

UCH-FC
Doc-Microb
C 796
C. 1

Estudio de los genes *CYC8* y *TUP1* de *Xanthophyllomyces dendrorhous* y su participación en represión catabólica y regulación de la carotenogénesis

Tesis

entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Microbiología

Facultad de Ciencias

por

Pamela Cecilia Córdova Vargas

Marzo, 2016

Director de Tesis: Dr. Víctor Cifuentes



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

PAMELA CECILIA CORDOVA VARGAS

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 20 de enero de 2015.

Director de Tesis:

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán

Co-Directora de Tesis

Dra. Jennifer Alcaíno Gorman

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Marcelo Baeza

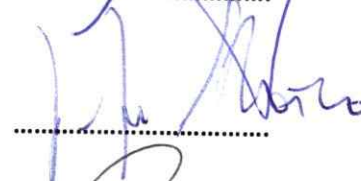
Dr. Ricardo Cabrera

Dr. Claudio Martínez

Dr. Claudio Vásquez



.....



.....



.....



.....



.....



.....



A mi familia.

BIOGRAFÍA



Nací el 31 de marzo de 1988 en la ciudad de Santiago. En el año 1994, comencé mi educación en el colegio "*The Angel's School*" donde terminé la educación media en noviembre de 2005. En 2006 comencé la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular de la Universidad de Chile. El año 2010 obtuve la Licenciatura en Ingeniería en Biotecnología Molecular y en el año 2012 recibí mi título profesional luego de desarrollar mi seminario de título en el laboratorio de Genética bajo la tutela del Dr. Víctor Cifuentes. En 2011 ingresé al programa de Doctorado en Ciencias con mención en Microbiología que imparte la Universidad de Chile. Durante cinco años desarrollé mi Tesis en el mismo laboratorio y actualmente estoy presentando mi trabajo para optar al grado de Doctora en Ciencias con mención en Microbiología.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que me acompañaron y apoyaron durante la realización de mi Tesis de Doctorado:

Agradezco al Dr. Victor Cifuentes, Director de esta Tesis, por recibirme en su laboratorio y brindarme su apoyo y confianza en mis capacidades, además de compartir generosamente su conocimiento y experiencia.

A la Dra. Jennifer Alcaíno, co-Directora de esta Tesis, por su constante ayuda y apoyo.

Al Dr. Marcelo Baeza por compartir su conocimiento y por sus críticas constructivas.

A la comisión evaluadora de esta Tesis conformada por el Dr. Claudio Martínez, Dr. Marcelo Baeza, Dr. Claudio Vásquez y Dr. Ricardo Cabrera por su buena disposición y colaboración durante todo el proceso de desarrollo de esta investigación.

A todos mis compañeros de laboratorio con los que compartí durante la realización de mi Tesis, que supieron entregar sus conocimientos de manera oportuna y apropiada.

A mi familia, por el cariño incondicional.

A TODOS mis amigos.

Al equipo de fútbol femenino JGM y su entrenador.

A los que no pudieron acompañarme hasta el final, pero dejaron grandes enseñanzas de vida.

GRACIAS.

Financiado por FONDECYT 1140504 y Beca de Doctorado CONICYT 21110252.

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE TABLAS.....	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> : aspectos generales.	1
1.2 Biosíntesis de carotenoides en <i>X. dendrorhous</i>	3
1.3 Regulación de la carotenogénesis en <i>X. dendrorhous</i> : represión por glucosa	5
1.4 Represión catabólica y sus principales componentes.	6
1.5 Complejo co-represor Cyc8- Tup1.....	9
1.6 Hipótesis y objetivos.....	13
1.6.1 Hipótesis de trabajo	13
1.6.2 Objetivos.	13
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
2.1 Cepas, mantención y condiciones de cultivo.	14
2.2 Determinación del crecimiento celular y biomasa.....	17
2.3 Determinación de glucosa en el medio extracelular.	17
2.4 Actividad invertasa extracelular.	18
2.5 Técnicas de biología molecular: plásmidos, ácidos nucleicos y enzimas.	18
2.6 Extracción de ácidos nucleicos.....	24
2.6.1 Extracción de DNA genómico de <i>X. dendrorhous</i>	24
2.6.2 Extracción de RNA total, obtención de cDNA y análisis por RT-qPCR.	24
2.6.3 Extracción de DNA plasmidico de <i>E. coli</i>	25
2.6.4 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.	25
2.7 Transformación mediante electroporación.	25
2.7.1 Transformación de <i>E. coli</i>	25
2.7.2 Transformación de <i>X. dendrorhous</i>	26
2.7.3 Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	27
2.8 Secuenciación y análisis bioinformático.....	28
2.9 Extracción de carotenoides totales de <i>X. dendrorhous</i> y análisis mediante RP-HPLC.	29
3. RESULTADOS.....	31
3.1- Aislamiento y caracterización de los genes <i>CYC8</i> y <i>TUP1</i> de <i>X. dendrorhous</i>	31
3.1.1- Parte I: crecimiento diáuxico en <i>X. dendrorhous</i>	31
3.1.2.- Parte II: caracterización genética y funcional de los genes <i>CYC8</i> y <i>TUP1</i>	33
3.1.2.1.- Caracterización genética de los genes <i>CYC8</i> y <i>TUP1</i>	33
3.1.2.2.- Caracterización funcional de los genes <i>CYC8</i> y <i>TUP1</i> de <i>X. dendrorhous</i> : complementación heteróloga en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
3.1.2.3.- Caracterización funcional de los genes <i>CYC8</i> y <i>TUP1</i> en <i>X. dendrorhous</i>	44
3.2 Determinación del efecto de la glucosa sobre la expresión de genes involucrados en carotenogénesis en las cepas mutantes <i>cyc8</i> y <i>tup1</i> derivadas de la cepa silvestre UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i>	53
3.3 Efecto de la glucosa sobre la producción de carotenoides en las cepas mutantes <i>cyc8</i> y <i>tup1</i> derivadas de la cepa silvestre UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i>	58

3.4 Identificación de genes regulados por glucosa y genes de reguladores que interactúan con el complejo Cyc8-Tup1 y comparación de su expresión por análisis bioinformático comparativo de transcriptomas de las cepas silvestre UCD 67-385 y las mutantes <i>cyc8</i> y <i>tup1</i> de <i>X. dendrorhous</i> cultivadas en distintas fuentes de carbono. ...	61
3.4.1 Parte I: identificación de posibles genes regulados por glucosa.	61
3.4.2 Parte II: identificación de posibles genes de reguladores que interactúan con el complejo Cyc8-Tup1.	71
3.5 Evaluación del fenómeno de represión por glucosa en cepas desreguladas sobreproductoras de carotenoides obtenidas por mutagénesis al azar.	81
4. DISCUSIÓN.	85
4.1 Caracterización genética de los genes <i>CYC8</i> y <i>TUP1</i> de <i>X. dendrorhous</i>	85
4.2 Caracterización funcional de los genes <i>CYC8</i> y <i>TUP1</i> de <i>X. dendrorhous</i>	86
4.3 Regulación de la carotenogénesis: participación del complejo Cyc8-Tup1.	89
4.4 Identificación de posibles funciones del complejo Cyc8-Tup1 en <i>X. dendrorhous</i> por análisis bioinformático de transcriptomas de la cepa silvestre y las mutantes <i>cyc8</i> y <i>tup1</i>	93
5. CONCLUSIONES.	102
6. REFERENCIAS.	103
ANEXO	112

