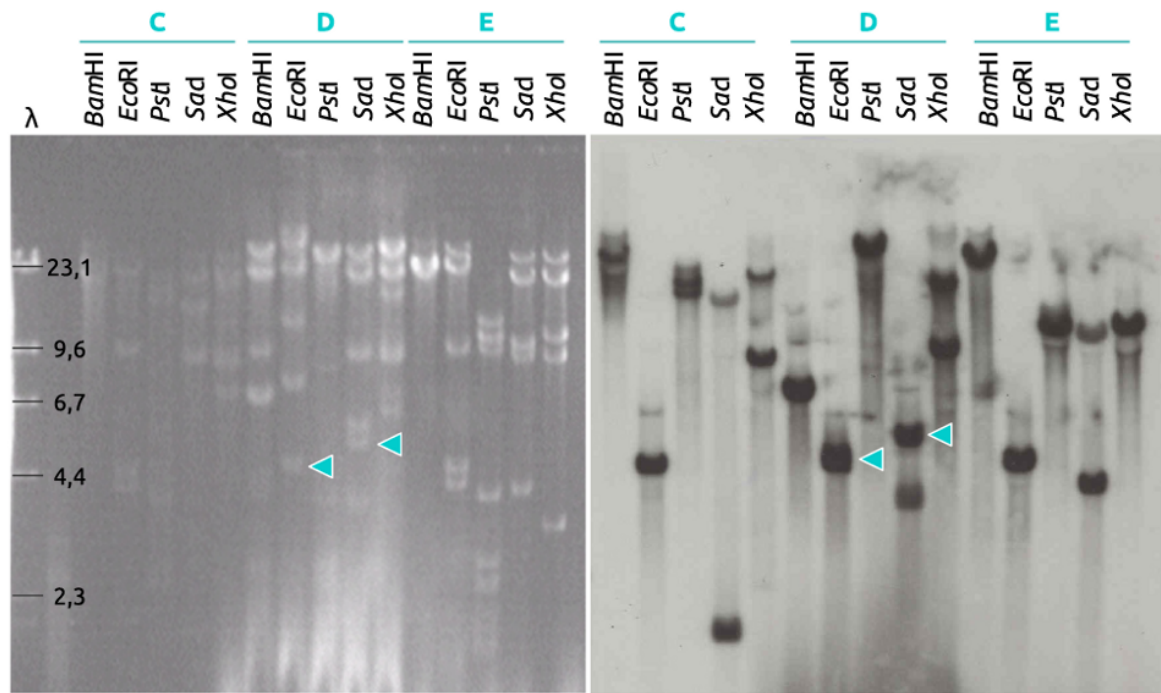


Figura 3.4. Análisis del DNA de los fagos C-E del rastreo de la genoteca.

DNA aislado de los clones del fago λ (C-E) que mostraron hibridación positiva con la sonda de cDNA de *mcwc-1a* (pMAT1125), se digirió con las enzimas *Bam*HI, *Eco*RI, *Pst*I, *Xho*I y *Sac*I (imagen de la izquierda). Una vez transferido el DNA a una membrana, se hibridó con la misma sonda usada en el rastreo de la genoteca (imagen de la derecha). Con triángulos azules se indican los fragmentos de DNA clonados para la secuenciación y construcción del plásmido pMAT1110 (gen *mcwc-1a*, Figura 3.5).

λ : Marcador λ + *Hind*III; DNA del fago λ digerido con *Hind*III. Los tamaños de los fragmentos en kb se indican a la izquierda de la imagen.

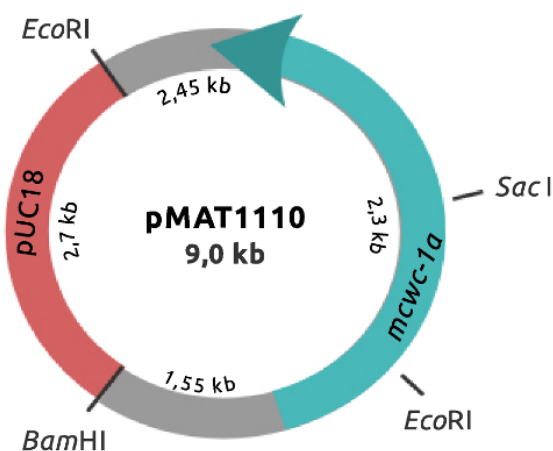


Figura 3.5. Esquema del plásmido pMAT1110.

Plásmido obtenido uniendo los fragmentos *Sac*I de 5,5 kb y *Eco*RI de 4,5 kb del fago D, tras eliminar las secuencias solapantes y acortar el extremo *Sac*I mediante digestión con *Bam*HI. Contiene una copia silvestre del gen *mcwc-1a* y secuencias adyacentes (1,55 kb aguas arriba y 2,45 kb aguas abajo del gen).

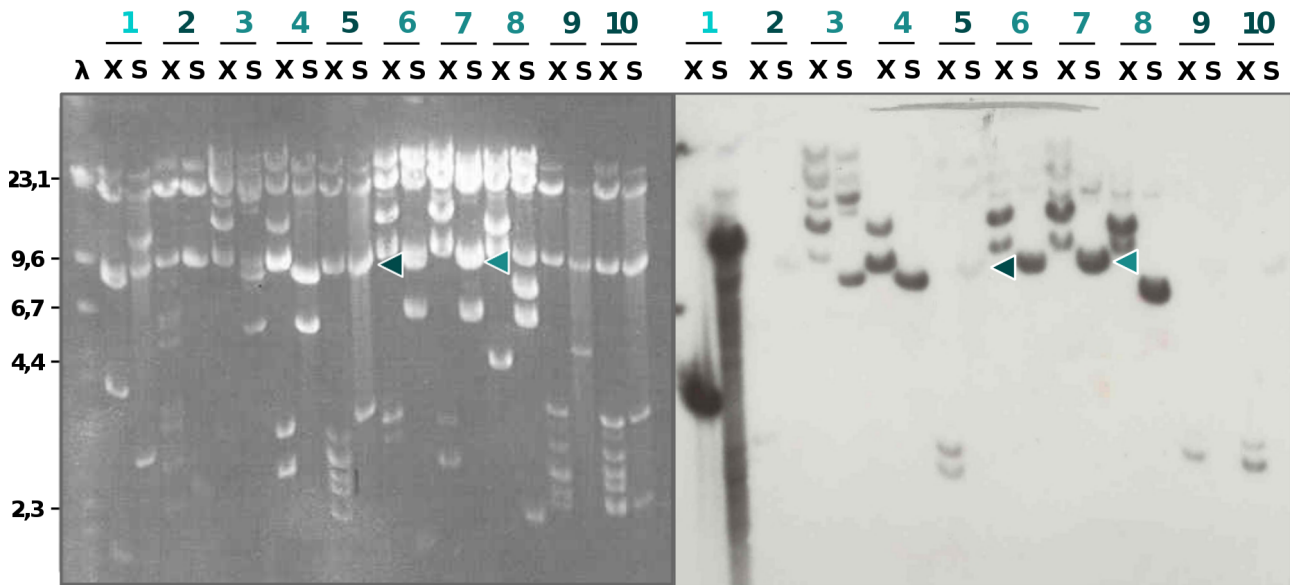


Figura 3.6. Análisis del DNA de los fagos 1-10 del rastreo de la genoteca.

DNA aislado de los clones del fago λ (1-10) que mostraron hibridación positiva con la sonda de cDNA de *mcwc-1a* (pMAT1125), se digirió con las enzimas *XhoI* (X) y *SacI* (S), (imagen de la izquierda). Una vez transferido el DNA a una membrana, se hibridó con la misma sonda usada en el rastreo de la genoteca (imagen de la derecha). Se aprecia la diferencia en señal de hibridación de los tres grupos de fagos seleccionados: fuerte (1), intermedia (3, 4, 6, 7 y 8) y débil (2, 5, 9 y 10). Con triángulos azules se indican los fragmentos inicialmente clonados para la secuenciación y construcción de los plásmidos:

pMAT1130 : [Fago 5 + *SacI*] (9 kb) (gen *mcwc-1c*).

pMAT1118 : [Fago 7 + *SacI*] (9 kb) (gen *mcwc-1b*).

λ : Marcador λ + *HindIII*; los tamaños de los fragmentos en kb se indican a la izquierda de la imagen.

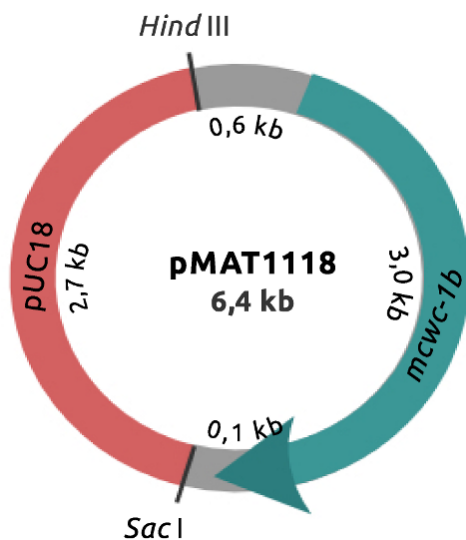


Figura 3.7. Esquema del plásmido pMAT1118.

Plásmido obtenido a partir del fragmento *SacI* de ~ 9 kb del fago 7, tras acortar un extremo con *HindIII*. Contiene una copia silvestre del gen *mcwc-1b* y secuencias adyacentes (0,6 kb aguas arriba y 0,1 kb aguas abajo del gen).

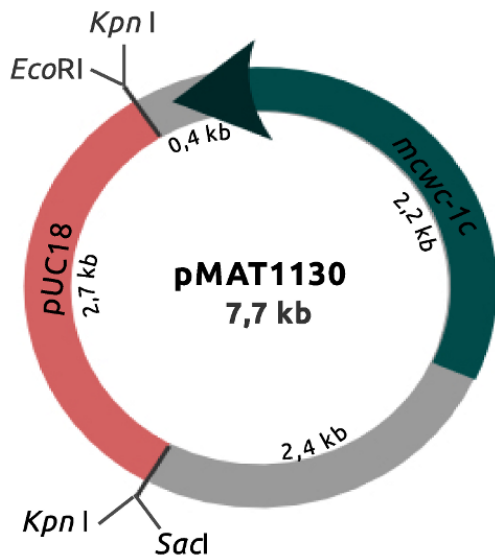


Figura 3.8. Esquema del plásmido pMAT1130.

Plásmido obtenido a partir del fragmento *SacI* de ~9 kb del fago 5, tras subclonar digiriendo con *KpnI*. Contiene una copia silvestre del gen *mcwc-1c* y secuencias adyacentes (2,4 kb aguas arriba y 0,4 kb aguas abajo del gen).

3.3. Descripción de los genes *mcwc-1*

Las secuencias correspondientes al fago D (Figura 3.4), con señal de hibridación fuerte, contenían la versión genómica del gen *mcwc-1a* (EMBL: AM040841; JGI: *scaffold_02*: 3289006-3291345, modelo: *Muccil.FSI_gw1.2.188.1*) (Figura 3.9). Los fragmentos derivados de los dos grupos de hibridación débil, fagos 5 y 7, correspondían a otros genes de tipo *white-collar-1*, similares al gen *mcwc-1a*. Estos genes se denominaron *mcwc-1b* (JGI: *scaffold_08*: 1833488-1836241, modelo: *Muccil.FSI_FSI_estExt_fgeneshMC_pg.C_70542*) (Figura 3.10) y *mcwc-1c* (JGI: *scaffold_03*: 4689103-4691323, modelo: *Muccil.FSI_estExt_fgeneshMC_kg.C_30374*) (Figura 3.11).

Las secuencias intrónicas y los lugares de inicio de la transcripción se confirmaron con experimentos de 5' RACE (realizados por el Dr. Eusebio Navarro) y con la secuenciación de ESTs realizada por el JGI. Estos modelos génicos dan lugar a las proteínas Mcwc-1a (Uniprot: Q14SS7; JGI: 104136) de 649 aminoácidos, Mcwc-1b (JGI: 104135) de 793 aminoácidos y Mcwc-1c (JGI: 104141) de 634 aminoácidos.

3.3.1. Estructura de los genes *mcwc-1*

El gen *mcwc-1a* está constituido por 3 intrones y 4 exones (Figura 3.9). En los genes *mcwc-1b* y *mcwc-1c* se identificaron cuatro intrones, tres de ellos conservados en *mcwc-1a* y el cuarto localizado en una posición no conservada aguas arriba de los otros intrones (Figuras 3.10 y 3.11).

3.3.1 Estructura de los genes *mcwc-1*

```
GCAGCCAATCATACCTGCTATCAATCAAAAAGGAAACCATCTTTTTTCTTGCTTTCGGGTGTATAAAAAGAGAAC
- 60 CAGCAGCATTCTTTTCTGCTGGTCTCTCTTTTCTTCCATTTTTACTCTTCAATCAAAATGGCTCATTATCAGCAGCA
    MAHYQQQ
21 GCAGCAACAACTGCCACAGCAAGCGAATTCAATATTCCTGGTCTGACGCAGCCGGTGGTGAACGATCAGCAATTGGCAG
    QQQTATASEFNIPGLTQPVVNDQQLA
101 AGATCCCACCATTGACTTGGCTCCTGTGGAGGTAGAGCAGACATCAGAGGCCCTCTAACCGGCGTCTACTCTAGCTCA
    EIPTIIDLAPVEVEQTS EAPLTGVYSSS
181 GGCTTTGATTTTGTGGCGTCTTGCCAAGCTCGTCAACAGACCCAAACCTCAAATCAATTTGGGCCCATCGACATGTC
    GFD FVGLSKLVNRPNPQINLGPIDMS
261 ATGTTCTTTTTGGTCACAGATGCTCGCCAGTACGATTGCCCATTTGCTATTGCTCTCCACCTTTGAGAATTTGACAG
    CSFLVT DARQYDCPIVYCSPTFENLT
341 GCTATCTGGCAAACGAATCGTGGCCGCAACTGCCGTTTCTTGACGGCTCCTGATGGCCAAGTGACCTGTGGCTCTGT
    GYLANEIVGRNCRFLQAPD GQVTCGSR
421 CGTACGTATACCGATAACCAAGGCTGTGTATCACTTGAAGGCGCAAATGTTGCAAACAAGGAGCACCAAGCATCCATTAT
    RTYTDNQAVYHLKAQMLQNK EHQASII
501 CAATTACAGAAAGGGTGGCCAGCCATTTGCAATCTCATCACTGTATCCCATCTGCAACGATAACAACGAGGTGCGCT
    NYRKG GQPFVNLITV IPI CNDNNEVA
581 TTTTCGTGGTTTGCAGGTTGATCTTGTAGAGCAGCCTAATGCCATCTTGGAAAAGATGAAAGGTACGTACACCAACGTT
    F FVGLQVDLVEQPNA ILEKMK
661 TCACTGATGCATAAATCTGACTGATTTATTATAGATGGTACTTATATGGTCAACTACCAACAGATGAACATTCCACCTTA
    DGTYMVN YQQMNIPPY
741 TATTCCTGGTAGCAGTAAGTAGTAGAACACTGCATGTACACACAGGGATACTGACCCAGCGTCTTTTTTTCTCTCTC
    I P G S
821 TAAGGCTTCAGTTCCGAGCCTGTTGATGACTACTCCGAGAGTTGCCTACCACAGCTCCTGCATCCTCCACATTGGCCTC
    G F S S E P V D D Y F R E L P T T A P A S S T L A S
901 TCCTGAAATCCTGGAACCTGTGAGCTGTGCTGGTACAAACGAAACAGCTGCAACAAGAGTGAACAAGCTGTGCTGTGG
    P E I L E L V S C A G D N E Q Q L Q Q E W N K L L L
981 ATCAATCCGAGGACTTTATCCATGTGCTTTCTGTTGAAGGGCTTCTTCTTGTACTGCTCTCGCTCCTCGTCTCATTGCTG
    D Q S E D F I H V L S L K G F F L Y C S R S S S H L L
1061 GAGCAGGATCCTGAGGAGTTGGTGGCCATCCCTTGTATCCATCTGCCATCCCTCTGACATTGTCCCTGTGATGCGTGA
    E H D P E E L V G H P L S S I C H P S D I V P V M R E
1141 GATCAAGGAAGCTGCTAGCAACACGGACAAGGTCGTCAATCTCATCTTCCGTGTGCGCCGCAAGTACTCTGGCTACATGT
    I K E A A S N T D K V V N L I F R V R R K Y S G Y M
```



Figura 3.9. Secuencias genómica y aminoacídica del gen *mcwc-1a* y de la proteína Mcwc-1a. Se indican los exones codificantes en rojo, las regiones UTR (*UnTranslated Regions*) en azul y los intrones en negro. En la parte inferior se muestra un resumen de la estructura génica, con el mismo código de colores, indicando los tamaños de los exones e intrones en pares de bases. Modelos construidos utilizando el portal del JGI [112].

3.3.1 Estructura de los genes *mcwc-1*

- 162 GGTATTTGCGGGATCTTTACAGTTGTCTCTTTCTCTCCAAAAGGACCTCTGTTGATAGACATCCCCTTCTTTTCTTT

- 82 TTAATCTCTCTCTCTCTGTTATATATGAATCAACCCCTTCTCCTCTTCTTCTTGGCCTTCGTAATACCTGTACA

- 2 TTATGGATCCGTTTCAATCTTTGGGTCAATCAACCCGCAAATCTATGAGAGCAGCAATGTGCCGCCGTCTCTGATAAG
M D P F Q S L G Q F N P Q I Y E S S N V P P S S D K

79 TTGTTCTCGTTCAGTGGGTTCCAAGCTGGACTGATGACAAACCAGACATCCTCCATGCAGGCACCGAGCGCAATTTACA
L F S F S G F Q A G L M T N Q T S S M Q A P S A N L Q

159 GCAGCAACAGCCCAGGCCACATAGCATACCGTCGCAACAGCATTTTATACAGCAACCACAGCAGCCATTTATACCGCCTC
Q Q Q P R P H S I P S Q Q H F I Q Q P Q Q P F I P P

239 AACAGCACCATCGCAACCGCAATTGCAGCATGCCATGATGCAGCCCTCAGGCACAGCATCCATGAACCACTTCTTGCCC
Q Q A P S Q P Q L Q H A M M Q P S G T A S M N H F L P

319 TCTGCTCCACCGCCAGTACTGCCTCCATCGTCCGCATCCAATCAAGCCGACAGCGGCCGTATTGAGGCATGATGCCAA
S A P P P V L P P S S A S N Q A D S G R Y S G M Y A N

399 CACGGGCTTTGATATGCTCTCCATCTTATCGCGCGTGGCTAATAGGTACACTGTATTGCATGACATCTACCGCCGCTGC
T G F D M L S I L S R V A N

479 CAATGTAATAACAGCCAGAATTCTCCATCAGACCAAACCTCAAATCAACTGGGGCCCGTTGATTTGTCGTGCTCTTTT
R P N P Q I N L G P V D L S C S F

559 GTTGTGTTGATGCAAAAACAATACGATTTTCCGCTTGTTCACGCTCGCCCATGTTTGAGAGATTGACGGGATACGCCCC
V V V D A K Q Y D F P L V Y A S P M F E R L T G Y A P

639 AAGCGAAGTGATAGGCAGAAACTGCCGTTCTCCAGGCGCCGACGGCAGAGTCGCTATTGGATCCAGACGAAAGTACA
S E V I G R N C R F L Q A P D I G R V A I G S R R K Y

719 CGGACAACACCACAGTGTACCACATCAAAACACACATGGTGCAGGGCAAAGAGTCGCAATCCAGCATCATCAACTACCGA
T D N T T V Y H I K T H M V Q G K E S Q S S I I N Y R

799 AAGACGGGACAGCCCTTTGTCAATCTGTTGACGGTGTATCCCATTCGCTGGGAGTCGTGAGAGGACATTGACTACTTTAT
K T G Q P F V N L L T V I P I A W E S S E D I D Y F I

879 TGGACTGCAGGTGGATCTGGTAGAGCAGCCAAATTCATCTTTCAAAGCATGAAGGGTACGTGATAGTAGCATAGCA
G L Q V D L V E Q P N S I F Q S M K

959 GAGACACGGCACTTATTCTCTGTTAAAGACGGCACCTATTCTGTCAGCTATCGCAATTCACCATCCCTCCCTCCATT
D G T Y S V S Y R N S T I P P S I

1039 AAGGTAGGCGCTTGTGATGCGAGTGTGTTGATCCATTAAACCAGTAGTTTTGTAGCGGGCCTCAGCATCAATGCTGAT
Q A G L S I N A D

1119 CCAGGCGCTGCCATGGCAGAACCCATTACGGAGTGGACGAGGCCCGTGTACCCAAGCCAACGTACAACGCCAACAGTTC
P G A A M A E P I T E W T R P V S P K P T Y N A N S S

1199 GCAGCAGCCCCATCATACAGCAGTAACCTGCCGAGCAAAAATGCCTCCATCACAGAAAGCGCCATCGTGCCATCGCAGC
Q Q P H H T A V T L P S K N A S I T E S A I V P S Q



Figura 3.10. Secuencias genómica y aminoacídica del gen *mcwc-1b* y de la proteína Mcwc-1b. Se indican los exones codificantes en rojo, las regiones UTR (*UnTranslated Regions*) en azul y los intrones en negro. En la parte inferior se muestra un resumen de la estructura génica, con el mismo código de colores, indicando los tamaños de los exones e intrones en pares de bases. Modelos construidos utilizando el portal del JGI [112].

3.3.1 Estructura de los genes *mcwc-1*

- 109 CGGTGCTATTACAGCCAGATCCTGCAAAAACCTTAAAAGGGAGAAAAGCGCAAATTATTTATCCCTTCTTTCTCTCTATC

- 29 TCTTTCTTTTTAATCAGAAACATTTACCATGATGAACAACCTCTATTTCAATGGACACGACCATGACCGCTACCGCAACG
M M N N S I S M D T T M T A T A T

52 ACGACGCTTACAACCACCAGCCACCACCATCGATGCTGTCCAAGACATCAATCCCAGTATCATGAGTCCACCGCTTGC
T T L T T T S P P P S M L S K D I N P S I M S P P L A

132 GGGTGTTTACTCCAACACTGGATTTGATATGATCAACATCTTATCGCGACTCATGAACAGACCAATCCACAGATCCAAT
G V Y S N T G F D M I N I L S R L M N R P N P Q I Q

212 TGGGCCCAATTGATCTGTCTGCTCCTTTGTCGTGTGGATGCGCGTCAGTACGACTGTCCAGTCACTATTGCTCGCT
L G P I D L S C S F V V S D A R Q Y D C P V I Y C S P

292 GCTTTTGAGAGACTCACGGGCTACACCAACAACGAGATTGTGGGCAAGAATTGCAGGTTTCTACAGAGCCCGATGGCCA
A F E R L T G Y T N N E I V G K N C R F L Q S P D G Q

372 GGTCACTTGCAGCTCAAGACGCCAGCACCGGACAACAGGCTGTCTACCATCTGAAGGCTCAATTGAATCAAGGAAAGG
V T C G S R R Q H T D N Q A V Y H L K A Q L N Q G K

452 AGCACCAAGCCAGTATCATCAACTATCGCAAAGGCGGACAGGTAAAATGGCACTTTGGGCGGGATCTTTACATGTCTGT
E H Q A S I I N Y R K G G Q

532 GACAGCCTTTATCTATAGCCGTTTGTCAATCTGGTTACCGTGATACCGATCCTGGTGACAATGGCCAAGTGGACTATTT
P F V N L V T V I P I L G D N G Q V D Y F

612 TGTGGGTTTGCAGGTGGATTTGGTGGAGCAGCCCAATTCATCTTGGAGAAAATGAAGGTTGAGTTTTGAGTGTGTCT
V G L Q V D L V E Q P N S I L E K M K

692 GTGCCACTCTTTCTTAACGCTCGGGGCAATTATAGATGGCACGTATTTGATCAACTATCATCAAAGCACAAAGCGTATTAC
D G T Y L I N Y H Q S T S V L

772 CATCCCATCGATTGACAGGTGCAGCAGGTAAAGAGTGAAAAAAAACACTACGCTCCAGGCGCCTGACATGCTGACATTGGAC
P S H R L T G A A

852 GTGTGTATAGGAAACGACAGCAATTTGCTAGGTTTCGAATCCTCCATGGACGACTATTTCCGTGAGATTCTAGCTCC
G N D S N L L G F E S S M D D Y F R E I P S S

932 AACACAGCAACAGACATCATCAGCCTACTGGATGCGACTCGTATTGACTATGACGATCCAGGCTTCAACGAGCAGCAGAT
N T A T D I I S L L D A T R I D Y D D P G F N E Q Q I

1012 ACAAAGGAGTGAAACCAGCTTTTACTGGACCAAAGCTGCGATTTTCATCCACGTCTTGTGCTTAAAGGTGCTTTTTGT
Q K E W N Q L L L D Q S C D F I H V L S L K G V F L

1092 ATGTGTCCAACCTCAAGCGCCTCCATGTTGGAATACGAGCCAGAGGAACTATTAGGAAACTCACTCAGTTC AATTTGCCAT
Y V S N S S A S M L E Y E P E E L L G N S L S S I C H

1172 CCTTCGACATCATACCGTCCATGAGAGAAATCAAAGAGGCCACCTCCAATCCAGACAAGATGATCAACCTGCTGTTTAG
P S D I I P V M R E I K E A T S N P D K M I N L L F R

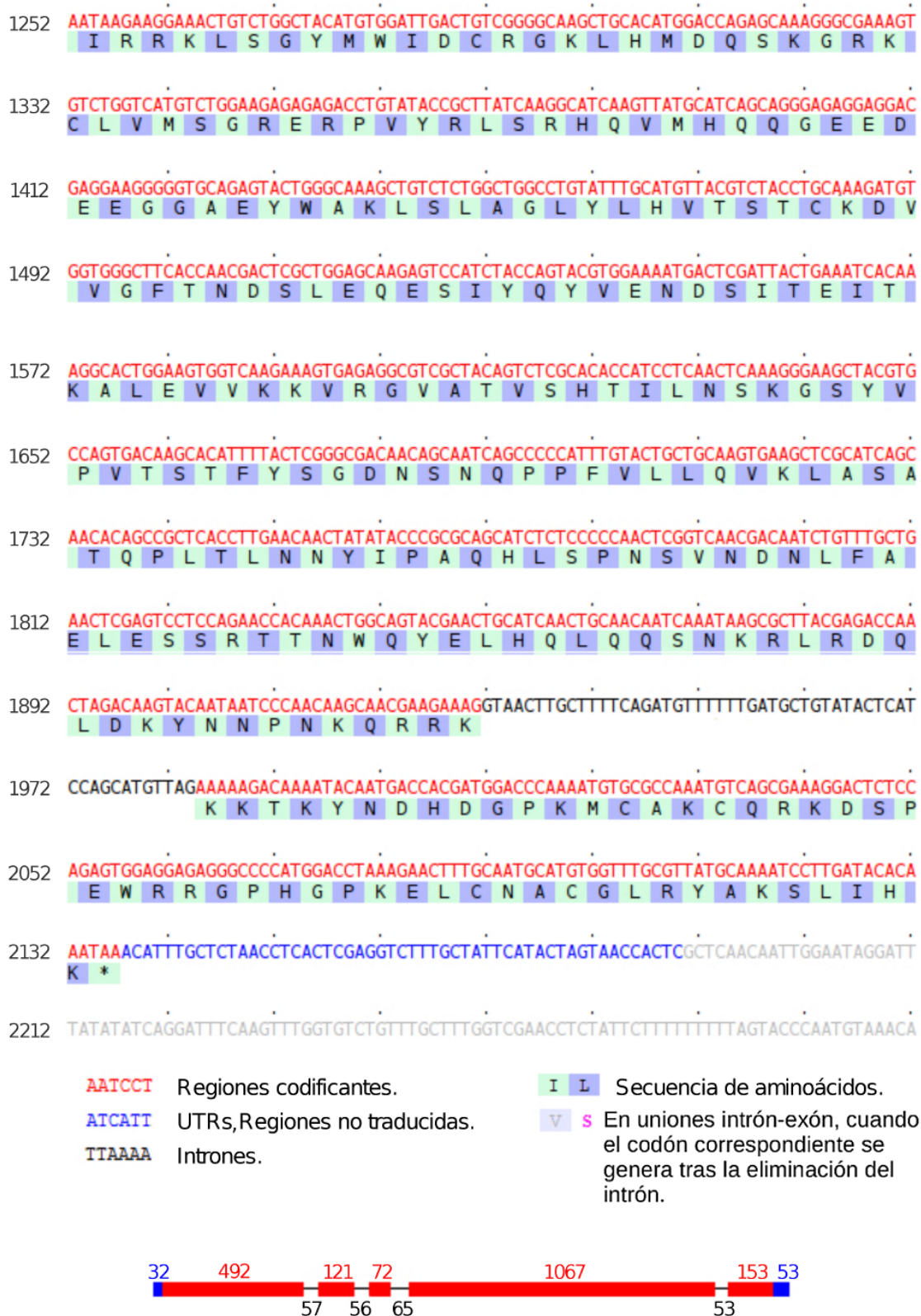


Figura 3.11. Secuencias genómica y aminoacídica del gen *mcwc-1c* y de la proteína Mcwc-1c. Se indican los exones codificantes en rojo, las regiones UTR (*UnTranslated Regions*) en azul y los intrones en negro. En la parte inferior se muestra un resumen de la estructura génica, con el mismo código de colores, indicando los tamaños de los exones e intrones en pares de bases. Modelos construidos utilizando el portal del JGI [112].

3.3.2. Descripción de las proteínas Mcwc-1

Las proteínas Mcwc-1 son muy similares entre ellas y tienen una estructura parecida a Wc-1 de *N. crassa* (Figura 3.12 y Tabla 3.1). A continuación se describen los distintos dominios encontrados en las proteínas Mcwc-1 utilizando distintos programas informáticos.

Dominios LOV

Las tres proteínas Mcwc-1 poseen dominios LOV (PAS_A/LOV) con los 11 residuos necesarios para el contacto con el cromóforo de flavina [72] y con la cisteína conservada que participaría en la formación del aducto [153] (Figura 3.13). Estos dominios se localizaron usando dos bases de datos distintas:

Mcwc-1a: aminoácidos 87-204 (PF13426, PAS_9, *e-value*: 1,3e-18) utilizando PFAM o aminoácidos 77-205 (SM000091 + SM000086, PAS + PAC, *e-values*: 9,54 y 7,3e-4, respectivamente (ambos significativos)) utilizando SMART.

Mcwc-1b: aminoácidos 161-279 (PF13426, PAS_9, *e-value*: 1,2e-15) utilizando PFAM o aminoácidos 151-289 (SM000091 + SM000086, PAS + PAC, *e-values*: 2,01 y 6,7e-3, respectivamente (ambos significativos)) utilizando SMART.

Mcwc-1c: aminoácidos 77-194 (PF13426, PAS_9, *e-value*: 5.3e-21) utilizando PFAM o aminoácidos 77-205 (SM000091 + SM000086, PAS + PAC, *e-values*: 1,4 y 5,6e-5, respectivamente (ambos significativos)) utilizando SMART.

Es de destacar que las tres proteínas poseen el lazo extendido de 11 aminoácidos entre las hélices A y C, típico de hongos y que permitiría acomodar el cromóforo FAD [45,58,73].

Otros dominios

Adicionalmente, Mcwc-1a y Mcwc-1c presentan dos dominios PAS, un dominio de localización nuclear (NLS) y un dominio dedo de Zn tipo GATA (Zn-Finger), siendo su organización idéntica a la de Wc-1. Su posición e identificación se describen a continuación:

- **Mcwc-1a:** **PAS_B:** aminoácidos 163-395 (SM000091 (PAS) + SM000086 (PAC), *e-values*: 1,18e-8 y 299, ambos significativos según SMART); **PAS_C:** aminoácidos 400-468 (SM000091, *e-value*: 24,5 significativo según SMART); **Zn_GATA:** aminoácidos 589-641 (SM000401, *e-value*: 2,16e-13); **NLS:** aminoácidos 563-579, señal de localización nuclear bipartita: RKLKEQLENYANPKRRK (identificada utilizando *PSort2*).



Figura 3.12. Arquitectura de las proteínas Wc-1 de hongos.

Los tamaños de las proteínas y la posición de los distintos dominios se representan a escala. Las secuencias utilizadas se resumen en la Tabla 2.7, donde se indica el organismo de procedencia y sus identificadores en las distintas bases de datos utilizadas. Los dominios se identificaron utilizando principalmente Pfam y SMART [178, 246] (véase apartado 2.10). El dominio *4gat_A*, presente en las proteínas de tipo Mcwc-1b de cigomicetos, corresponde con un dominio dedo de Zn tipo GATA definido en PDB (base de datos de estructuras terciarias [25]) y reconocido por el programa HHPred [297].

3.3.2 Descripción de las proteínas Mcwc-1

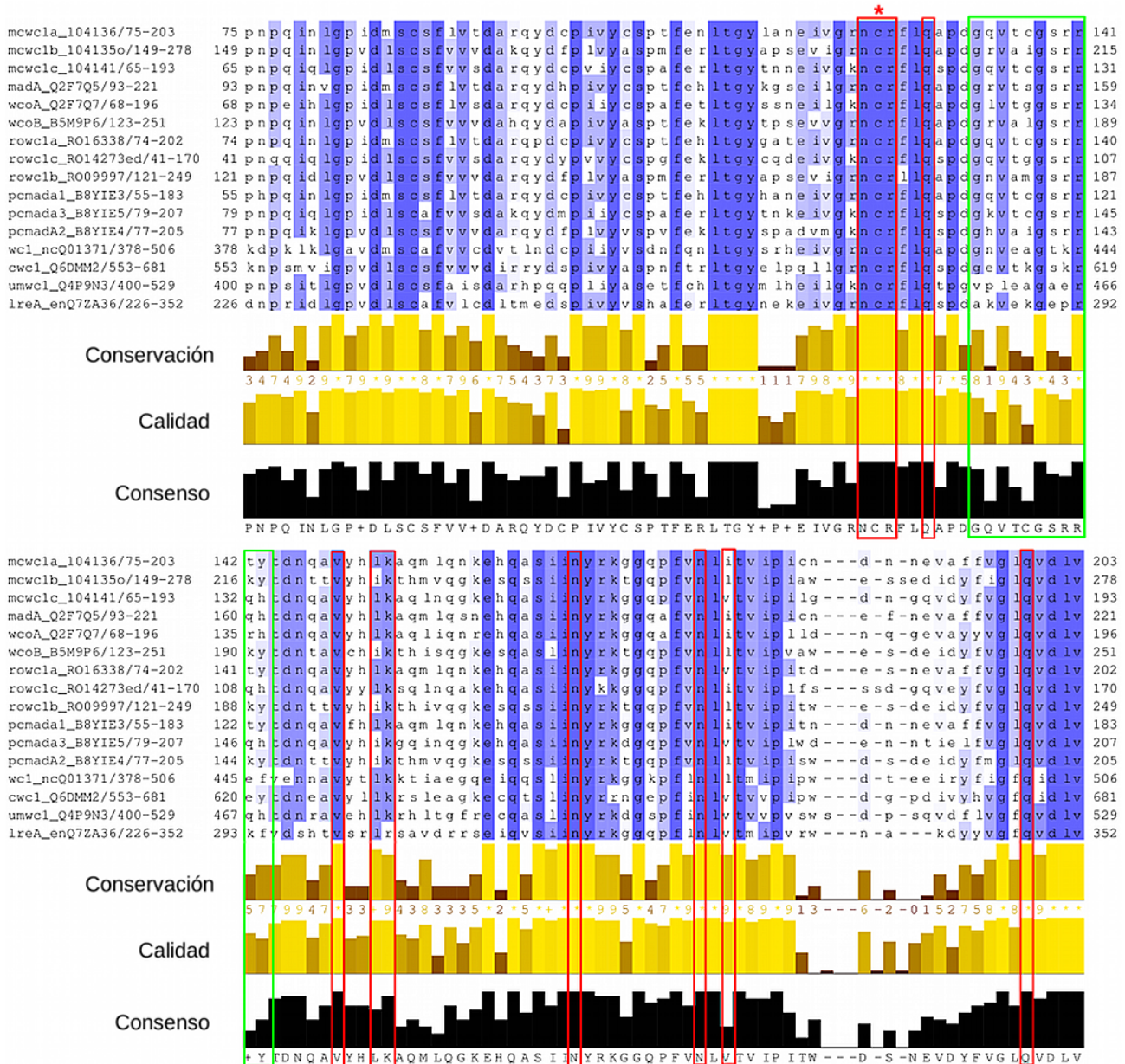


Figura 3.13. Alineamiento de los dominios LOV de Wc-1s de hongos

Alineamiento generado con *T-Coffee* [229] (combinado con *Muscle* [85] y *MAFFT* [154]) y representado con *Jalview* [331]. El sombreado en azul indica el grado de conservación e identidad (cuanto más intenso mayor grado de conservación). Las columnas recuadradas en rojo indican los 11 residuos esenciales para la unión del cromóforo, la cisteína que forma el aducto excitado está marcada con un asterisco rojo y las columnas recuadradas en verde indican los residuos que forman la extensión entre los lazos A y C, necesaria para el acomodamiento de FAD. Los identificadores de las proteínas utilizadas en el alineamiento se indican a la izquierda y corresponden a: *M. circinelloides* Mcwc-1a, Mcwc-1b y Mcwc-1c (JGI [148]); *P. blakesleeanus* MadA, WcoA y WcoB, (Uniprot [6]); *R. oryzae* Rowc-1a, Rowc-1b, Rowc-1c (Broad Institute) [141]; *P. crystallinus* Pcmada-1, Pcmada-2, Pcmada-3 (Uniprot [6]); *N. crassa* Wc-1_nc (Uniprot [6]); *C. neoformans* Cwc-1 (Uniprot [6]); *U. maydis* Umwc-1 (Uniprot [6]); *E. nidulans* LreA (Uniprot [6]). Debajo de cada columna se indica el grado de conservación, la calidad del alineamiento y la secuencia consenso. El dominio LOV se delimitó según el modelo definido por SMART y PFAM.