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas y de levadura utilizadas en este trabajo.....	15
Tabla 2. Plásmidos utilizados y generados en este trabajo.....	20
Tabla 3. Partidores diseñados y utilizados en este trabajo para PCR convencional.....	21
Tabla 4. Partidores utilizados para PCR cuantitativo en tiempo real.....	23
Tabla 5. Composición porcentual de carotenoides en las cepas silvestre (385) y mutantes <i>tup1</i> y <i>cyc8</i> de <i>X. dendrorhous</i> cultivadas en medio YM-glucosa.....	50
Tabla 6. Composición porcentual de carotenoides en las cepas silvestre (385) y mutantes <i>tup1</i> y <i>cyc8</i> de <i>X. dendrorhous</i> cultivadas en medio MMv-glucosa 2%.....	52
Tabla 7. Genes de <i>X. dendrorhous</i> potencialmente regulados por glucosa, homólogos a los descritos en otras levaduras.....	62

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de la ruta de biosíntesis de carotenoides en <i>X. dendrorhous</i>	4
Figura 2. Mecanismo de represión catabólica en levaduras.	8
Figura 3. Modelos propuestos para el mecanismo de acción del complejo Cyc8-Tup1. ...	11
Figura 4. Crecimiento diáuxico de <i>X. dendrorhous</i> cultivada en MMv suplementado con glucosa y/o glicerol.	32
Figura 5. Análisis de la secuencia del gen <i>CYC8</i> de <i>X. dendrorhous</i>	34
Figura 6. Análisis de la secuencia del gen <i>TUP1</i> de <i>X. dendrorhous</i>	36
Figura 7. Evaluación de la funcionalidad de los genes <i>CYC8</i> y <i>TUP1</i> de <i>X. dendrorhous</i> en <i>S. cerevisiae</i> : evaluación del crecimiento de las cepas mutantes (<i>cyc8</i> o <i>tup1</i>) de <i>S. cerevisiae</i> complementadas con los genes <i>CYC8</i> o <i>TUP1</i> de <i>X. dendrorhous</i>	38
Figura 8. Evaluación de la funcionalidad de los genes <i>CYC8</i> y <i>TUP1</i> de <i>X. dendrorhous</i> en <i>S. cerevisiae</i> : determinación del efecto de 2-desoxi-D-glucosa sobre el crecimiento en medio mínimo SD con sacarosa como única fuente de carbono.....	40
Figura 9. Evaluación de la funcionalidad de los genes <i>CYC8</i> y <i>TUP1</i> de <i>X. dendrorhous</i> en <i>S. cerevisiae</i> : determinación de la actividad invertasa en fase exponencial temprana y estacionaria de crecimiento.	42
Figura 10. Análisis genómico por PCR de los mutantes homocigoto y heterocigoto del gen <i>TUP1</i>	45
Figura 11. Determinación de la actividad invertasa en las cepas silvestre y mutantes <i>cyc8</i> y <i>tup1</i> de <i>X. dendrorhous</i> en presencia y ausencia de glucosa.....	47
Figura 12. Crecimiento y producción de carotenoides de las cepas <i>cyc8</i> , <i>tup1</i> y silvestre de <i>X. dendrorhous</i>	48
Figura 13. Crecimiento y producción de pigmentos de las cepas <i>cyc8</i> , <i>tup1</i> y silvestre de <i>X. dendrorhous</i> cultivada en MMv-Glucosa 2%.	52
Figura 14. Crecimiento y concentración de glucosa residual en la fracción tratada (glucosa) y control	54
Figura 15. Efecto de la glucosa sobre la expresión a nivel de mRNA de genes involucrados en carotenogénesis en las cepas silvestre y mutantes <i>cyc8</i> y <i>tup1</i> de <i>X. dendrorhous</i>	56
Figura 16. Efecto de la adición de glucosa en la producción de carotenoides en las cepas mutantes <i>cyc8</i> y <i>tup1</i> de <i>X. dendrorhous</i>	59
Figura 17. Distribución de la participación en diferentes procesos biológicos de los posibles genes identificados que se encuentran mayormente representados en el transcriptoma en glucosa de la cepa <i>cyc8</i> en comparación a la cepa silvestre (385).	67
Figura 18. Distribución de la participación en diferentes procesos biológicos de los posibles genes identificados que se encuentran mayormente representados en el transcriptoma en glucosa de la cepa <i>tup1</i> en comparación a la cepa silvestre (385).....	68
Figura 19. Distribución de la participación en diferentes procesos biológicos de los genes comunes que se encuentran mayormente representados en el transcriptoma en glucosa en ambas cepas mutantes en comparación a la cepa silvestre (385).	70
Figura 20. Identificación y análisis bioinformático del regulador Yap6 de <i>X. dendrorhous</i>	73
Figura 21. Identificación y análisis bioinformático del regulador Skn7 de <i>X. dendrorhous</i>	74

Figura 22. Identificación y análisis bioinformático del regulador Rox1 de <i>X. dendrorhous</i>.	76
Figura 23. Identificación y análisis bioinformático del regulador Crt1 de <i>X. dendrorhous</i>.	77
Figura 24. Identificación y análisis bioinformático del regulador Rgt1 de <i>X. dendrorhous</i>.	79
Figura 25. Identificación y análisis bioinformático del regulador Opi1 de <i>X. dendrorhous</i>.	80
Figura 26. Inhibición de la carotenogénesis en presencia de glucosa	82
Figura 27. Pigmento específico post- tratamiento de las cepas mutantes sobreproductoras y sus parentales	83
Figura 28. Funciones del complejo co-represor Cyc8-Tup1 en <i>X. dendrorhous</i>.	101

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
cDNA	DNA complementario
DNS	Ácido dinitrosalicílico
dNTP	Desoxirribonucleotido trifosfato
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
Hyg	Higromicina B
IGS	Espaciador intergénico
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
min	Minutos
NTG	N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina
ORF	Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
qPCR	PCR cuantitativo
rDNA	DNA ribosomal
RP-HPLC	Cromatografía líquida en fase reversa
RT	Transcripción reversa
SD	Medio de cultivo Dextrosa Sintética
STM	Sacarosa- Tris-MgCl
TAE	Tris-acetato-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
TPR	Repetido tetratricopéptido
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U	Unidades enzimáticas
µg	microgramos
UV	ultravioleta
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido
YM	Medio de cultivo de levadura-malta
Zeo	Zeocina

RESUMEN

Xanthophyllomyces dendrorhous es una levadura productora de astaxantina, carotenoide de interés comercial debido a su uso en la industria acuícola y farmacéutica. Actualmente, se conoce la ruta de biosíntesis de astaxantina y el perfil de expresión de sus genes. Si bien aún se desconocen los mecanismos regulatorios de dicho proceso, diversos estudios han demostrado que la presencia de glucosa reprime la carotenogénesis en *X. dendrorhous*. Adicionalmente, en nuestro laboratorio se ha caracterizado genética y funcionalmente el regulador Mig1, comprobándose que éste reconoce secuencias en las regiones promotoras de algunos genes carotenogénicos. En otras levaduras, el regulador Mig1 requiere del complejo co-represor Cyc8-Tup1 para ejercer la represión sobre los genes blanco, siendo este mecanismo altamente conservado en eucariontes y conocido como represión catabólica. El objetivo general de este trabajo fue estudiar el mecanismo de regulación de la carotenogénesis por represión catabólica en *X. dendrorhous*, enfocándose en la función del complejo co-represor Cyc8-Tup1.