- Mcwc-1c: **PAS_B**: aminoácidos 281-396 (SM000091 (PAS) + SM000086 (PAC), *e-values*: 5,56e-9 y 30,7 ambos significativos según SMART); **PAS_C**: aminoácidos 418-472 (SM000091, *e-value*: 6,00e-12); **Zn_GATA**: aminoácidos 592-634 (SM000401, *e-value*: 5,21e-7); **NLS**: aminoácidos 578-584, señal de localización nuclear PNKQRRK (identificada utilizando *PSort2*).

La proteína Mcwc-1b contiene también los dos dominios PAS ((**PAS_B**: aminoácidos 402-517 (SM000091 (PAS) + SM000086 (PAC), *e-values*: 1,62e-10 y 25,5, respectivamente); **PAS_C**: aminoácidos 533-601 (SM000091, *e-value*: 16,5), todos significativos según SMART)) y la secuencia de localización nuclear PDVKKKG (aminoácidos 665-671, identificada utilizando *PSort2*). Por el contrario, no posee un dominio canónico de dedo de zinc tipo GATA, ni se reconoce este dominio utilizando *HMMER* contra las bases de datos de Pfam o SMART. Sin embargo, utilizando el programa *HHPred* [297], muy potente para la identificación de homología remota, sí se obtienen alineamientos con estructuras de dominios dedo de zinc tipo GATA. *HHPred* utiliza alineamientos múltiples para generar HMMs (*Hidden Markov Models*) que comparará con bases de datos de alineamientos múltiples, igualmente compuestas por HMMs, como Pfam o SMART. El análisis también combina la información estructural procedente de la base de datos PDB (*Protein Data Bank*) [25] y las predicciones de estructura secundaria para los HMMs. De esta forma, *HHPred* logra una mayor sensibilidad dando muy buenos resultados para la búsqueda de homólogos remotos, basándose en el hecho de que la estructura de un dominio está mucho más conservada que su secuencia. Así, el programa *HHPred* alinea la secuencia de Mcwc-1b con un dominio dedo de Zn tipo GATA, el dominio *4gat_A* de la proteína AreA de *A. nidulans* (*e-value* 8,8e-13, Probabilidad = 99,9 %, mientras que utilizando la secuencia de Mcwc-1a se obtiene un *e-value* de 2,5e-16) (Figura 3.14). AreA es un factor transcripcional tipo GATA típico de hongos, que media la represión por metabolitos de nitrógeno dependiendo de la abundancia de nitrógeno en el medio [168] (Figura 3.14). Además, los pares de cisteínas, que son los elementos característicos de los dominios de dedo de zinc, están conservados en Mcwc-1b, aunque la distancia que los separa es mayor que la distancia canónica, que es de 17-18 aminoácidos

Los pesos moleculares estimados de las proteínas Mcwc-1a, Mcwc-1b y Mcwc-1c son 72,6, 88,19 y 71,4 kDa respectivamente. Los puntos isoeléctricos teóricos correspondientes son 5,46, 5,89 y 6,79 (*Materiales y Métodos* 2.10). Usando el programa *PSort2* [215], en los tres casos se predice una localización nuclear (69,6 % para Mcwc-1a y 60,9 % para Mcwc-1b y Mcwc-1c).

Tabla 3.1. Similitud e identidad de las proteínas Mcwc-1 con otras proteínas de hongos

	Rowc-1a	Pcmada1	MadA	Mcwc-1c	Mwcw-1b	Sppg_2644	Sppg_2664	Cwc-1	Wc-1
Mcwc-1a	87.2 (78.7)	86.4 (81.8)	75.9 (66.4)	70.8 (54.0)	51.3 (35.7)	55.8 (38.0)	44.3 (28.7)	29.4 (18.9)	33.2 (22.3)

	Rowc-1c	Pcmada3	WcoA	Mcwc-1a	Mcwc-1b	Sppg_2644	Sppg_2664	Cwc-1	Wc-1
Mcwc-1c	71.9 (58.6)	74.5 (61.3)	69.8 (53.9)	70.8 (54.0)	51.8 (36.5)	51.9 (34.8)	43.7 (28.5)	29.7 (20.6)	32.0 (20.6)

	Rowc-1b	Pcmada2	WcoB	Mcwc-1a	Mcwc-1c	Sppg_2644	Sppg_2664	Cwc-1	Wc-1
Mcwc-1b	75.9 (66.8)	68.7 (60.4)	69.8 (59.2)	51.3 (35.7)	51.8 (36.5)	44.2 (29.2)	42.8 (26.8)	32.5 (22.0)	32.5 (21.5)

Se muestran los porcentajes de similitud e identidad (entre paréntesis) de las proteínas Mcwc-1 entre sí y con proteínas similares de hongos, calculados utilizando el programa *Needle* [222,256]. Se compararon con las posibles proteínas homólogas dentro de los cigomicetos (*Rhizopus oryzae* (Ro), *Pilobolus crystallinus* (Pc) y *Phycomyces blakesleeanus* (MadA, WcoA y WcB)) y con representantes de quitridios (*Spizellomyces punctatus* (Sppg)), ascomicetos (*Neurospora crassa* (Wc-1)) y basidiomicetos (*Cryptococcus neoformans*(Cwc-1)). Un resumen de las secuencias utilizadas se recoge en la Tabla 2.7.

Tabla 3.2. Genes en sintenia con los genes *wc-1* de cigomicetos

	MAPK	RhoGEF GTPasa	BTB/POZ dominio	Permeasa de Glúcidos	Rho GAP	TF AreA-like	Crg/Cig (más alejado)	TEF-1 γ	Dipeptidil peptidasa S9
<i>mcwc-1a</i>	x	x3	x4						
<i>mcwc-1c</i>			x	x	x	x			
<i>mcwc-1b</i>								x	x
<i>madA</i>	x						x		
<i>wcoA</i>	x	x	x		x	x			
<i>wcoB</i>								x	
<i>rowc-1a</i>	x	x		x	x				
<i>rowc-1c</i>							x		
<i>rowc-1b</i>									x

Relaciones de sintenia de los genes tipo *wc-1* de los cigomicetos con genomas secuenciados. Se indican en color violeta los genes asociados a *mcwc-1a* y *mcwc-1c* y en color naranja los genes en sintenia con *mcwc-1b*. La comparación se basa en las anotaciones realizadas por el JGI (*M. circinelloides*, *P. blakesleeanus* y *R. oryzae*) y el Broad Institute (*R. oryzae*).

los genes del tipo *mcwc-1b* están asociados a un grupo distinto de genes (Tabla 3.2). Todos los genes tipo *mcwc-1a* (*mcwc-1a*, *wcoA* y *rowc-1a*) conservan una MAPK y una RhoGEF-GTPasa en las proximidades, pero la mayoría de genes en posible sintenia con *mcwc-1a* y *mcwc-1c* aparecen asociados con uno u otro miembro del par en los otros

dos cigomicetos, con una distribución diferente en cada caso. También es de destacar la presencia de genes de la familia *crg* y *cig* en sintenia con genes *wc-1* en los genomas de *P. blakesleeanus* y *R. oryzae*. En *M. circinelloides*, el gen *crgA* aparece junto a *cigC* y el gen *crgB* junto a *cigA*, aunque no se encuentran cerca de ningún gen *mcwc-1*. Sin embargo, en *P. blakesleeanus*, *crgB* (JGI id: 33844) se localiza a unas 45 kb de distancia de *madA*, mientras que en *R. oryzae* un gen similar a *cigA* (JGI id: 5548) está a menos de 3 kb del gen *rowc-1c* (JGI id:5550).

En las regiones adyacentes a los genes tipo *mcwc-1b*, además de no identificarse ninguno de los genes asociados al par *mcwc-1a/mcwc-1c*, se conservan dos genes en posible sintenia, un factor de elongación de la transcripción (TEF-1 γ) y una dipeptidil peptidasa S9, aunque solo aparece uno de los dos en las proximidades de *wcoB* y *rowc-1b* (Tabla 3.2).

3.3.5. Análisis filogenético de las proteínas Mcwc-1

Se realizó un árbol filogenético con las proteínas Mcwc-1 y representantes de sus posibles homólogos en otros grupos de hongos. Las secuencias de aminoácidos utilizadas pertenecen a cigomicetos, quitridios, ascomicetos y basidiomicetos (Tabla 2.7). Los alineamientos se realizaron con *T-Coffee* y *Muscle*, editándose posteriormente en *Jalview* para eliminar huecos, menos los provocados por la secuencia utilizada como grupo externo (véase más abajo).

Como no existen proteínas Wc-1 fuera de hongos, como grupo externo se utilizó la proteína F5UBU5 de la cianobacteria *Microcoleus vaginatus*, que se obtiene como mejor resultado fuera de hongos en un BLAST realizado con la secuencia de Mcwc-1a. Esta proteína contiene tres dominios PAS en conformación parecida a la de las proteínas Wc-1, aunque el resto de la proteína no presenta homología.

El árbol filogenético obtenido para las proteínas de cigomicetos es similar a análisis previos (Figura 1.10) [69], con una agrupación bastante clara de las proteínas homólogas a Mcwc-1b por un lado y del par Mcwc-1a/Mcwc-1c por otro (Figura 3.15). Dentro de cigomicetos, en todos los casos las proteínas de *R. oryzae* y *P. crystallinus* se encuentran más próximas a las de *M. circinelloides* que a las de *P. blakesleeanus*. El resto de divisiones principales también se observan claramente, separándose las proteínas de ascomicetos, de basidiomicetos y las de quitridios, siendo las proteínas de los ascomicetos las más lejanas a las de cigomicetos. En cuanto a la cercanía con basidiomicetos y quitridios, los valores de *bootstrap* obtenidos no son muy altos por lo que no puede concluirse rotundamente si las proteínas Wc-1 de cigomicetos se encuentran más cercanas a las de quitridios que a las de basidiomicetos, aunque la mayor similitud de secuencia (Tabla 3.1) sugiere que se encuentran más cercanas a quitridios.

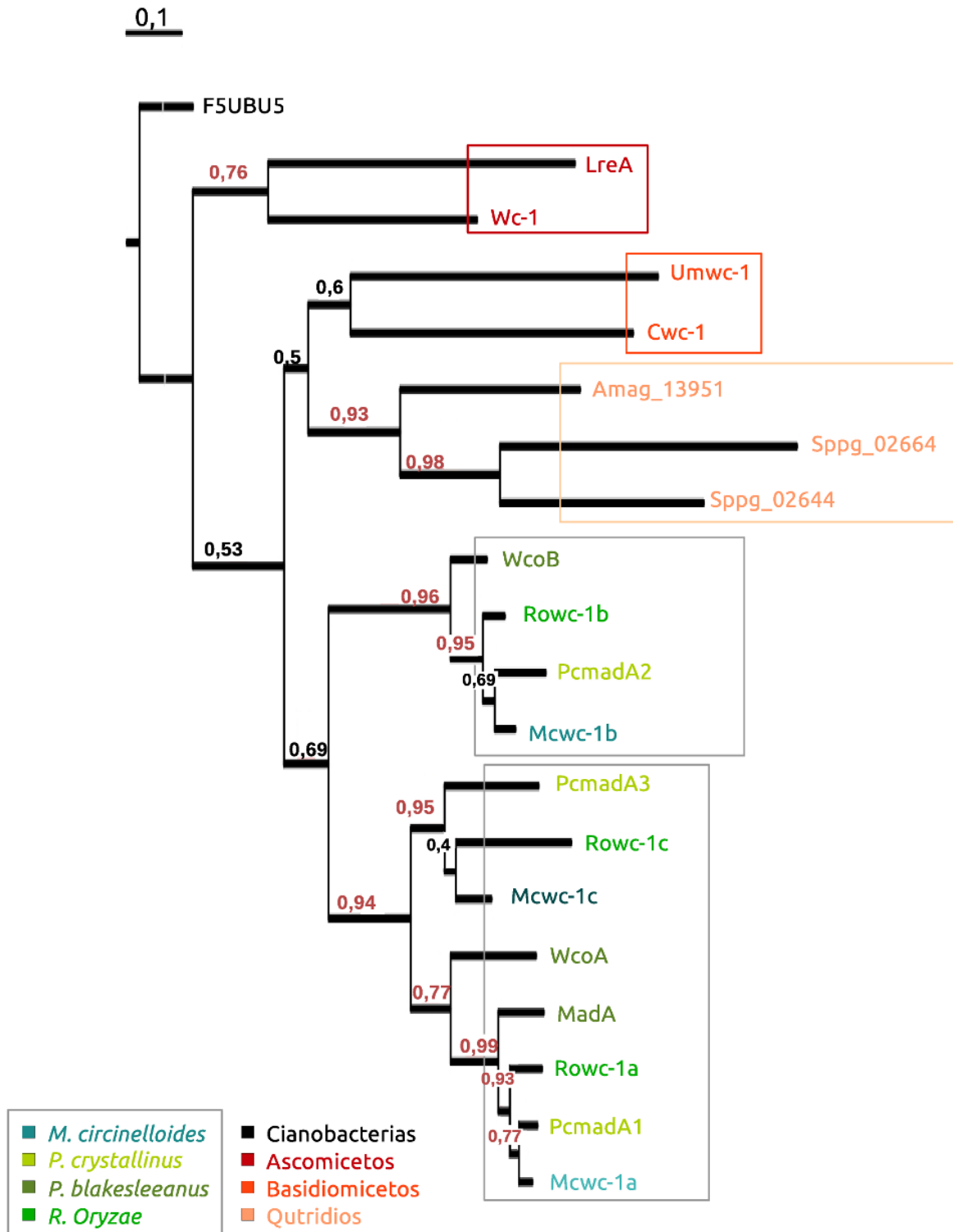


Figura 3.15. Filogenia de las proteínas tipo Wc-1 en hongos.

Árbol filogenético resumen de las proteínas tipo Wc-1 en hongos, utilizando la proteína F5UBU5 de la cianobacteria *Microcoleus vaginatus* como grupo externo. El alineamiento se realizó con *T-Coffee*, añadiendo *Muscle* y *MAFFT*, con las secuencias indicadas (ver resumen de las secuencias en la Tabla 2.7). Se editó en *Jalview* para eliminar huecos y se analizó con *PhyML* con 200 réplicas. Se indican los porcentajes de *bootstrap* sobre las divisiones, apareciendo en color rojo aquellos que están por encima del 70 %.

3.4. Expresión de los genes *mcwc-1*

La regulación de los genes *wc-1* varía según el organismo, encontrándose tanto ejemplos de inducción como de represión por la luz. Así, por ejemplo, los genes *wc-1* de los ascomicetos *N. crassa* y *Tuber borchii* se transcriben intensamente tras la iluminación [3, 15], mientras que el gen *cwc-1* del basidiomiceto *C. neoformans* se expresa débil y constitutivamente [136, 198], y el gen *madA* del cigomiceto *P. blakesleeanus* se inhibe ligeramente por la luz [138].

Para caracterizar la regulación por la luz de los genes *mcwc-1* de *M. circinelloides* se analizaron los niveles de sus mRNAs por medio de hibridación tipo *Northern*. En estos experimentos, RNA total de micelios de la estirpe silvestre R7B, crecidos primero en oscuridad durante 48 horas (tiempo 0), y posteriormente iluminados durante diferentes tiempos (5, 10, 20, 30 y 60 minutos), se hibridaron con sondas de cada uno de los genes *mcwc-1* y de los genes carotenogénicos *carRP* y *carB* (Tabla 2.8 y Figura 3.16).

La acumulación de mRNAs de los genes *mcwc-1* mostró patrones claramente distintos en respuesta a la luz (Figura 3.16). Así, mientras que los niveles de *mcwc-1a* y *mcwc-1b* no variaron de manera significativa tras la iluminación, los niveles de *mcwc-1c* aumentaron considerablemente tras solo 5 minutos de iluminación, precediendo a la inducción de los genes *carB* y *carRP* (Figura 3.16).

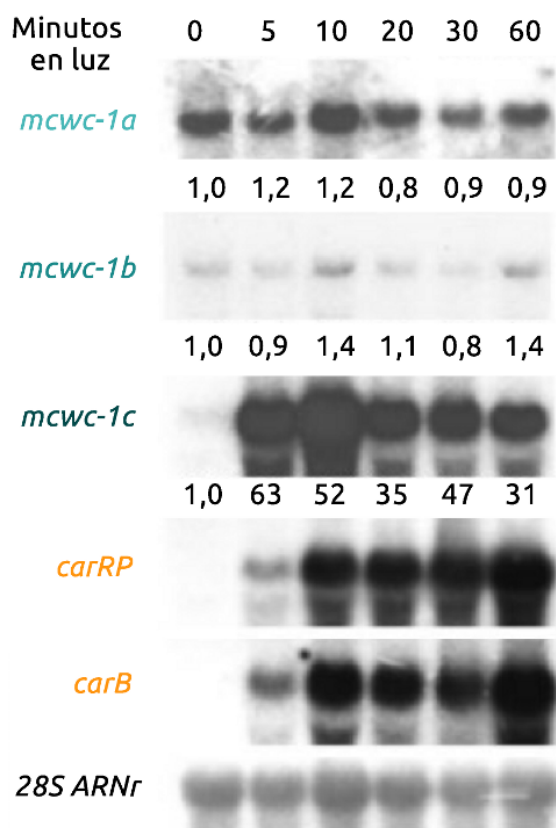


Figura 3.16. Expresión de los genes *mcwc-1*, *carB* y *carRP* en fondo silvestre.

RNA aislado de micelios de la estirpe R7B, silvestre para la carotenogénesis, crecidos sobre medio sólido (MMC pH 4,5) durante 48 horas en oscuridad (tiempo 0) y posteriormente iluminados con luz blanca el tiempo indicado, se hibridó de manera sucesiva con sondas específicas para cada gen (Tabla 2.8). Como control de carga se hibridó con una sonda del ARNr 28S.

Las cantidades relativas de transcritos *mcwc-1* se indican bajo de cada calle. Los valores están normalizados con el control de carga y corresponden a la señal de cada muestra en la luz respecto a la muestra de oscuridad.

3.5. Generación de mutantes simples *mcwc-1*Δ

La estrategia genética clásica para determinar la función de un gen es la generación o el aislamiento de sus mutantes. Por esa razón, para determinar la función de los genes *mcwc-1*, se generaron los correspondientes mutantes nulos mediante reemplazamiento de la mayor parte de cada gen por el marcador de selección *pyrG*. Para ello, se construyeron vectores de interrupción que contenían el gen *pyrG* flanqueado por suficiente secuencia adyacente a los genes *mcwc-1* como para permitir la recombinación homóloga [218, 251]. Estos plásmidos se denominaron pMAT1113 para *mcwc-1a*, pMAT1120 para *mcwc-1b* y pMAT1128 para *mcwc-1c*. Como las transformaciones se realizaron con fragmentos lineales, los plásmidos se digirieron con las enzimas de restricción adecuadas para liberar los fragmentos diseñados. En las Figuras 3.17, 3.19 y 3.21 se muestran las construcciones, indicando las enzimas y cebadores utilizados en su generación. Como estirpe receptora se usó MU402 [225], que es silvestre para la carotenogénesis y el fototropismo pero auxótrofa para uracilo y leucina (*pyrG⁻ leuA⁻*).

3.5.1. Aislamiento de mutantes homocariontes

Las diferentes transformaciones, con los fragmentos de interrupción de cada uno de los genes *mcwc-1*, produjeron 21 transformantes *ura⁺* para *mcwc-1a*, 67 para *mcwc-1b* y 35 para *mcwc-1c*.

Los transformantes de *M. circinelloides* son normalmente heterocariontes, debido a la presencia de varios núcleos en los protoplastos y a que el DNA no se integra en todos los núcleos. La obtención de transformantes homocariontes requiere varios ciclos de crecimiento vegetativo en medio selectivo, para favorecer la pérdida de los núcleos no transformados. Tras varios ciclos de crecimiento en medio MMC, selectivo para *ura⁺*, se aisló un transformante homocariote para el gen *mcwc-1a* (MU242), tres para *mcwc-1b* (MU244, MU245 y MU246) y dos para *mcwc-1c* (MU247 y MU248). También se obtuvo un transformante heterocarionte para el gen *mcwc-1a* que no se consiguió llevar a homocariosis (MU243).

3.5.2. Comprobación de las interrupciones mediante hibridaciones tipo *Southern*

Con el objetivo de comprobar la correcta interrupción de los genes *mcwc-1* y descartar la posible existencia de integraciones ectópicas adicionales del fragmento de interrupción, se analizó el DNA de los transformantes seleccionados mediante experimentos de hibridación tipo *Southern*.

En el caso de *mcwc-1a*, se digirió el DNA de MU242 con *SacI* y, tras la electroforesis, se hibridó con dos sondas del gen *mcwc-1a* (sondas *a* y *b*) (Tabla 2.8 y Figura 2.1). La sonda *a* debía reconocer tanto el alelo silvestre como la versión delecionada, produciendo fragmentos de tamaño conocido y distintos según la estirpe, mientras que la sonda *b* era específica de la zona delecionada y solo debía hibridar con fragmentos derivados del alelo silvestre (Tabla 3.3 y Figura 3.17). Las hibridaciones sucesivas con ambas sondas produjeron los patrones de fragmentos esperados, confirmando la sustitución, en el mutante MU242, de 1,4 kb del gen *mcwc-1a* por el gen *pyrG* (Tabla 3.3 y Figura 3.18).

En el caso de *mcwc-1b*, se digirió el DNA de MU244, MU245 y MU246 con *EcoRI* y se hibridó con las sondas *c* y *d* del gen *mcwc-1b* (Tabla 2.8 y Figura 2.1). La sonda *c* distingue entre el alelo silvestre del gen (fragmentos de hibridación de 2,0 kb y 1,3 kb) y la versión delecionada (fragmento de hibridación de 5,3 kb) (Tabla 3.3 y Figura 3.19). Todas las estirpes mostraron el fragmento esperado de 5,3 kb, sugiriendo que el gen había sido delecionado. La hibridación con la sonda *d*, que reconoce solo la zona delecionada, confirmó la deleción del gen *mcwc-1b* en los tres transformantes, ya que no aparecieron señales de hibridación en ninguno de los transformantes (Figura 3.20).

Por último, para el gen *mcwc-1c*, se digirió el DNA de los transformantes MU247 y MU248 con *SpeI* y se hibridó con las dos sondas del gen *mcwc-1c* (*e* y *f*) (Tabla 2.8 y Figura 2.1). Ambos transformantes mostraron únicamente la banda esperada de 8,6 kb, correspondiente al reemplazamiento de la versión silvestre por el alelo mutado, que se confirmó por la ausencia de hibridación con la sonda *f*, que reconoce solo la región delecionada del gen (Tabla 3.3 y Figuras 3.21 y 3.22).

Tabla 3.3. Fragmentos esperados y obtenidos en las hibridaciones tipo *Southern* de los mutantes *mcwc-1Δ*

Gen	Sonda	Fragmentos Esperados (kb)		Fragmentos Obtenidos (kb)	Estirpe
		Silvestre	Deleción		
<i>mcwc-1a</i>	<i>a</i>	5,4	4,7	4,7	MU242
	<i>b</i>	5,4 y 12	Ausencia	Ausencia	
<i>mcwc-1b</i>	<i>c</i>	2,0 y 1,3	5,3	5,3	MU244 MU245 MU246
	<i>d</i>	1,3	Ausencia	Ausencia	
<i>mcwc-1c</i>	<i>e</i>	6,6	8,6	8,6	MU247 MU248
	<i>f</i>	6,6	Ausencia	Ausencia	

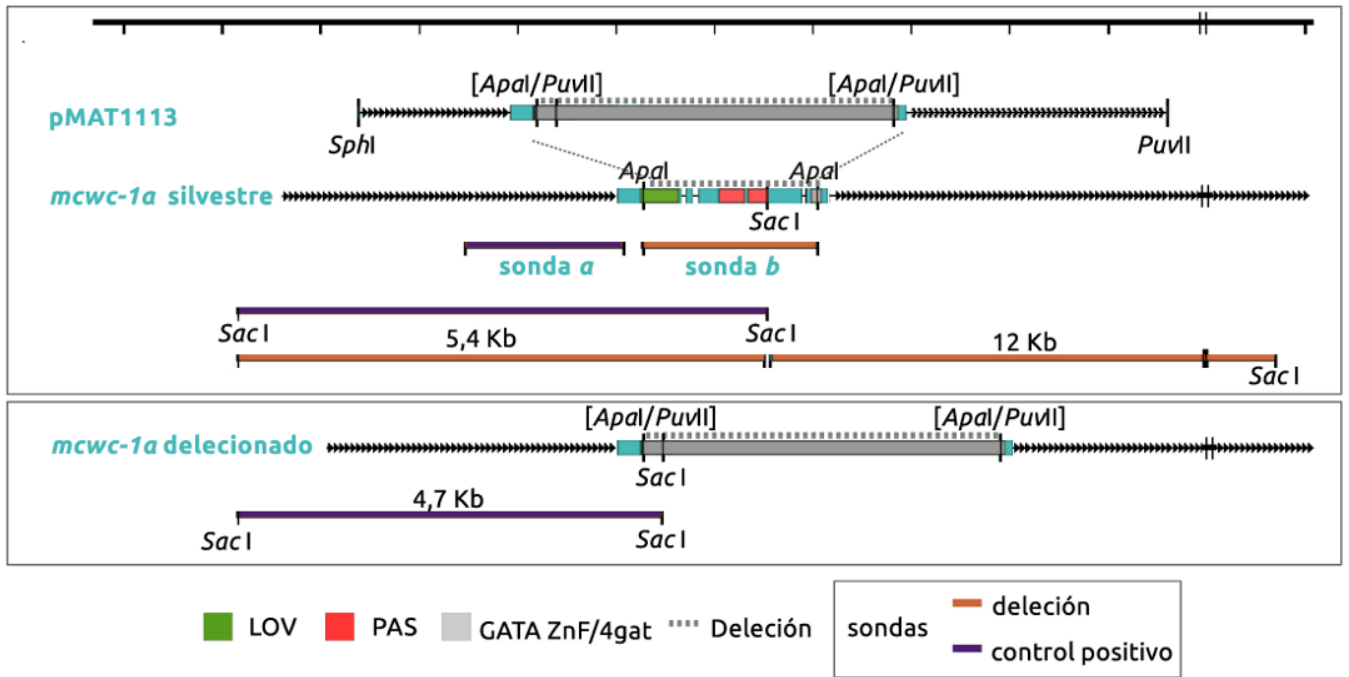


Figura 3.17. Esquemas de la interrupción de *mcwc-1a*.

Arriba: Esquema del gen *mcwc-1a* en la estirpe silvestre y del fragmento del plásmido pMAT1113 utilizado en la interrupción, obtenido mediante digestión con *SphI* y *PuvII*.

Abajo: Esquema del gen *mcwc-1a* tras la recombinación homóloga con el fragmento de reemplazamiento.

Se indican las posiciones de las sondas *a* y *b*, los puntos de corte más relevantes y los tamaños de los fragmentos esperados en las hibridaciones tipo *Southern* (digestión *SacI*).

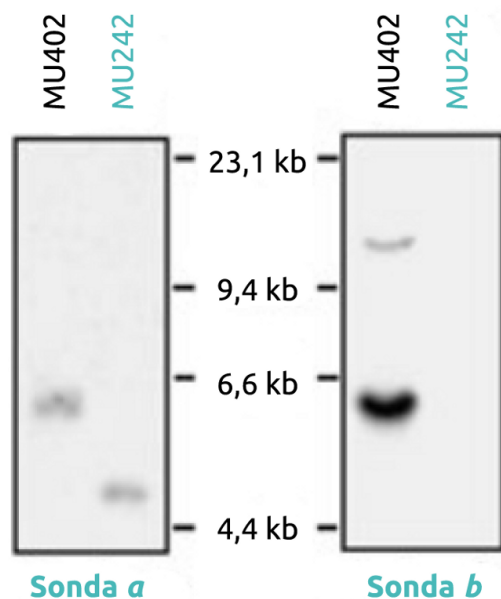


Figura 3.18. Hibridación tipo *Southern* del mutante *mcwc-1aΔ*.

DNA genómico de las estirpes MU402 (receptor) y MU242 (*mcwc-1aΔ*), digerido con *SacI*, se hibridó con las sondas *a* y *b* (Figura 2.1 y Tabla 2.8). Los tamaños de los fragmentos del marcador molecular ($\lambda + HindIII$) se indican entre las dos imágenes. Los tamaños esperados se muestran en la Tabla 3.3 y Figura 3.17.

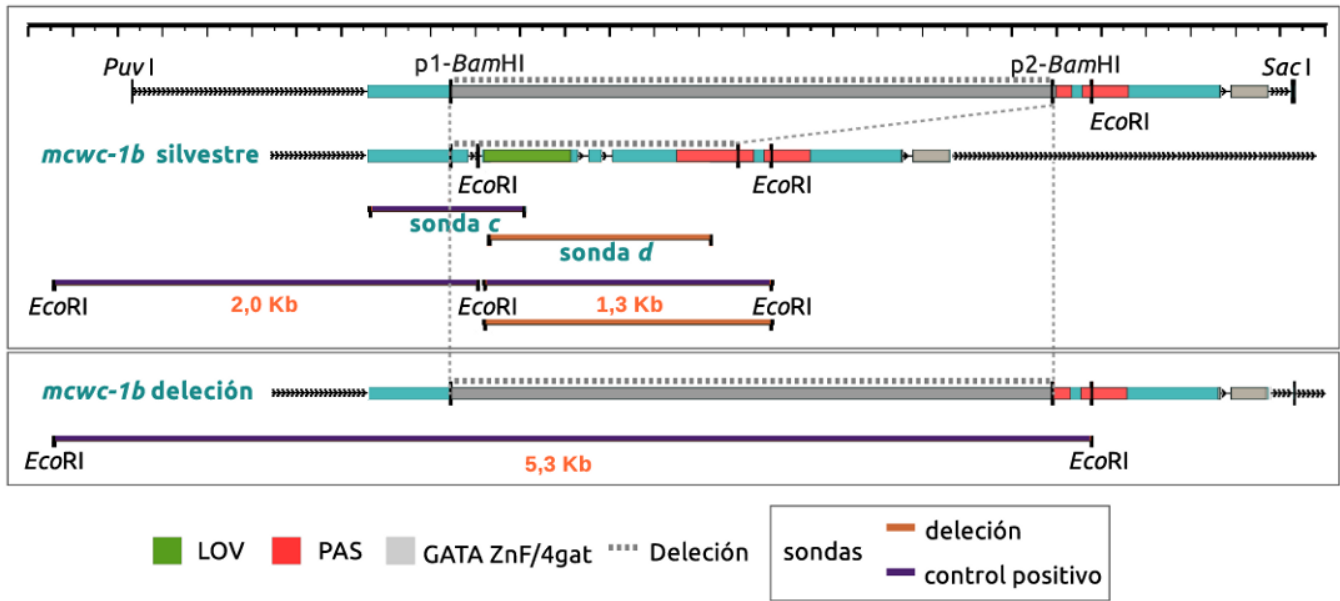


Figura 3.19. Esquemas de la interrupción de *mcwc-1b*.

Se indican las posiciones de las sondas *c* y *d*, los cebadores utilizados en la interrupción, los puntos de corte más relevantes, y los tamaños de los fragmentos esperados en las hibridaciones tipo *Southern* (digestión *EcoRI*).

Arriba: Esquema del gen *mcwc-1b* en la estirpe silvestre y del fragmento del plásmido pMAT1120 utilizado en la interrupción, obtenido mediante digestión con *SacI* y *PuvI*.

Abajo: Esquema del gen *mcwc-1b* tras la recombinación homóloga con el fragmento de reemplazamiento.

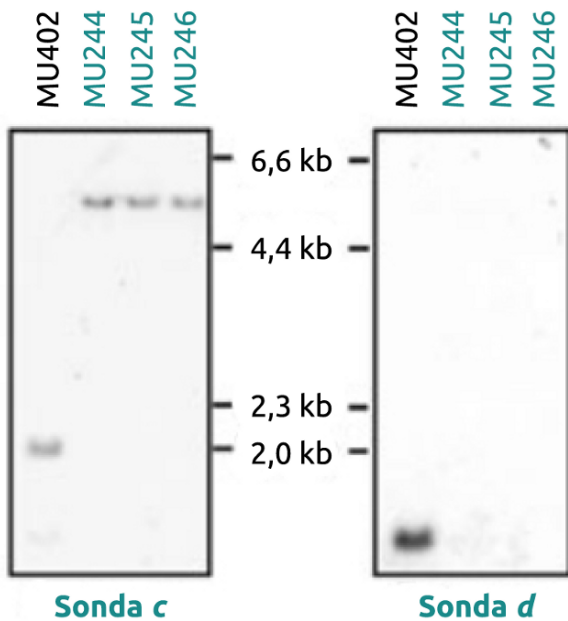


Figura 3.20. Hibridación tipo *Southern* de los mutantes *mcwc-1bΔ*.

DNA genómico de las estirpes MU402 (recipiente) y MU244-6 (*mcwc-1bΔ*), digerido con *EcoRI*, se hibridó con las sondas *c* y *d* (Figura 2.1 y Tabla 2.8). Los tamaños de los fragmentos del marcador molecular (λ + *HindIII*) se indican entre las dos imágenes. Los tamaños esperados se muestran en la Tabla 3.3 y Figura 3.19.

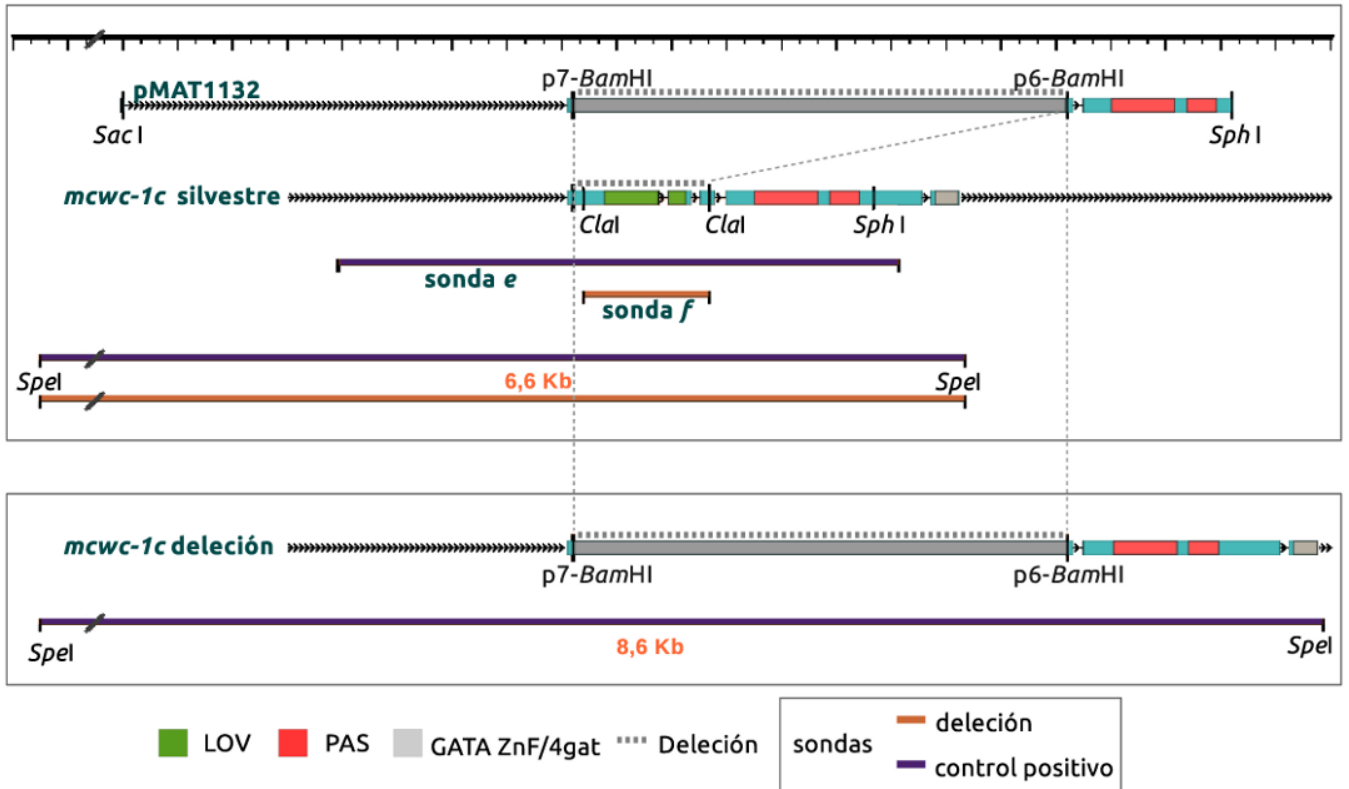


Figura 3.21. Esquemas de la interrupción de *mcwc-1c*.