En primera instancia, se caracterizaron los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous* y se determinó la secuencia de sus ORFs. Mediante análisis bioinformático se determinó que codifican los componentes del complejo Cyc8-Tup1 descrito previamente en otros organismos como *S. cerevisiae*. Para estudiar la funcionalidad de los genes *CYC8* y *TUP1* se obtuvieron cepas mutantes de dichos genes derivadas de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* y se evaluó su efecto en el crecimiento, represión mediada por glucosa de la actividad invertasa extracelular, producción de carotenoides y en la expresión a nivel de los transcritos de distintos genes involucrados en carotenogénesis (*HMGR*, *idi*, *FPS*, *crtE*, *crtYB*, *crtI*, *crtS* y *crtR*). Como resultado, se observó que ambas cepas mutantes tienen una tasa máxima de crecimiento menor que la cepa silvestre y la producción de carotenoides es un 90% (en mutante *cyc8*) y 40% (en mutante *tup1*) mayor en comparación a la cepa silvestre al cultivarlas con glucosa como única fuente de carbono. En concordancia, se observó que el efecto represor de la glucosa sobre la síntesis de carotenoides prácticamente se pierde en las mutantes *cyc8* y *tup1*.

Además, el efecto de la glucosa sobre los niveles de transcrito de los distintos genes estudiados es diferente en las mutantes en comparación a la cepa silvestre, destacándose genes involucrados en la síntesis de precursores de los carotenoides como *HMGR*, *idi* y *FPS*.

Paralelamente, se realizaron ensayos de complementación heteróloga mediante la expresión de los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous* en cepas de *S. cerevisiae* mutantes de los genes respectivos. Se observó que los genes de *X. dendrorhous* complementan parcialmente dichas mutaciones, utilizando como criterio la tasa de crecimiento y la represión mediada por glucosa de la actividad invertasa extracelular.

Por otra parte, se realizó un análisis bioinformático de los transcriptomas de las cepas silvestre UCD 67-385, *cyc8* y *tup1* de *X. dendrorhous*, obtenidos a partir de cultivos en que se utilizó glucosa, maltosa o succinato como única fuente de carbono. De esta manera se distinguieron 166 y 93 ORFs mayormente representados (basado en su valor de RPKM) en los transcriptomas de cultivos con glucosa de las cepas *cyc8* y *tup1*, respectivamente, en comparación a la cepa silvestre. Los genes identificados estarían involucrados principalmente en procesos de transporte transmembrana, metabolismo de carbohidratos, regulación de la transcripción y metabolismo de lípidos. En concordancia, mediante análisis bioinformático se logró identificar posibles genes que codificarían los reguladores Rox1, Skn7, Yap6, Crt1, Opi1 y Rgt1 que similar a Mig1, reclutarían el complejo Cyc8-Tup1 a los promotores de los distintos grupos de genes blanco.

Finalmente, de acuerdo a los resultados obtenidos, en este trabajo se concluyó que los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous* identificados, son funcionales y estarían involucrados en la regulación de diferentes procesos biológicos. Mediante su participación en el mecanismo de represión catabólica, los genes *CYC8* y *TUP1* contribuyen en la regulación de la carotenogénesis en *X. dendrorhous*.

ABSTRACT

Xanthophyllomyces dendrorhous is an astaxanthin producer yeast, a carotenoid of commercial interest because of its use in aquaculture and pharmaceutical industry. Currently, the carotenogenic pathway and the expression profile of the genes involved are known. Even though the regulatory mechanisms of this process are still unknown, several studies have shown that glucose represses carotenogenesis in *X. dendrorhous*. Also, in our laboratory the regulator Mig1 was genetic and functionally characterized, proving that it recognize specific sequences in the promoter region of some carotenogenic genes. In other yeasts, Mig1 requires the corepressor complex Cyc8-Tup1 to repress the target genes, this mechanism is highly conserved in eukaryotes and is known as catabolite repression. The general aim of this work was to study the carotenogenesis regulatory mechanism by catabolite repression in *X. dendrorhous*, focusing on the role of the corepressor complex Cyc8-Tup1.

First, the *X. dendrorhous* *CYC8* and *TUP1* genes were characterized and their ORFs sequences were identified. By bioinformatic analysis, it was determined that these genes encode the components of Cyc8-Tup1 complex previously described in other organisms like *S. cerevisiae*. To evaluate the *CYC8* and *TUP1* genes functionality, mutant strains deriving from the wild-type strain UCD 67-385 of *X. dendrorhous* of the corresponding genes were constructed. The effect of these mutations on growth, extracellular invertase activity repression, carotenoid production and the expression of different genes involved in carotenogenesis (*HMGR*, *idi*, *FPS*, *crtE*, *crtYB*, *crtI*, *crtS* y *crtR*) at their transcripts level, was evaluated. Both mutant strains had a slower growth rate than the wild-type and carotenoid production was 90% (in the *cyc8* mutant) and 40% (in the *tup1* mutant) higher compared to wild-type when culture with glucose as sole carbon source. Accordingly, it was observed that the repressive effect of glucose on carotenoid synthesis was practically lost in the *cyc8* and *tup1* mutants. Furthermore, the effect of glucose on the transcript levels of the studied genes was different in the mutants strains compared to wild-type, particularly in those genes involved in the synthesis of carotenoids precursors such as *HMGR*, *idi* and *FPS*.

In parallel, heterologous complementation assays were performed by expressing the *X. dendrorhous* *CYC8* and *TUP1* genes in *S. cerevisiae* mutants strains of the corresponding genes. It was observed that both *X. dendrorhous* genes partially complement the corresponding mutations, using as a criterion the growth rate and the extracellular invertase activity glucose mediated repression.

Moreover, the transcriptomes of the wild-type (UCD 67-385), *tup1* and *cyc8* *X. dendrorhous* strains, obtained from cultures using glucose, maltose or succinate as the sole carbon source, were analyzed. By this way (based on RPKM value), 166 and 93 ORFs were mainly represented in the *cyc8* and *tup1* strains transcriptomes, respectively, compared to the wild-type when cultured with glucose. The identified genes are principally involved in transmembrane transport, carbohydrate metabolism, regulation of transcription and lipid metabolism. Accordingly, by bioinformatic analysis it was possible to identify potential genes encoding the Rox1, Skn7, Yap6, Crt1, Opi1 and Rgt1 regulators, which like Mig1, would recruit the Cyc8-Tup1 complex to the promoter region of the different groups of target genes.

Finally, in this work we were able to conclude that the identified *CYC8* and *TUP1* *X. dendrorhous* genes are functional and involved in the regulation of different biological processes. These genes participate in the catabolite repression mechanism and in this way, they contribute to the *X. dendrorhous* carotenogenesis regulation.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Xanthophyllomyces dendrorhous*: aspectos generales.

X. dendrorhous es una levadura carotenogénica basidiomicete aislada originalmente en la década del 60 de exudados de árboles en regiones frías de Japón y Alaska (Phaff y col., 1972; Libkind y col., 2007). Más recientemente fue encontrada en la Patagonia argentina en cuerpos fructíferos de *Cyttaria hariatii* asociados a árboles del género *Nothofagus* (Libkind y col., 2007; Libkind y col., 2008). También se ha encontrado asociada a hojas de eucaliptus en el sur de Chile (Weber y col., 2008) y en muestras de suelo de la región antártica Chilena (Contreras y col., 2015). *X. dendrorhous* ha sido estudiada durante décadas, principalmente por su capacidad de producir carotenoides (Frengova y Beshkova, 2009; Schmidt y col., 2011). A lo anterior se suma un reciente interés por el potencial de esta levadura como una "fábrica celular" para la producción de otros isoprenoides dado el elevado flujo metabólico hacia su ruta nativa de producción de terpenos (Melillo y col., 2013; Hara y col., 2014).

Los carotenoides son compuestos orgánicos derivados del isopreno (terpenos) que están formados por cadenas de dobles enlaces conjugados y en ocasiones contienen uno o dos anillos terminales. Estos compuestos son producidos naturalmente por plantas, algas, algunas bacterias y hongos, cumpliendo diversas funciones tales como pigmentos fotosintéticos accesorios, antioxidantes (protección contra fotooxidación y radicales libres), precursores de otros metabolitos esenciales como la vitamina A o participar en la atracción visual de animales polinizadores (Frengova y Beshkova, 2009).

Debido a las condiciones del hábitat natural de *X. dendrorhous* (exudados de árboles) rico en especies reactivas de oxígeno (ROS) y sustancias antifúngicas, se postula que los carotenoides cumplirían un rol protector en la levadura compensando la baja actividad o ausencia de algunas enzimas antioxidantes (Schroeder y Johnson, 1993). El principal carotenoide producido por *X. dendrorhous* es la astaxantina, que pertenece al grupo de las xantófilas (carotenoides oxigenados), cuyos grupos funcionales 3-hidroxilo y 4-ceto en los

anillos β -ionona terminales le confieren atributos particulares como una mayor polaridad y actividad antioxidante que la de otros carotenoides como el β -caroteno, luteína, zeaxantina y cantaxantina (Schroeder y Johnson, 1993; Schroeder y Johnson, 1995; Schmidt y col., 2011). Debido a la elevada actividad antioxidante de la astaxantina, se le atribuyen variadas propiedades beneficiosas para el ser humano y entre ellas destacan sus propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, inmunoestimulantes, fotoprotectoras, neuroprotectoras y anticancerígenas (Frengova y Beshkova, 2009; Schmidt y col., 2011). Por otra parte, este pigmento se utiliza en acuicultura como suplemento alimenticio que otorga el color rojo-anaranjado característico a la carne de peces salmónidos y además, constituye un nutriente necesario para el crecimiento y reproducción de las especies en cautiverio (Higuera-Ciapara y col., 2006).

En la actualidad, la mayoría de la oferta comercial de astaxantina corresponde a astaxantina sintética (Schmidt y col., 2011); sin embargo, su uso prevalente en las industrias alimenticia, acuícola y farmacéutica, junto a la creciente demanda por productos naturales, el alto costo de los pigmentos sintéticos y la pobre absorción de éstos en la carne de peces salmónidos (Osterlie y col., 1999; Bjerkeng, 2000), ha estimulado la búsqueda de fuentes naturales del pigmento como sistemas alternativos de producción y *X. dendrorhous* representa un buen candidato ya que exhibe una serie de ventajas. Entre ellas, *X. dendrorhous* produce astaxantina no modificada como carotenoide principal, no requiere luz para su crecimiento y pigmentación, puede utilizar variadas fuentes de carbono bajo condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas y presenta un crecimiento relativamente rápido (Frengova y Beshkova, 2009). Sin embargo, la producción específica de astaxantina en cepas silvestres de la levadura es muy baja para ser una fuente comercialmente competitiva (Schmidt y col., 2011). Por esto, diversos trabajos han intentado mejorar su producción, entre los que destacan: la optimización de las condiciones de cultivo (Yamane y col., 1997; Hu y col., 2006), suplementación de distintos aditivos o químicos estimulantes al medio de cultivo (Gu y col., 1997; Wang y col., 2006; Kim y col., 2007), métodos clásicos de mutagénesis química y física (Ukibe y col., 2008;

Rodríguez-Sáiz y col., 2010) e ingeniería metabólica (Verdoes y col., 2003). A pesar que aun no se han obtenido resultados satisfactorios, dichos estudios han contribuido al conocimiento de la biología de la levadura y del proceso de biosíntesis de carotenoides y es así como actualmente se conoce la mayor parte de la ruta de carotenogénesis incluyendo las enzimas involucradas y los genes que las codifican (Loto y col., 2012).

1.2 Biosíntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*.

Al igual que en otros eucariontes no fotosintéticos, la síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous* deriva de la ruta del mevalonato la que a partir de acetil-CoA, genera isopentenil pirofosfato (IPP, C₅) que es el precursor general de todos los isoprenoides (Sandmann, 2001; Schmidt y col., 2011) (Figura 1). En la síntesis de carotenoides (Figura 1), el IPP es isomerizado a dimetilalil pirofosfato (DMAPP) por acción de la enzima IPP isomerasa codificada por el gen *idi* (Kajiwara y col., 1997). En los pasos siguientes se genera geranilgeranil pirofosfato (GGPP, C₂₀) a partir de IPP y DMAPP por la acción de enzimas prenil transferasas como farnesil pirofosfato (FPP, C₁₅) sintasa y geranilgeranil pirofosfato (GGPP) sintasa codificadas por los genes *FPS* y *crtE*, respectivamente (Alcaño y col., 2014). Posteriormente, por acción de la enzima fitoeno-β-caroteno sintasa (PBS; codificada por el gen *crtYB*) se condensan dos moléculas de GGPP dando origen a fitoeno (C₄₀), el primer carotenoide de la vía (Verdoes y col., 1999a). Luego, el fitoeno sufre cuatro desaturaciones catalizadas por la enzima fitoeno desaturasa (PDS; producto del gen *crtI*) formando licopeno (Verdoes y col., 1999b; Schmidt y col., 2011). Este último es convertido en β-caroteno por la actividad licopeno ciclasa de la enzima PBS. Finalmente, el β-caroteno es oxidado mediante la incorporación de un grupo hidroxilo en las posiciones 3 y un grupo ceto en las posiciones 4 de ambos anillos β-ionona del β-caroteno generando astaxantina como producto final. Este último paso es llevado a cabo por la enzima astaxantina sintasa (CrtS; codificada por el gen *crtS*), una citocromo P450 monooxigenasa (Ojima y col., 2006) que requiere la acción de una enzima citocromo p450 reductasa, codificada por el gen *crtR*, la cual provee los electrones necesarios a la enzima astaxantina sintasa para la oxigenación del sustrato (Alcaño y col., 2008).