Se indican las posiciones de las sondas *e* y *f*, los cebadores utilizados en la interrupción, los puntos de corte más relevantes y los tamaños de los fragmentos esperados en las hibridaciones tipo *Southern* (digestión *SpeI*).

Arriba: Esquema del gen *mcwc-1c* en la estirpe silvestre y del fragmento del plásmido pMAT1132 utilizado en la interrupción, obtenido mediante digestión con *SacI* y *SphI*.

Abajo: Esquema del gen *mcwc-1c* tras la recombinación homóloga con el fragmento de reemplazamiento.

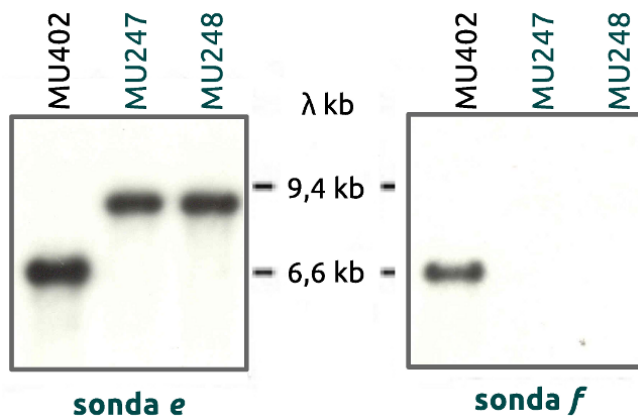


Figura 3.22. Hibridación tipo *Southern* de los mutantes *mcwc-1cΔ*.

DNA genómico de las estirpes MU402 (recipiente) y MU247-8 (*mcwc-1cΔ*), digerido con *SpeI*, se hibridó con las sondas *e* y *f* (Figura 2.1 y Tabla 2.8). Los tamaños de los fragmentos del marcador molecular (λ + *HindIII*) se indican entre las dos imágenes. Los tamaños esperados se muestran en la Tabla 3.3 y en la Figura 3.21.

3.6. Fenotipos de los mutantes *mcwc-1*Δ

Una vez obtenidos los mutantes simples, se analizaron sus respuestas a la luz y se compararon con las de la estirpe silvestre R7B, ya que posee el mismo fondo genético que todos los mutantes en los genes *mcwc-1*.

3.6.1. La delección del gen *mcwc-1c* afecta a la fotocarotenogénesis

La acumulación de β -caroteno en los mutantes nulos *mcwc-1a*Δ (MU242) y *mcwc-1b*Δ (MU244, MU245 y MU246) fue similar a la de la estirpe silvestre, tanto en la oscuridad como en la luz, con solo una ligera reducción de la acumulación de β -caroteno en la luz en la estirpe mutante para el gen *mcwc-1a* (MU242) (Figura 3.23). Por el contrario,

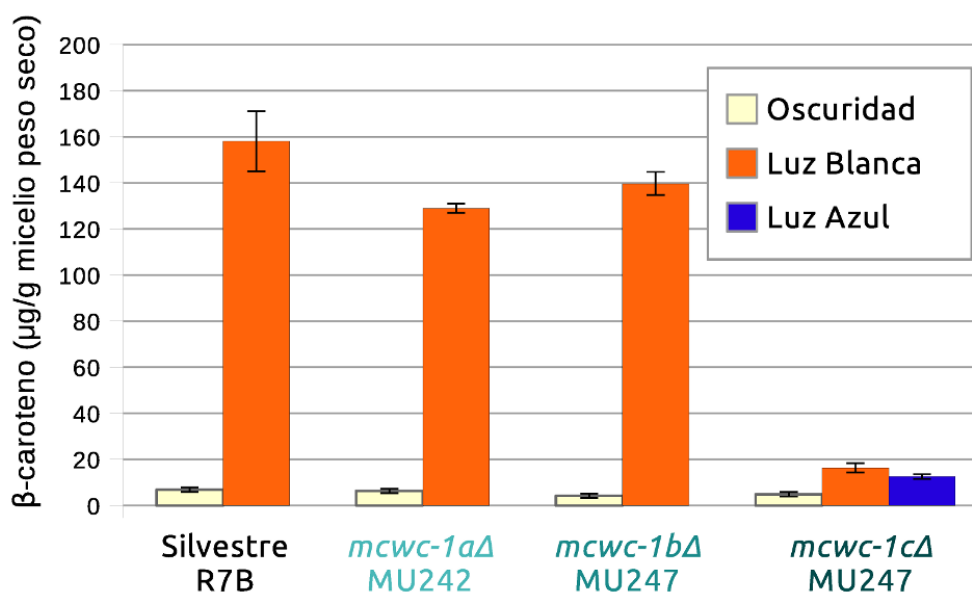


Figura 3.23. Contenido en β -caroteno de los mutantes *mcwc-1*Δ

Carotenos extraídos de los micelios de las estirpes indicadas, crecidas sobre medio sólido (YNB + leucina pH 4,5) en condiciones de oscuridad (84 h en oscuridad) o luz (60 h en oscuridad + 24 h en luz). Se representan las medias \pm errores estándar de 4 experimentos diferentes.

los micelios de los mutantes en *mcwc-1c* (MU247 y MU248) mostraban un claro defecto en la inducción de la síntesis de carotenos por la luz, ya que los micelios iluminados, tras el crecimiento en oscuridad, presentaban un color amarillo muy pálido. El análisis de la acumulación de carotenos mostró que en la estirpe silvestre la iluminación con luz azul o blanca provocaba un incremento de ~ 21 veces en la acumulación de β -caroteno, mientras que en el mutante *mcwc-1c*Δ el aumento era solo de 3 veces (Figura 3.23).

Estos resultados demuestran que aunque el mutante *mcwc-1c* Δ sigue respondiendo a la luz, la pérdida de este gen afecta gravemente a la respuesta fotocarotenogénica. Por el contrario, la falta del gen *mcwc-1c* no repercute en los niveles de β -caroteno en la oscuridad, indicando que su función está implicada directamente en la inducción de la síntesis de carotenos por la luz (Figura 3.23).

Se confirmó que el fenotipo observado en el mutante *mcwc-1c* Δ (MU247) se debía exclusivamente a la pérdida del gen *mcwc-1c* al conseguir complementar su mutación mediante la introducción de una copia silvestre del gen. La complementación se realizó transformando el mutante MU247 (*mcwc-1c* Δ , *leuA*⁻) con el plásmido pMAT1131, portador de un alelo silvestre del gen *mcwc-1c* (Figura 3.24), utilizando como control el plásmido pLEU4 [264], que solo contiene el gen marcador de selección *leuA*. La presencia de los plásmidos en los distintos transformantes se confirmó mediante hibridaciones tipo *Southern* (Figura 3.25).

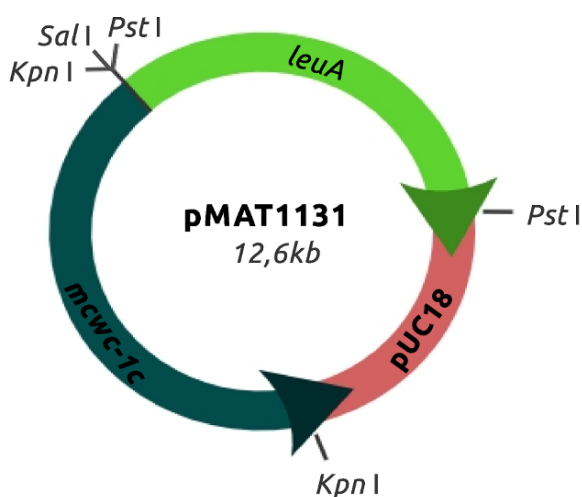


Figura 3.24. Esquema del plásmido pMAT1131.

Plásmido usado en la complementación del mutante (MU247). Contiene una copia del marcador *leuA* (fragmento *PstI* de 4,4 kb procedente de pLEU4 [264]), clonada en el sitio *PstI* de pMAT1130, que porta una copia silvestre de *mcwc-1c*. Ambos genes se encuentran bajo el control de sus respectivos promotores. Se indican otros puntos de corte de los sitios de clonación de pUC18 (*Kpn* y *SalI*) para ayudar a orientar los fragmentos.

El incremento de carotenos en respuesta a la luz en dos transformantes independientes (MU247 + pMAT1131 (1) y (2)) fue similar al de la estirpe silvestre control (R7B + pLEU4) (Figura 3.26). Además, la introducción del plásmido pMAT1131 provocó un incremento de la síntesis de carotenos en la oscuridad, en comparación con la estirpe control. Este incremento podría ser consecuencia de un mayor número de copias del gen *mcwc-1c*, ya que los transformantes presentan más de una copia del gen por genoma, como revela la hibridación con la sonda del gen *leuA*, que detecta tanto la copia cromosómica como la plasmídica de este gen (Figura 3.25). En ambos transformantes, las señales de hibridación de las copias plasmídicas del gen *leuA* eran de mayor intensidad

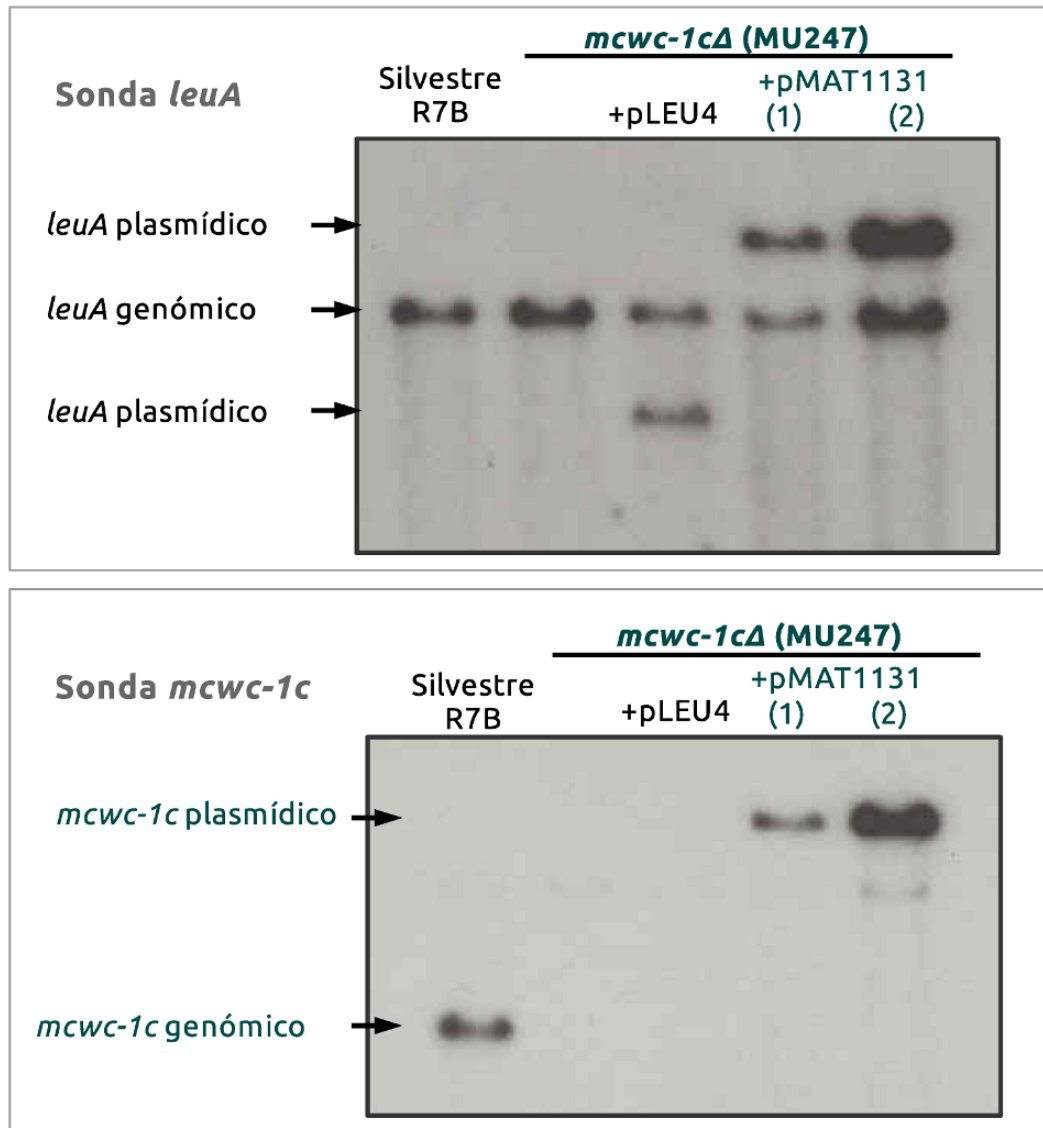


Figura 3.25. Hibridación tipo *Southern* del mutante *mcwc-1cΔ* complementado.

DNA genómico de las estirpes y transformantes indicados, digerido con *SalI*, se hibridó con una sonda del gen *leuA* (arriba) y con la sonda *f* (Tabla 2.8 y Figura 2.1) del gen *mcwc-1c* (abajo). La identidad de los fragmentos obtenidos en cada caso se indica a la izquierda de las imágenes, estando de acuerdo con los tamaños esperados.

que las cromosómicas (Figura 3.25).

3.6.2. La delección de *mcwc-1a* provoca la pérdida del fototropismo

Se estudió la respuesta fototrópica en los mutantes *mcwc-1Δ* mediante iluminación lateral de los micelios. Los mutantes nulos *mcwc-1bΔ* (MU244) y *mcwc-1cΔ* (MU247) mostraron una respuesta fototrópica silvestre a las luces blanca, verde y azul. Sin embargo, el mutante nulo *mcwc-1aΔ* (MU242) fue incapaz de responder a cualquiera de las

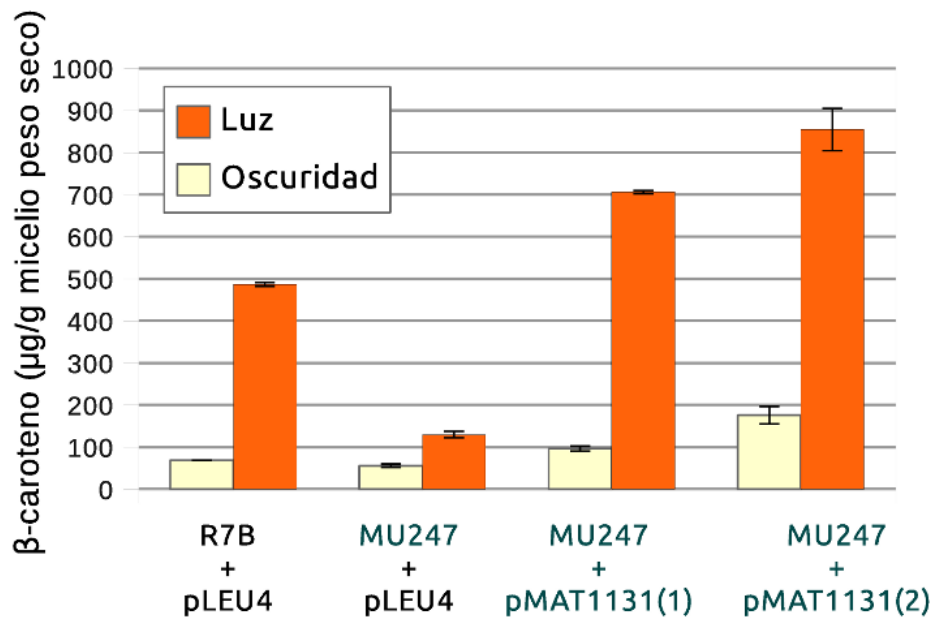


Figura 3.26. Contenido en β -caroteno del mutante *mcwc-1c* Δ complementado.

Carotenos extraídos de los micelios de transformantes de la estirpe silvestre (R7B) y de la estirpe *mcwc-1c* Δ (MU247), portando el plásmido control (pLEU4) o pMAT1131. En el caso del plásmido pMAT1131 se analizaron dos transformantes independientes (1 y 2). Los micelios se crecieron sobre medio sólido (YNB pH 4,5) en condiciones de oscuridad (3 días en oscuridad) o luz (2 días en oscuridad + 1 día en luz). Se representan las medias \pm errores estándar de 4 experimentos diferentes.

longitudes de onda anteriores, creciendo sus esporangióforos de manera desordenada, tal como ocurre en los micelios crecidos en la oscuridad (Figura 3.27A).

El fenotipo observado en el mutante *mcwc-1a* Δ (MU242) se debía exclusivamente a la pérdida del gen *mcwc-1a*, como se confirmó mediante la complementación con una copia silvestre del gen. La complementación se realizó transformando el mutante MU242 (*mcwc-1a* Δ , *leuA*⁻) con el plásmido pMAT1133, portador de un alelo silvestre del gen *mcwc-1a* (Figura 3.29), y utilizando como control el plásmido pLEU4 [264]. La presencia de los plásmidos en los distintos transformantes se confirmó mediante hibridaciones tipo *Southern* (Figura 3.28).

En este experimento, los dos transformantes complementados (MU242 + pMAT1133) orientaron sus esporangióforos hacia la fuente lateral de luz, mientras que los transformantes con el plásmido control (MU242 + pLEU4) continuaron mostrando el fenotipo mutante de la estirpe parental (Figura 3.27B).

El conjunto de estos resultados indica que el gen *mcwc-1a* regula el fototropismo.

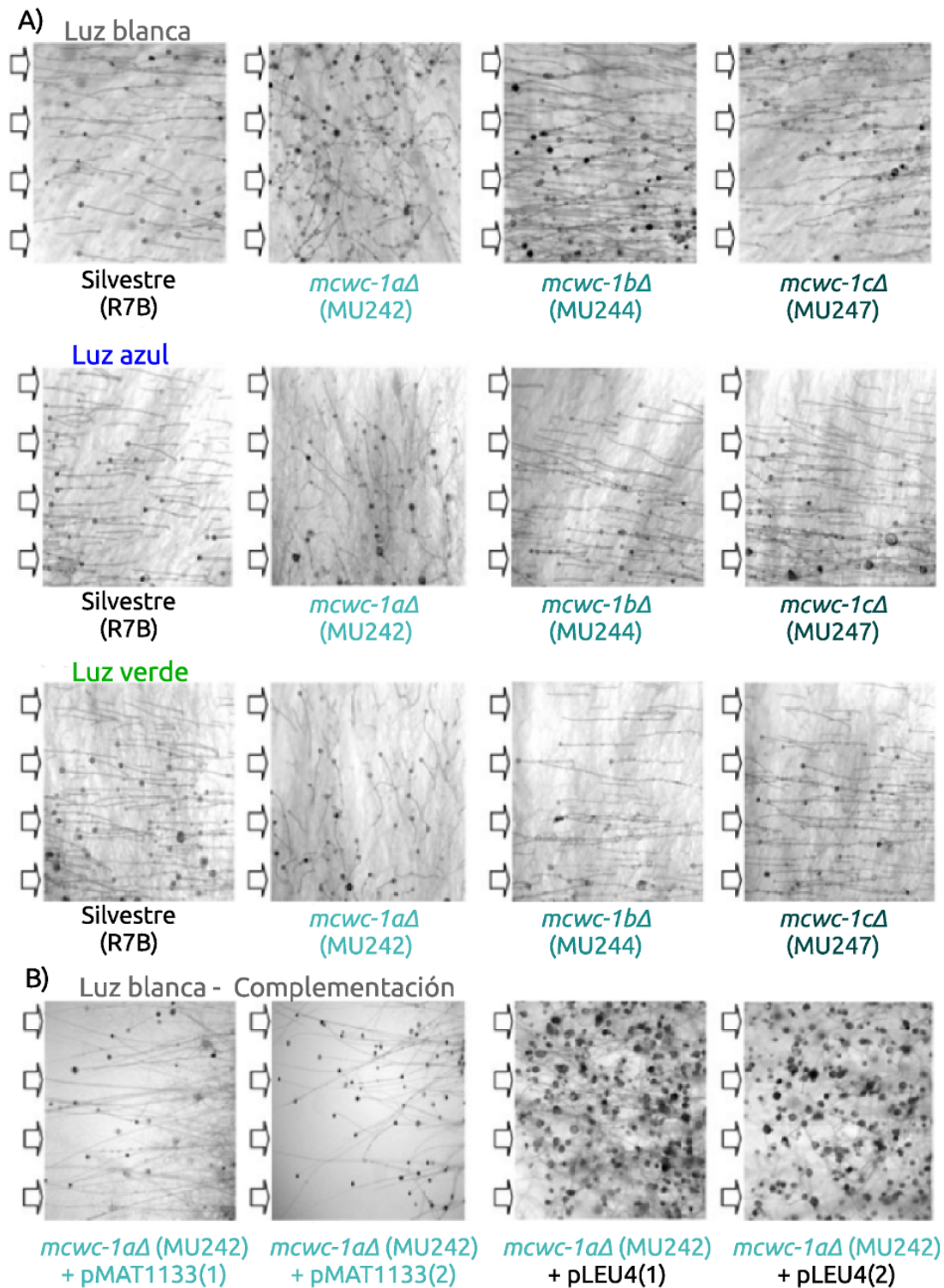


Figura 3.27. Fototropismo en los mutantes *mcwc-1*Δ.

A) Esporangióforos de los mutantes *mcwc-1*Δ y de la estirpe silvestre R7B crecidos durante 3 días, sobre medio sólido PDA (pH 3,2) y con iluminación unilateral (indicada por las fechas), utilizando luces blanca, azul o verde.

B) Esporangióforos de los transformantes indicados crecidos durante 3 días sobre medio sólido YNB con iluminación unilateral (indicada por las fechas).

Las fotografías se tomaron perpendicularmente a la superficie del micelio usando una lupa binocular.

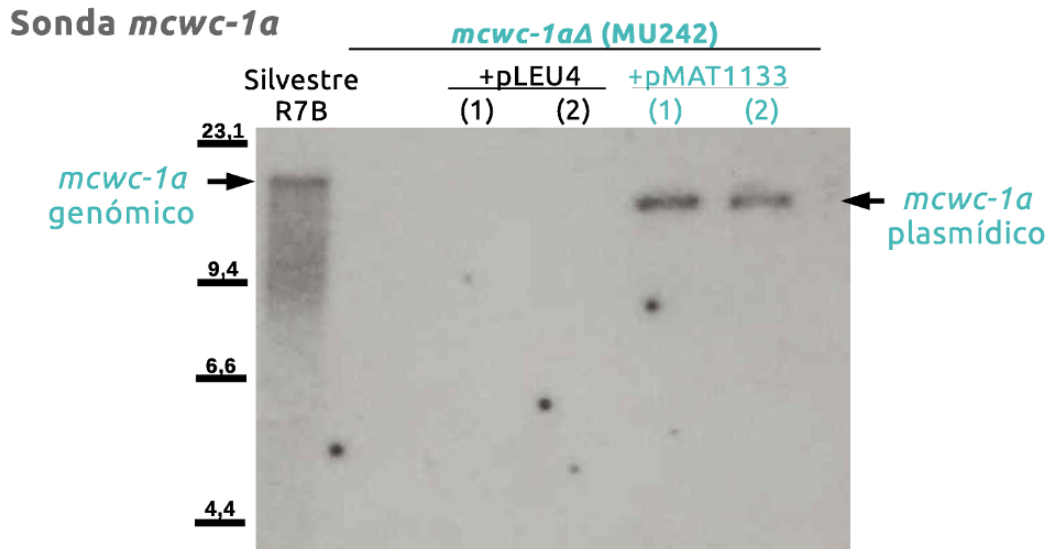


Figura 3.28. Hibridación tipo *Southern* del mutante *mcwc-1aΔ* complementado

DNA genómico de las estirpes y de los transformantes independientes indicados, digerido con *SphI*, se hibridó con la sonda *b* (Tabla 2.8 y Figura 2.1) correspondiente a la región deletionada de *mcwc-1a*. La identidad de los fragmentos que hibridan con la sonda se indica a ambos lados de la imagen y confirma la presencia del plásmido pMAT1133 y la ausencia de la copia genómica del gen *mcwc-1a* en los transformantes analizados en la Figura 3.27. Tamaños esperados en la hibridación:

Silvestre: 17 kb (*mcwc-1a* genómico).

MU242 y MU242+pLEU4: ausencia (*mcwc-1aΔ*).

MU242 + pMAT1133: 13,4 kb (copia de *mcwc-1a* en el plásmido).

3.7. Regulación de la expresión génica por la luz en los mutantes simples *mcwc-1Δ*

Con el objetivo de obtener una visión general del papel de cada gen *mcwc-1* en la regulación, tanto de los otros genes *mcwc-1* como de los genes carotenogénicos (*carB* y *carRP*), se estudió la acumulación de mRNA en los mutantes *mcwc-1Δ*. Este análisis se realizó mediante hibridaciones tipo *Northern*, utilizando RNA total de micelios de la estirpe silvestre R7B y de los tres mutantes *mcwc-1Δ*, crecidos durante 48 horas en oscuridad (tiempo 0) e iluminados durante diferentes tiempos (5, 10, 20, 30 y 60 minutos).

La acumulación de mRNA de *mcwc-1a* no se vio afectada por la pérdida de los genes *mcwc-1b* o *mcwc-1c*, indicando que su expresión no está regulada por estos genes. De forma similar, la falta de los genes *mcwc-1a* o *mcwc-1c* no afectó a la acumulación de mRNA del gen *mcwc-1b* (Figura 3.30), indicando que no participan en su regulación. Sin embargo, la ausencia del gen *mcwc-1a* afectó a la inducción de la acumulación de mRNA del gen *mcwc-1c* por la luz, mostrando niveles mucho menores en el mutante *mcwc-1aΔ*

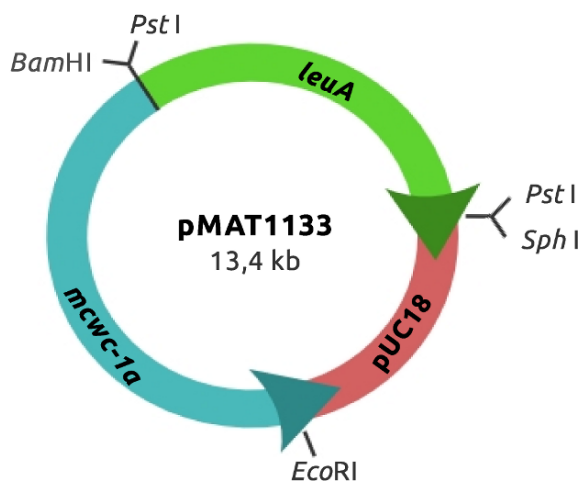


Figura 3.29. Esquema del plásmido pMAT1133.

Plásmido utilizado en la complementación del mutante (MU242). Contiene una copia del marcador de selección *leuA* (fragmento *PstI* de 4,4 kb procedente de pLEU4 [264]), clonada en el sitio *PstI* de pMAT1110 portador de una copia silvestre de *mcwc-1a*. Ambos genes se encuentran bajo el control de sus respectivos promotores. Se indican otros puntos de corte de los sitios de clonación de pUC18 (*EcoRI* y *BamHI*) para ayudar a orientar los fragmentos.

que en la estirpe silvestre o en el mutante *mcwc-1bΔ* (Figura 3.30). Esto indica que el gen *mcwc-1a* es un elemento clave para la inducción de la expresión del gen *mcwc-1c* por la luz.

En *M. circinelloides*, la activación de la carotenogénesis por la luz está asociada a la inducción de la acumulación de transcritos de los genes estructurales *carB* y *carRP* [323, 324]. Así, se analizó la acumulación de transcritos de estos genes en respuesta a la luz en mutantes para cada uno de los genes *mcwc-1*. Los niveles de mensajero de *carB* y *carRP* en el mutante *mcwc-1cΔ* fueron muy inferiores a los observados en la estirpe silvestre o en el mutante en el gen *mcwc-1b* (Figura 3.30), apoyando los resultados de la medida de carotenos en estos mutantes (Figura 3.23).

Sorprendentemente, el incremento de los niveles de transcritos de los genes carotenogénicos en respuesta a la luz también fue menor en el mutante *mcwc-1aΔ*, que sin embargo es prácticamente silvestre para la fotocarotenogénesis (Apartado 3.6.1). Aunque la inducción es débil en ambos mutantes, *mcwc-1cΔ* y *mcwc-1aΔ*, en el caso de este último parece suficiente para una síntesis normal de carotenos. La diferencia podría deberse a los distintos patrones de acumulación de los transcritos de los genes carotenogénicos, ya que en el mutante *mcwc-1aΔ* se incrementan más tarde, pero parecen ir aumentando lentamente, mientras que en el mutante *mcwc-1cΔ* los niveles de mRNA aumentan poco y disminuyen rápidamente. En cualquier caso, este resultado apoya el papel del gen *mcwc-1c* en la inducción por la luz de la expresión de *carB* y *carRP*.

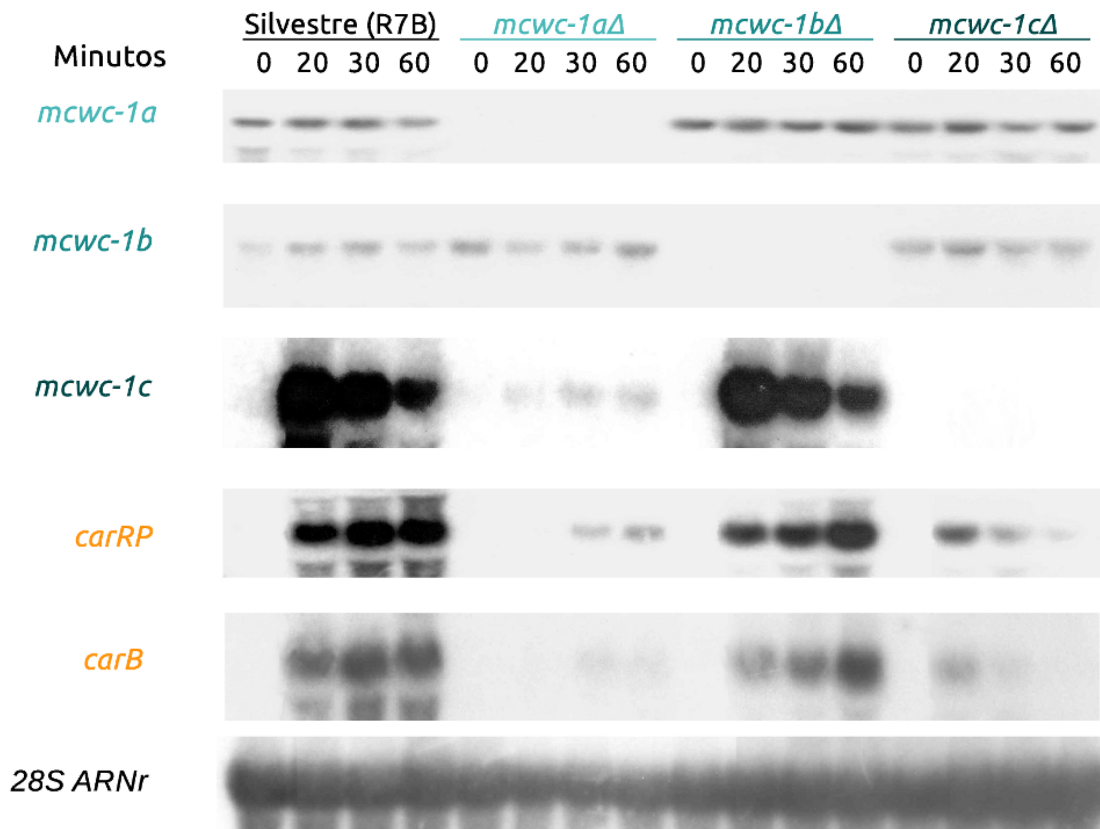


Figura 3.30. Regulación por luz de la acumulación de mRNA de los genes *mcwc-1*, *carB* y *carRP* en los mutantes *mcwc-1Δ*.

Micelios de la estirpe silvestre R7B y de los mutantes *mcwc-1aΔ* (MU242), *mcwc-1bΔ* (MU244) y *mcwc-1cΔ* (MU247) se crecieron en medio sólido YNB + leucina pH 4,5, durante 48 horas en oscuridad (tiempo 0) seguido de los tiempos indicados bajo luz blanca. El RNA extraído de cada muestra se hibridó sucesivamente con sondas específicas para cada gen (Tabla 2.8). Como control de carga, la misma membrana se hibridó con una sonda correspondiente al ARNr 28S.

3.8. Generación de mutantes dobles *mcwc-1Δ crgAΔ*

Como el gen *crgA* es un represor de la carotenogénesis cuya ausencia provoca, tanto en luz como en oscuridad, la sobreacumulación de carotenos y la sobreexpresión de *carB* y *carRP* [218], se decidió estudiar las posibles interacciones entre los genes *mcwc-1* y *crgA*. Para ello, se generaron mutantes dobles para *crgA* y cada uno de los genes *mcwc-1*, interrumpiendo los genes *mcwc-1* en un mutante *crgAΔ*. Así, se transformó una estirpe *crgAΔ pyrG⁻* (MU223) utilizando los mismos fragmentos de restricción que en la generación de los mutantes simples *mcwc-1Δ* (Figuras 3.17, 3.19 y 3.21 del Apartado 3.5). Estos fragmentos contenían el gen *pyrG* flanqueado por secuencias de cada uno de los genes *mcwc-1*, para permitir la recombinación homóloga y la sustitución de estos genes por el gen *pyrG*.

3.8.1. Aislamiento de mutantes homocariontes

Se obtuvo un total de 28 transformantes *ura*⁺ para el gen *mcwc-1a*, 14 para *mcwc-1b* y 74 para *mcwc-1c*. Los transformantes iniciales se crecieron en medio selectivo durante varios ciclos vegetativos hasta que se consiguieron transformantes homocariontes para cada gen. Estos fueron: la estirpe MU251 para la interrupción del gen *mcwc-1a*, los mutantes MU252 y MU253 para la del gen *mcwc-1b*, y MU254 y MU255 para la del gen *mcwc-1c*.

3.8.2. Comprobación de las interrupciones mediante *Southern*

En todos los casos se comprobó, mediante hibridaciones tipo *Southern*, la delección tanto de los genes *mcwc-1* como del gen *crgA* en los transformantes homocariontes (Figuras 3.31, 3.32 y 3.33). Para comprobar las interrupciones de los genes *mcwc-1* se realizaron las mismas digestiones y se utilizaron las mismas sondas que para la caracterización de las interrupciones en fondo silvestre (resumen de las sondas utilizadas y de los fragmentos esperados en las Tablas 2.8 y 3.3). El análisis de los fragmentos de hibridación obtenidos demostró la interrupción de cada gen *mcwc-1* en los transformantes correspondientes, lo que además quedó claramente patente por la coincidencia de los patrones de bandas de hibridación entre los transformantes y los correspondientes mutantes sencillos para cada gen *mcwc-1* (Figuras 3.31, 3.32 y 3.33), cuando se utilizaron las sondas de los genes *mcwc-1* (*a*, *b*, *c*, *d*, *e* y *f*). Para comprobar que las estirpes continuaban portando la delección del gen *crgA*, las membranas se rehibridaron con la sonda del gen *crgA* (sonda *g*) correspondiente a la región delecionada en el mutante MU223, observándose que todos los mutantes carecían del gen *crgA* (Figuras 3.31, 3.32 y 3.33)

3.9. Estudio de la fotocarotenogénesis en los mutantes *mcwc-1*Δ *crgA*Δ

La acumulación de carotenos en respuesta a la luz se estudió en los dobles mutantes *mcwc-1*Δ *crgA*Δ, comparándolas con la estirpe silvestre (MU241) y un mutante *crgA*Δ (MU221), para determinar si existían interacciones entre *crgA* y alguno de los genes *mcwc-1* en la regulación de la síntesis de carotenos (Figura 3.34).

3.9.1. Los genes *mcwc-1a* y *mcwc-1c* no participan en la regulación de la carotenogénesis por *crgA*.

La acumulación de β-caroteno en la estirpe *mcwc-1a*Δ *crgA*Δ fue similar a la del mutante simple *crgA*Δ, confirmando que el gen *mcwc-1a* no regula la acumulación de carotenos (Figura 3.34). Sin embargo, la acumulación de carotenos en los mutantes *mcwc-1c*Δ *crgA*Δ mostraba diferencias respecto a la del mutante simple *crgA*Δ. Aunque ambos

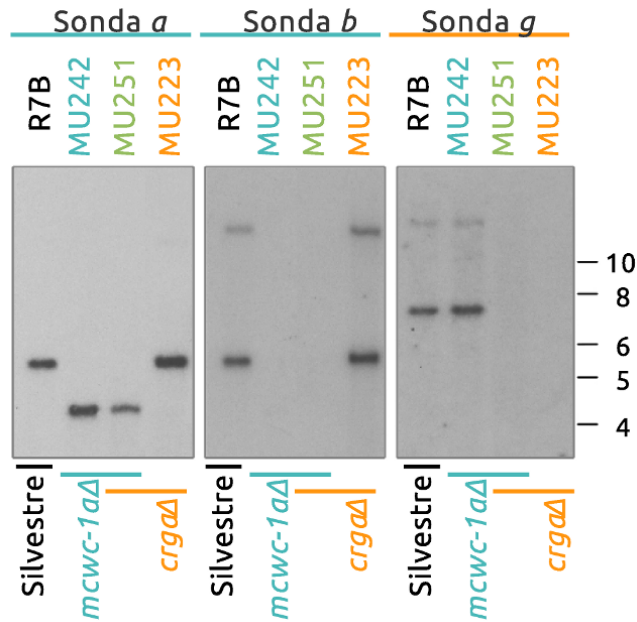


Figura 3.31. Hibridación tipo *Southern* de los mutantes *mcwc-1aΔ crgAΔ*

DNA genómico de las estirpes silvestre (R7B), recipiente (MU223), mutante simple *mcwc-1aΔ* (MU242) y doble mutante *mcwc-1aΔ crgAΔ* (MU251), se digirió con *SacI* y se hibridó con las sondas *a* y *b* de *mcwc-1a* y *g* de *crgA* (ver Tablas 2.8 y 3.3).

Las posiciones y tamaños de los fragmentos del marcador de tamaños (*GeneRuler 1 kb DNA Ladder*, Fermentas) se indican a la derecha de la imagen.

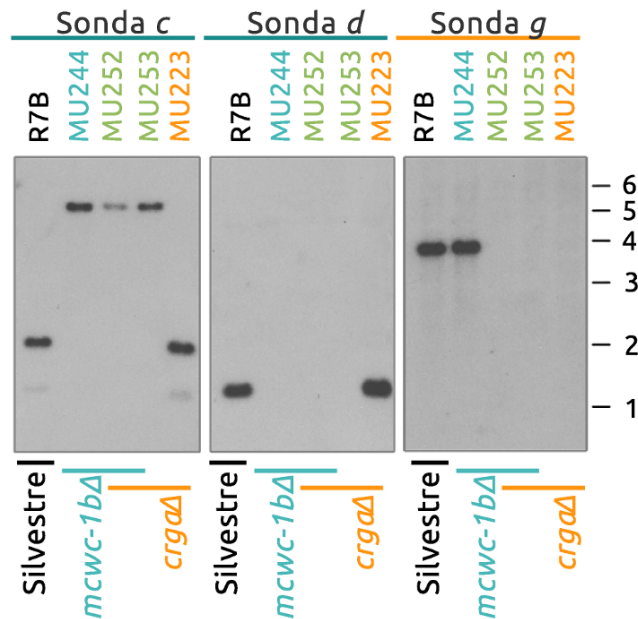


Figura 3.32. Hibridación tipo *Southern* de los dobles mutantes *mcwc-1bΔ crgAΔ*

DNA genómico de las estirpes silvestre (R7B), recipiente (MU223), mutante simple *mcwc-1bΔ* (MU244) y dobles mutantes *mcwc-1bΔ crgAΔ* (MU252-3), se digirió con *EcoRI* y se hibridó con las sondas *c* y *d* de *mcwc-1b* y *g* de *crgA* (ver Tablas 2.8 y 3.3).

Las posiciones y tamaños de los fragmentos del marcador de tamaños (*GeneRuler 1 kb DNA Ladder*, Fermentas) se indican a la derecha de la imagen.

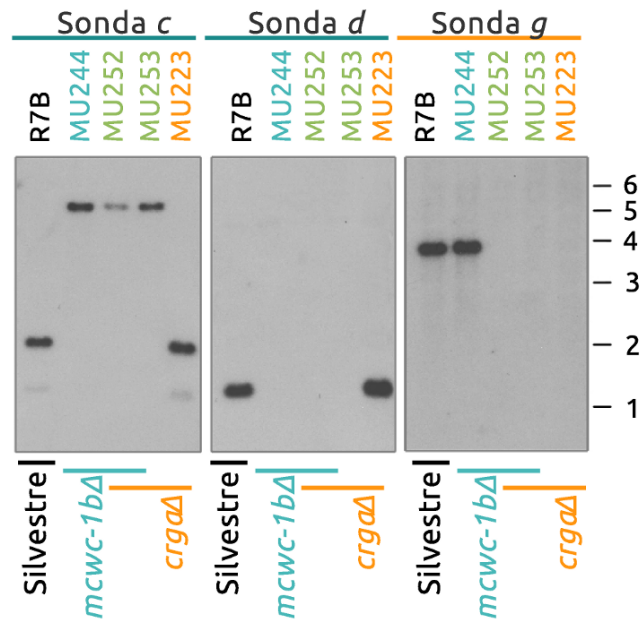


Figura 3.33. Hibridación tipo *Southern* de los mutantes *mcwc-1cΔ crgAΔ*

DNA genómico de las estirpes silvestre (R7B), recipiente (MU223), del mutante simple *mcwc-1cΔ* (MU247) y de los dobles mutantes *mcwc-1cΔ crgAΔ* (MU254-5), se digirió con *SpeI* y se hibridó con las sondas *e* y *f* de *mcwc-1c* y *g* de *crgA* (ver Tablas 2.8 y 3.3).

Las posiciones y tamaños de los fragmentos del marcador de tamaños (*GeneRuler 1 kb DNA Ladder*, Fermentas) se indican a la derecha de la imagen.

tipos de estirpes presentaban niveles similares de carotenos en la oscuridad, los mutantes *mcwc-1cΔ crgAΔ* solo fueron capaces de incrementarlos ligeramente en respuesta a la iluminación, al contrario de lo que ocurre en el mutante simple *crgAΔ*, donde los niveles se duplican (Figura 3.34).

Estos resultados indican que los mutantes dobles *mcwc-1cΔ crgAΔ*, al igual que los mutantes simples *mcwc-1cΔ*, son deficientes en la inducción por luz de la carotenogénesis y sugieren la presencia de una ruta de inducción por luz mediada por *mcwc-1c* e independiente de la ruta de represión mediada por *crgA*.

3.9.2. El gen *mcwc-1b* es necesario para la regulación de la carotenogénesis por *crgA*

Sorprendentemente, los mutantes dobles *mcwc-1bΔ crgAΔ* presentaron un fenotipo silvestre respecto a la carotenogénesis, mostrando niveles de β -caroteno, en oscuridad y luz, muy parecidos a los de la estirpe silvestre. Según estos datos, la pérdida del gen *mcwc-1b* suprime completamente el efecto de la mutación de *crgA*, recuperándose el fenotipo silvestre tanto en oscuridad como en luz (Figura 3.34).

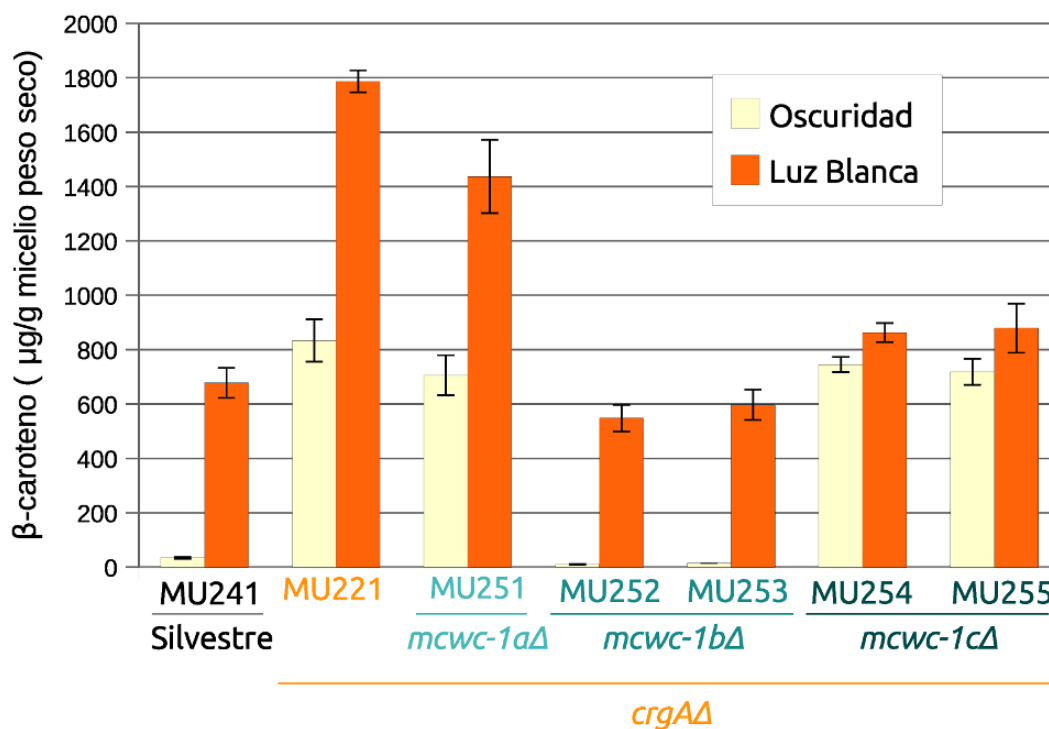


Figura 3.34. Contenido de β -caroteno en los mutantes *mcwc-1Δ crgAΔ*.

Carotenos extraídos de los micelios de las estirpes indicadas, crecidas sobre medio sólido (YNB pH 4,5), en condiciones de oscuridad (48 h en oscuridad) o luz (24 h en oscuridad + 24 h en luz). Se representan las medias \pm errores estándar de 4 experimentos diferentes.

El papel de *mcwc-1b* en la regulación por *crgA* se confirmó con el aislamiento de una estirpe en la que se suprimía el fenotipo *crgA*⁻ (MU256). El mutante supresor MU256 se aisló fortuitamente debido a su fenotipo silvestre, color blanco en la oscuridad, en una siembra de esporas de la estirpe MU223 (*crgAΔ pyrG*⁻), cuyas colonias son normalmente amarillas en la oscuridad. Los genes *mcwc-1b* y *crgA* de este mutante supresor se analizaron mediante secuenciación e hibridaciones tipo *Southern*, confirmándose por un lado la delección del gen *crgA*, y por otro la existencia de una delección de 47 pb en la zona de unión entre el exón 3 y el intrón 3 del gen *mcwc-1b* (Figuras 3.35 y 3.40). Esta mutación genera un codón sin sentido prematuro que produce una proteína truncada, con solo el dominio LOV (Figura 3.40). Además, mediante amplificación por PCR, se confirmó que esta delección era exclusiva del mutante MU256 y que no estaba presente en la estirpe parental MU223 (Figura 3.36).

De nuevo se recurrió a la complementación para demostrar que la mutación en el gen *mcwc-1b* era la responsable del fenotipo supresor. Para ello, se reintrodujo una copia silvestre del gen *mcwc-1b* en el mutante supresor MU256 (*mcwc-1bΔ crgAΔ pyrG*⁻) utilizando el plásmido pMAT1148 (Figura 3.37), que contenía una copia silvestre del gen *mcwc-1b*, con su promotor, y el marcador de selección *pyrG*.

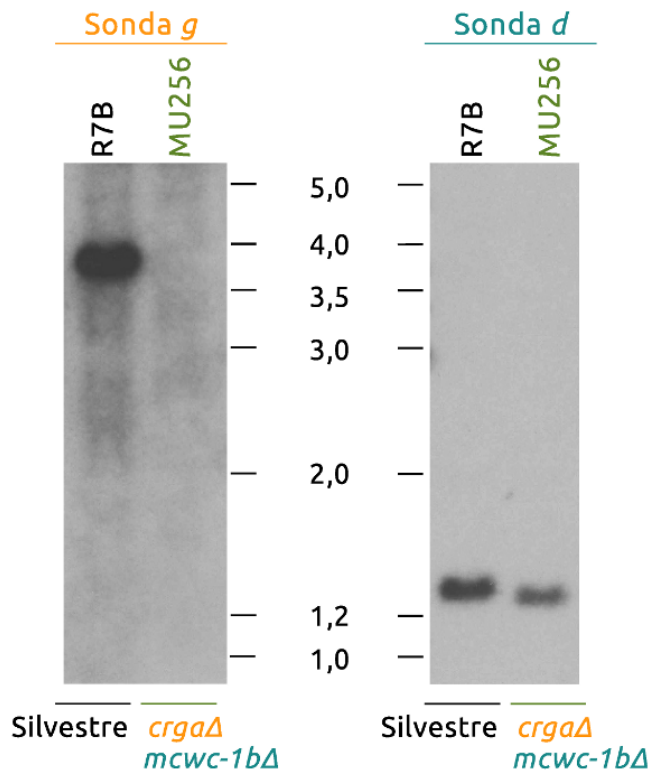


Figura 3.35. Hibridación tipo *Southern* del mutante supresor MU256.

DNA genómico de las estirpes indicadas, digerido con *EcoRI*, se hibridó con las sondas *g* (*crgA*) y *d* (*mcwc-1b*). Fragmentos esperados en la hibridación:

Sonda *g*: banda de 3,8 kb en el silvestre, ausencia de fragmento en el mutante *crgAΔ*.

Sonda *d*: 1,3 kb en una estirpe silvestre para el gen *mcwc-1b*.

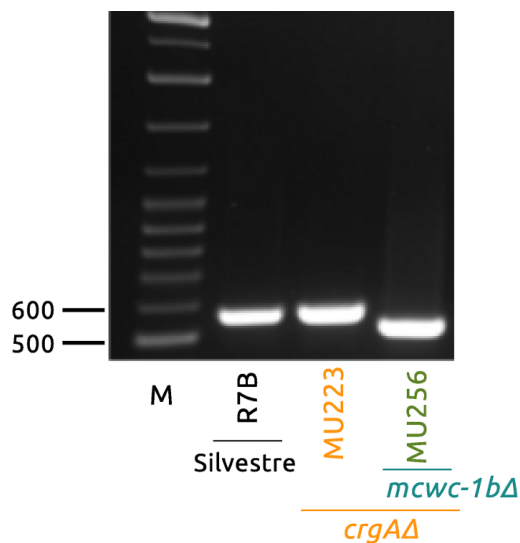


Figura 3.36. Amplificación por PCR del gen *mcwc-1b* en las estirpes supresora (MU256) y parental (MU223).

DNA genómico de las estirpes indicadas se amplificó con cebadores específicos del gen *mcwc-1b* (*mcwc-1b-m1* y *mcwc-1b-p9*). Los fragmentos obtenidos en cada caso corresponden a la versión silvestre del gen (552 pb) y a la versión mutante con una deleción de 47 pb (505 pb).

M: Las posiciones de los fragmentos de 500 y 600 pb del marcador de tamaños (*GeneRuler 1 kb DNA Ladder*, Fermentas) se indican a la izquierda de la imagen.

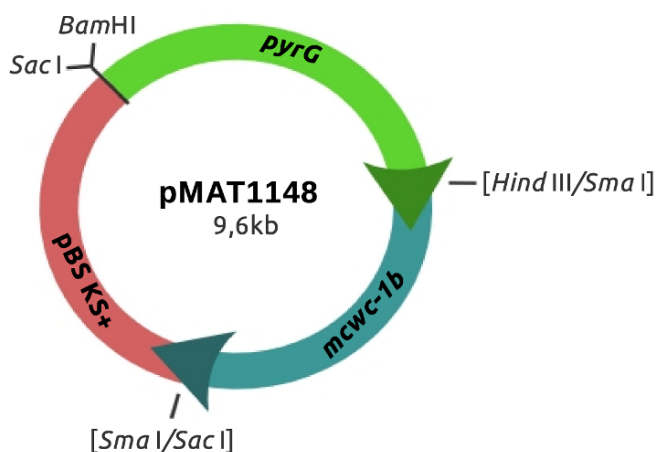


Figura 3.37. Plásmido pMAT1148.

Plásmido usado en la complementación del mutante *mcwc-1b⁻ crgA Δ* (MU256). Contiene una copia silvestre del gen *mcwc-1b* clonada en el sitio *SmaI* de pEPM1 [22], que porta el marcador de selección *pyrG*. El gen *mcwc-1b* se purificó del plásmido pMAT1118 por digestión con *HindIII* y *SacI* (fragmento de 3,4 Kb). Ambos genes se encuentran bajo el control de sus respectivos promotores.

La mayor parte de los 101 transformantes iniciales mostraron el fenotipo silvestre de la estirpe recipiente en la oscuridad (color blanco), pero 11 de ellos presentaban tonos amarillentos, desde amarillo pálido hasta intenso, lo que sugería la complementación del fenotipo supresor. Se sembraron esporas de dos de los transformantes más amarillos (T1 y T2) y se analizó el contenido en β -caroteno de las colonias amarillas obtenidas, observándose, en ambos casos, niveles de β -caroteno superiores a los de la estirpe supresora, aunque no se llegaron a alcanzar las cantidades del mutante *crgA Δ* (Figura 3.38).

De los dos transformantes analizados, el transformante T1 presentaba niveles de carotenos más parecidos a la estirpe mutante *crgA⁻*, lo que puede estar relacionado con el número de copias del plásmido pMAT1148, como sugirió la amplificación por PCR del gen *mcwc-1b* en los transformantes T1 y T2. Los cebadores utilizados amplificaban tanto el alelo cromosómico (mutante) como plasmídico (silvestre), permitiendo diferenciar uno del otro debido a la delección de 47 pb presente en el mutante. Los resultados de esta amplificación mostraron que la cantidad de alelo silvestre es mayor en el transformante T1 que en T2 (Figura 3.39). Por tanto, la introducción del alelo silvestre de *mcwc-1b* restaura parcialmente el fenotipo mutante *crgA⁻*, tanto en oscuridad como en luz (Figura 3.38), siendo probable que la restauración parcial sea consecuencia de un bajo número de copias del mismo.

Estos resultados indican que el fenotipo silvestre observado en la estirpe supresora MU256 se debe a la presencia del alelo mutante de *mcwc-1b*, y que el fenotipo *crgA⁻* depende de la presencia de un alelo funcional del gen *mcwc-1b*.

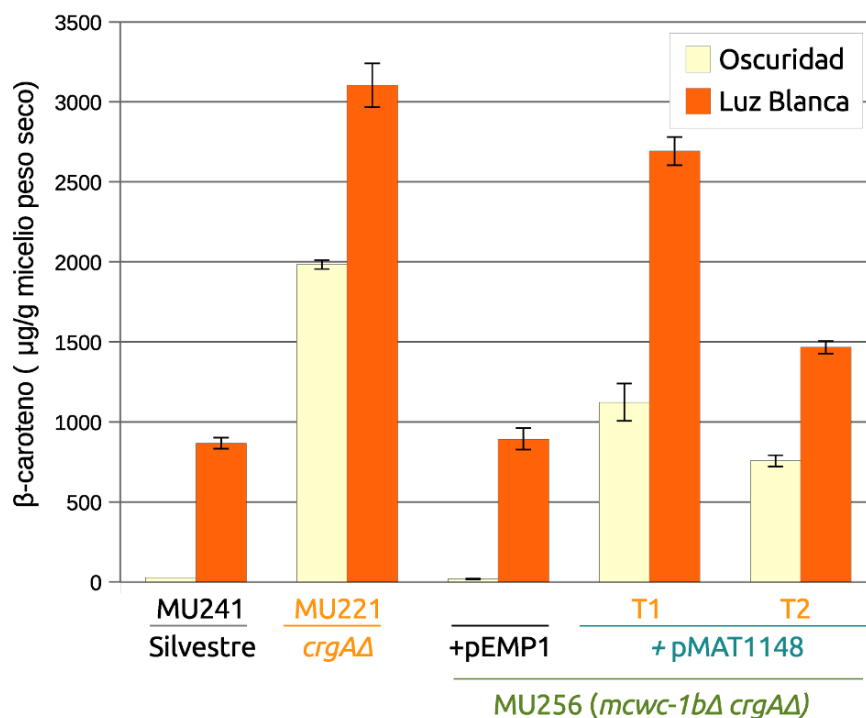


Figura 3.38. Acumulación de carotenos en transformantes *mcwc-1b⁻ crgAΔ* (MU256) complementados.

Contenido de carotenos en micelios de las estirpes indicadas, crecidas sobre medio sólido (YNB pH 3,2), en condiciones de oscuridad (84 h en oscuridad) o luz (60 h en oscuridad + 24 h en luz). Se representan las medias \pm errores estándar de 4 experimentos diferentes.

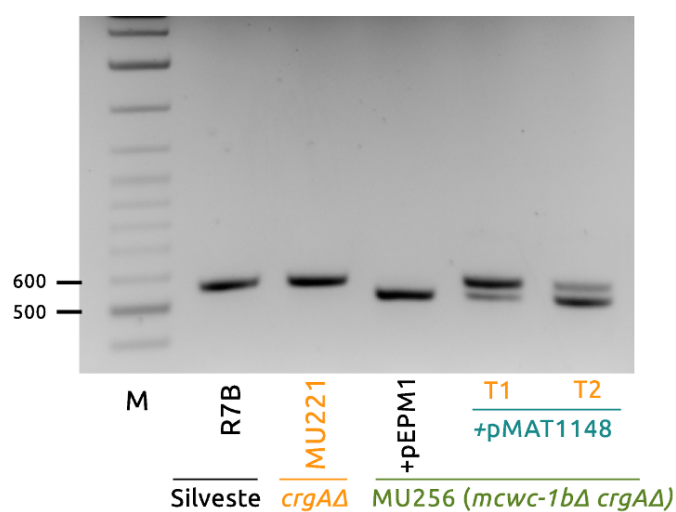


Figura 3.39. Amplificación del gen *mcwc-1b* en los transformantes T1 y T2.

DNA de las estirpes indicadas se amplificó con cebadores específicos del gen *mcwc-1b* (*mcwc-1b-m1* y *mcwc-1b-p9*). Los fragmentos obtenidos en cada caso corresponden a la versión silvestre del gen (552 pb) y a la versión mutante con una delección de 47 pb (505 pb).

M: Las posiciones de los fragmentos de 500 y 600 pb del marcador de tamaños (*GeneRuler 1 kb DNA Ladder*, Fermentas) se indican a la izquierda de la imagen.

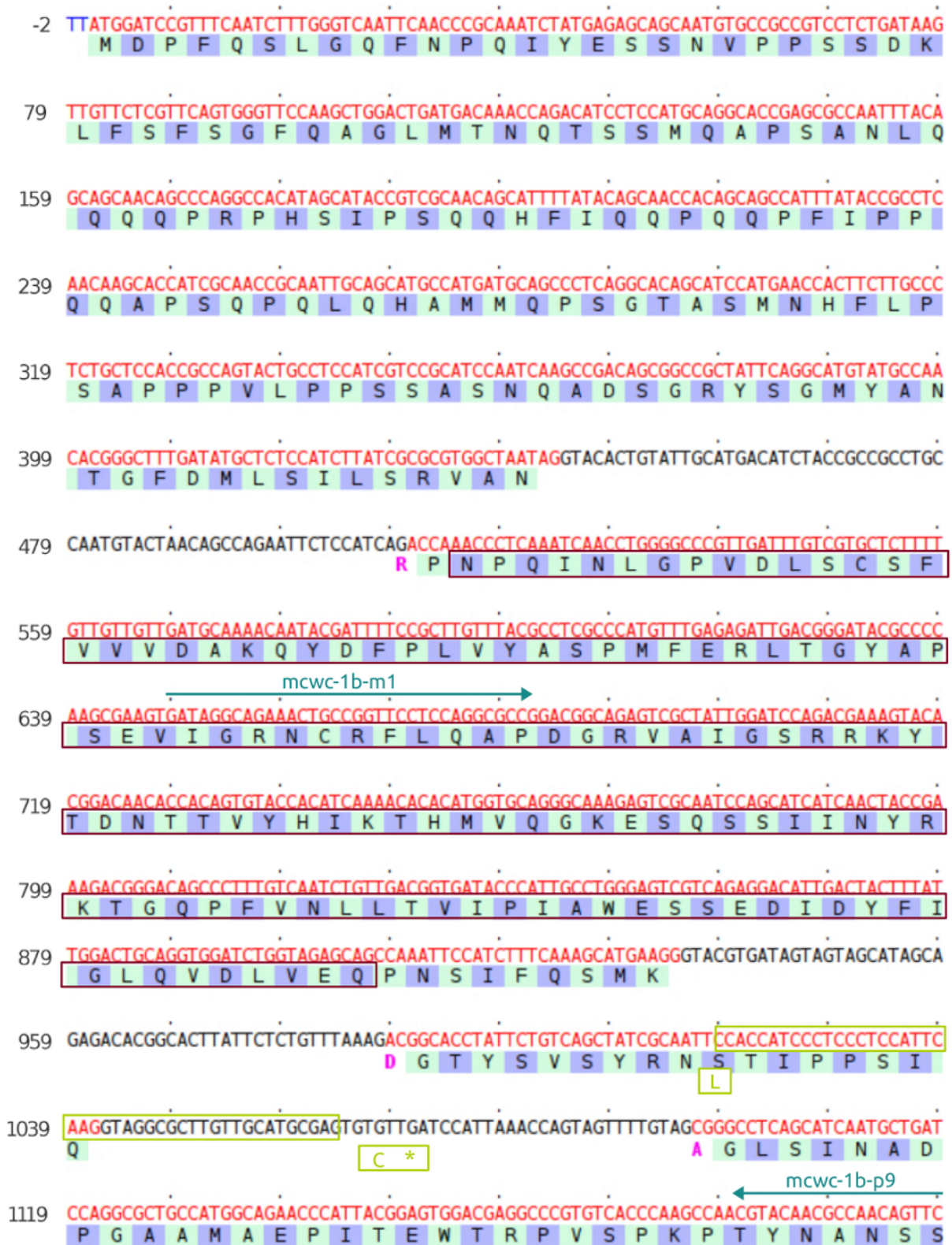


Figura 3.40. Delección presente en el gen *mcwc-1b* del mutante supresor MU256 (*mcwc-1b⁻crgAΔ*).

La región deletcionada del gen *mcwc-1b* en el mutante MU256 se indica recuadrada en verde. Los aminoácidos del hipotético extremo carboxilo de la proteína truncada resultante se indican bajo la secuencia aminoacídica silvestre, recuadrados en verde. El dominio LOV se representa recuadrado en rojo. También se indican los cebadores utilizados en las Figuras 3.36 y 3.39

3.10. Regulación por luz en los mutantes *mcwc-1*Δ *crgA*Δ

Las medidas de β -caroteno en los mutantes dobles *mcwc-1*Δ *crgA*Δ sugieren la existencia de dos rutas de regulación independientes mediadas por distintos genes *mcwc-1*. Para determinar si estas rutas están actuando a nivel de transcripción se analizó la expresión génica de *carB*, *carRP* y *mcwc-1c* en los mutantes dobles.

3.10.1. Expresión de los genes *carB* y *carRP*

El análisis se llevó a cabo de manera similar al realizado en los mutantes simples *mcwc-1*Δ (Apartado 3.7), pero añadiéndose un mutante simple *crgA*Δ a la comparación. Este mutante sobreexpresa los genes *carB* y *carRP*, fundamentalmente en la oscuridad, conservando la inducción por la luz [218]. En nuestro caso, se estudió la acumulación de RNA mensajero, en oscuridad y tras iluminación durante 20 y 60 minutos, mediante hibridaciones tipo *Northern*.

Expresión en los mutantes *mcwc-1a*Δ *crgA*Δ y *mcwc-1c*Δ *crgA*Δ

En los mutantes *mcwc-1a*Δ *crgA*Δ y *mcwc-1c*Δ *crgA*Δ, los niveles de los mRNAs de los genes carotenogénicos son similares a los del mutante simple *crgA*Δ, esto es, *carB* y *carRP* siguen sobreexpresándose, tanto en oscuridad como en luz (Figura 3.41), y se inducen por la luz. Este resultado sugiere que en ausencia del gen *crgA* se recupera la fotoinducción de los genes carotenogénicos, que estaba severamente afectada en los mutantes simples *mcwc-1a*Δ y *mcwc-1c*Δ (Figura 3.30).

Si cabe, es más sorprendente el incremento de los niveles de mensajero de los genes carotenogénicos en respuesta a la luz en el mutante *mcwc-1c*Δ *crgA*Δ, ya que no está asociado a un incremento considerable en el contenido en carotenos (Figura 3.34). Este resultado sugiere que la proteína Mcwc-1c podría participar en la síntesis de carotenos en un paso posterior a la regulación transcripcional de los genes carotenogénicos.

Expresión en el mutante *mcwc-1b*Δ *crgA*Δ

En el mutante doble *mcwc-1b*Δ *crgA*Δ, la acumulación de mRNA de los genes carotenogénicos fue similar a la que se observó en la estirpe silvestre, lo que es más evidente cuando se comparan los niveles en la oscuridad de ambas estirpes (Figura 3.41). La expresión de los genes *carB* y *carRP* en el mutante doble *mcwc-1b*Δ *crgA*Δ concuerdan con su fenotipo silvestre respecto a la carotenogénesis, y por lo tanto, la pérdida del gen *mcwc-1b* suprime el efecto de la mutación de *crgA* sobre la expresión de los genes carotenogénicos, tanto en oscuridad como en luz.

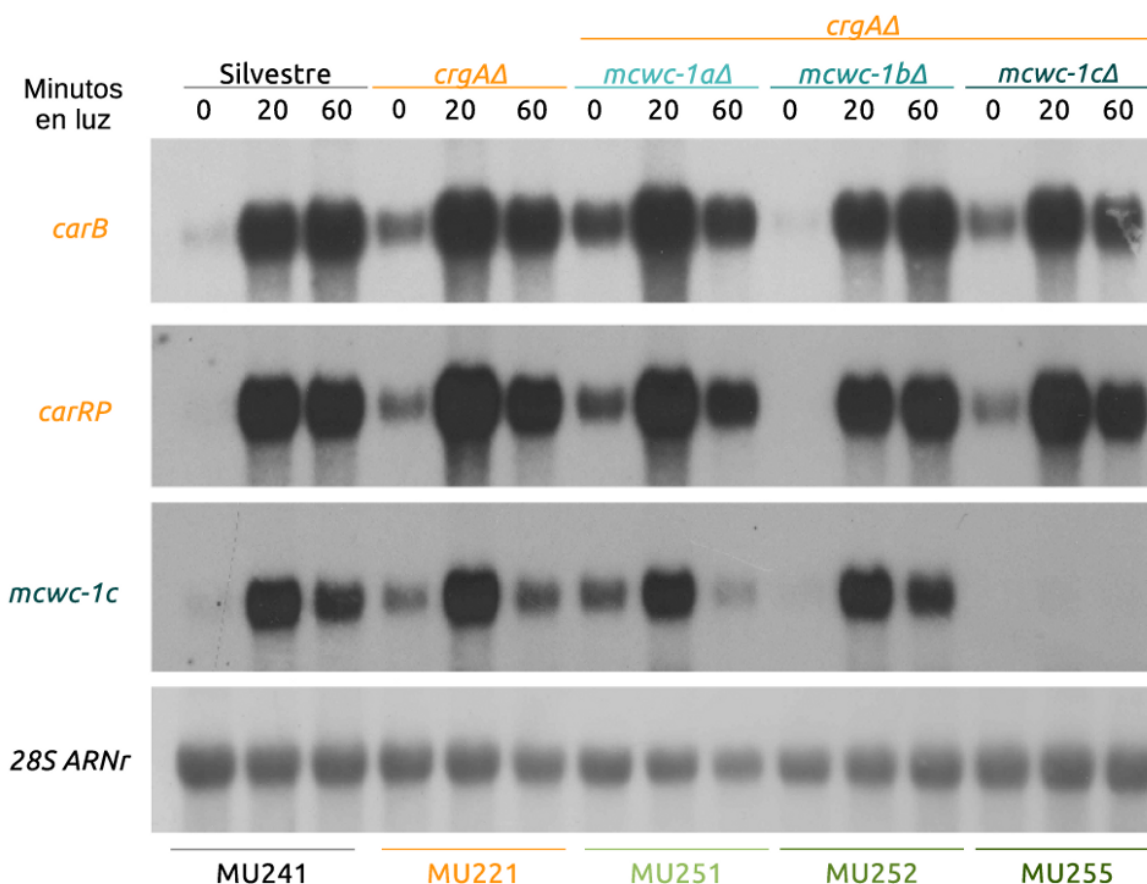


Figura 3.41. Análisis de la acumulación de transcritos de *mcwc-1c*, *carB* y *carRP* en los mutantes *mcwc-1Δ crgAΔ*.

Micelios de la estirpe silvestre MU241, del mutante simple *crgAΔ* (MU221), y de los mutantes dobles *mcwc-1aΔ crgAΔ* (MU251), *mcwc-1bΔ crgAΔ* (MU252) y *mcwc-1cΔ crgAΔ* (MU255), crecidos en medio sólido (YNB pH 4,5) durante 48 horas en oscuridad (tiempo 0), fueron iluminados con luz blanca el tiempo indicado (min). El RNA extraído de cada muestra se hibridó sucesivamente con sondas para cada gen y para el control de carga ARNr 28S (Tabla 2.8 y Figura 2.1).

3.10.2. Expresión del gen *mcwc-1c* en los mutantes *mcwc-1Δ crgAΔ*

Los mutantes simple *crgAΔ* y doble *mcwc-1aΔ crgAΔ* acumulan mayores cantidades de mensajero de *mcwc-1c* que la estirpe silvestre, tanto en oscuridad como en luz, de forma parecida a lo que ocurre en los genes carotenogénicos estructurales, indicando que su expresión está controlada por *crgA*. Así mismo, y de nuevo de forma parecida a lo que ocurre con los genes carotenogénicos, se observó una recuperación del patrón de expresión silvestre de *mcwc-1c* en el mutante *mcwc-1bΔ crgAΔ*, indicando que *crgA* regula la expresión de *mcwc-1c* a través de *mcwc-1b* (Figura 3.41).

3.11. Regulación de la expresión de *mcwc-1b* por *crgA*

3.11.1. Análisis de la regulación a nivel transcripcional

Los análisis de los mutantes *mcwc-1b*Δ *crgA*Δ, descritos en los apartados precedentes, indicaban que *crgA* controla la carotenogénesis a través del gen *mcwc-1b*. Concretamente, *crgA* debería bloquear la función de *mcwc-1b*, a nivel transcripcional o postranscripcional. Para determinar si el control se produce a nivel transcripcional, se analizó la acumulación de mRNA de *mcwc-1b* en el mutante *crgA*Δ y se comparó con la estirpe silvestre, en oscuridad y tras iluminación. Como se muestra en la hibridación tipo *Northern* de la Figura 3.42, los niveles de mensajero de *mcwc-1b* fueron similares en el silvestre y en el mutante nulo *crgA*Δ, sugiriendo que la transcripción de *mcwc-1b* no está controlada por *crgA*.

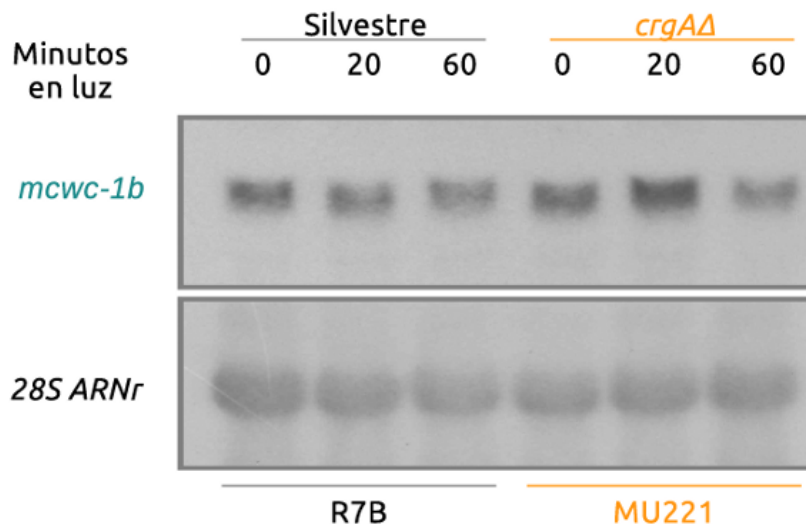


Figura 3.42. Acumulación de transcritos del gen *mcwc-1b* en el mutante simple *crgA*Δ.

Micelios de la estirpe silvestre MU241 y del mutante simple *crgA*Δ (MU221), crecidos en medio sólido (YNB pH 4,5) durante 48 horas en oscuridad (tiempo 0), fueron iluminados con luz blanca el tiempo indicado. Se muestra la hibridación con la sonda *d* (Tabla 2.8 y Figura 2.1), específica del gen *mcwc-1b*, y con la sonda del ARNr 28S como control de carga.

3.11.2. Análisis de la regulación a nivel post-transcripcional

Una vez determinado que la regulación de *mcwc-1b* no se produce a nivel transcripcional, se analizó la proteína Mcwc-1b mediante inmunodetección tipo *Western*. Estos análisis fueron posibles gracias a la generación previa de un anticuerpo monoespecífico

contra un péptido de 119 aminoácidos de la proteína, desde la isoleucina de la posición 284 a la cisteína de la posición 402. Estos anticuerpos fueron purificados mediante cromatografía de afinidad en columnas que contenían el mismo péptido (Pacific Immunologic, ver *Materiales y Métodos* 2.8.5).