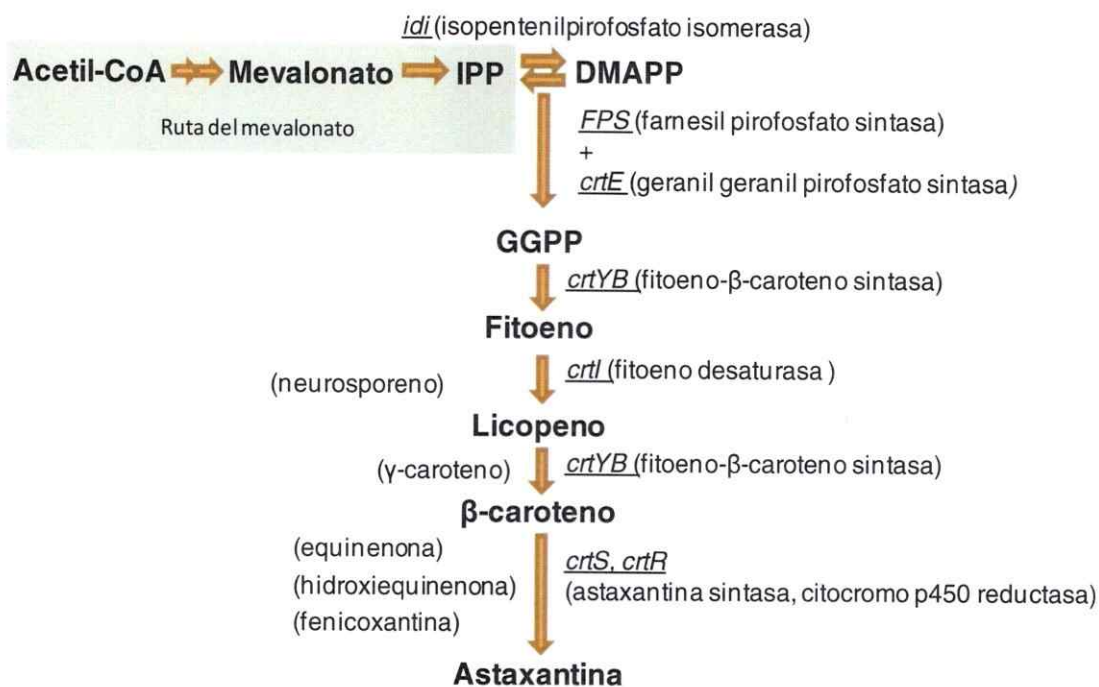


Figura 1. Diagrama de la ruta de biosíntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*. La ruta de síntesis de astaxantina desde IPP es controlada por siete genes (subrayados) que codifican las enzimas que catalizan cada paso (indicadas en paréntesis a la derecha de la ruta). A la izquierda se muestran en paréntesis algunos de los intermediarios que se generan entre un metabolito y el siguiente. Los principales pigmentos producidos son xantófilas, de las cuales la astaxantina representa un 83-87 % del total de carotenoides, seguida por fenicoxantina (5-7 %), equinenona (3-4 %) y β-caroteno (2-2,5 %). Adaptado de Wozniak y col., 2011. Abreviaturas: IPP: isopentenil pirofosfato, DMAPP: dimetilalil pirofosfato, FPS: farnesil pirofosfato, GGPP: geranilgeranil pirofosfato.

1.3 Regulación de la carotenogénesis en *X. dendrorhous*: represión por glucosa

A pesar que tanto las enzimas que participan en la síntesis de carotenoides como los genes que las codifican en *X. dendrorhous* se han descrito y caracterizado, el conocimiento respecto a la regulación de esta vía es más bien escaso. Diversos estudios han mostrado que existe una relación entre la fuente de carbono utilizada por la levadura y la síntesis de carotenoides. Respecto a lo anterior, se ha demostrado que la producción de carotenoides es menor al cultivar la levadura en presencia de fuentes de carbono fermentables como glucosa o fructosa y aumenta al utilizar fuentes de carbono no fermentables como succinato y etanol (Wozniak y col., 2011; Marcoleta, 2011a). Se ha observado que al cultivar la levadura con glucosa como única fuente de carbono, la síntesis de carotenoides sólo se inicia cuando el azúcar se ha agotado en el medio de cultivo. Mientras que en cultivos utilizando succinato como única fuente de carbono, se observó que la producción de carotenoides coincide con el crecimiento de la levadura, aumentando sostenidamente hasta llegar a fase estacionaria. Esto demuestra que la producción de carotenoides comienza antes y es mayor cuando se utiliza una fuente de carbono no fermentable (Wozniak y col., 2011).

Por otra parte, estudios de los transcritos de los genes carotenogénicos (*crtI*, *crtYB* y *crtS*), muestran que sus niveles alcanzan su máximo valor en la fase exponencial tardía de crecimiento, lo que coincide con la inducción de la carotenogénesis, con el agotamiento de la glucosa del medio y con el comienzo del consumo del etanol producido por la fermentación del azúcar (Lodato y col., 2007; Wozniak y col., 2011). También se ha observado que la adición de glucosa al medio de cultivo disminuye los niveles de los transcritos de los genes *crtYB*, *crtI* y *crtS*, lo que se correlaciona con una inhibición completa de la síntesis de pigmentos (Marcoleta, 2011a). De acuerdo a estos antecedentes, es claro que la glucosa causa represión de la carotenogénesis en *X. dendrorhous*.

La glucosa es la fuente de carbono preferida por la mayoría de los microorganismos incluyendo las levaduras; generalmente, cuando este azúcar está presente en el medio de cultivo se reprime la expresión de genes involucrados en el metabolismo de fuentes de carbono

alternativas a la glucosa y en el metabolismo secundario (Gancedo y col., 1998). Este fenómeno se conoce como "represión catabólica" o "represión por glucosa" (Schüller, 2003) y podría ser responsable de la represión de los genes carotenogénicos en *X. dendrorhous* durante el metabolismo fermentativo. Cabe destacar que no existen precedentes que muestren que la fuente de carbono regule la carotenogénesis en otros organismos, por lo que resulta muy interesante estudiar este aspecto en *X. dendrorhous*.

1.4 Represión catabólica y sus principales componentes.

En los microorganismos de vida libre, la disponibilidad de nutrientes se encuentra en constante cambio y es el principal factor de regulación de su crecimiento y desarrollo. Para las levaduras, como para muchos otros microorganismos, la glucosa es la fuente de carbono y energía preferida. Por ello, no es extraño que la glucosa además de su función como nutriente, cumpla un rol regulatorio muy importante en el metabolismo de los microorganismos. Es así que una alta concentración de glucosa en el medio indica condiciones óptimas de crecimiento a la maquinaria celular y causa la inducción de variadas vías de transducción de señales y la activación o inactivación de diversas proteínas. El papel regulador de la glucosa es más prominente a nivel de la transcripción y el mecanismo más general de represión catabólica involucra una disminución paralela de los niveles de transcritos de los genes blanco y consecuentemente, de las proteínas que codifican (Gancedo y col., 1998; Rolland y col., 2002). Generalmente, los genes que están bajo la regulación por represión por glucosa codifican enzimas que están involucradas en gluconeogénesis, ciclo de Krebs, ciclo del glioxilato, respiración, desarrollo mitocondrial, utilización de fuentes de carbono alternativas a la glucosa y de transportadores de glucosa de alta afinidad (Meijer y col., 1998; Rolland y col., 2002). Por otra parte, genes que codifican una variedad de activadores transcripcionales, también son reprimidos por glucosa. Finalmente, destaca un gran grupo de genes de proteínas involucradas principalmente en la respuesta a varios tipos de estrés, que se caracterizan por tener elementos *STRE* (*stress response element*) en sus promotores y que también son reprimidos en presencia de glucosa (Rolland y col., 2002).

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la principal vía de represión es a nivel transcripcional y tiene como componente fundamental el regulador Mig1, una proteína de unión a DNA que reconoce y se une a secuencias específicas denominadas cajas Mig1 en los promotores de los genes blanco. Una vez que Mig1 se une a la región reguladora de ellos, recluta a un complejo co-represor compuesto por las proteínas Cyc8 y Tup1. Se ha demostrado que este complejo es el que finalmente lleva a cabo la represión (Trumbly, 1992; Smith y Johnson, 2000; Schüller, 2003) (Figura 2).