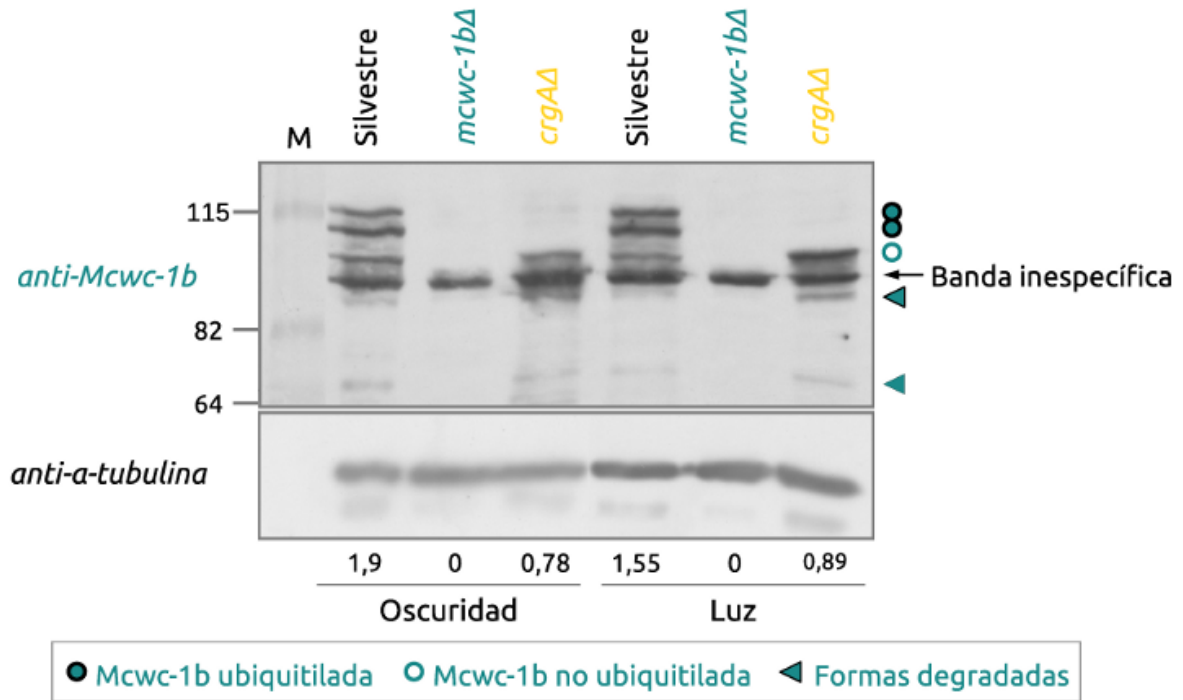


Figura 3.43. Isoformas de la proteína Mcwc-1b en la estirpe silvestre y en el mutante *crgAΔ*.

Arriba: Extractos crudos de micelios de la estirpe silvestre (MU241) y de los mutantes simples *mcwc-1bΔ* (MU244+pLEU4) y *crgAΔ* (MU221), crecidos sobre medio sólido (YNB pH 4,5), en condiciones de oscuridad (18 h en oscuridad) o luz (17h en oscuridad + 1h en luz), fueron analizados mediante inmunodetección tipo *Western* usando anticuerpos monoespecíficos anti-Mcwc-1b. Los círculos indican formas de la proteína Mcwc-1b (rellenos: formas específicas de la estirpe silvestre; vacíos: forma presente en la estirpe silvestre y en el mutante *crgAΔ*). Los triángulos indican posibles productos de degradación de Mcwc-1b. M: marcador cuyos pesos moleculares se indican a la izquierda de la imagen (kDa).

Abajo: Control de carga. Se muestra la misma membrana incubada con anticuerpos anti- α -tubulina humana. Debajo de cada calle se indica la cantidad relativa de proteína Mcwc-1b, obtenida sumando las señales de todas las isoformas en la calle correspondiente y normalizando con la señal de la α -tubulina.

Los niveles de la proteína Mcwc-1b se analizaron en la estirpe silvestre y en el mutante simple *crgAΔ*, en luz y en oscuridad, usando como control negativo el mutante *mcwc-1bΔ*. En la estirpe silvestre, el anticuerpo reconoció tres formas proteicas, de 106, 115 y 125 kDa, correspondientes a la proteína Mcwc-1b, como sugiere su ausencia en el

mutante *mcwc-1b* Δ . Las tres isoformas de *Mcwc-1b* podrían deberse a variantes transcripcionales del gen o a formas modificadas de la proteína. Además de estas isoformas de *Mcwc-1b*, el anticuerpo reaccionó con una proteína distinta a *Mcwc-1b* (interacción inespecífica), que se usó posteriormente como control de carga en algunos experimentos. También se detectaron algunas bandas específicas de menor intensidad y tamaño, que podrían corresponder a productos de degradación. Por el contrario, en el mutante *crgA* Δ no aparecieron las isoformas de 115 y 125 kDa, presentando únicamente la isoforma de 106 kDa (Figura 3.43). La desaparición de las isoformas de 115 y 125 kDa en el mutante nulo *crgA* Δ implica a *crgA*, directa o indirectamente, en su producción.

Además, la luz no modificó ni la cantidad de proteína *Mcwc-1b* acumulada ni la abundancia relativa de cada isoforma, tanto en la estirpe silvestre como en el mutante *cgrA* Δ (Figura 3.43), sugiriendo que la luz no regula la aparición de estas isoformas ni la abundancia de la proteína.

3.11.3. Caracterización de las modificaciones post-traduccionales de la proteína *Mcwc-1b*

Como se ha comentado anteriormente, el patrón de isoformas de *Mcwc-1b* observado en la estirpe silvestre podría deberse a modificaciones post-traduccionales. Por ello, se analizaron tres modificaciones que pueden afectar a la movilidad electroforética de las proteínas: glicosilación, fosforilación y ubiquitilación.

Análisis de N-glicosilación

Para determinar si las isoformas eran consecuencia de un diferente estado de glicosilación, se trataron extractos totales de proteína de la estirpe silvestre con N-glicosidasa F, enzima que elimina los azúcares unidos a proteínas a través de la cadena lateral de la asparragina (N-glicosilación), uno de los tipos de glicosilación de proteínas que aparecen en hongos. El patrón de bandas obtenido tras el tratamiento fue idéntico al del control sin glicosidasa (Figura 3.44), por lo que *Mcwc-1b* carecería de N-glicanos, lo que concuerda con su predicción de localización nuclear y con la ausencia de péptido señal para su secreción.

Análisis de fosforilación

De forma equivalente al análisis de N-glicosilación, para determinar si la aparición de distintas isoformas dependía del estado de fosforilación, se trataron extractos totales de proteína de la estirpe silvestre con la fosfatasa de λ , enzima que elimina los grupos fosfato unidos a proteínas a través de las cadenas laterales de serina, treonina o tirosina.

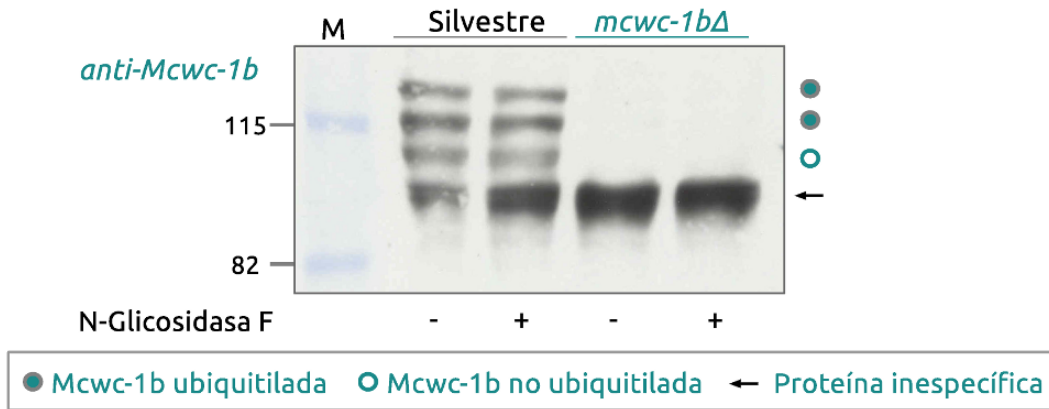


Figura 3.44. Análisis del estado de N-glicosilación de *Mcwc-1b*.

Extractos crudos extraídos de micelios de la estirpe silvestre (MU241) y del mutante simple *mcwc-1bΔ* (MU244+pLEU4), crecidos sobre medio sólido (YNB pH 4,5) en oscuridad (18 h), fueron tratados con N-Glicosidasa F y analizados mediante inmunodetección tipo *Western*, usando el anticuerpo monoespecífico anti-*Mcwc-1b*. Los círculos indican formas de la proteína *Mcwc-1b* (re llenos: formas específicas de la estirpe silvestre; vacíos: forma presente en la estirpe silvestre y en el mutante *cgrAΔ*). Flecha: proteína inespecífica utilizada como control de carga.

Este tratamiento no alteró el número de isoformas de *Mcwc-1b*, pero sí incrementó ligeramente la movilidad de todas ellas, sin afectar a la proteína inespecífica (Figura 3.45). Este efecto desapareció cuando se bloqueó la actividad de la fosfatasa de λ mediante el tratamiento con EDTA, que secuestra los iones Mg^{+2} necesarios para la actividad de la enzima. Estos resultados sugirieron que las isoformas de *Mcwc-1b* en la estirpe silvestre están fosforiladas, aunque seguía sin explicarse la presencia de varias isoformas.

Análisis de ubiquitilación

Las tres isoformas de *Mcwc-1b* difieren entre 9 y 10 kDa, una diferencia que es compatible con la adición de moléculas de ubiquitina. Por esta razón, y porque *CrgA* posee dominios típicos de una ligasa de ubiquitina, se estudió también el estado de ubiquitilación de la proteína *Mcwc-1b*.

En primer lugar, se inmunoprecipitó *Mcwc-1b* a partir de extractos de la estirpe silvestre y de los mutantes nulos *crgAΔ* y *mcwc-1bΔ*, usando el mismo anticuerpo monoespecífico que en los experimentos previos. El resultado de la inmunoprecipitación se analizó mediante inmunodetección tipo *Western*, incubando con el anticuerpo utilizado en la inmunoprecipitación, como control de la inmunoprecipitación, y con anticuerpos policlonales anti-ubiquitina humana para detectar la presencia de moléculas de ubiquitina unidas a *Mcwc-1b*.

La incubación con el anticuerpo anti-*Mcwc-1b* demostró que la inmunoprecipitación

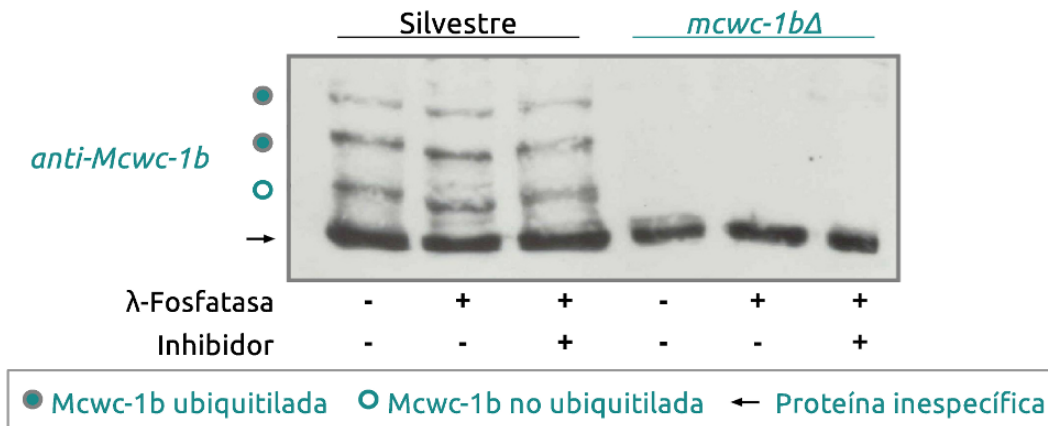


Figura 3.45. Análisis del estado de fosforilación de *Mcwc-1b*.

Extractos crudos extraídos de micelios de la estirpe silvestre (MU241) y del mutante simple *mcwc-1bΔ* (MU244+pLEU4), crecidos sobre medio sólido (YNB pH 4,5) en oscuridad (18 h), fueron tratados con la Fosfatasa de λ , con y sin inhibidor (50mM EDTA), y analizados mediante inmunodetección tipo *Western*, usando el anticuerpo monoespecífico anti-*Mcwc-1b*. Los círculos indican formas de la proteína *Mcwc-1b* (rellenos: formas específicas de la estirpe silvestre; vacío: forma presente en la estirpe silvestre y en el mutante *cgrAΔ*). Flecha: proteína inespecífica utilizada como control de carga.

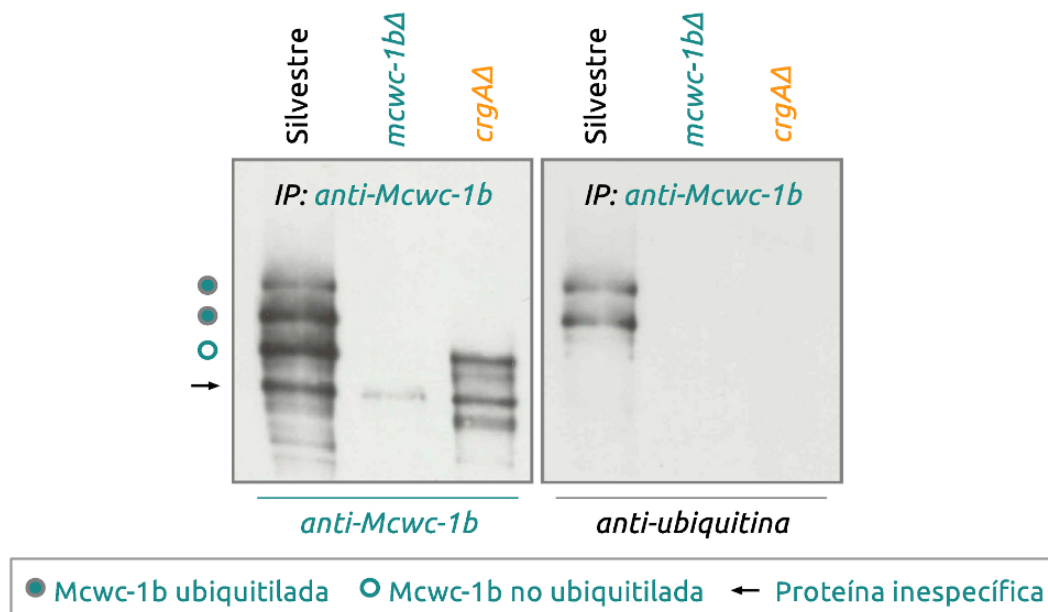


Figura 3.46. Análisis del estado de ubiquitilación de *Mcwc-1b*.

Extractos crudos extraídos de micelios de la estirpe silvestre (MU241) y de los mutantes simples *mcwc-1bΔ* (MU244+pLEU4) y *cgrAΔ* (MU221), crecidos sobre medio sólido (YNB pH 4,5) en oscuridad (18 h), fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo monoespecífico anti-*Mcwc-1b* y analizados mediante inmunodetección tipo *Western*, usando este mismo anticuerpo (izquierda) y un anticuerpo policlonal contra ubiquitina humana (derecha).

funcionaba correctamente, ya que se inmunoprecipitaron todas las isoformas de Mcwc-1b, así como la proteína inespecífica que reconoce el anticuerpo (Figura 3.46, izquierda). Sin embargo, los anticuerpos anti-ubiquitina solo reconocieron las isoformas de 115 y 125 kDa presentes en la estirpe silvestre (Figura 3.46, derecha), sugiriendo la unión de una y dos moléculas de ubiquitina, respectivamente, a Mcwc-1b. Siguiendo el mismo razonamiento, la isoforma de 106 kDa, que no fue reconocida por el anticuerpo anti-ubiquitina, correspondería a una forma no ubiquitilada de Mcwc-1b, pero con un tamaño mayor del estimado a partir de la secuencia deducida de aminoácidos (88,2 kDa). Esta diferencia de tamaño podría deberse a otras modificaciones no analizadas, o a una movilidad anormal de esta proteína en la electroforesis. Además, este análisis aportó un dato fundamental sobre la función de *crgA*, ya que la ausencia de las dos formas ubiquitiladas en el mutante *crgA* Δ sugiere la implicación de CrgA en la ubiquitilación de Mcwc-1b.

Una de las funciones más conocidas de la ubiquitilación es el marcaje para degradación vía proteosoma 26S. En este caso, según las estimaciones obtenidas mediante análisis densitométrico de las señales en el experimento de *Western* (Figura 3.43), Mcwc-1b es incluso más abundante en la estirpe silvestre, donde aparecen formas ubiquitiladas, que en el mutante *crgA* Δ , donde solo se encuentra la forma no ubiquitilada, sugiriendo que la adición de estas ubiquitinas no marcan a la proteína para su degradación.

3.11.4. Análisis de la interacción entre Mcwc-1b y CrgA

Si CrgA ubiquitila directamente a Mcwc-1b, debería entrar en contacto con ella en algún momento. Para determinar si esta interacción tiene lugar, se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación, utilizando anticuerpo anti-Mcwc-1b para inmunoprecipitar los posibles complejos Mcwc-1b-CrgA. Tras la inmunoprecipitación, la presencia de la proteína CrgA se analizó por inmunodetección tipo *Western*, incubando con tres anticuerpos anti-CrgA diferentes [193,213]. Ninguno de los anticuerpos detectó la presencia de CrgA, lo que sugiere una ausencia de interacción directa entre ambas proteínas o bien una interacción muy débil (Figura 3.47). Estas conclusiones se vieron apoyadas por la ausencia de interacción entre CrgA y Mcwc-1b en el sistema de dos híbridos de levadura, experimentos que se realizaron en nuestro laboratorio, con posterioridad a la finalización de este trabajo (Dr. Eusebio Navarro, comunicación personal).

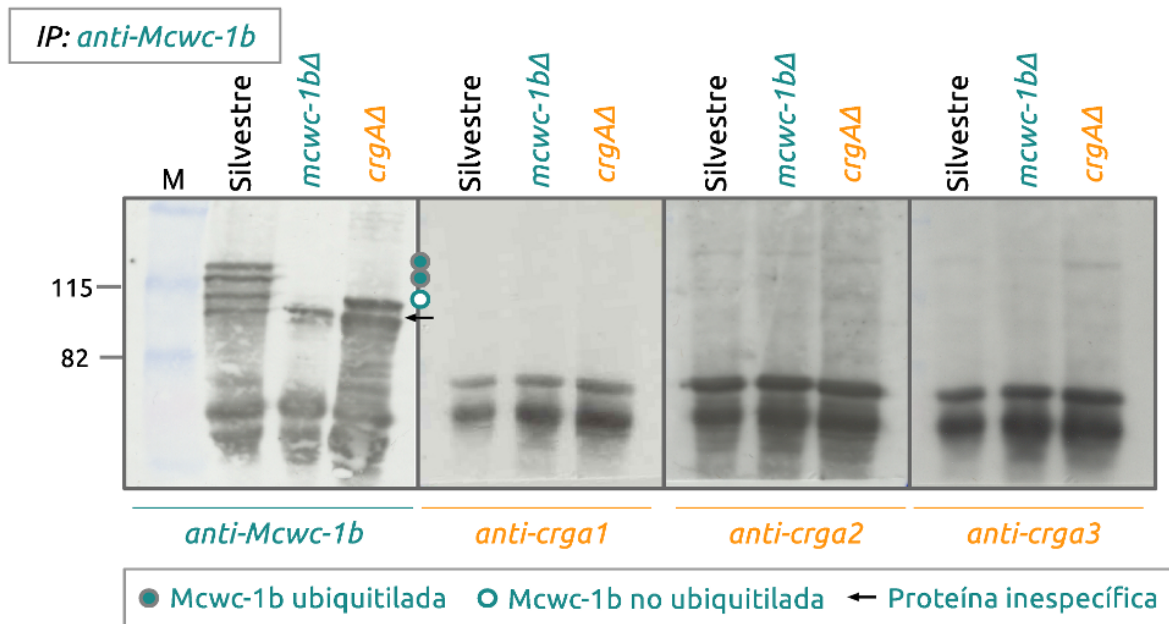


Figura 3.47. Co-inmunoprecipitación de *Mcwc-1b* y *CrgA*.

Extractos crudos extraídos de micelios de la estirpe silvestre (MU241) y de los mutantes simples *mcwc-1b* Δ (MU244+pLEU4) y *crgA* Δ (MU221), crecidos sobre medio sólido (YNB pH 4,5) en oscuridad (18 h), fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo mono-específico anti-*Mcwc-1b*, y analizados mediante inmunodetección tipo *Western*, usando este mismo anticuerpo (izquierda) y tres anticuerpos contra *CrgA* (*Materiales y Métodos* 2.8.6 y 2.8.10), para detectar la presencia de complejos *Mcwc-1b*-*CrgA*. Las proteínas de menor peso molecular que aparecen en todos los geles corresponden a las cadenas pesadas del anticuerpo utilizado en la inmunoprecipitación.

4 Discusión

4.1. Genes *mcwc-1* y sus homólogos en otros cigomicetos

En hongos, como en la mayoría de organismos, la luz es una fuente de información esencial. Los mecanismos moleculares implicados en las respuestas a la luz en hongos se han caracterizado más extensamente en el ascomiceto *N. crassa*, donde las proteínas Wc-1 (fotorreceptor) y Wc-2 controlan las principales respuestas a la luz, con la excepción de la fotoadaptación, que depende de Vivid [288].

Los mecanismos presentes en otros grupos de hongos parecen similares a los de *N. crassa*. Así, en basidiomicetos y cigomicetos los complejos WC también regulan la mayoría de respuestas conocidas, aunque en estos últimos el modelo se complica con la aparición de varias copias de los genes *wc-1* y *wc-2* por genoma. Los tres cigomicetos secuenciados en el momento de la redacción de esta memoria, *P. blakesleeanus*, *M. circinelloides* y *R. oryzae*, poseen tres genes de tipo *wc-1*, con diferentes funciones, tanto entre las distintas copias como entre organismos [138, 141, 293, 294]. En esta tesis identificamos y clonamos, previamente a la secuenciación del genoma, los tres genes de *M. circinelloides* con parecido a los genes *wc-1* de otros hongos, a los que hemos denominado *mcwc-1a*, *mcwc-1b* y *mcwc-1c*. Junto con los análisis realizados en *P. blakesleeanus*, este trabajo, y otros posteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio, constituyen los estudios más completos que existen sobre la función de este tipo de genes en cigomicetos.

En *P. blakesleeanus* se han propuesto cuatro rutas de transducción de la señal luminosa, distintas funcionalmente y constituidas por elementos específicos y compartidos por las otras rutas [48, 50]. En todas ellas intervienen los genes *madA* y *madB*, reflejando el papel clave de estos genes en la respuesta a la luz de este hongo. La clonación de los tres genes *wc-1* en ese organismo demostró que *madA* es uno de los genes *wc-1* [138], aunque las funciones de los otros dos genes *wc-1*, *wcoA* y *wcoB*, se desconocen. La expresión de los tres genes *wc-1* de *P. blakesleeanus* está controlada por la luz, mientras que en *M. circinelloides* la luz solamente afecta a la expresión de *mcwc-1c* [138, 279, 294]. No solo es diferente la regulación de la expresión de los genes *wc-1* en *M. circinelloides* y *P. blakesleeanus*, sino que el grado de especialización funcional también lo es, ya que en *P. blakesleeanus* tanto la fotocarotenogénesis como el fototropismo dependen de *madA*,

sin la aparente participación de *wcoA* o *wcoB*, mientras que en *M. circinelloides* el fototropismo está controlado por *mcwc-1a*, la fotocarotenogénesis por *mcwc-1c*, y *mcwc-1b* regula distintos procesos celulares, incluyendo la síntesis de carotenos, que dependen del gen *crgA* [138, 279, 293, 294].

Es difícil concretar relaciones de homología sin especificar funciones conservadas. La aparición de tres genes *wc-1* parece ser un evento propio de los cigomicetos, derivado de duplicaciones previas ya presentes en el ancestro común de estos organismos. Aunque es fácil separar a *mcwc-1b* y *wcoB* como provenientes de la misma duplicación ancestral, es un poco más complicado diferenciar los posibles ortólogos de *mcwc-1a* y *mcwc-1c* en *P. blakesleeanus*. Si nos fijamos en el árbol filogenético obtenido y en el grado de similitud entre las correspondientes proteínas, el gen *mcwc-1a* se encontraría más próximo a *madA* (Figura 3.15 y Tabla 3.1).

Si comparamos las regiones genómicas cercanas a los genes *wc-1* en los tres genomas de cigomicetos considerados, de nuevo es sencillo diferenciar dos grupos principales de sintenia, derivados de la misma duplicación ancestral. Según la anotación generada por el JGI y por el Broad Institute [141, 148, 149], por un lado se pueden agrupar los genes *mcwc-1b*, *wcoB* y *rowc-1b* (*Rhizopus oryzae wc-1b*), que comparten dos genes en sintenia (Factor de elongación de la traducción 1- γ y una dipeptidil peptidasa S9) (Tabla 3.2), y por el otro los genes *mcwc-1a*, *mcwc-1c*, *madA*, *wcoA*, *rowc-1a* y *rowc-1c*, en los que se reconoce un mayor número de genes conservados asociados a uno u otro gen de la pareja de cada especie, o incluso a ambos, como en el caso de la MAPK, que aparece cerca de *mcwc-1a*, de *rowc-1a* y de ambos genes de *P. blakesleeanus* (*madA* y *wcoA*). En este segundo grupo, por lo tanto, los genes asociados se mezclan entre los dos miembros de la pareja y no se puede asignar un conjunto de genes a *mcwc-1a* y otro *mcwc-1c* (Tabla 3.2).

Llama la atención la presencia de un gen de la asociación *crg/cig* en sintenia con genes *wc-1* de *P. blakesleeanus* y *R. oryzae*, aunque a mayor distancia que el resto de genes indicados (Tabla 3.2). Los genes *crgA/cigC* y *crgB/cigA* se encuentran agrupados y en tándem en *M. circinelloides*, por lo que encontrar uno de los miembros del par cerca de un gen *wc-1* podría verse como los restos de la presencia del par completo en el pasado. En *M. circinelloides*, sin embargo, ninguno de los genes *crg* o *cig* se localiza cerca de genes *mcwc-1*, aunque la presencia en *P. blakesleeanus* y *R. oryzae* podría indicar una asociación genómica en el pasado.

Con los datos actuales parece que cada grupo de proteínas Wc-1 evolucionó de forma diferente en cada cigomiceto, probablemente adquiriendo funciones especializadas relacionadas con la regulación por luz. Es por ello que, aunque podamos identificar posibles ortólogos basándonos en la historia evolutiva, no debemos extrapolar sus funciones concretas en otros cigomicetos.

4.2. Características estructurales de los productos de los genes *mcwc-1*

Las secuencias aminoacídicas, deducidas a partir de la secuencia de nucleótidos, y las arquitecturas de las tres proteínas Mcwc-1, son similares pero no idénticas. Todas presentan los dominios característicos de las proteínas Wc-1, como el dominio LOV, los dominios PAS, el dominio de localización nuclear y el dominio dedo de zinc tipo GATA, a excepción de la proteína Mcwc-1b que carece de dominio dedo de zinc canónico (Figuras 3.12 y 3.14). Los dominios LOV de las tres proteínas Mcwc-1 conservan los 11 aminoácidos esenciales para la interacción con el cromóforo [72], por lo que es probable que puedan unirlo y actuar como fotorreceptores, de forma similar a Wc-1 y Vivid en *N. crassa* (Figura 3.13). Además, como es típico de las proteínas Wc-1 de hongos, las tres poseen el lazo extendido de 11 aminoácidos respecto a los dominios LOV de plantas, entre las hélices A y C, sugiriendo el uso de FAD como cromóforo, en vez de FMN como en las fototropinas de plantas [45, 58, 73] (Figura 3.13).

Los otros dominios PAS de las proteínas Mcwc-1 podrían estar implicados en interacciones proteína-proteína, como ocurre en caso de *N. crassa*, donde algunos de ellos están implicados en la interacción entre Wc-1 y Wc-2 para formar los complejos WC [14] (Apartado 1.4.1). Por tanto, es probable que intervengan en las uniones entre Mcwc-1 y Mcwc-2, o entre los hipotéticos complejos WC y otros componentes de la ruta de transducción de la señal. La existencia de estos complejos en *M. circinelloides* está apoyada por la demostración de la interacción de las proteínas MadA y MadB (homólogos a Wc-1 y Wc-2, respectivamente) de *P. blakesleeanus*, tanto en estudios de doble híbrido en levaduras como en experimentos de copurificación en *E. coli* [279]. Sorprendentemente, a pesar de la existencia de 4 genes *wc-2* y de 3 genes *wc-1* en *P. blakesleeanus*, no se han detectado interacciones entre las otras proteínas Wc-1/Wc-2 en este organismo [279]. Este resultado puede deberse a las limitaciones de los sistemas heterólogos de expresión utilizados en los experimentos, como pueden ser la falta de modificaciones post-traduccionales específicas o de proteínas adicionales necesarias para la interacción [279].

La secuencia y la organización en tándem de los dos dominios PAS centrales de las proteínas tipo Wc-1 (PAS-B y PAS-C) son similares a los de las proteínas Period (Per) de mamíferos, que son componentes del reloj circadiano en estos organismos [12, 156]. Las estructuras de las tres proteínas Per en ratón (mPer1, mPer2 y mPer3) se han determinado recientemente [167], confirmándose la formación de homodímeros mediados por las superficies hoja- β de sus dominios PAS-B, que en las proteínas Wc-1 se corresponden con los dominios PAS-C (Figura 1.4). Los dos dominios PAS de las proteínas mPer me-

dian interacciones homo- y heterodiméricas entre ellas, pero también con otras proteínas, como los criptocromos y algunos factores transcripcionales [156, 167, 173, 339].

El dominio LOV presente en las proteínas Wc-1 también adopta una estructura de tipo PAS y se ha comprobado que puede mediar interacciones proteína-proteína, como la formación de dímeros en el caso de Vivid y Wc-1 [14, 342, 344]. Estas interacciones dependen de los cambios conformacionales desencadenados en el dominio LOV tras la iluminación [342], lo que permitiría modificar la composición de los complejos WC de forma dependiente de la luz.

Las secuencias de aminoácidos deducidas de Mcwc-1a y Mcwc-1c presentan un dominio dedo de zinc tipo GATA canónico, que suele asociarse a factores transcripcionales ya que puede unirse a DNA. Estos dominios no solo aparecen en proteínas tipo Wc-1, sino también en proteínas Wc-2, habiéndose demostrado en *N. crassa* que el dominio de Wc-2 es necesario para la inducción de la expresión génica por la luz, mientras que el de Wc-1 solo es necesario para la regulación de genes controlados por Wc-1 en la oscuridad, como los del ritmo circadiano [57, 58, 65, 185]. Además, las proteínas Wc-1 de basidiomicetos carecen de este dominio, por lo que es probable que en estos organismos la unión al DNA se produzca a través del dominio presente en Wc-2 [136].

Mcwc-1b y sus posibles ortólogos WcoB y Rowc-1b carecen de una secuencia canónica de dominio dedo de zinc tipo GATA, y tampoco se reconoce este dominio utilizando *HMMER* contra las bases de datos de Pfam o SMART (véase Apartado 3.3.2). Sin embargo, sí se obtienen alineamientos con estructuras de dominios dedo de zinc tipo GATA (Figura 3.14) utilizando programas (*HHPred*) que comparan estructuras de dominios. Estos programas presentan una mayor sensibilidad para la búsqueda de homólogos remotos debido a que la estructura de un dominio está más conservada que su secuencia.

Los elementos característicos de los dominios de dedo de zinc son los dos pares de cisteínas que unen el átomo de zinc, separados por un número concreto de aminoácidos (17-18 aminoácidos en plantas y hongos [185, 310]). Los pares de cisteínas están conservados en Mcwc-1b, WcoB y Rowc-1b, apoyando la existencia de dominios dedo de zinc, aunque la distancia que los separa es mayor de 18 aminoácidos. No obstante, en los últimos años se ha visto que la composición de aminoácidos alrededor de las cisteínas es bastante flexible. Por ejemplo Wc-1 y Wc-2 contienen residuos muy diferentes en posiciones que están conservadas en los dominios GATA de mamíferos [329]. Además, se conocen dominios dedos de zinc tipo GATA que unen secuencias de DNA distintas a las consenso y que se encuentran bastante alejados del modelo canónico, como el dedo de zinc tipo GATA de MED-1 en *C. elegans* [195] (Figura 4.1).

De todas formas, no se puede descartar que la secuencia de Mcwc-1b haya divergido demasiado y realmente no exista ya un dominio dedo de zinc tipo GATA funcional. Serían necesarios experimentos de mutagénesis, dirigidos a las cisteínas conservadas, para determinar si la activación de la transcripción observada en el mutante *crgA*⁻ depende de este hipotético dominio (véase Apartado 4.3.3). Sin embargo, es de destacar que HHPred no detecta ningún dominio dedo de zinc tipo GATA en los extremos C-terminales de las proteínas Wc-1 de basidiomicetos, ni en las de quitridios sin dedo de zinc canónico (una de las proteínas de *S. punctatus* tiene un dominio dedo de zinc tipo GATA canónico). Es más, todas ellas han perdido los pares de cisteínas que interaccionan con el zinc y sus extremos C-terminales no alinean con el resto de proteínas Wc-1.

4.3. Funciones de los genes *mcwc-1*

4.3.1. Control del fototropismo: *mcwc-1a*

En este trabajo se describe, por primera vez, que los esporangióforos de *M. circinelloides* presentan fototropismo positivo a la luz azul y verde. El comportamiento de los esporangióforos frente a la luz verde se había observado previamente en *P. blakesleeanus* y sugería la participación de un fotorreceptor diferente al de la carotenogénesis, ya que en la fotocarotenogénesis solo hay respuesta a la luz azul [100].

La respuesta a la luz verde en *M. circinelloides* se confirmó con la utilización de un filtro de banda estrecha (524-540 nm) para eliminar una posible contribución de la luz azul. Esta respuesta frente a la luz verde lleva a preguntarse cuál es el fotorreceptor de cigomicetos sensible a esta luz. En los genomas de *M. circinelloides* y de *P. blakesleeanus* no se han encontrado fotorreceptores de luz verde, apareciendo únicamente probables receptores de luz azul, como las proteínas Wc-1 y los criptocromos. El análisis de los mutantes en los genes *mcwc-1* ha mostrado que en *M. circinelloides* esta respuesta está controlada por el gen *mcwc-1a* (véase Apartado 3.6.2), al igual que en *P. blakesleeanus* lo está por *madA* [138], por tanto, por genes tipo *wc-1* en ambos casos. La proteína Wc-1 de *N. crassa* responde a luz azul y UV cercano, en concordancia con el espectro de absorción del cromóforo que une (FAD). Sin embargo se ha demostrado que los criptocromos de plantas, que también utilizan flavinas como cromóforos, pueden mediar respuestas a la luz verde [182].

Otra posibilidad es que exista un fotorreceptor desconocido para la luz verde, que tendría que actuar en conjunción con Mcwc-1a debido a su papel esencial en el fototropismo. En otros organismos se ha observado este tipo de agregaciones, con estímulos captados

4.3.1 Control del fototropismo: mcwc-1a

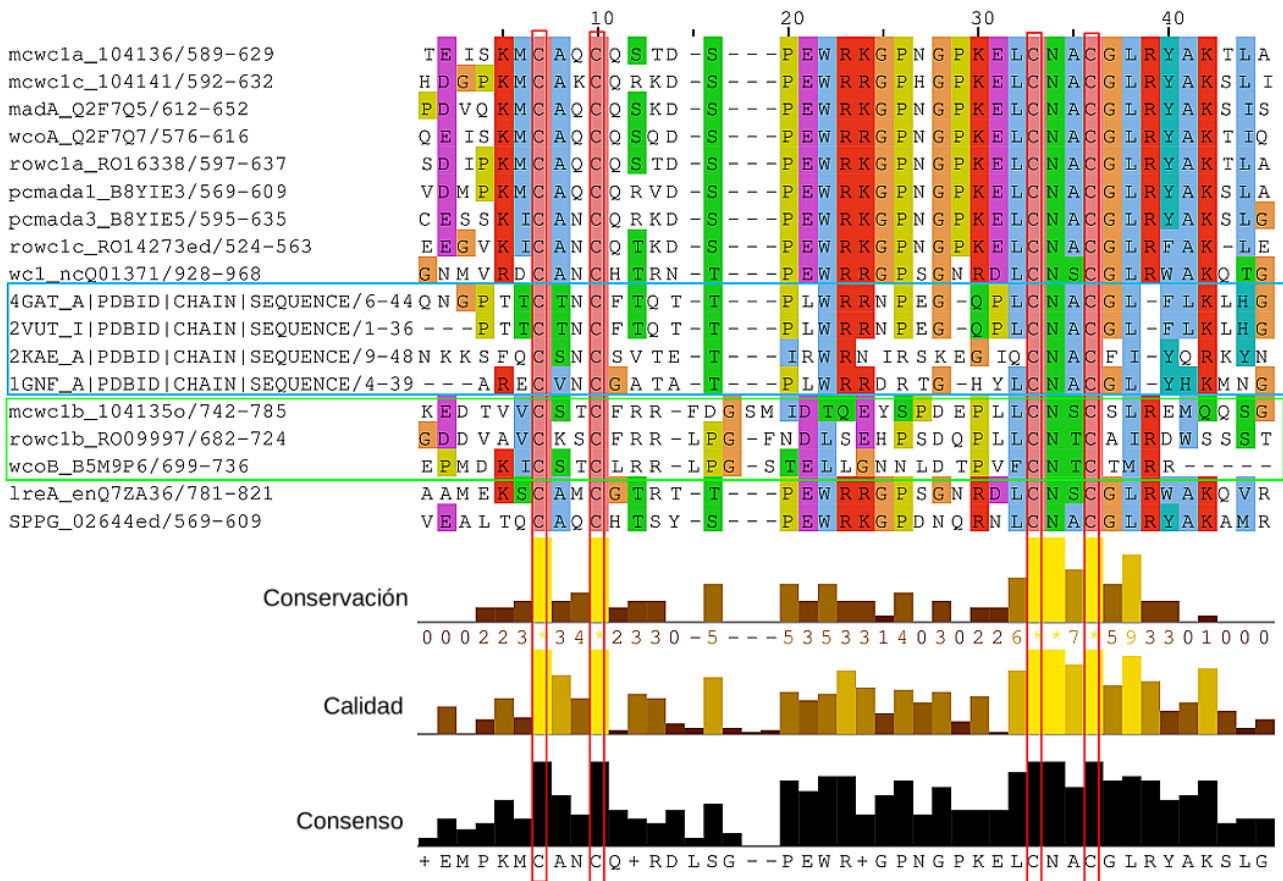


Figura 4.1. Alineamiento de dominios GATA-ZnF de Wc-1 de hongos

Alineamiento generado con *T-Coffee Expresso* [7] (combinado con Muscle [85] y MAFFT [154]) y representado con *Jalview* [331]. Los aminoácidos están sombreados según sus propiedades fisicoquímicas siguiendo el código de colores de *Clustal X* [174]. Las columnas recuadradas en rojo indican los dos pares de cisteínas que coordinan el átomo de zinc. Los identificadores de las secuencias de proteínas utilizadas en el alineamiento se indican a la izquierda y corresponden a: *M. circinelloides* Mcwc-1a, Mcwc-1b y Mcwc-1c (JGI [148]); *P. blakesleeanus* MadA, WcoA y WcoB, (Uniprot [6]); *R. oryzae* Rowc-1a, Rowc-1b, Rowc-1c (Broad Institute) [141]; *P. crystallinus* Pcmada-1, Pcmada-3 (Uniprot [6]); *N. crassa* Wc-1_nc (Uniprot [6]); *E. nidulans* LreA (Uniprot [6]); *S. punctatus* SPPG (Broad Institute [140]). Recuadradas en verde se indican Mcwc-1b y sus homólogos en *P. blakesleeanus* y *R. oryzae*. Las secuencias recuadradas en azul corresponden a estructuras de dominios GATA-Zinc Finger depositadas en PDB [25]: 4GAT_A (AreA, *E. nidulans*) [301], 2KEA_A (MED1, *Caenorhabditis elegans*) [195] y 1GNF_A (FOG, *Mus musculus*) [160]. Debajo de cada columna se indica el grado de conservación, la calidad del alineamiento y la secuencia consenso.

por distintas proteínas que reconducen la señal hacia un señalizador central, como ocurre en la regulación de la esporulación en *A. nidulans*, donde los fitocromos modulan la actividad del complejo WC en función de la presencia de luz roja [18, 90, 239, 266].

Además del fotorreceptor responsable, otro aspecto a estudiar sería el propio mecanismo molecular que produce el fototropismo. Las tres proteínas Mcwc-1 poseen señales de localización nuclear y, como ocurre con Wc-1 en *N. crassa*, se espera que su localización sea nuclear y que actúen directamente como factores transcripcionales, por lo que no es fácil proponer un mecanismo dependiente de Wc-1 capaz de producir un crecimiento diferencial en la pared de un esporangióforo.

En los tallos de plantas, el fototropismo está mediado por la presencia de auxina en las células de la zona menos iluminada. La auxina activa bombas de protones en la membrana, lo que va a reducir el pH, produciendo la ruptura de puentes de H en la celulosa de la pared y la activación de las expansinas, unas enzimas capaces de reducir la rigidez de la pared celular y catalizar su extensión [155, 335]. En este caso, es relativamente fácil conseguir un crecimiento diferencial en el tallo variando los niveles de auxinas en las células menos iluminadas respecto a las más iluminadas, lo que se puede conseguir con cambios en la transcripción dependientes de la recepción de luz en unas células y no en otras.

Teniendo en cuenta que los esporangióforos de *P. blakesleeanus* y *M. circinelloides* están formados por una sola célula, el mecanismo tiene que ser diferente al de plantas, ya que es necesario que, de alguna forma, se pueda diferenciar entre lados opuestos de una misma célula y, al mismo tiempo, identificar cual es el lado iluminado y cual el que está en sombra [98]. Sin embargo, en los genomas de cigomicetos solo se ha encontrado otro hipotético fotorreceptor, un criptocromo de tipo DASH-cry, además de los tres genes *wc-1* [69, 139]. Aunque en plantas los criptocromos participan en el fototropismo, el tipo de criptocromo presente en cigomicetos apunta más bien a un papel en la respuesta contra el daño fototóxico (Véase Apartado 1.3.1). Además, al igual que las proteínas Wc-1, los criptocromos no son proteínas de membrana, por lo que seguiría faltando un elemento activado en la pared capaz de indicar la dirección de la luz recibida.

Otra posibilidad podría ser un efecto directo de la luz sobre la membrana o la pared. Es posible que la luz afecte a alguno de sus componentes, una molécula fotolábil por ejemplo, que vería sus niveles reducidos en la zona más iluminada. Esta situación permitiría la creación de un gradiente de concentración que podría influir en las tasas de crecimiento de la pared, por ejemplo limitando el crecimiento en la zona iluminada o permitiendo el crecimiento en la zona en sombra. No obstante, la función de cualquier proteína regulada por la luz implicada en el fototropismo debe depender de la presencia de MadA en *P. blakesleeanus* y de Mcwc-1a en *M. circinelloides*.

Con este trabajo se han sentado las primeras bases de los procesos que gobiernan el fototropismo en *M. circinelloides*, pero queda mucho por hacer y descubrir para poder modelizar esta respuesta en cigomicetos a nivel molecular, siendo cuanto menos intrigante la existencia de un mecanismo capaz de traducir diferencias en la iluminación entre las dos ‘caras’ de una célula.

4.3.2. Control de la inducción de la síntesis de carotenos por la luz: *mcwc-1c*

Este trabajo ha confirmado, mediante análisis de mutantes, el efecto de la luz azul en la carotenogénesis en *M. circinelloides*, sugerido por estudios anteriores en *N. crassa*, *P. blakesleeanus* [50, 185] y en el propio *Mucor* [323], además de analizar el papel de los genes *mcwc-1* en la regulación de este proceso. Los micelios de los mutantes sencillos en cualquiera de los genes *mcwc-1* presentaron unos niveles de carotenos en la oscuridad similares a los encontrados en la estirpe silvestre, indicando que no tienen un papel en la acumulación de carotenos en la oscuridad en fondo silvestre. Sin embargo, los micelios iluminados de los mutantes *mcwc-1c* Δ fueron casi blancos, presentando un ligero incremento en el contenido de carotenos con respecto a la oscuridad, mientras que los mutantes *mcwc-1a* Δ y *mcwc-1b* Δ presentaron una inducción de la síntesis de carotenos similar a la estirpe silvestre (Figura 3.23). Este fenotipo de los mutantes *mcwc-1c* Δ indica que el gen *mcwc-1c* es el elemento clave en la inducción de la carotenogénesis por luz (Figura 3.26). En concordancia con esta falta de respuesta a la luz, en relación con la acumulación de carotenos, la acumulación de mRNAs de los genes carotenogénicos *carB* y *carRP* también está afectada ya que los mutantes *mcwc-1c* Δ presentan solo una activación residual en presencia de luz (Figura 3.30), probablemente debida a cierta redundancia funcional entre las proteínas Mcwc-1.

Los micelios iluminados del mutante *mcwc-1a* también mostraron bajos niveles de transcritos de los genes carotenogénicos, pero en este caso resultó solo en una ligera disminución del contenido en carotenos (Figuras 3.23 y 3.30). Las diferencias en el contenido de carotenos en la luz entre los mutantes en *mcwc-1a* y *mcwc-1c* podrían ser el resultado de patrones diferentes de acumulación de transcritos de los genes carotenogénicos, ya que el mutante en *mcwc-1a* mostró niveles de transcritos bajos, pero que se mantenían en el periodo de tiempo estudiado, mientras que los mutantes en *mcwc-1c* mostraron un aumento transitorio en respuesta a la luz (Figura 3.30). Las discrepancias entre los niveles de mRNA y el contenido de caroteno pueden deberse a que estamos estudiando dos respuestas que en el fondo tienen una base distinta. El análisis molecular de la respuesta a la luz en este hongo y otros revela que la inducción de los genes carotenogénicos es una respuesta transitoria, relativamente rápida en comparación con la

producción de carotenos, que es el resultado de un proceso complejo con múltiples etapas. Esta discrepancia también se observa cuando se comparan los niveles de transcritos de los genes carotenogénicos del mutante *crgA*Δ en la oscuridad, con los niveles de la estirpe silvestre tras la inducción por luz. Aunque los niveles de transcritos en el mutante *crgA*Δ en la oscuridad son muy inferiores a los de la estirpe silvestre tras un pulso de luz, la acumulación de carotenos es superior en el mutante [218] (Figuras 3.34 y 3.41). Estas diferencias entre los niveles de ARNm de los genes carotenogénicos y la acumulación de β-carotenos también se ha observado en otros hongos, como *N. crassa*, pero el mecanismo subyacente se desconoce [204, 287]

Los datos obtenidos en esta tesis nos han llevado a proponer un modelo para explicar la regulación de la carotenogénesis por la luz en *M. circinelloides*, basado en los datos de expresión de los genes *mcwc-1*, *carB* y *carRP* y en la información disponible sobre complejo WC de *N. crassa* [123, 190] (Figura 4.2). En ese modelo, Mcwc-1a se encontraría en el micelio de manera constitutiva, ya que su expresión es independiente de la iluminación (la acumulación de su mRNA es similar en oscuridad y luz). De forma similar a lo que ocurre con Wc-1 en *N. crassa*, la luz induciría cambios post-traduccionales en Mcwc-1a (cambios conformacionales en el dominio LOV y otras modificaciones, como fosforilaciones), que en conjunto influirían en la composición y estado de activación de los complejos WC. La proteína Mcwc-1a activada induciría rápidamente la transcripción del gen *mcwc-1c*, alcanzando niveles máximos de mRNA en solo 5-10 minutos, precediendo a la activación de la transcripción de los genes carotenogénicos (Figura 3.30).

En ausencia de *mcwc-1a*, la inducción de *mcwc-1c* es muy débil pero, sin embargo, es suficiente para conseguir niveles normales de carotenos en el micelio, quizás debido a una dinámica más lenta (escasa inducción de *mcwc-1c* pero mantenida durante más tiempo), que acabe produciendo suficiente cantidad de Mcwc-1c. Proteínas capaces de activar la expresión de *mcwc-1c* en respuesta a la luz, aunque en menor medida o más lentamente, podrían ser Mcwc-1b o la propia Mcwc-1c. Mcwc-1b podría ser un buen candidato, ya que también se expresa de forma constitutiva y está presente en oscuridad y luz a niveles similares (Figuras 3.30 y 3.43). También podría ocurrir que hubiese una expresión mínima de *mcwc-1c* en oscuridad que produjera suficiente proteína Mcwc-1 para inducir su propia transcripción en respuesta a la luz.

La proteína Mcwc-1c recién sintetizada activaría la transcripción de los genes carotenogénicos [324], probablemente formando complejos con proteínas Wc-2, capaces de unirse a los promotores de genes carotenogénicos. Aunque no hemos podido demostrar si la proteína Mcwc-1c tiene que ser activada por la luz, la presencia de un dominio LOV con los aminoácidos necesarios para la unión del cromóforo apuntan en ese sentido. De hecho, datos provisionales de mutantes en la cisteína 115, uno de los aminoácidos claves

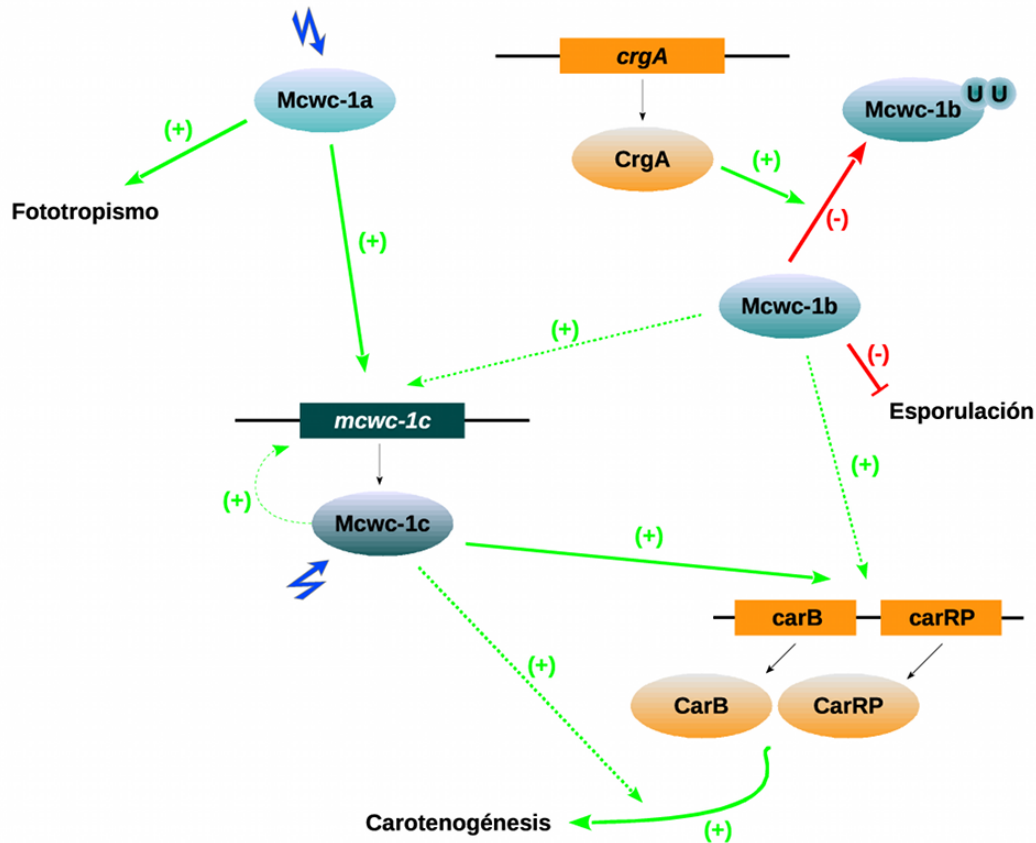


Figura 4.2. Modelo de regulación propuesto para las proteínas Mcwc-1s y CrgA

En verde (+) se indican activaciones, en rojo (-) inhibiciones. Las líneas continuas representan procesos con evidencias experimentales, las discontinuas pasos de regulación propuestos y en proceso de estudio. Las flechas azules indican recepción de luz. Los óvalos y círculos representan proteínas (U: ubiquitina), los rectángulos los genes correspondientes.

para la formación del aducto excitado, apoyan esta hipótesis, ya que la transformación de mutantes *mcwc-1c* Δ con un alelo de *mcwc-1c* en el que se ha sustituido la cisteína 115 por alanina no recupera el fenotipo silvestre. Por lo tanto, la expresión de *mcwc-1c* no es suficiente para la producción de carotenos, siendo necesaria la presencia de un dominio LOV funcional (resultados preliminares propios y posteriores del Dr. Eusebio Navarro).

El análisis del mutante *mcwc-1c* Δ *crgA* Δ , en el que se produce una fuerte inducción de los genes carotenogénicos tras la iluminación, pero sin el correspondiente aumento en carotenos (Figuras 3.34 y 3.41), aporta un revelador aspecto sobre la función de Mcwc-1c en la regulación de la carotenogénesis, que nos lleva a proponer su participación en un punto de control posterior a la transcripción (Figura 4.2). La activación de la transcripción por la luz de los genes *carB* y *carRP* seguiría dependiendo de la presencia de Mcwc-1c, pero esta proteína sería también necesaria, directa o indirectamente, para el correcto procesamiento de sus mensajeros o para su traducción o para la activación de las proteínas

CarB y CarRP. Estos aspectos están actualmente siendo objeto de estudio en nuestro grupo de investigación.

Al menos otra proteína, además de Mcwc-1c, tiene que tener la capacidad de inducir la expresión de *carB* y *carRP* en respuesta a la luz, aunque solo sea para generar la expresión residual y transitoria observada en el mutante *mcwc-1c* Δ (Figura 3.30). No sería extraño, dado el parecido entre las tres proteínas Mcwc-1, que existiera cierto solapamiento o redundancia entre sus funciones y que Mcwc-1a y/o Mcwc-1b puedan inducir la expresión de los genes carotenogénicos en respuesta a la iluminación. Este solapamiento es particularmente evidente en un fondo genético donde no hay proteína CrgA, ya que el mutante *mcwc-1c* Δ *crgA* Δ presenta un incremento de los niveles de transcritos de los genes carotenogénicos en respuesta a la luz muy parecido al mutante sencillo *crgA* Δ . A pesar de este incremento, prácticamente no hay aumento del contenido de carotenos en el mutante *mcwc-1c* Δ *crgA* Δ en respuesta a la luz, a diferencia de lo que ocurre en el mutante sencillo *crgA* Δ , apoyando el sugerido papel esencial del gen *mcwc-1c* en la síntesis de carotenos en niveles de control posteriores a la transcripción. Debido al mayor parecido entre los genes *mcwc-1a* y *mcwc-1c* es probable que la inducción de la transcripción de los genes carotenogénicos en mutantes en *mcwc-1c* sea debida a Mcwc-1a y no a Mcwc-1b, aunque sería necesaria la generación de los dobles mutantes *mcwc-1a* Δ *mcwc-1c* Δ y *mcwc-1b* Δ *mcwc-1c* Δ para comprobarlo.

4.3.3. Activación de la carotenogénesis independientemente de la luz: gen *mcwc-1b*

Una vez establecidas las bases del mecanismo de regulación responsable de la inducción de la carotenogénesis por la luz, en el que el gen *mcwc-1c* parece ser el elemento clave, la atención se centró en el primer gen regulador de la carotenogénesis que se ha caracterizado molecularmente, el gen *crgA* [218, 220]. Este gen reprime la carotenogénesis y, por tanto, se había considerado la posibilidad de que estuviese actuando sobre el mecanismo de regulación implicado en la inducción por luz. Sin embargo, los mutantes *crgA* Δ , que muestran un contenido de carotenos elevadísimo en la oscuridad, muy superior al de la estirpe silvestre en la luz, son capaces de responder a la luz incrementándolo aún más, lo que sugiere que el mecanismo de regulación por la luz sigue siendo funcional en estos mutantes. Esta idea inicial se confirmó con la generación y el análisis de los dobles mutantes *crgA* Δ *mcwc-1c* Δ . Aunque estos mutantes acumulan carotenos en oscuridad en cantidades equivalentes a las de los mutantes con solo la delección de *crgA*, son incapaces de incrementar el contenido de carotenos en respuesta a la luz. Este fenotipo de los mutantes *crgA* Δ *mcwc-1c* Δ indica la existencia de dos mecanismos independientes de regulación de la carotenogénesis: uno positivo dependiente de la luz,

donde *mcwc-1c* es el elemento clave, y otro represor, en el que *crgA* es el elemento clave (Figura 4.2). También indica que el incremento de carotenos en la oscuridad en los mutantes en el gen *crgA* no es consecuencia del incremento de expresión del activador *mcwc-1c* (Figuras 3.34 y 3.41). Por tanto, todos los datos sugieren que *crgA* no regula la carotenogénesis modulando la expresión de *mcwc-1c*. La ruta de regulación de *crgA* tampoco depende de *mcwc-1a*, ya que los mutantes *crgA* Δ *mcwc-1a* Δ conservan el fenotipo *crgA*⁻, tanto a nivel de acumulación de carotenos como de expresión de *carB* y *carRP* (Figura 3.41).

Sin embargo, el rescate del fenotipo silvestre en los mutantes *crgA* Δ *mcwc-1b* Δ indica que *crgA* y *mcwc-1b* participan en el mismo mecanismo de regulación. El rescate es completo, siendo el fenotipo de los dobles mutantes *crgA* Δ *mcwc-1b* Δ totalmente silvestre, no solo respecto a la respuesta carotenogénica, tanto para la acumulación de carotenos como para la regulación génica, sino también para la esporulación y el aspecto general del micelio [219].

En trabajos previos se había propuesto que CrgA tuviese actividad ligasa de ubiquitina debido a la presencia de dominios RING-finger. En otros organismos se han descrito ligasas de ubiquitina con importantes papeles en la regulación de la respuesta a la luz, siendo el caso más estudiado el de la proteína COP1 (*Constitutive photomorphogenesis 1*) de *Arabidopsis*, un represor de la fotomorfogénesis en oscuridad. COP1 actúa en el núcleo ubiquitilando factores transcripcionales, como HYH y HY5, que regulan respuestas a la luz formando homo y heterodímeros. La ubiquitilación de estos factores conlleva su degradación en el proteosoma. COP1 se encuentra aguas abajo de criptocromos y fitocromos en la cascada de señalización por luz pero, aunque se sabe que estos fotorreceptores interaccionan directamente con COP1, no se conoce el mecanismo por el cual regulan su actividad [131, 152].

De acuerdo con el mecanismo de acción de COP1, se propuso que CrgA debería actuar marcando a proteínas activadoras de la carotenogénesis para su degradación en el proteosoma. Así, en presencia de CrgA se destruiría el activador y no habría transcripción de los genes carotenogénicos, mientras que en su ausencia, el activador no se eliminaría y permanecería activado de forma constitutiva. El fenotipo de los mutantes *crgA* Δ *mcwc-1b* Δ sugiere que el candidato evidente a ser la diana de CrgA es Mcwc-1b. Los análisis de la acumulación de mRNA y de proteína de *mcwc-1b*, en fondo silvestre y en el mutante *crgA*⁻, apoyan que *crgA* no regule la expresión de *mcwc-1b* a nivel transcripcional, sino mediante ubiquitilación de la proteína Mcwc-1b. En la estirpe silvestre aparecen tres isoformas claras de Mcwc-1b de distinto peso molecular, dos de ellas ubiquitiladas (con una y dos ubiquitinas), mientras que en el mutante *crgA*⁻ solo aparece la de menor peso molecular, que no está ubiquitilada. La forma no ubiquitilada de Mcwc-1b debe ser

la forma capaz de activar la transcripción de los genes carotenogénicos, mientras que la presencia de formas ubiquitiladas en la célula bloquea de alguna manera esa capacidad. A diferencia de lo que ocurre con otras proteínas, la ubiquitilación de Mcwc-1b no parece estar asociada a degradación, ya que no aparecen niveles más bajos de proteína en la estirpe silvestre que en el mutante *crgA⁻*, ni se observan formas con más de dos moléculas de ubiquitina, características de la degradación en el proteasoma (Figura 3.46). Estudios posteriores con inhibidores del proteasoma han confirmado que la proteína ubiquitilada no es degradada en el proteasoma [293].

La hipótesis de que CrgA ubiquitila directamente a Mcwc-1b implica que debe haber un contacto entre ambas proteínas. Sin embargo en los experimentos de coimmunoprecipitación y del sistema de dos híbridos de levaduras no se ha detectado interacción entre ambas proteínas [293]. Estos resultados negativos pueden deberse a que CrgA no sea la ligasa que ubiquitila directamente a Mcwc-1b, o a que la interacción sea transitoria o muy débil, como frecuentemente ocurre entre otras ligasas de ubiquitina y sus sustratos [113, 147]. Tampoco pueden descartarse problemas asociados con los niveles extremadamente bajos de CrgA, tanto en el micelio de *M. circinelloides* como en levaduras [213].

Los experimentos de doble híbrido de levadura referidos anteriormente demostraron que Mcwc-1b es capaz de interactuar consigo misma [293], siendo probable que forme complejos WC constituidos por Mcwc-1b y alguna o varias de las proteínas Mcwc-2. Al igual que ocurre en *N. crassa* [58], las proporciones de estas proteínas podrían variar dependiendo del estado de activación o de las modificaciones post-traduccionales presentes en las distintas proteínas Mcwc, incluyendo Mcwc-1b, que sufre al menos fosforilaciones y ubiquitilaciones (Figuras 3.45 y 3.46). En *N. crassa* el estado fosforilado de Wc-1 es importante en la regulación de su activación y de su vida media, aunque no es el único factor del que dependen (véase Apartado 1.4.3). En el caso de Mcwc-1b, se ha demostrado que está fosforilada en la oscuridad en fondo silvestre, tanto las formas ubiquitiladas como la no ubiquitilada (Figura 3.45). Sin embargo, no se ha comprobado lo que ocurre en el mutante *crgA Δ* , en el que Mcwc-1b se encuentra en su estado activo. En el caso de Met4, un factor transcripcional de *S. cerevisiae* también regulado por oligoubiquitilación (véase más adelante), la forma transcripcionalmente activa se encuentra fosforilada y no ubiquitilada, mientras que las formas inactivas están ubiquitiladas y no fosforiladas [151]. Sería interesante comprobar si se producen cambios en el estado de fosforilación inmediatamente después de la activación de Mcwc-1b, o si la luz o el ritmo circadiano influyen de alguna manera, pero ese estudio no será posible hasta que se identifique la señal de la que depende la activación de Mcwc-1b.

4.4. Posibles funciones de la ruta *Mcwc-1b/CrgA*

Aunque la distribución de genes que cifran proteínas similares a *crgA* es muy amplia en eucariotas, estas proteínas no aparecen en todos los hongos y, por ejemplo, no se encuentran en el genoma de *N. crassa*, donde tampoco se han aislado mutantes sobreproductores de carotenos en oscuridad [118, 234]. No obstante, en el también ascomiceto *F. oxysporum* se ha identificado un homólogo de *crgA* como responsable del fenotipo de, o al menos parte de, los llamados mutantes *carS* [144, 261]. Su comportamiento es similar al de los mutantes *crgA* de *M. circinelloides*, ya que sobreexpresan los genes *carB* y *carRA* en oscuridad, siendo capaces de responder igualmente a la iluminación incrementando aún más su expresión [261]. La denominación *carS* proviene de los mutantes sobreproductores de carotenos en oscuridad identificados originariamente en *P. blakesleeanus* [214], y es por ese motivo que en *F. oxysporum* se le asignó ese mismo nombre, aunque recientemente se ha descubierto que el gen *carS* de *P. blakesleeanus* no codifica un homólogo de *crgA*, sino una oxigenasa de β -caroteno que cataliza el primer paso en la síntesis de varios apocarotenoides [305].

El fenotipo de los mutantes *carS* en *Fusarium* se ha estudiado con mayor profundidad en la especie *F. fujikuroi*, próxima a *F. oxysporum* y con una ruta carotenogénica similar [260, 261]. En este organismo, la acumulación de carotenos depende de la disponibilidad de nitrógeno en el medio, incrementándose la producción en condiciones de ayuno de nitrógeno. Sin embargo, la inducción por luz de la carotenogénesis, tanto a nivel de mRNA como de acumulación de carotenos, es independiente de la disponibilidad de nitrógeno [260]. Respecto a los mutantes *carS*, además de la sobreproducción de carotenos también están afectadas rutas del metabolismo secundario dependientes del nitrógeno, como la producción de giberelinas o bikaverinas, sugiriendo un nexo común en la regulación de ambas rutas [260]. Además, los mutantes en el único gen tipo *wc-1* de *F. fujikuroi*, *wcoA*, también están afectados en el metabolismo secundario dependiente de nitrógeno [88], sugiriendo que *wcoA* podría ser diana de *carS* también en *Fusarium*, pese a la distancia evolutiva entre cigomicetos y ascomicetos.

No obstante, existen claras diferencias en la regulación dependiente de *crgA/carS* entre ambas especies. En *M. circinelloides* la fotocarotenogénesis depende de *mcw-1c* (véanse Apartados 3.6.1 y 3.7), pero en *Fusarium* los mutantes en *wcoA* siguen respondiendo a la luz [88, 269], no habiéndose identificado aún el fotorreceptor responsable. En los mutantes *carS* de *F. oxysporum* no se incrementa el contenido en carotenos tras la iluminación, a pesar de la inducción de los genes *carB* y *carRA* [261], al contrario de lo que ocurre en los mutantes *crgA*⁻ de *M. circinelloides*, que sí lo incrementan (véase Apartado 3.9). Este comportamiento de los mutantes *carS* de *Fusarium* podría deberse a una saturación del metabolismo de carotenos, a mecanismos compensatorios [261] o podría conectar a *carS*

con la inducción de la síntesis de carotenos por la luz, a diferencia de lo que ocurre con *crgA* en *M. circinelloides*.

En *M. circinelloides* no se ha estudiado la respuesta carotenogénica en condiciones de ayuno de nitrógeno, ni el fenotipo de los mutantes *crgA* respecto al metabolismo secundario dependiente de nitrógeno. Los últimos datos, provenientes de un estudio de proteómica realizado recientemente en nuestro laboratorio, muestran la implicación de CrgA/Mcwc-1b en el metabolismo del carbono, en la síntesis de sideróforos, en el desarrollo vegetativo y en las respuestas al estrés por daño oxidativo [219]. Entre las proteínas con mayores diferencias de expresión se encuentra MasA, una proteína similar a NmrA de *A. nidulans* [5, 219]. Las proteínas tipo NmrA contienen un dominio de tipo Rossmann de unión a NAD(P)H/NAD(P)(+) y están implicadas en la regulación del metabolismo dependiente de nitrógeno en *A. nidulans* [5], del desarrollo en *Dictyostelium discoideum* [230] y de la patogenicidad en *Mangaporthe oryzae* [337].

En *A. nidulans*, NmrA actúa interaccionando con el factor transcripcional AreA [158, 171], que es el principal regulador del metabolismo de nitrógeno [168]. El dominio dedo de zinc tipo GATA de AreA es el responsable tanto de la unión a DNA como a la proteína NmrA, siendo la elección entre uno u otro de tipo competitiva, de manera que la asociación a NmrA va a impedir la unión al DNA e inhibir la actividad transcripcional de AreA [158]. El dominio GATA de AreA es el más parecido al hipotético dominio dedo de zinc de Mcwc-1b (véanse Apartados 3.3.2 y 4.2), por lo que es tentador sugerir un modo de acción parecido para las proteínas Mcwc-1b y MasA en *M. circinelloides*.

A pesar de las similitudes en el fenotipo y en la arquitectura global de CarS y CrgA, la baja identidad a nivel de secuencia que presentan y la existencia de diferencias en los dominios que las conforman (solo se reconoce un dominio RF en CarS y el dominio LON, interrumpido en CrgA pero no en CarS) hace difícil predecir si ambas proteínas comparten mecanismos de acción parecidos [261].

Respecto a otros cigomicetos, nuestro grupo demostró que *Blakeslea trispora* contiene un gen ortólogo a *crgA* que es capaz de complementar los mutantes *crgA*Δ de *M. circinelloides*, sugiriendo que debería regular la síntesis de carotenos en *B. trispora* [250], aspecto que no ha podido ser demostrado debido a las dificultades para manipular este hongo. Tampoco ha podido demostrarse si la carotenogénesis en *P. blakesleeanus* esta regulada por alguno de los genes similares a *crgA* (genes *crg*), ya que, en este hongo, los rastreos realizados buscando mutantes en la carotenogénesis no han identificado mutantes en ninguno de sus cuatro genes *crg*, lo que sugiere la existencia de diferencias en la regulación y/o funciones de los genes *mwc-1b/wcob* y *crgA* entre *M. circinelloides* y *P. blakesleeanus*, o bien un mayor solapamiento de funciones entre las proteínas Crg presentes en *P. blakesleeanus*. Al igual que *P. blakesleeanus*, *M. circinelloides* presenta

otros tres genes con similitud a *crgA*. Sin embargo, sus funciones deben ser distintas a las de *crgA*, ya que de otro modo no se hubiesen observado las importantes alteraciones fenotípicas que muestran sus mutantes. Los ESTs de *M. circinelloides* secuenciados por el JGI [148], junto con los estudios realizados en *P. blakesleeanus* [104] indican que, aunque *crgA* está regulado por la luz, es otro de sus posibles parálogos, *crgC*, el más fuertemente inducido tras la iluminación, siendo uno de los genes con mayor respuesta a la luz en ambos cigomicetos. Queda, pues, por estudiar, el papel de los otros genes tipo *crgA* presentes en cigomicetos, probablemente implicados en la regulación por luz, y de los que nada se sabe respecto a sus dianas o mecanismos de acción.

Fuera del reino de los hongos, la práctica totalidad de los eucariotas presentan secuencias similares a *crgA* en sus genomas, pero carecen de genes tipo *wc-1*, exclusivos de hongos, por lo que sus posibles dianas de ubiquitilación deben ser diferentes. La conservación de los genes *crg* en los distintos grupos de eucariotas sugiere que tiene una función importante para la fisiología de la célula eucariótica, probablemente distinta a la regulación de la producción de carotenos. El único organismo distinto a hongos donde se han estudiado genes *crg*, aunque solo ligeramente, es el pez cebra (*Danio rerio*), en el que casi todas sus células pueden responder directamente a la luz [332]. En este organismo, las principales clases funcionales reguladas por la luz son los genes del ritmo circadiano, los de la reparación del DNA y los de la respuesta a estrés (proteínas de choque térmico y genes de respuesta al estrés oxidativo). Otras clases de genes inducidos por luz son los pertenecientes al metabolismo del grupo hemo, muchos de ellos asociados a la mitocondria, y los genes mitocondriales, lo que refuerza la relación propuesta entre los efectos tóxicos producidos por la luz y el papel de la mitocondria en el metabolismo de las ROS (especies reactivas de oxígeno) [63, 332]. No obstante, entre los genes que presentan un incremento mayor de sus niveles de mRNA en respuesta a la luz se encuentran los genes *lonrf1-1* y *lonrf1-2* [332], que son genes tipo *crg*. Aunque la función de estos genes se desconoce, es interesante el hecho de que estén regulados directamente por el factor transcripcional Tef (*Thyrotroph embryonic factor*), implicado en el metabolismo de destoxicación, principalmente en la reparación del DNA y la protección frente al daño oxidativo [106].

En el caso de *M. circinelloides*, la producción de carotenos en respuesta a la luz, probablemente con fines protectores frente al UV, o frente a las ROS generadas por daño fototóxico, apuntan hacia unos papeles similares a los hipotetizados en peces, aunque como ya hemos visto, CrgA también está regulando otros procesos, como el metabolismo del carbono, la esporulación, el desarrollo de hifas aéreas o la síntesis de sideróforos [219]. Respecto a este último, es de destacar que en hongos la ferroquelasa Hem15, una proteína implicada en la síntesis del grupo hemo en la mitocondria, es una diana conservada de

la ruta de señalización de Wc-1 [137].

Desgraciadamente no existen muchos más datos sobre esta familia de proteínas en otros organismos, por lo que cabe esperar que continúen los estudios en pez cebra, cigomicetos y *Fusarium*. El análisis del transcriptoma de los mutantes *crgA*Δ, en realización en nuestro laboratorio, ofrecerá una visión más amplia de las rutas reguladas por CrgA/Mcwc-1b y ayudará a comprobar si, y hasta qué punto, las reguladas por CrgA solapan con las activadas por la luz en *M. circinelloides* y en *D. rerio*, y con las rutas reguladas por CarS en *Fusarium*. Por último, la existencia de proteínas Lonrf1 implicadas en la respuesta a la luz en peces aumenta el interés en esta vía de transducción, que podría participar en respuestas de protección frente al daño por luz desde muy temprano en la evolución de los eucariotas [318].

4.5. Regulación de la ruta CrgA/Mcwc-1b

Actualmente se desconocen las señales a las que responde la ruta de regulación de *crgA* en *M. circinelloides* y de las que dependería la ubiquitilación/desubiquitilación de Mcwc-1b. No se puede descartar que una de las señales sea la luz, pero si es así, debería ser en unas condiciones que no se dan en el laboratorio. Por otro lado, también es posible que Mcwc-1b actúe como fotorreceptor, ya que posee un dominio LOV canónico, aunque el hecho de que Mcwc-1b esté activo en el mutante *crgA*Δ en la oscuridad, sin necesidad de recibir luz, parece reducir la importancia de la luz en la regulación de Mcwc-1b. Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, entre las clases funcionales reguladas por Mcwc-1b se han identificado genes del metabolismo del carbono y de la síntesis de sideróforos, ambos procesos dependientes de los niveles de oxígeno, sugiriendo un posible papel de Mcwc-1b, y de su dominio LOV, en cambios entre metabolismo anaerobio y aerobio [219].