La función de Mig1 está determinada principalmente por su localización subcelular. En presencia de altos niveles de glucosa (señal de represión), el factor Mig1 migra al núcleo y se une a los promotores de los genes blanco. Mientras que en ausencia de ella, se activa el complejo quinasa Snf1 que fosforila a Mig1 perdiendo su capacidad de interactuar con el componente Cyc8 del complejo co-represor (Wong y Struhl, 2011; Roy y col., 2014) y posteriormente, mediante su interacción con la exportina nuclear Msn5, es trasladado hacia el citoplasma (Trumbly, 1992; Rolland y col., 2002; Schüller, 2003). Por otra parte, en presencia de glucosa, la proteína fosfatasa 1 (Glc7) antagonista de Snf1, desfosforila a Mig1 permitiendo su transporte hacia el núcleo desde el citoplasma (Schüller, 2003).

Genes homólogos a *MIG1* se han identificado en las levaduras *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* y en el hongo ascomicete *Aspergillus nidulans* (Gancedo y col., 1998). Recientemente, se identificó un gen homólogo a *MIG1* en el genoma de *X. dendrorhous*. Adicionalmente, por análisis bioinformático, se identificaron posibles cajas Mig1 en las regiones promotoras de los genes carotenogénicos *crtE*, *crtI*, *crtYB* y *crtS*, justamente aquellos en que también se observó un efecto represor de la glucosa a nivel transcripcional (Marcoleta y col., 2011b).

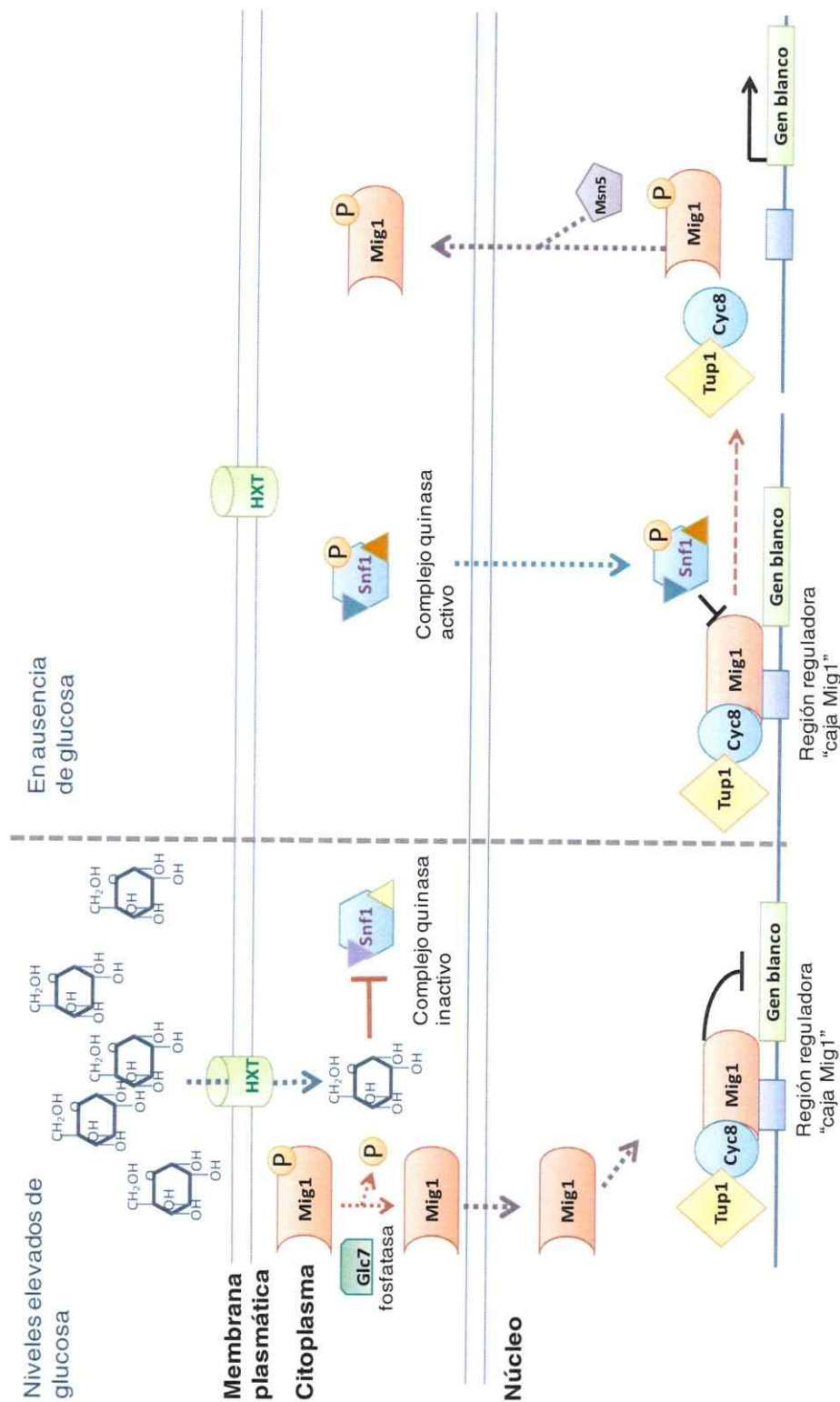


Figura 2. Mecanismo de represión catabólica en levaduras. Esquema del mecanismo general del fenómeno de represión catabólica en levaduras y sus principales componentes. En presencia de niveles elevados de glucosa, el regulador Mig1 es desfosforilado y migra al núcleo donde reconoce las secuencias denominadas cajas Mig1 en la región reguladora de los genes blanco. Mig1 recluta al complejo Cyc8-Tup1 que reprime la expresión de dichos genes. En ausencia de glucosa, en el núcleo Mig1 es fosforilado por el complejo quinasa Snf1 perdiendo la interacción con el complejo co-represor y es exportado al citoplasma (Adaptado de Schüller, 2003).

En concordancia, experimentos de retraso en la movilidad electroforética (EMSA) revelaron que la proteína Mig1 de *X. dendrorhous* se une de manera específica a regiones en los promotores de los genes carotenogénicos que contienen las potenciales cajas Mig1. También se evidenció que una cepa mutante *mig1*⁻ de *X. dendrorhous* muestra una mayor producción de carotenoides que la cepa silvestre y pérdida de la represión por glucosa de la expresión de los genes carotenogénicos (Bravo, 2015). Además, en nuestro laboratorio se identificó un gen homólogo a *CYC8* en *X. dendrorhous* y se observó que mutantes *cyc8*⁻ producen más carotenoides que cepas silvestres, principalmente en etapas tempranas de crecimiento cuando la concentración de glucosa en el medio de cultivo es alta (Córdova, 2012). Estos antecedentes sugieren que tanto el factor Mig1 como el represor Cyc8 tendrían un rol en la regulación de la carotenogénesis en *X. dendrorhous* mediante el mecanismo de represión catabólica.

1.5 Complejo co-represor Cyc8- Tup1.

Las proteínas Cyc8 y Tup1 pertenecen a familias de proteínas conservadas evolutivamente y se sugiere que tanto levaduras como lombrices, moscas y mamíferos, poseen represores que se asemejan a Cyc8 y Tup1, no sólo en secuencia sino también en función (Smith y Johnson, 2000). En la levadura *S. cerevisiae* el complejo Cyc8-Tup1 reprime más de 180 genes regulados por diferentes vías y por ende, es considerado un co-represor global de la transcripción. Este complejo no es capaz de unirse directamente al DNA, pero es dirigido a los diferentes promotores por represores de unión a secuencias específicas de DNA. Por ejemplo, los genes reprimidos por glucosa, inducidos por daños en el DNA o regulados por oxígeno, son reconocidos por las proteínas de unión a DNA Mig1, Crt1 y Rox1, respectivamente (Smith y Johnson, 2000; Zhang y Reese, 2005). En *S. cerevisiae*, la eliminación de los genes *CYC8* y/o *TUP1* no es letal para las células, pero tiene efectos pleiotrópicos originando diversos fenotipos como crecimiento lento, floculación, baja esporulación y pérdida de ciertos aspectos de la represión por glucosa (Gancedo y col., 1998; Smith y Johnson, 2000).