En el modelo propuesto, la mono- y di-ubiquitilación de Mcwc-1b provocaría su inactivación, mientras que la forma no ubiquitilada sería la responsable de la activación de los genes carotenogénicos y de la represión de la esporulación en el mutante *crgA* [219,293]. Este tipo de regulación, dependiente de oligo-ubiquitilación se ha descrito con bastante detalle en el factor transcripcional Met4 de *S. cerevisiae*, que controla la inducción de genes del metabolismo de aminoácidos azufrados (metionina y cisteína) y de compuestos derivados de ellos, como el glutatión [312]. Al igual que Mcwc-1b, la transcripción de los genes regulados por Met4 correlaciona con su estado de ubiquitilación, que en este caso depende del complejo Cdc34/SCFmet30 [151]. Met4 no es degradado, ni su vida media se acorta, como consecuencia de la ubiquitilación, pero su forma oligo-ubiquitilada es transcripcionalmente inactiva, a pesar de mantener su capacidad de unión

a los promotores de sus genes diana [151]. En este caso, se ha demostrado que la activación de Met4 depende de la concentración de metionina del medio, de tal forma que al someter células silvestres a condiciones de ayuno de metionina se produce una reducción temporal de la proporción de formas ubiquitiladas, que coincide con la inducción transitoria de los genes diana de Met4. El patrón de formas de Met4 en el momento de la inducción de los genes diana es muy similar al que aparece en el mutante *met30* [151]. Se ha propuesto que el bloqueo de la actividad de Met4 como consecuencia de la ubiquitilación se deba a la imposibilidad de interacción con el también factor transcripcional Cbf1, con el que Met4 forma complejos para iniciar la transcripción, mientras que la activación de Met4 parece producida por una pérdida muy rápida de las formas ubiquitiladas, probablemente mediante desubiquitilación [151]. De forma análoga, la ubiquitilación de *Mcwc-1b* podría estar impidiendo la formación de complejos WC o la interacción con otras proteínas.

Respecto a *CrgA*, se ha propuesto que los dominios LON sean capaces de unir RNA y DNA [189, 197], acercando las LON-ATPasas mitocondriales a las zonas de inicio de la transcripción del DNA mitocondrial, posibilitando así la interacción y modificación de factores transcripcionales unidos en las cercanías [189, 197] (véase Apartado 1.7). Se podría especular que *CrgA* se une a zonas cercanas a los promotores de los genes regulados por las dianas de *CrgA* y que esa proximidad ayuda en la interacción y ubiquitilación de dichas dianas. Si esto fuese cierto para las proteínas tipo *Crg*, *CrgA* podría unirse a zonas del genoma cercanas a los genes carotenogénicos, acercándose de esta manera a *Mcwc-1b*, hipotéticamente unido al promotor de los genes *carB* y *carRP*. Esto podría explicar que no se haya podido detectar interacción entre *CrgA* y *Mcwc-1b* mediante dos aproximaciones experimentales distintas: coinmunoprecipitación (Figura 3.47) y sistema de dos híbridos de levadura [293].

Los resultados obtenidos en este trabajo, así como los datos aportados en *P. blakesleeanus* muestran que la regulación de la expresión por la luz es más compleja en cigomicetos que en otros grupos de hongos, como consecuencia de las duplicaciones genómicas producidas en su historia evolutiva [200]. De esta manera se generaron varias copias de genes *wc-1*, que han evolucionado para especializarse en funciones distintas, al menos en el caso de *M. circinelloides*. Además, estos resultados han permitido descubrir un nexo de unión entre la proteína *CrgA* y una proteína tipo *Wc-1* (*Mcwc-1b*), lo que abre nuevas posibilidades para el estudio de las rutas reguladas por proteínas *Crg*, tanto en hongos como en otros eucariotas.

5 Conclusiones

1. Se ha demostrado que los esporangióforos de *M. circinelloides* presentan fototropismo positivo a luz azul y verde, mientras que la inducción de la síntesis de carotenos depende únicamente de la luz azul.
2. Se han clonado tres genes de tipo *wc-1* en *M. circinelloides*, denominados *mcwc-1a*, *mcwc-1b* y *mcwc-1c*, que cifran proteínas que contienen dominios LOV con todos los residuos esenciales para la unión del cromóforo, incluyendo una extensión típica de hongos que permite la unión a FAD.
3. Los tres genes no presentan el mismo patrón de expresión en respuesta a la luz. Así, la expresión de los genes *mcwc-1a* y *mcwc-1b* no está regulada por la luz, mientras que la expresión del gen *mcwc-1c* se induce fuertemente por la luz, siendo su expresión previa a la de los genes carotenogénicos y dependiente de *mcwc-1a*.
4. Los genes *mcwc-1* parecen proceder de dos duplicaciones sucesivas, la primera habría dado lugar al gen *mcwc-1b* y al ancestro de los genes *mcwc-1a* y *mcwc-1c*, que serían el resultado de una duplicación más reciente.
5. Tras las duplicaciones génicas, estos genes han sufrido un proceso de especialización funcional, de tal forma que el gen *mcwc-1a* controla el fototropismo a luz azul y verde, *mcwc-1c* controla la inducción de la síntesis de carotenos por la luz azul y *mcwc-1b* participa en una ruta de regulación de la carotenogénesis que no parece depender de la luz.
6. El gen *mcwc-1b* es un activador de la carotenogénesis, y su producto, la proteína Mcwc-1b, está regulado por ubiquitilación independiente de degradación. Las formas no ubiquitiladas de Mcwc-1b provocan la activación de la carotenogénesis independientemente de la presencia de luz.
7. Se ha profundizado en el mecanismo molecular por el que el gen *crgA* reprime la carotenogénesis, demostrándose que la proteína CrgA bloquea la función de la proteína Mcwc-1b mediante su ubiquitilación, lo que apoya su papel como ligasa de ubiquitina.

-
8. Se han establecido dos rutas de regulación de la síntesis de carotenos, una dependiente de la luz a través de *mcwc-1c* y otra dependiente de *crgA* a través de *mcwc-1b*.

6 Anexo

Secuencias de las proteínas modificadas respecto a las presentes en las bases de datos

Rhizopus oryzae RO3G_14273

MSFSNNGLEITNNQRPAILSGVYSNTGFDMVGILSRLINRPNQQIQLGPIDLSCS
FVVSDARQYDYPVVYCSPGFEKLTGYCQDEIVGKNCRFLQSPDGQVTGGSRRQH
TDNQAVYYLKSQNLNQAKEHQASIINYKKGQPFVNLITVIPLFSSSDGQVEYFVG
LQVDLVEQPNSILEKMKSENVVDDGVSLLDDEYFRELPAPDFNADMLSLLDHSAS
GISSSQIRKEWNQLVLNQTNDFIYVLSLKGTFLYVSDSSLSILEYQPHELFGKSLN
SICHPSDIIPVMREIKEKTTNNNMDSVSVIFRIRRKHSGYMWIDCRGKLHMDQN
KARKCLVLCGREYPTYNLSYSQADMSKEAYWAKLSLSGLYLHVTEVCKEIVGF
TADTLLNESIYQYVENEAITKISSALQSVKETRNSMSVRHSLNLSKGDYVPVLSTF
YPGDRDRCIPLFILLQVRPVKDDNNTICCDSDVNFSELDVTRSTNWQYELHQ
LQQFNRLREEIEKYMNPNKRSRKKIKEEGVKICANCQTKDSPEWRKGPNGPKE
LCNACGLRFAKLEKNNKK

Spizellomyces punctatus SPPG_02644

MFLHQQIGRNQREHEEEKKGYSQHSQHQKLQTMPEPKPILGTAPTIVTKIPP
SVNLTGIYSATGFDLLGILSRVHRPNPVIALGPVDLSCAFLVTDPRRPDNPVYA
SETFSKLTGYSNAEVLNRNCRFLQAPDGQQEPGQARRYTDNAVVSQKQAIDRN
EECQFTLINYKKGGEFINLVTVPVEYGRPGEVSFFVGFQVDLIDQPQAILDRMK
DGTYTINYQIAEQLDARQPAAMSDVAAFQQETFHLLSPVQAPKSPDYTPPLDAIE
NLVEDFDFFVHILSLRGLFLYAAPRSTKRLLEYTAELMGHSLHEFVHPADFVSV
MRELRTSASTDTINIICRFRRKHSGYMYLEINGHIYDEDNKRKTKCFIMSGREKQV
TTLRVKNILLPGPDTSETWAKLSLEGLILYVCPNAVPIFGLYPEELVAKSLVEFLH
DSDHQACRDALQTIVNGQSVQNLRCRIAVKRGFSSAVLRFYADGCTPRSTIFCQI
KAVEVGRTPDLKTLVEYEPLYEDGNLFDVMNEVRATSLHYELNQLRLHNRK
LREELDSIIAPIKKTTPRVEALTQCAQCHTSYSPEWRKGPDPNQRNLCNACGLRY
AKAMRNRASIG

***Allomyces macrogynus* AMAG_13951**

MDAATAAALRTPPTAAAAAARAASRRASGAQPPPSFQDFTVPAATDPMA
LAASSSSLANTGYSPYGASGPYDPNGALISPTDPFMAVAPPPPPPPPPPPYGLRPT
PSPGLSGGPAPAPPRAPLCPRTSVPGLYSSTGFDMIGVLSKVASRPNPQVSIGPVD
MSCSFVVS DARKPDMPIVYVSDTFERLTGYSAGECVGKNCRFLQSPGLVNEGSH
RRYTDNASVSSMKQSIMSQRECQYTLINRKGGEFFINLITIIPIAWGSDDDDTDIAY
FVGFQVDLVEQPNAIMNRMKDGTYVVNYQIADAPVAVPRVLRPPPQESIPPVPA
VPAYARPAQQHHQPHQHPMLTHPTTASLVLSANTTPLAAGGNMMDVDLAPLE
DAPPPGPGESVPPRPARLIVPDPRAGWRVGGGITSTATTTTTTPVTPAPTSGGGGG
SSGSGGVGHAPGHFAMDVTDLVGVRHAGEAADLFYRALVDQVDFVHVLSLKG
VFLYVSRDCQRVLEYDEAELIGKPLSQFCHPGDLVSV MRELKDSSTGLSAVHIVY
RIRKRSGYMWMEVAGRCTQGEKSKGKKFVVL TGREKPVVRVHRADIARVGG
IRDASPDTTSGPVTVAGTPLAATSAAAAAARLVVGDPTAPLPTHGGADLWAKLA
LEGLFLHVSAEAPGLLGFTPAELVGKSLLDLVHIDDLPALRRALALVRAAHVVA
LPHRIKNKKGEYLSVTSALIPGNSAQPGGVRFALHRC SAATGDDAMPAIPGVPAL
VPMGGNGWGIRAAPALSVVEDADDLFDVLSV RCTSWQYELHQLRLQNRRLRA
ELDEVDTATRSKKRQNTGNGAGVGS GSGGSSSSSARAAGGGG

Bibliografía

- [1] E. R. Almeida and E. Cerdá-Olmedo. Gene expression in the regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Curr. Genet.*, 53(3):129–137, Mar 2008.
- [2] S. F. Altschul et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25(17):3389–3402, Sep 1997.
- [3] R. Ambra et al. Photomorphogenesis in the hypogeous fungus *Tuber borchii*: isolation and characterization of Tbwc-1, the homologue of the blue-light photoreceptor of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.*, 41(7):688–697, Jul 2004.
- [4] N. Anaya and M. I. Roncero. Transformation of a methionine auxotrophic mutant of *Mucor circinelloides* by direct cloning of the corresponding wild type gene. *Mol. Gen. Genet.*, 230(3):449–455, Dec 1991.
- [5] A. Andrianopoulos, S. Kourambas, J. A. Sharp, M. A. Davis, and M. J. Hynes. Characterization of the *Aspergillus nidulans* nmrA gene involved in nitrogen metabolite repression. *J. Bacteriol.*, 180(7):1973–1977, Apr 1998.
- [6] R. Apweiler et al. Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.*, 40(Database issue):D71–75, Jan 2012.
- [7] F. Armougom et al. Expresso: automatic incorporation of structural information in multiple sequence alignments using 3D-Coffee. *Nucleic Acids Res.*, 34(Web Server issue):W604–608, Jul 2006.
- [8] G. A. Armstrong and J. E. Hearst. Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J.*, 10(2):228–237, Feb 1996.
- [9] N. Arrach. *Biosíntesis de carotenoides en hongos: los genes carA de Phycomyces y al-2 de Neurospora. Tesis doctoral.* Universidad de Sevilla, 2001.
- [10] L. Atanesyan, V. Gunther, B. Dichtl, O. Georgiev, and W. Schaffner. Polyglutamine tracts as modulators of transcriptional activation from yeast to mammals. *Biol. Chem.*, 393(1-2):63–70, Jan 2012.
- [11] F. M. Ausubel et al. *Currents protocols in Molecular Biology*. New York. Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1989.

- [12] K. Bae et al. Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron*, 30(2):525–536, May 2001.
- [13] Y. S. Bahn et al. Sensing the environment: lessons from fungi. *Nat. Rev. Microbiol.*, 5(1):57–69, Jan 2007.
- [14] P. Ballario, C. Talora, D. Galli, H. Linden, and G. Macino. Roles in dimerization and blue light photoresponse of the PAS and LOV domains of *Neurospora crassa* white collar proteins. *Mol. Microbiol.*, 29(3):719–729, Aug 1998.
- [15] P. Ballario et al. White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *EMBO J.*, 15(7):1650–1657, Apr 1996.
- [16] R. Banerjee and A. Batschauer. Plant blue-light receptors. *Planta*, 220(3):498–502, Jan 2005.
- [17] S. Bartnicki-Garcia and W. J. Nickerson. Induction of yeast-like development in *Mucor* by carbon dioxide. *J. Bacteriol.*, 84:829–840, Oct 1962.
- [18] O. Bayram, G. H. Braus, R. Fischer, and J. Rodriguez-Romero. Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal Genet. Biol.*, 47(11):900–908, Nov 2010.
- [19] E. R. Bejarano, F. Parra, F. J. Murillo, and E. Cerdá-Olmedo. End-product regulation of carotenogenesis in *Phycomyces*. *Archives of Microbiology*, 150:209–214, 1988.
- [20] W. J. Belden, J. J. Loros, and J. C. Dunlap. Execution of the circadian negative feedback loop in *Neurospora* requires the ATP-dependent chromatin-remodeling enzyme CLOCKSWITCH. *Mol. Cell*, 25(4):587–600, Feb 2007.
- [21] D. Bell-Pedersen et al. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat. Rev. Genet.*, 6(7):544–556, Jul 2005.
- [22] E. P. Benito, J. M. Diaz-Minguez, E. A. Iturriaga, V. Campuzano, and A. P. Eslava. Cloning and sequence analysis of the *Mucor circinelloides pyrG* gene encoding orotidine-5'-monophosphate decarboxylase: use of *pyrG* for homologous transformation. *Gene*, 116(1):59–67, Jul 1992.
- [23] K. Bergman et al. *Phycomyces*. *Bacteriol Rev*, 33(1):99–157, Mar 1969.
- [24] K. Bergman, A. P. Eslava, and E. Cerda-Olmedo. Mutants of *Phycomyces* with abnormal phototropism. *Mol. Gen. Genet.*, 123(1):1–16, 1973.
- [25] H. M. Berman et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.*, 28(1):235–242, Jan 2000.

- [26] G. Berrocal-Tito, L. Sametz-Baron, K. Eichenberg, B. A. Horwitz, and A. Herrera-Estrella. Rapid blue light regulation of a *Trichoderma harzianum* photolyase gene. *J. Biol. Chem.*, 274(20):14288–14294, May 1999.
- [27] G. M. Berrocal-Tito, T. Rosales-Saavedra, A. Herrera-Estrella, and B. A. Horwitz. Characterization of blue-light and developmental regulation of the photolyase gene *phr1* in *Trichoderma harzianum*. *Photochem. Photobiol.*, 71(5):662–668, May 2000.
- [28] J. A. Bieszke et al. The *nop-1* gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96(14):8034–8039, Jul 1999.
- [29] J. A. Bieszke, L. Li, and K. A. Borkovich. The fungal opsin gene *nop-1* is negatively-regulated by a component of the blue light sensing pathway and influences conidiation-specific gene expression in *Neurospora crassa*. *Curr. Genet.*, 52(3-4):149–157, Sep 2007.
- [30] K. L. Borden and P. S. Freemont. The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 6(3):395–401, Jun 1996.
- [31] G. E. Borgstahl, D. R. Williams, and E. D. Getzoff. A structure of photoactive yellow protein, a cytosolic photoreceptor: unusual fold, active site, and chromophore. *Biochemistry*, 34(19):6278–6287, May 1995.
- [32] K. A. Borkovich et al. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68(1):1–108, Mar 2004.
- [33] P. M. Bramley and A. Mackenzie. Regulation of carotenoid biosynthesis. *Curr. Top. Cell. Regul.*, 29:291–343, 1988.
- [34] P. M. Bramley and A. Mackenzie. *Handbook of Applied Mycology 4*. Marcel Dekker, New York, 1992.
- [35] W. R. Briggs. The LOV domain: a chromophore module servicing multiple photoreceptors. *J. Biomed. Sci.*, 14(4):499–504, Jul 2007.
- [36] W. R. Briggs and J. M. Christie. Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci.*, 7(5):204–210, May 2002.
- [37] G. Britton. *The Biochemistry of Natural Pigments*. Cambridge Texts in Chemistry and Biochemistry. Cambridge University Press, 1983.

- [38] G. Britton. *Carotenoids in chloroplast pigment-protein complexes. In: Pigment-protein complexes in plastids: synthesis and assembly.* Cell biology. Academic Press, 1993.
- [39] L. S. Brown, A. K. Dioumaev, J. K. Lanyi, E. N. Spudich, and J. L. Spudich. Photochemical reaction cycle and proton transfers in *Neurospora* rhodopsin. *J. Biol. Chem.*, 276(35):32495–32505, Aug 2001.
- [40] M. Brunner and K. Kaldi. Interlocked feedback loops of the circadian clock of *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.*, 68(2):255–262, Apr 2008.
- [41] W. N. Burnette. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.*, 112(2):195–203, Apr 1981.
- [42] S. Calo, F. E. Nicolas, A. Vila, S. Torres-Martinez, and R. M. Ruiz-Vazquez. Two distinct RNA-dependent RNA polymerases are required for initiation and amplification of RNA silencing in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Mol. Microbiol.*, 83(2):379–394, Jan 2012.
- [43] A. Carattoli, E. Kato, M. Rodriguez-Franco, W. D. Stuart, and G. Macino. A chimeric light-regulated amino acid transport system allows the isolation of blue light regulator (*blr*) mutants of *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92(14):6612–6616, Jul 1995.
- [44] A. Carattoli, N. Romano, P. Ballario, G. Morelli, and G. Macino. The *Neurospora crassa* carotenoid biosynthetic gene (*albino 3*) reveals highly conserved regions among prenyltransferases. *J. Biol. Chem.*, 266(9):5854–5859, Mar 1991.
- [45] S. Casas-Flores, M. Rios-Momberg, M. Bibbins, P. Ponce-Noyola, and A. Herrera-Estrella. BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology (Reading, Engl.)*, 150(Pt 11):3561–3569, Nov 2004.
- [46] S. Casas-Flores et al. Cross talk between a fungal blue-light perception system and the cyclic AMP signaling pathway. *Eukaryotic Cell*, 5(3):499–506, Mar 2006.
- [47] A. R. Cashmore. Cryptochromes: enabling plants and animals to determine circadian time. *Cell*, 114(5):537–543, Sep 2003.
- [48] Cerdá-Olmedo and E.D. Lipson. *Phycomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1987.
- [49] E. Cerdá-Olmedo. Carotene mutants of *Phycomyces*. *Methods in Enzymology*, 110:220–243, 1985.

- [50] E. Cerdá-Olmedo. *Phycomyces* and the biology of light and color. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25(5):503–512, Dec 2001.
- [51] E. Cerdá-Olmedo and Corrochano L. M. *Photoregulation of fungal gene expression. Light as an energy source and information carrier in plant physiology*. NATO ASI series: Life sciences. Plenum Press, 1996.
- [52] J. A. Chemler, Y. Yan, and M. A. Koffas. Biosynthesis of isoprenoids, polyunsaturated fatty acids and flavonoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.*, 5:20, 2006.
- [53] C. H. Chen, B. S. DeMay, A. S. Gladfelter, J. C. Dunlap, and J. J. Loros. Physical interaction between VIVID and white collar complex regulates photoadaptation in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107(38):16715–16720, Sep 2010.
- [54] C. H. Chen, J. C. Dunlap, and J. J. Loros. *Neurospora* illuminates fungal photoreception. *Fungal Genet. Biol.*, 47(11):922–929, Nov 2010.
- [55] C. H. Chen, C. S. Ringelberg, R. H. Gross, J. C. Dunlap, and J. J. Loros. Genome-wide analysis of light-inducible responses reveals hierarchical light signalling in *Neurospora*. *EMBO J.*, 28(8):1029–1042, Apr 2009.
- [56] P. Cheng, Q. He, Y. Yang, L. Wang, and Y. Liu. Functional conservation of light, oxygen, or voltage domains in light sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100(10):5938–5943, May 2003.
- [57] P. Cheng, Y. Yang, K. H. Gardner, and Y. Liu. PAS domain-mediated WC-1/WC-2 interaction is essential for maintaining the steady-state level of WC-1 and the function of both proteins in circadian clock and light responses of *Neurospora*. *Mol. Cell. Biol.*, 22(2):517–524, Jan 2002.
- [58] P. Cheng, Y. Yang, L. Wang, Q. He, and Y. Liu. WHITE COLLAR-1, a multifunctional *Neurospora* protein involved in the circadian feedback loops, light sensing, and transcription repression of *wc-2*. *J. Biol. Chem.*, 278(6):3801–3808, Feb 2003.
- [59] D. K. Choi. Differential screening of novel gene in apoptotic neuronal cells and its functional study during embryonic development, 2005.
- [60] J. M. Christie. Phototropin blue-light receptors. *Annu Rev Plant Biol.*, 58:21–45, 2007.
- [61] J. M. Christie, M. Salomon, K. Nozue, M. Wada, and W. R. Briggs. LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (*nph1*): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96(15):8779–8783, Jul 1999.

- [62] J. M. Christie, T. E. Swartz, R. A. Bogomolni, and W. R. Briggs. Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function. *Plant J.*, 32(2):205–219, Oct 2002.
- [63] M. L. Circu and T. Y. Aw. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.*, 48(6):749–762, Mar 2010.
- [64] M. Clamp, J. Cuff, S. M. Searle, and G. J. Barton. The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics*, 20(3):426–427, Feb 2004.
- [65] M. A. Collett, N. Garceau, J. C. Dunlap, and J. J. Loros. Light and clock expression of the *Neurospora* clock gene frequency is differentially driven by but dependent on WHITE COLLAR-2. *Genetics*, 160(1):149–158, Jan 2002.
- [66] R. C. Conaway, C. S. Brower, and J. W. Conaway. Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science*, 296(5571):1254–1258, May 2002.
- [67] S. B. Corchnoy et al. Intramolecular proton transfers and structural changes during the photocycle of the LOV2 domain of phototropin 1. *J. Biol. Chem.*, 278(2):724–731, Jan 2003.
- [68] L. M. Corrochano. Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behaviour. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 6(7):725–736, Jul 2007.
- [69] L. M. Corrochano and V. Garre. Photobiology in the *Zygomycota*: multiple photoreceptor genes for complex responses to light. *Fungal Genet. Biol.*, 47(11):893–899, Nov 2010.
- [70] A. J. Courey, D. A. Holtzman, S. P. Jackson, and R. Tjian. Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1. *Cell*, 59(5):827–836, Dec 1989.
- [71] S. Crosson and K. Moffat. Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: insights into light-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98(6):2995–3000, Mar 2001.
- [72] S. Crosson and K. Moffat. Photoexcited structure of a plant photoreceptor domain reveals a light-driven molecular switch. *Plant Cell*, 14(5):1067–1075, May 2002.
- [73] S. Crosson, S. Rajagopal, and K. Moffat. The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry*, 42(1):2–10, Jan 2003.

- [74] Y. Dang, Q. Yang, Z. Xue, and Y. Liu. RNA interference in fungi: pathways, functions, and applications. *Eukaryotic Cell*, 10(9):1148–1155, Sep 2011.
- [75] B. H. Davies. *Analysis of carotenoid pigments. En T.W. Goodwin (Ed.). Chemistry and biochemistry of plant pigments*. New York-London: Academic Press, 1965.
- [76] J. P. de Haro. *Silenciamiento génico en Mucor circinelloides: análisis estructural y funcional del gen dicer-2*. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, 2010.
- [77] J. P. de Haro et al. A single *dicer* gene is required for efficient gene silencing associated with two classes of small antisense RNAs in *Mucor circinelloides*. *Eukaryotic Cell*, 8(10):1486–1497, Oct 2009.
- [78] F. Degli-Innocenti and V. E. Russo. Isolation of new *white collar* mutants of *Neurospora crassa* and studies on their behavior in the blue light-induced formation of protoperithecia. *J. Bacteriol.*, 159(2):757–761, Aug 1984.
- [79] D. L. Denault, J. J. Loros, and J. C. Dunlap. WC-2 mediates WC-1-FRQ interaction within the PAS protein-linked circadian feedback loop of *Neurospora*. *EMBO J.*, 20(1-2):109–117, Jan 2001.
- [80] J. Deruère et al. Fibril assembly and carotenoid overaccumulation in chromoplasts: a model for supramolecular lipoprotein structures. *Plant Cell*, 6(1):119–133, Jan 1994.
- [81] R. J. Deshaies and C. A. Joazeiro. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Biochem.*, 78:399–434, 2009.
- [82] P. Di Mascio, S. Kaiser, and H. Sies. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.*, 274(2):532–538, Nov 1989.
- [83] M. Dorn, M. Jurk, and P. Schmieder. Blue news update: BODIPY-GTP binds to the blue-light receptor YtvA while GTP does not. *PLoS ONE*, 7(1):e29201, 2012.
- [84] J. C. Dunlap and J. J. Loros. The *Neurospora* circadian system. *J. Biol. Rhythms*, 19(5):414–424, Oct 2004.
- [85] R. C. Edgar. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5:113, Aug 2004.
- [86] M. Elvin, J. J. Loros, J. C. Dunlap, and C. Heintzen. The PAS/LOV protein VIVID supports a rapidly dampened daytime oscillator that facilitates entrainment of the *Neurospora* circadian clock. *Genes Dev.*, 19(21):2593–2605, Nov 2005.

- [87] D. Escher, M. Bodmer-Glavas, A. Barberis, and W. Schaffner. Conservation of glutamine-rich transactivation function between yeast and humans. *Mol. Cell. Biol.*, 20(8):2774–2782, Apr 2000.
- [88] A. F. Estrada and J. Avalos. 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 Genet. Biol.*, 45(5):705–718, May 2008.
- [89] A. F. Estrada and J. Avalos. Regulation and targeted mutation of *opsA*, coding for the NOP-1 opsin orthologue in *Fusarium fujikuroi*. *J. Mol. Biol.*, 387(1):59–73, Mar 2009.
- [90] O. Etxebeste, A. Garzia, E. A. Espeso, and U. Ugalde. *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. *Trends Microbiol.*, 18(12):569–576, Dec 2010.
- [91] E. Falvey, F. Fleury-Olela, and U. Schibler. The rat hepatic leukemia factor (HLF) gene encodes two transcriptional activators with distinct circadian rhythms, tissue distributions and target preferences. *EMBO J.*, 14(17):4307–4317, Sep 1995.
- [92] A. P. Feinberg and B. Vogelstein. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, 132(1):6–13, Jul 1983.
- [93] A. P. Feinberg and B. Vogelstein. "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal. Biochem.*, 137(1):266–267, Feb 1984.
- [94] C. S. Foote and R. W. Denny. Chemistry of singlet oxygen. VII. Quenching by beta-carotene. *J. Am. Chem. Soc.*, 90(22):6233–6235, 1968.
- [95] A. C. Froehlich et al. Genetic and molecular characterization of a cryptochrome from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 9(5):738–750, May 2010.
- [96] A. C. Froehlich, Y. Liu, J. J. Loros, and J. C. Dunlap. White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science*, 297(5582):815–819, Aug 2002.
- [97] A. C. Froehlich, B. Noh, R. D. Vierstra, J. Loros, and J. C. Dunlap. Genetic and molecular analysis of phytochromes from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 4(12):2140–2152, Dec 2005.
- [98] P. Galland. Phototropism of the *Phycomyces* sporangiophore: A comparison with higher plants. *Photochemistry and Photobiology*, 52:233–248, 1990.

- [99] P. Galland. Reception of far-ultraviolet light in *Phycomyces*: antagonistic interaction with blue and red light. *Planta*, 205(2):269–276, Jun 1998.
- [100] P. Galland and E. D. Lipson. Blue-light reception in *Phycomyces* phototropism: evidence for two photosystems operating in low- and high-intensity ranges. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84(1):104–108, Jan 1987.
- [101] M. Y. Galperin, A. N. Nikolskaya, and E. V. Koonin. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol. Lett.*, 203(1):11–21, Sep 2001.
- [102] Q. Gao and F. Garcia-Pichel. Microbial ultraviolet sunscreens. *Nat. Rev. Microbiol.*, 9(11):791–802, Nov 2011.
- [103] F. Garcia-Pichel. A model for internal self-shading in planktonic organisms and its implications for the usefulness of ultraviolet sunscreens. *Limnology and Oceanography*, 39:1804–1717, 1994.
- [104] V. García Tagua. *Una aproximación genómica a la regulación por la luz de la transcripción en Phycomyces blakesleeanus*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla, 2012.
- [105] E. Gasteiger et al. *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, 2005.
- [106] D. Gavriouchkina et al. Thyrotroph embryonic factor regulates light-induced transcription of repair genes in zebrafish embryonic cells. *PLoS ONE*, 5(9):e12542, 2010.
- [107] G. W. Gooday, P. Fawcett, D. Green, and G. Shaw. The formation of fungal sporopollenin in the zygosporangium wall of *Mucor mucedo*: a role for the sexual carotenogenesis in the *Mucorales*. *Journal of General Microbiology*, 74:233–239, 1973.
- [108] T.W. Goodwin. *The biochemistry of the carotenoids: Plants. Animals. v.1-2*. Chapman and Hall, 1980.
- [109] H. C. Gorham, S. J. McGowan, P. R. Robson, and D. A. Hodgson. Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: light-dependent membrane sequestration of ECF sigma factor CarQ by anti-sigma factor CarR. *Mol. Microbiol.*, 19(1):171–186, Jan 1996.
- [110] M. Gouy, S. Guindon, and O. Gascuel. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.*, 27(2):221–224, Feb 2010.

- [111] N. S. Govin and E. Cerdá-Olmedo. Sexual activation of carotenogenesis in *Phycomyces blakesleeanus*. *J Gen. Microbiol.*, 132:2775–2780, 1986.
- [112] I. V. Grigoriev et al. The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute. *Nucleic Acids Res.*, 40(Database issue):26–32, Jan 2012.
- [113] R. Groisman et al. CSA-dependent degradation of CSB by the ubiquitin-proteasome pathway establishes a link between complementation factors of the Cockayne syndrome. *Genes Dev.*, 20(11):1429–1434, Jun 2006.
- [114] S. Guindon et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.*, 59(3):307–321, May 2010.
- [115] A. Gutierrez, S. Lopez-Garcia, and V. Garre. High reliability transformation of the basal fungus *Mucor circinelloides* by electroporation. *J. Microbiol. Methods*, 84(3):442–446, Mar 2011.
- [116] J. Gómez Mateo. *Análisis estructural y funcional de los genes crgB y mcwc-1a de Mucor circinelloides*. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, 2005.
- [117] K. Haglund and I. Dikic. Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J.*, 24(19):3353–3359, Oct 2005.
- [118] R. W. Harding, D.Q. Philip, B.Z. Drozdowicz, and N.P. Williams. A *Neurospora crassa* mutant which over accumulates carotenoid pigments. *Neurospora newsl.*, 31:23–25, 1984.
- [119] R. W. Harding and R. V. Turner. Photoregulation of the Carotenoid Biosynthetic Pathway in Albino and White Collar Mutants of *Neurospora crassa*. *Plant Physiol.*, 68(3):745–749, Sep 1981.
- [120] S. M. Harper, L. C. Neil, and K. H. Gardner. Structural basis of a phototropin light switch. *Science*, 301(5639):1541–1544, Sep 2003.
- [121] Q. He et al. FWD1-mediated degradation of FREQUENCY in *Neurospora* establishes a conserved mechanism for circadian clock regulation. *EMBO J.*, 22(17):4421–4430, Sep 2003.
- [122] Q. He et al. White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science*, 297(5582):840–843, Aug 2002.
- [123] Q. He and Y. Liu. Molecular mechanism of light responses in *Neurospora*: from light-induced transcription to photoadaptation. *Genes Dev.*, 19(23):2888–2899, Dec 2005.

- [124] Q. He et al. Light-independent phosphorylation of WHITE COLLAR-1 regulates its function in the *Neurospora* circadian negative feedback loop. *J. Biol. Chem.*, 280(17):17526–17532, Apr 2005.
- [125] C. Heintzen, J. J. Loros, and J. C. Dunlap. The PAS protein VIVID defines a clock-associated feedback loop that represses light input, modulates gating, and regulates clock resetting. *Cell*, 104(3):453–464, Feb 2001.
- [126] J. T. Henry and S. Crosson. Ligand-binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annu. Rev. Microbiol.*, 65:261–286, 2011.
- [127] A. Herrera-Estrella and B. A. Horwitz. Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception. *Mol. Microbiol.*, 64(1):5–15, Apr 2007.
- [128] J. Herrou and S. Crosson. Function, structure and mechanism of bacterial photosensory LOV proteins. *Nat. Rev. Microbiol.*, 9(10):713–723, Oct 2011.
- [129] D. S. Hibbett et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.*, 111(Pt 5):509–547, May 2007.
- [130] D.A. Hodgson and F.J. Murillo. *Genetics of regulation and pathway of synthesis of carotenoids. In: Myxobacteria II.* ASM Press, Washington, D.C., 1993.
- [131] M. Holm, L. G. Ma, L. J. Qu, and X. W. Deng. Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Dev.*, 16(10):1247–1259, May 2002.
- [132] D. S. Holmes and M. Quigley. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.*, 114(1):193–197, Jun 1981.
- [133] S. M. Hunt, M. Elvin, S. K. Crosthwaite, and C. Heintzen. The PAS/LOV protein VIVID controls temperature compensation of circadian clock phase and development in *Neurospora crassa*. *Genes Dev.*, 21(15):1964–1974, Aug 2007.
- [134] S. M. Hunt, S. Thompson, M. Elvin, and C. Heintzen. VIVID interacts with the WHITE COLLAR complex and FREQUENCY-interacting RNA helicase to alter light and clock responses in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107(38):16709–16714, Sep 2010.
- [135] A. Idnurm and S. Crosson. The photobiology of microbial pathogenesis. *PLoS Pathog.*, 5(11):e1000470, Nov 2009.
- [136] A. Idnurm and J. Heitman. Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom. *PLoS Biol.*, 3(4):e95, Apr 2005.

- [137] A. Idnurm and J. Heitman. Ferrochelatase is a conserved downstream target of the blue light-sensing White collar complex in fungi. *Microbiology (Reading, Engl.)*, 156(Pt 8):2393–2407, Aug 2010.
- [138] A. Idnurm et al. The *Phycomyces madA* gene encodes a blue-light photoreceptor for phototropism and other light responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103(12):4546–4551, Mar 2006.
- [139] A. Idnurm, S. Verma, and L. M. Corrochano. A glimpse into the basis of vision in the kingdom *Mycota*. *Fungal Genet. Biol.*, 47(11):881–892, Nov 2010.
- [140] Broad Institute. Origins of Multicellularity Sequencing Project, Broad Institute of Harvard and MIT. (<http://www.broadinstitute.org/>).
- [141] Broad Institute. *Rhizopus oryzae* Sequencing Project. Broad Institute of Harvard and MIT. (<http://www.broadinstitute.org/>).
- [142] M. Inui et al. USP15 is a deubiquitylating enzyme for receptor-activated SMADs. *Nat. Cell Biol.*, 13(11):1368–1375, Nov 2011.
- [143] P. C. Iwen, L. Sigler, R. K. Noel, and A. G. Freifeld. *Mucor circinelloides* was identified by molecular methods as a cause of primary cutaneous zygomycosis. *J. Clin. Microbiol.*, 45(2):636–640, Feb 2007.
- [144] Avalos. J. and Cerdá-Olmedo E. Profiles on Biotechnology. *Current Genetics*, 11(6-7):505–511, March 1987.
- [145] Avalos. J., B. Mehta, and Cerdá-Olmedo E. Profiles on Biotechnology. *Universidad de Santiago de Compostela*, 323, 1992.
- [146] T. Y. James et al. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*, 443(7113):818–822, Oct 2006.
- [147] I. C. Jang, J. Y. Yang, H. S. Seo, and N. H. Chua. HFR1 is targeted by COP1 E3 ligase for post-translational proteolysis during phytochrome A signaling. *Genes Dev.*, 19(5):593–602, Mar 2005.
- [148] JGI. *Mucor circinelloides* Sequencing Project. JGI. (<http://genome.jgi-psf.org/mucci2/>).
- [149] JGI. *Phycomyces blakesleeanus* Sequencing Project. JGI. (<http://genome.jgi-psf.org/phyco2/>).