Cyc8 y Tup1 se asocian en un complejo de alto peso molecular compuesto por una unidad de Cyc8 y cuatro de Tup1. La proteína Tup1 en su región amino terminal posee un dominio

conservado denominado TupN que es necesario para la tetramerización de las proteínas Tup1 y también para la interacción del tetrámero con la proteína Cyc8. Por otra parte, en su región carboxilo terminal contiene siete copias de un motivo WD40, las que son necesarias para la función represora de la proteína (Zhang y col., 2002). Sobre la proteína Cyc8, se sabe que en su extremo amino terminal contiene 10 copias de un motivo de 34 aminoácidos, el repetido tetratricopéptido (TPR), que son requeridas para la interacción con Tup1 y los distintos reguladores de unión a DNA (Schüller, 2003; Palaiomylitou y col., 2008).

Una cantidad considerable de trabajos han propuesto diversos mecanismos de represión no excluyentes entre sí (Figura 3). El primero de ellos corresponde a un modelo de represión mediada por Cyc8-Tup1 que posiciona y estabiliza a los nucleosomas en el promotor de distintos genes blanco; incluso se ha demostrado que Tup1 interactúa directamente con las histonas H3 y H4 en su estado desacetilado (Zhang y Reese, 2005; Chen y col., 2013). Un segundo modelo de represión complementario al anterior, implica el reclutamiento de enzimas modificadoras de histonas. El complejo Cyc8-Tup1 interactúa con las histonas desacetilasas: Rpd3, Hos1, Hos2 y Hda1 que promueven la hipoacetilación de histonas en promotores de genes blanco favoreciendo un mayor grado de compactación de la cromatina lo que inhibe a la transcripción (Davie y col., 2002; Wong y Struhl, 2011). Además de los mecanismos de represión asociados a remodelación de la cromatina, el complejo Cyc8-Tup1 también puede funcionar bloqueando activadores e interfiriendo directamente con la maquinaria de transcripción. Se ha determinado la existencia de interacciones entre Tup1 y varias subunidades de complejo mediador de la holoenzima de la RNA polimerasa II y se ha observado que mutaciones en componentes del complejo causan la desrepresión de genes regulados por Cyc8-Tup1 (Parnell y Stillman, 2011).

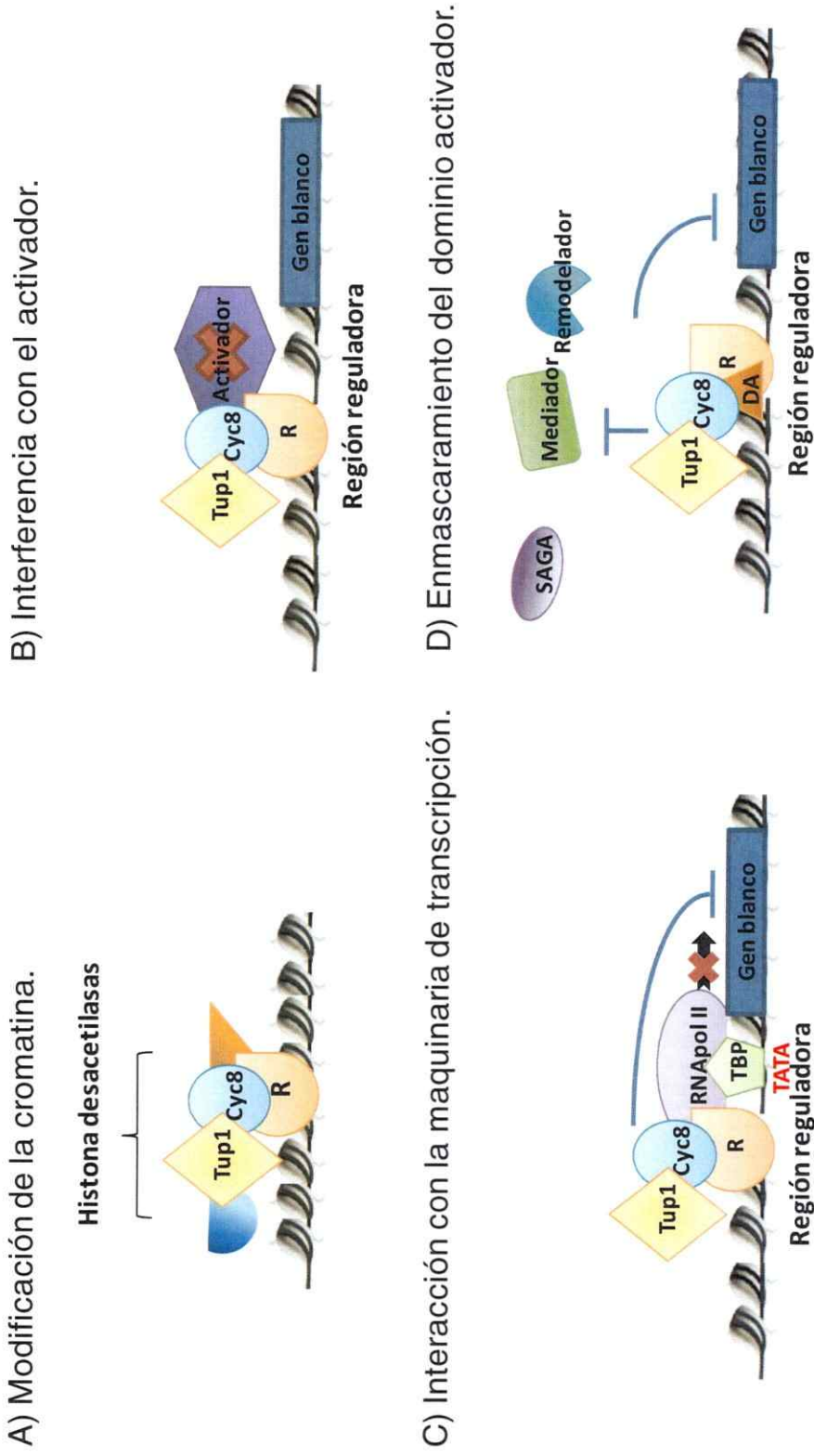


Figura 3. Modelos propuestos para el mecanismo de acción del complejo Cyc8-Tup1. A) Modificación local de la estructura de la cromatina mediante interacción con histonas, desacetilasas u otros remodeladores de cromatina. B) Interferencia con el activador. C) Interacción con la maquinaria general de transcripción; TBP: Proteína de unión a caja TATA. D) Enmascaramiento del dominio activador del regulador de unión a DNA, inhibiendo el reclutamiento de co-activadores. SAGA: complejo acetilador de histonas.

Por otra parte, un modelo más reciente propone que Cyc8-Tup1 regularía la transcripción principalmente mediante el enmascaramiento de los dominios de activación de las distintas proteínas de unión a DNA que reclutan el complejo a los promotores de los genes blanco. En este caso, el regulador de unión a DNA sería un represor-activador y su función como activador estaría siendo contrarrestada al interactuar con el complejo Cyc8-Tup1, impidiendo el reclutamiento de co-activadores como los complejos remodeladores de cromatina SAGA o SWI/SNF entre otros (Wong y Struhl, 2011; Parnell y Stillman 2011).