- [150] M. A. Jones, K. A. Feeney, S. M. Kelly, and J. M. Christie. Mutational analysis of phototropin 1 provides insights into the mechanism underlying LOV2 signal transmission. *J. Biol. Chem.*, 282(9):6405–6414, Mar 2007.
- [151] P. Kaiser, K. Flick, C. Wittenberg, and S. I. Reed. Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCF(Met30)-mediated inactivation of the transcription factor Met4. *Cell*, 102(3):303–314, Aug 2000.
- [152] C. Y. Kang, H. L. Lian, F. F. Wang, J. R. Huang, and H. Q. Yang. Cryptochromes, phytochromes, and COP1 regulate light-controlled stomatal development in Arabidopsis. *Plant Cell*, 21(9):2624–2641, Sep 2009.
- [153] M. Kasahara et al. Photochemical properties of the flavin mononucleotide-binding domains of the phototropins from *Arabidopsis*, rice, and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.*, 129(2):762–773, Jun 2002.
- [154] K. Katoh, K. Misawa, K. Kuma, and T. Miyata. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.*, 30(14):3059–3066, Jul 2002.
- [155] M. Kimura and T. Kagawa. Phototropin and light-signaling in phototropism. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9(5):503–508, Oct 2006.
- [156] C. H. Ko and J. S. Takahashi. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.*, 15 Spec No 2:R271–277, Oct 2006.
- [157] R. Kort et al. The xanthopsins: a new family of eubacterial blue-light photoreceptors. *EMBO J.*, 15(13):3209–3218, Jul 1996.
- [158] M. Kotaka et al. Structural analysis of the recognition of the negative regulator NmrA and DNA by the zinc finger from the GATA-type transcription factor AreA. *J. Mol. Biol.*, 381(2):373–382, Aug 2008.
- [159] T. Kouyama and M. Murakami. Structural divergence and functional versatility of the rhodopsin superfamily. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 9(11):1458–1465, Nov 2010.
- [160] K. Kowalski, R. Czolij, G. F. King, M. Crossley, and J. P. Mackay. The solution structure of the N-terminal zinc finger of GATA-1 reveals a specific binding face for the transcriptional co-factor FOG. *J. Biomol. NMR*, 13(3):249–262, Mar 1999.
- [161] M. Kozak. Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eucaryotic cell-free translation systems. *Mol. Cell. Biol.*, 9(11):5073–5080, Nov 1989.

- [162] U. Krauss et al. Distribution and phylogeny of light-oxygen-voltage-blue-light-signaling proteins in the three kingdoms of life. *J. Bacteriol.*, 191(23):7234–7242, Dec 2009.
- [163] N. I. Krinsky. Carotenoid protection against oxidation. *Pure Appl. Chem.*, 51(3):649–660, 1979.
- [164] H. Kubo. Isolation of *madA* homologs in *Pilobolus crystallinus*. *Mycoscience*, 50:400–406, 2009.
- [165] H. Kubo and Mihara H. Phototropic fluence-response curves for *Pilobolus crystallinus* sporangiophore. *Planta*, 174(2):174–179, 1988.
- [166] H. Kubo and Mihara H. Lag period for phototropism in *Pilobolus crystallinus* sporangiophores. *Mycoscience*, 37:295–299, 1996.
- [167] N. Kucera et al. Unwinding the differences of the mammalian PERIOD clock proteins from crystal structure to cellular function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109(9):3311–3316, Feb 2012.
- [168] B. Kudla et al. The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. *EMBO J.*, 9(5):1355–1364, May 1990.
- [169] W. Kühlbrandt, D. N. Wang, and Y. Fujiyoshi. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature*, 367(6464):614–621, Feb 1994.
- [170] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685, Aug 1970.
- [171] H. K. Lamb et al. The negative transcriptional regulator NmrA discriminates between oxidized and reduced dinucleotides. *J. Biol. Chem.*, 278(34):32107–32114, Aug 2003.
- [172] J. S. Lamb, B. D. Zoltowski, S. A. Pabit, B. R. Crane, and L. Pollack. Time-resolved dimerization of a PAS-LOV protein measured with photocoupled small angle X-ray scattering. *J. Am. Chem. Soc.*, 130(37):12226–12227, Sep 2008.
- [173] S. Langmesser, T. Tallone, A. Bordon, S. Rusconi, and U. Albrecht. Interaction of circadian clock proteins PER2 and CRY with BMAL1 and CLOCK. *BMC Mol. Biol.*, 9:41, 2008.
- [174] M. A. Larkin et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21):2947–2948, Nov 2007.

- [175] A. D. Larsen and P. S. Sypherd. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and morphogenesis in *Mucor racemosus*. *J. Bacteriol.*, 117(2):432–438, Feb 1974.
- [176] B. A. Lasker and P. T. Borgia. High-frequency heterokaryon formation by *Mucor racemosus*. *J. Bacteriol.*, 141(2):565–569, Feb 1980.
- [177] I. Letunic and P. Bork. Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Res.*, 39(Web Server issue):W475–478, Jul 2011.
- [178] I. Letunic, T. Doerks, and P. Bork. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.*, 40(Database issue):D302–305, Jan 2012.
- [179] C. H. Li et al. Sporangiospore size dimorphism is linked to virulence of *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathog.*, 7(6):e1002086, Jun 2011.
- [180] L. Li, S. S. Chang, and Y. Liu. RNA interference pathways in filamentous fungi. *Cell. Mol. Life Sci.*, 67(22):3849–3863, Nov 2010.
- [181] W. A. Lim. The modular logic of signaling proteins: building allosteric switches from simple binding domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 12(1):61–68, Feb 2002.
- [182] C. Lin, M. Ahmad, D. Gordon, and A. R. Cashmore. Expression of an Arabidopsis cryptochrome gene in transgenic tobacco results in hypersensitivity to blue, UV-A, and green light. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92(18):8423–8427, Aug 1995.
- [183] C. Lin and T. Todo. The cryptochromes. *Genome Biol.*, 6(5):220, 2005.
- [184] H. Linden, P. Ballario, and G. Macino. Blue light regulation in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.*, 22(3):141–150, Dec 1997.
- [185] H. Linden and G. Macino. White collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. *EMBO J.*, 16(1):98–109, Jan 1997.
- [186] H. Linden, M. Rodriguez-Franco, and G. Macino. Mutants of *Neurospora crassa* defective in regulation of blue light perception. *Mol. Gen. Genet.*, 254(2):111–118, Mar 1997.
- [187] P. Linnemannstöns, M. M. Prado, R. Fernandez-Martin, B. Tudzynski, and J. Avalos. A carotenoid biosynthesis gene cluster in *Fusarium fujikuroi*: the genes *carB* and *carRA*. *Mol. Genet. Genomics*, 267(5):593–602, Jul 2002.

- [188] S. Lipkowitz and A. M. Weissman. RINGs of good and evil: RING finger ubiquitin ligases at the crossroads of tumour suppression and oncogenesis. *Nat. Rev. Cancer*, 11(9):629–643, Sep 2011.
- [189] T. Liu et al. DNA and RNA binding by the mitochondrial Lon protease is regulated by nucleotide and protein substrate. *J. Biol. Chem.*, 279(14):13902–13910, Apr 2004.
- [190] Y. Liu, Q. He, and P. Cheng. Photoreception in *Neurospora*: a tale of two White Collar proteins. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60(10):2131–2138, Oct 2003.
- [191] Y. Liu, J. Loros, and J. C. Dunlap. Phosphorylation of the *Neurospora* clock protein FREQUENCY determines its degradation rate and strongly influences the period length of the circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97(1):234–239, Jan 2000.
- [192] L. M. Lombardi and S. Brody. Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: clock gene homologues in fungi. *Fungal Genet. Biol.*, 42(11):887–892, Nov 2005.
- [193] J. M. Lorca-Pascual, L. Murcia-Flores, V. Garre, S. Torres-Martinez, and R. M. Ruiz-Vazquez. The RING-finger domain of the fungal repressor *crgA* is essential for accurate light regulation of carotenogenesis. *Mol. Microbiol.*, 52(5):1463–1474, Jun 2004.
- [194] A. Losi and W. Gärtner. Old chromophores, new photoactivation paradigms, trendy applications: flavins in blue light-sensing photoreceptors. *Photochem. Photobiol.*, 87(3):491–510, 2011.
- [195] J. A. Lowry et al. Structural analysis of MED-1 reveals unexpected diversity in the mechanism of DNA recognition by GATA-type zinc finger domains. *J. Biol. Chem.*, 284(9):5827–5835, Feb 2009.
- [196] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193(1):265–275, Nov 1951.
- [197] B. Lu et al. Roles for the human ATP-dependent Lon protease in mitochondrial DNA maintenance. *J. Biol. Chem.*, 282(24):17363–17374, Jun 2007.
- [198] Y. K. Lu, K. H. Sun, and W. C. Shen. Blue light negatively regulates the sexual filamentation via the Cwc1 and Cwc2 proteins in *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.*, 56(2):480–491, Apr 2005.
- [199] T. L. Lübbehusen, J. Nielsen, and M. McIntyre. Morphology and physiology of the dimorphic fungus *Mucor circinelloides* (syn. *M. racemosus*) during anaerobic growth. *Mycol. Res.*, 107(Pt 2):223–230, Feb 2003.

- [200] L. J. Ma et al. Genomic analysis of the basal lineage fungus *Rhizopus oryzae* reveals a whole-genome duplication. *PLoS Genet.*, 5(7):e1000549, Jul 2009.
- [201] E. Malzahn, S. Ciprianidis, K. Kaldi, T. Schafmeier, and M. Brunner. Photoadaptation in *Neurospora* by competitive interaction of activating and inhibitory LOV domains. *Cell*, 142(5):762–772, Sep 2010.
- [202] A. Marchler-Bauer et al. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res.*, 39(Database issue):D225–229, Jan 2011.
- [203] B. J. Mehta, L. M. Salgado, E. R. Bejarano, and E. Cerda-Olmedo. New Mutants of *Phycomyces blakesleeanus* for (beta)-Carotene Production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(9):3657–3661, Sep 1997.
- [204] M. Merrow et al. Circadian regulation of the light input pathway in *Neurospora crassa*. *EMBO J.*, 20(3):307–315, Feb 2001.
- [205] J.H. Miller. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor., 1972.
- [206] E. Molinari, M. Gilman, and S. Natesan. Proteasome-mediated degradation of transcriptional activators correlates with activation domain potency in vivo. *EMBO J.*, 18(22):6439–6447, Nov 1999.
- [207] M. Moline, D. Libkind, M. d. e. l. C. Dieguez, and M. van Broock. Photoprotective role of carotenoids in yeasts: Response to UV-B of pigmented and naturally-occurring albino strains. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.*, 95(3):156–161, Jun 2009.
- [208] D. T. Mooney and P. S. Sypherd. Volatile factor involved in the dimorphism of *Mucor racemosus*. *J. Bacteriol.*, 126(3):1266–1270, Jun 1976.
- [209] J. L. Mooney and L. N. Yager. Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev.*, 4(9):1473–1482, Sep 1990.
- [210] M. M. Moore, M. W. Breedveld, and A. P. Autor. The role of carotenoids in preventing oxidative damage in the pigmented yeast, *Rhodotorula mucilaginosa*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 270(2):419–431, May 1989.
- [211] S. A. Morris and R. E. Subden. Effects of ultraviolet radiation on carotenoid-containing and albino strains of *Neurospora crassa*. *Mutat. Res.*, 22(2):105–109, Feb 1974.
- [212] L. Murcia-Flores. *Análisis traduccional y post-traduccional de una proteína implicada en la regularización de la fotocarotenogénesis en Mucor circinelloides*. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, 2007.

- [213] L. Murcia-Flores, J. M. Lorca-Pascual, V. Garre, S. Torres-Martinez, and R. M. Ruiz-Vazquez. Non-AUG translation initiation of a fungal RING finger repressor involved in photocarotenogenesis. *J. Biol. Chem.*, 282(21):15394–15403, May 2007.
- [214] F. J. Murillo and E. Cerda-Olmedo. Regulation of carotene synthesis in *Phycomyces*. *Mol. Gen. Genet.*, 148(1):19–24, Oct 1976.
- [215] K. Nakai and P. Horton. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem. Sci.*, 24(1):34–36, Jan 1999.
- [216] C. Nanbru et al. Alternative translation of the proto-oncogene c-myc by an internal ribosome entry site. *J. Biol. Chem.*, 272(51):32061–32066, Dec 1997.
- [217] A. I. Nash, W. H. Ko, S. M. Harper, and K. H. Gardner. A conserved glutamine plays a central role in LOV domain signal transmission and its duration. *Biochemistry*, 47(52):13842–13849, Dec 2008.
- [218] E. Navarro et al. A negative regulator of light-inducible carotenogenesis in *Mucor circinelloides*. *Mol. Genet. Genomics*, 266(3):463–470, Nov 2001.
- [219] E. Navarro, A. Penaranda, W. Hansberg, S. Torres-Martinez, and V. Garre. A White Collar 1-like protein mediates opposite regulatory functions in *Mucor circinelloides*. *Fungal Genet. Biol.*, Jan 2013.
- [220] E. Navarro, V. L. Ruiz-Perez, and S. Torres-Martinez. Overexpression of the *crgA* gene abolishes light requirement for carotenoid biosynthesis in *Mucor circinelloides*. *Eur. J. Biochem.*, 267(3):800–807, Feb 2000.
- [221] E. Navarro, G. Sandmann, and S. Torres-Martinez. Mutants of the carotenoid biosynthesis pathway of *Mucor circinelloides*. *Experimental Mycology*, 19:186–190, 1995.
- [222] S. B. Needleman and C. D. Wunsch. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.*, 48(3):443–453, Mar 1970.
- [223] M. A. Nelson, G. Morelli, A. Carattoli, N. Romano, and G. Macino. Molecular cloning of a *Neurospora crassa* carotenoid biosynthetic gene (*albino-3*) regulated by blue light and the products of the *white collar* genes. *Mol. Cell. Biol.*, 9(3):1271–1276, Mar 1989.
- [224] F. E. Nicolas et al. A RING-finger photocarotenogenic repressor involved in asexual sporulation in *Mucor circinelloides*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 280(1):81–88, Mar 2008.

- [225] F. E. Nicolas, J. P. de Haro, S. Torres-Martinez, and R. M. Ruiz-Vazquez. Mutants defective in a *Mucor circinelloides* dicer-like gene are not compromised in siRNA silencing but display developmental defects. *Fungal Genet. Biol.*, 44(6):504–516, Jun 2007.
- [226] F. E. Nicolas et al. Endogenous short RNAs generated by Dicer 2 and RNA-dependent RNA polymerase 1 regulate mRNAs in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Nucleic Acids Res.*, 38(16):5535–5541, Sep 2010.
- [227] F. E. Nicolas, S. Torres-Martinez, and R. M. Ruiz-Vazquez. Two classes of small anti-sense RNAs in fungal RNA silencing triggered by non-integrative transgenes. *EMBO J.*, 22(15):3983–3991, Aug 2003.
- [228] F. E. Nicolas-Molina, E. Navarro, and R. M. Ruiz-Vazquez. Lycopene over-accumulation by disruption of the negative regulator gene *crgA* in *Mucor circinelloides*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 78(1):131–137, Feb 2008.
- [229] C. Notredame, D. G. Higgins, and J. Heringa. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.*, 302(1):205–217, Sep 2000.
- [230] B. Nuñez-Corcuera, I. Serafimidis, E. Arias-Palomo, A. Rivera-Calzada, and T. Suarez. A new protein carrying an NmrA-like domain is required for cell differentiation and development in *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.*, 321(2):331–342, Sep 2008.
- [231] I. Nyilasi, K. Acs, T. Papp, E. Nagy, and C. Vagvolgyi. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Mucor circinelloides*. *Folia Microbiol. (Praha)*, 50(5):415–420, 2005.
- [232] J. Ocampo et al. A subunit of protein kinase a regulates growth and differentiation in the fungus *Mucor circinelloides*. *Eukaryotic Cell*, 8(7):933–944, Jul 2009.
- [233] J. Ocampo et al. Protein kinase A regulatory subunit isoforms regulate growth and differentiation in *Mucor circinelloides*: essential role of PKAR4. *Eukaryotic Cell*, 11(8):989–1002, Aug 2012.
- [234] M. Olmedo, C. Ruger-Herreros, E. M. Luque, and L. M. Corrochano. A complex photoreceptor system mediates the regulation by light of the conidiation genes *con-10* and *con-6* in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.*, 47(4):352–363, Apr 2010.
- [235] M. Orłowski. *Mucor* dimorphism. *Microbiol. Rev.*, 55(2):234–258, Jun 1991.
- [236] J. M. Ortiz-Guerrero, M. C. Polanco, F. J. Murillo, S. Padmanabhan, and M. Elias-Arnanz. Light-dependent gene regulation by a coenzyme B12-based photoreceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108(18):7565–7570, May 2011.

- [237] Eslava A. P., Álvarez M. I., and E. Cerdá-Olmedo. Regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces* by vitamin A and beta-ionone. *European Journal of Biochemistry*, 48:617–623, 1974.
- [238] R. M. Page. Light and the asexual reproduction of *Pilobolus*. *Science*, 138(3546):1238–1245, Dec 1962.
- [239] H. S. Park and J. H. Yu. Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Curr. Opin. Microbiol.*, 15(6):669–677, Dec 2012.
- [240] W. R. Pearson and D. J. Lipman. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85(8):2444–2448, Apr 1988.
- [241] U. V. Pedmale, R. B. Celaya, and E. Liscum. Phototropism: mechanism and outcomes. *Arabidopsis Book*, 8:e0125, 2010.
- [242] E. Peter, B. Dick, and S. A. Baeurle. Illuminating the early signaling pathway of a fungal light-oxygen-voltage photoreceptor. *Proteins*, Oct 2011.
- [243] A. Pfeifer, T. Mathes, Y. Lu, P. Hegemann, and T. Kottke. Blue light induces global and localized conformational changes in the kinase domain of full-length phototropin. *Biochemistry*, 49(5):1024–1032, Feb 2010.
- [244] M. M. Prado, A. Prado-Cabrero, R. Fernandez-Martin, and J. Avalos. A gene of the opsin family in the carotenoid gene cluster of *Fusarium fujikuroi*. *Curr. Genet.*, 46(1):47–58, Jul 2004.
- [245] S. R. Pulivarthy et al. Reciprocity between phase shifts and amplitude changes in the mammalian circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104(51):20356–20361, Dec 2007.
- [246] M. Punta et al. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.*, 40(Database issue):290–301, Jan 2012.
- [247] J. Purschwitz, S. Muller, C. Kastner, and R. Fischer. Seeing the rainbow: light sensing in fungi. *Curr. Opin. Microbiol.*, 9(6):566–571, Dec 2006.
- [248] E. Quevillon et al. InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res.*, 33(Web Server issue):W116–120, Jul 2005.
- [249] M. D Quiles-Rosillo. *Genes de Mucor circinelloides regulados por crgA, un gen regulador de la carotenogénesis*. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, 2001.

- [250] M. D. Quiles-Rosillo, R. M. Ruiz-Vazquez, S. Torres-Martinez, and V. Garre. Light induction of the carotenoid biosynthesis pathway in *Blakeslea trispora*. *Fungal Genet. Biol.*, 42(2):141–153, Feb 2005.
- [251] M. D. Quiles-Rosillo, S. Torres-Martinez, and V. Garre. *cigA*, a light-inducible gene involved in vegetative growth in *Mucor circinelloides* is regulated by the carotenogenic repressor *crgA*. *Fungal Genet. Biol.*, 38(1):122–132, Feb 2003.
- [252] D. Rambaldi and F. D. Ciccarelli. FancyGene: dynamic visualization of gene structures and protein domain architectures on genomic loci. *Bioinformatics*, 25(17):2281–2282, Sep 2009.
- [253] C. Ratledge. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Biochemical Society transactions*, 30:1047–1050, 2002.
- [254] N. D. Rawlings and A. J. Barrett. Families of cysteine peptidases. *Meth. Enzymol.*, 244:461–486, 1994.
- [255] J. A. Ribes, C. L. Vanover-Sams, and D. J. Baker. *Zygomycetes* in human disease. *Clin. Microbiol. Rev.*, 13(2):236–301, Apr 2000.
- [256] P. Rice, I. Longden, and A. Bleasby. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.*, 16(6):276–277, Jun 2000.
- [257] J.W. Rippon. *Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*. Saunders, 1982.
- [258] D. Roberts et al. Modulation of phototropic responsiveness in *Arabidopsis* through ubiquitination of phototropin 1 by the CUL3-Ring E3 ubiquitin ligase CRL3(NPH3). *Plant Cell*, 23(10):3627–3640, Oct 2011.
- [259] R. A. Rodriguez-Frometa, A. Gutierrez, S. Torres-Martinez, and V. Garre. Malic enzyme activity is not the only bottleneck for lipid accumulation in the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Oct 2012.
- [260] R. Rodriguez-Ortiz, M. C. Limon, and J. Avalos. Regulation of carotenogenesis and secondary metabolism by nitrogen in wild-type *Fusarium fujikuroi* and carotenoid-overproducing mutants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(2):405–413, Jan 2009.
- [261] R. Rodriguez-Ortiz, C. Michielse, M. Rep, M. C. Limon, and J. Avalos. Genetic basis of carotenoid overproduction in *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet. Biol.*, 49(9):684–696, Sep 2012.

- [262] M. Rodríguez-Saiz et al. Blakeslea trispora genes for carotene biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(9):5589–5594, Sep 2004.
- [263] M. I. Roncero. Enrichment method for the isolation of auxotrophic mutants of *Mucor* using the polyene antibiotic N-glycosyl-polyfungin. *Carlsberg Res Commun*, 49:685–690, 1984.
- [264] M. I. Roncero, L. P. Jepsen, P. Strøman, and R. van Heeswijck. Characterization of a *leuA* gene and an ARS element from *Mucor circinelloides*. *Gene*, 84(2):335–343, Dec 1989.
- [265] T. V. Rotanova et al. Classification of ATP-dependent proteases Lon and comparison of the active sites of their proteolytic domains. *Eur. J. Biochem.*, 271(23-24):4865–4871, Dec 2004.
- [266] C. Ruger-Herreros et al. Regulation of conidiation by light in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 188(4):809–822, Aug 2011.
- [267] M. J. Ruiz-Hidalgo, E. P. Benito, G. Sandmann, and A. P. Eslava. The phytoene dehydrogenase gene of *Phycomyces*: regulation of its expression by blue light and vitamin A. *Mol. Gen. Genet.*, 253(6):734–744, Feb 1997.
- [268] V. L. Ruiz-Perez, F. J. Murillo, and S. Torres-Martinez. PkpA, a novel *Phycomyces blakesleeanus* serine/threonine protein kinase. *Curr. Genet.*, 28(4):309–316, Sep 1995.
- [269] M. C. Ruiz-Roldan, V. Garre, J. Guarro, M. Marine, and M. I. Roncero. Role of the white collar 1 photoreceptor in carotenogenesis, UV resistance, hydrophobicity, and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell*, 7(7):1227–1230, Jul 2008.
- [270] R. M. Ruiz-Vazquez and S. Torres-Martinez. *Production of carotenoids in Mucorales: structural and regulatory genes. In: Useful organism for health care, foods and enzyme production.* Research Signpost, 2003.
- [271] K. Rutherford et al. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*, 16(10):944–945, Oct 2000.
- [272] L. M. Salgado, E. R. Bejarano, and E. Cerdá-Olmedo. Carotene-superproducing mutants of *Phycomyces blakesleeanus*. *Experimental Mycology*, 13:332–336, 1989.
- [273] M. Salomon, J. M. Christie, E. Knieb, U. Lempert, and W. R. Briggs. Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. *Biochemistry*, 39(31):9401–9410, Aug 2000.

- [274] M. Salomon, U. Lempert, and W. Rudiger. Dimerization of the plant photoreceptor phototropin is probably mediated by the LOV1 domain. *FEBS Lett.*, 572(1-3):8–10, Aug 2004.
- [275] J. Sambrook and D. W. Russell. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, 2001.
- [276] G. Sandmann. Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. *Eur. J. Biochem.*, 223(1):7–24, Jul 1994.
- [277] G. Sandmann et al. Functional identification of al-3 from *Neurospora crassa* as the gene for geranylgeranyl pyrophosphate synthase by complementation with crt genes, in vitro characterization of the gene product and mutant analysis. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.*, 18(2-3):245–251, May 1993.
- [278] C. Sanz, E. P. Benito, M. Orejas, M. I. Alvarez, and A. P. Eslava. Protein-DNA interactions in the promoter region of the *Phycomyces carB* and *carRA* genes correlate with the kinetics of their mRNA accumulation in response to light. *Fungal Genet. Biol.*, 47(9):773–781, Sep 2010.
- [279] C. Sanz et al. *Phycomyces* MADB interacts with MADA to form the primary photoreceptor complex for fungal phototropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106(17):7095–7100, Apr 2009.
- [280] C. Sanz, A. Velayos, M. I. Alvarez, E. P. Benito, and A. P. Eslava. Functional analysis of the *Phycomyces carRA* gene encoding the enzymes phytoene synthase and lycopene cyclase. *PLoS ONE*, 6(8):e23102, 2011.
- [281] T. Schafmeier and A. C. Diernfellner. Light input and processing in the circadian clock of *Neurospora*. *FEBS Lett.*, 585(10):1467–1473, May 2011.
- [282] T. Schafmeier et al. Transcriptional feedback of *Neurospora circadian* clock gene by phosphorylation-dependent inactivation of its transcription factor. *Cell*, 122(2):235–246, Jul 2005.
- [283] M. A. A. Schipper. On *Mucor circinelloides*, *Mucor racemosus* and related species. *Studies of Mycology*, 12(1):1–40, 1976.
- [284] T. J. Schmidhauser, F. R. Lauter, V. E. Russo, and C. Yanofsky. Cloning, sequence, and photoregulation of *al-1*, a carotenoid biosynthetic gene of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.*, 10(10):5064–5070, Oct 1990.

- [285] T. J. Schmidhauser et al. Characterization of *al-2*, the phytoene synthase gene of *Neurospora crassa*. Cloning, sequence analysis, and photoregulation. *J. Biol. Chem.*, 269(16):12060–12066, Apr 1994.
- [286] T. F. Schultz, T. Kiyosue, M. Yanovsky, M. Wada, and S. A. Kay. A role for LKP2 in the circadian clock of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13(12):2659–2670, Dec 2001.
- [287] C. Schwerdtfeger and H. Linden. Blue light adaptation and desensitization of light signal transduction in *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.*, 39(4):1080–1087, Feb 2001.
- [288] C. Schwerdtfeger and H. Linden. VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *EMBO J.*, 22(18):4846–4855, Sep 2003.
- [289] A. Scorpio, T. E. Blank, W. A. Day, and D. J. Chabot. Anthrax vaccines: Pasteur to the present. *Cell. Mol. Life Sci.*, 63(19-20):2237–2248, Oct 2006.
- [290] C. P. Selby and A. Sancar. A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103(47):17696–17700, Nov 2006.
- [291] A. K. Sharma, J. L. Spudich, and W. F. Doolittle. Microbial rhodopsins: functional versatility and genetic mobility. *Trends Microbiol.*, 14(11):463–469, Nov 2006.
- [292] J. M. Shick and W. C. Dunlap. Mycosporine-like amino acids and related Gadusols: biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. *Annu. Rev. Physiol.*, 64:223–262, 2002.
- [293] F. Silva et al. A RING-finger protein regulates carotenogenesis via proteolysis-independent ubiquitylation of a white collar-1-like activator. *Mol. Microbiol.*, 70(4):1026–1036, Nov 2008.
- [294] F. Silva, S. Torres-Martinez, and V. Garre. Distinct *white collar-1* genes control specific light responses in *Mucor circinelloides*. *Mol. Microbiol.*, 61(4):1023–1037, Aug 2006.
- [295] K. M. Smith et al. Transcription factors in light and circadian clock signaling networks revealed by genomewide mapping of direct targets for *Neurospora* white collar complex. *Eukaryotic Cell*, 9(10):1549–1556, Oct 2010.
- [296] R. F. Smith, B. A. Wiese, M. K. Wojzynski, D. B. Davison, and K. C. Worley. BCM Search Launcher—an integrated interface to molecular biology data base search and analysis services available on the World Wide Web. *Genome Res.*, 6(5):454–462, May 1996.

- [297] J. Soding, A. Biegert, and A. N. Lupas. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res.*, 33(Web Server issue):W244–248, Jul 2005.
- [298] Y. Song, J. P. Wynn, Y. Li, D. Grantham, and C. Ratledge. A pre-genetic study of the isoforms of malic enzyme associated with lipid accumulation in *Mucor circinelloides*. *Microbiology*, 147(Pt 6):1507–1515, Jun 2001.
- [299] W. Stahl and H. Sies. Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? *Arch. Biochem. Biophys.*, 336(1):1–9, Dec 1996.
- [300] W. Stahl and H. Sies. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol. Aspects Med.*, 24(6):345–351, Dec 2003.
- [301] M. R. Starich, M. Wikstrom, H. N. Arst, G. M. Clore, and A. M. Gronenborn. The solution structure of a fungal AREA protein-DNA complex: an alternative binding mode for the basic carboxyl tail of GATA factors. *J. Mol. Biol.*, 277(3):605–620, Apr 1998.
- [302] A. Stechmann and T. Cavalier-Smith. Phylogenetic analysis of eukaryotes using heat-shock protein Hsp90. *J. Mol. Evol.*, 57(4):408–419, Oct 2003.
- [303] M. Sumii, Y. Furutani, S. A. Waschuk, L. S. Brown, and H. Kandori. Strongly hydrogen-bonded water molecule present near the retinal chromophore of Leptosphaeria rhodopsin, the bacteriorhodopsin-like proton pump from a eukaryote. *Biochemistry*, 44(46):15159–15166, Nov 2005.
- [304] T. E. Swartz et al. Blue-light-activated histidine kinases: two-component sensors in bacteria. *Science*, 317(5841):1090–1093, Aug 2007.
- [305] V. G. Tagua et al. A gene for carotene cleavage required for pheromone biosynthesis and carotene regulation in the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *Fungal Genet. Biol.*, 49(5):398–404, May 2012.
- [306] F. Takahashi et al. AUREOCHROME, a photoreceptor required for photomorphogenesis in stramenopiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104(49):19625–19630, Dec 2007.
- [307] C. Talora, L. Franchi, H. Linden, P. Ballario, and G. Macino. Role of a white collar-1-white collar-2 complex in blue-light signal transduction. *EMBO J.*, 18(18):4961–4968, Sep 1999.
- [308] T. A. Tatusova and T. L. Madden. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol. Lett.*, 174(2):247–250, May 1999.

- [309] B. L. Taylor and I. B. Zhulin. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63(2):479–506, Jun 1999.
- [310] G. R. Teakle and P. M. Gilmartin. Two forms of type IV zinc-finger motif and their kingdom-specific distribution between the flora, fauna and fungi. *Trends Biochem. Sci.*, 23(3):100–102, Mar 1998.
- [311] K. Terashima, K. Yuki, H. Muraguchi, M. Akiyama, and T. Kamada. The *dst1* gene involved in mushroom photomorphogenesis of *Coprinus cinereus* encodes a putative photoreceptor for blue light. *Genetics*, 171(1):101–108, Sep 2005.
- [312] D. Thomas and Y. Surdin-Kerjan. Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61(4):503–532, Dec 1997.
- [313] I. Topisirovic et al. Control of p53 multimerization by Ubc13 is JNK-regulated. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106(31):12676–12681, Aug 2009.
- [314] S. Torres-Martinez et al. Molecular tools for carotenogenesis analysis in the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Methods Mol. Biol.*, 898:85–107, 2012.
- [315] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76(9):4350–4354, Sep 1979.
- [316] S. J. Triezenberg. Structure and function of transcriptional activation domains. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 5(2):190–196, Apr 1995.
- [317] Y. Y. Tseng, S. M. Hunt, C. Heintzen, S. K. Crosthwaite, and J. M. Schwartz. Comprehensive modelling of the *Neurospora circadian* clock and its temperature compensation. *PLoS Comput. Biol.*, 8(3):e1002437, 2012.
- [318] Y. Uchida, J. Hirayama, and H. Nishina. A common origin: signaling similarities in the regulation of the circadian clock and DNA damage responses. *Biol. Pharm. Bull.*, 33(4):535–544, 2010.
- [319] M. A. van der Horst and K. J. Hellingwerf. Photoreceptor proteins, 'star actors of modern times': a review of the functional dynamics in the structure of representative members of six different photoreceptor families. *Acc. Chem. Res.*, 37(1):13–20, Jan 2004.
- [320] van Heeswijck R. The formation of protoplasts from *Mucor* species. *Carlsberg Research Communications*, 49:433–443, 1984.

- [321] van Heeswijck R. and M. I. Roncero. High frequency transformation of *Mucor* with recombinant plasmid DNA. *Carlsberg Research Communications*, 49:597–609, 1984.
- [322] G. Vatine et al. Light directs zebrafish period2 expression via conserved D and E boxes. *PLoS Biol.*, 7(10):e1000223, Oct 2009.
- [323] A. Velayos, J. L. Blasco, M. I. Alvarez, E. A. Iturriaga, and A. P. Eslava. Blue-light regulation of phytoene dehydrogenase (*carB*) gene expression in *Mucor circinelloides*. *Planta*, 210(6):938–946, May 2000.
- [324] A. Velayos, A. P. Eslava, and E. A. Iturriaga. A bifunctional enzyme with lycopene cyclase and phytoene synthase activities is encoded by the *carRP* gene of *Mucor circinelloides*. *Eur. J. Biochem.*, 267(17):5509–5519, Sep 2000.
- [325] A. Velayos, M. A. Lopez-Matas, M. J. Ruiz-Hidalgo, and A. P. Eslava. Complementation analysis of carotenogenic mutants of *Mucor circinelloides*. *Fungal Genet. Biol.*, 22(1):19–27, Aug 1997.
- [326] S. Veluchamy and J. A. Rollins. A CRY-DASH-type photolyase/cryptochrome from *Sclerotinia sclerotiorum* mediates minor UV-A-specific effects on development. *Fungal Genet. Biol.*, 45(9):1265–1276, Sep 2008.
- [327] G. Vicente et al. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. *Biochemical Engineering Journal*, 48(1):22–27, 2010.
- [328] G. Vicente et al. Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. *Biochemical Engineering Journal*, 48(1):22–27, 2009.
- [329] T. R. Vonderfecht, D. C. Schroyer, B. L. Schenck, V. M. McDonough, and M. J. Pikaart. Substitution of DNA-contacting amino acids with functional variants in the Gata-1 zinc finger: a structurally and phylogenetically guided mutagenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 369(4):1052–1056, May 2008.
- [330] S. A. Waschuk, A. G. Bezerra, L. Shi, and L. S. Brown. *Leptosphaeria* rhodopsin: bacteriorhodopsin-like proton pump from a eukaryote. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102(19):6879–6883, May 2005.
- [331] A. M. Waterhouse, J. B. Procter, D. M. Martin, M. Clamp, and G. J. Barton. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9):1189–1191, May 2009.
- [332] B. D. Weger et al. The light responsive transcriptome of the zebrafish: function and regulation. *PLoS ONE*, 6(2):e17080, 2011.

- [333] R. L. Welchman, C. Gordon, and R. J. Mayer. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6(8):599–609, Aug 2005.
- [334] D. L. Wheeler et al. Database resources of the National Center for Biotechnology. *Nucleic Acids Res.*, 31(1):28–33, Jan 2003.
- [335] C. W. Whippo and R. P. Hangarter. Phototropism: bending towards enlightenment. *Plant Cell*, 18(5):1110–1119, May 2006.
- [336] M. M. White et al. Phylogeny of the *Zygomycota* based on nuclear ribosomal sequence data. *Mycologia*, 98(6):872–884, 2006.
- [337] R. A. Wilson, R. P. Gibson, C. F. Quispe, J. A. Littlechild, and N. J. Talbot. An NADPH-dependent genetic switch regulates plant infection by the rice blast fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107(50):21902–21907, Dec 2010.
- [338] A. M. Wolff, K. F. Appel, J. B. Petersen, U. Poulsen, and J. Arnau. Identification and analysis of genes involved in the control of dimorphism in *Mucor circinelloides* (syn. *racemosus*). *FEMS Yeast Res.*, 2(2):203–213, May 2002.
- [339] K. Yagita et al. Dimerization and nuclear entry of mPER proteins in mammalian cells. *Genes Dev.*, 14(11):1353–1363, Jun 2000.
- [340] E. M. Zdobnov and R. Apweiler. InterProScan—an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics*, 17(9):847–848, Sep 2001.
- [341] Y. Zhang, I. P. Adams, and C. Ratledge. Malic enzyme: the controlling activity for lipid production? Overexpression of malic enzyme in *Mucor circinelloides* leads to a 2.5-fold increase in lipid accumulation. *Microbiology*, 153(7):2013–2025, Jul 2007.
- [342] B. D. Zoltowski and B. R. Crane. Light activation of the LOV protein Vivid generates a rapidly exchanging dimer. *Biochemistry*, 47(27):7012–7019, Jul 2008.
- [343] B. D. Zoltowski and K. H. Gardner. Tripping the light fantastic: blue-light photoreceptors as examples of environmentally modulated protein-protein interactions. *Biochemistry*, 50(1):4–16, Jan 2011.
- [344] B. D. Zoltowski et al. Conformational switching in the fungal light sensor Vivid. *Science*, 316(5827):1054–1057, May 2007.
- [345] B. D. Zoltowski, B. Vaccaro, and B. R. Crane. Mechanism-based tuning of a LOV domain photoreceptor. *Nat. Chem. Biol.*, 5(11):827–834, Nov 2009.