Sobre la base del conjunto de antecedentes expuestos y considerando que el mecanismo de represión catabólica se encuentra ampliamente conservado en eucariontes y es uno de los circuitos regulatorios más importantes en levaduras, resulta apropiado pensar que este mecanismo también puede regular el proceso de carotenogénesis. Es importante destacar que el efecto represor que tiene la glucosa sobre la carotenogénesis en *X. dendrorhous* es un fenómeno sin precedentes, ya que no se ha descrito otro caso en que la fuente de carbono disponible tenga un papel regulatorio en la biosíntesis de carotenoides. Es por esto que resulta interesante estudiar el posible mecanismo y los distintos componentes que median este efecto represor en *X. dendrorhous*. Así, en este trabajo se propuso determinar el rol de algunos factores involucrados en represión por glucosa en la regulación de la carotenogénesis.

1.6 Hipótesis y objetivos

1.6.1 Hipótesis de trabajo

La biosíntesis de carotenoides en *X. dendrorhous* estaría regulada por la fuente de carbono, siendo reprimida en presencia de glucosa mediante el mecanismo de represión catabólica donde la participación del complejo co-represor Cyc8-Tup1 sería esencial para la represión de la expresión de los genes carotenogénicos a nivel de su transcripción.

1.6.2 Objetivos.

Objetivo general

Estudiar el mecanismo de regulación de la carotenogénesis por represión catabólica en cepas silvestres y mutantes desreguladas (sobreproductoras de carotenoides) de *X. dendrorhous* enfocándose en el rol del complejo co-represor Cyc8-Tup1 en dicho mecanismo.

Objetivos específicos

- I. Aislar y caracterizar los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous*.
- II. Determinar el efecto de la glucosa sobre la expresión de genes involucrados en carotenogénesis en las cepas mutantes *cyc8⁻* y *tup1⁻* (derivadas de la cepa silvestre UCD 67-385) de *X. dendrorhous*.
- III. Estudiar el efecto de la glucosa sobre la producción de carotenoides en las cepas mutantes *cyc8⁻* y *tup1⁻* (derivadas de la cepa silvestre UCD 67-385) de *X. dendrorhous*.
- IV. Identificar genes regulados por glucosa y genes de reguladores que interactúan con el complejo Cyc8-Tup1 y comparar su expresión mediante análisis bioinformático comparativo en transcriptomas de las cepas silvestre UCD 67-385 y las mutantes *cyc8⁻* y *tup1⁻* de *X. dendrorhous* cultivadas en distintas fuentes de carbono.
- V. Evaluar si el fenómeno de represión por glucosa se encuentra afectado en cepas desreguladas sobreproductoras de carotenoides obtenidas por mutagénesis al azar.



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepas, mantención y condiciones de cultivo.

Las cepas bacterianas y de levadura utilizadas y construidas en este trabajo se describen en la Tabla 1. Los cultivos en medio semi-sólido se realizaron con agar al 1,5 %. Las cepas de *E. coli* se cultivaron a 37 °C en medio completo LB (extracto de levadura 10 g/l, triptona 5 g/l, NaCl 5 g/l) (Sambrook y Russell, 2001). En el caso de cepas portadoras de plásmidos con resistencia a antibiótico, el medio se suplementó con ampicilina (100 µg/ml). Las cepas de *X. dendrorhous* se cultivaron a 22 °C en medio completo YM (extracto de levadura 3 g/l, extracto de malta 3 g/l y peptona 5 g/l) suplementado en algunos casos con glucosa 10 g/l o en medio mínimo Vogel (MM_v) suplementado con glucosa al 1 % o 2 %, maltosa 2 % o glicerol 1 % (Wozniak y col., 2011). Las cepas de levadura resistentes a antibiótico se cultivaron en medio YM suplementado con higromicina B y/o zeocina a una concentración final de 15 µg/ml y 20 µg/ml, respectivamente. Las distintas cepas de *S. cerevisiae* se cultivaron a 22 o 30 °C en medio rico YEP (extracto de levadura 10 g/l, bacto peptona 20 g/l, glucosa 20 g/l) o medio mínimo SD [Yeast Nitrogen Base (Difco) 6,7 g/l y glucosa 20 g/l] suplementado con uracilo (0,02 g/l), histidina (0,02 g/l), metionina (0,02 g/l) o leucina (0,1 g/l) según correspondía.

Las cepas de *E. coli* se conservaron en glicerol estéril al 50 % en tubos Eppendorf a -80 °C y las de levadura de acuerdo a lo descrito previamente (Baeza y col., 2009). Brevemente, la cepa a conservar se cultivó en medio YM semi-sólido a 22 °C y luego se tomó las células frescas con un asa y se mezclaron con 500 µl de medio YM. Se agregó 500 µl de gelatina estéril tibia (20 %), se homogeneizó y se depositaron gotas sobre parafina sólida contenida en la tapa de una placa de Petri. Luego que la gelatina gelificó, se agregó sílica gel con indicador de humedad en la base de la placa y se invirtió la tapa de ésta dejando la parafina con las gotas de gelatina en la parte superior. La placa se selló con PARAFILM y se dejó a temperatura ambiente hasta que las gotas de gelatina se deshidrataron completamente las que luego se depositaron en tubos de ensayo que contenían algodón sobre sílica gel que se sellaron con PARAFILM.

Tabla 1. Cepas bacterianas y de levadura utilizadas en este trabajo.

Cepa	Características	Fuente/Referencia
<i>E. coli</i>		
DH5 α	Amp ^S	Sambrook y Russell, 2001
<i>X. dendrorhous</i>		
UCD 67-385	Cepa silvestre, diploide (Hyg ^S y Zeo ^S).	Miller, 1976; ATCC 24230
385.T2ZeoR3 <i>cyc8</i>	o Mutante homocigoto (<i>cyc8/cyc8</i>). Hyg ^H , Zeo ^H , que deriva de UCD 67-385. Un alelo del gen <i>CYC8</i> interrumpido por un módulo que confiere resistencia a higromicina B y el otro por un módulo que confiere resistencia a zeocina.	Córdova, 2012
Tup1ZH o <i>tup1</i>	Mutante homocigoto (<i>tup1/tup1</i>). Hyg ^H , Zeo ^H , que deriva de UCD 67-385. Un alelo del gen <i>TUP1</i> interrumpido por un módulo que confiere resistencia a higromicina B y el otro por un módulo que confiere resistencia a zeocina.	Este trabajo
atxS1	Cepa mutante obtenida por mutagénesis al azar con NTG que deriva de la cepa silvestre UCD 67-385. Hyg ^S , Zeo ^S .	Cifuentes y col., 1997
atxS2	Cepa mutante obtenida por mutagénesis al azar con NTG que deriva de la cepa silvestre UCD 67-385. Hyg ^S , Zeo ^S .	Lodato y col., 2004; Lodato y col., 2007
AVHN2	Cepa nativa silvestre (Hyg ^S y Zeo ^S).	Laboratorio de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
AVHN2.4.8	Cepa mutante sobreproductora de astaxantina obtenida en el laboratorio por mutagénesis al azar que deriva de la cepa chilena silvestre AVHN2. Hyg ^S , Zeo ^S .	Laboratorio de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
RV4	Cepa nativa silvestre (Hyg ^S y Zeo ^S).	Laboratorio de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
RV4_M1	Cepa mutante sobreproductora de astaxantina obtenida en el laboratorio por mutagénesis al azar que deriva de la cepa chilena silvestre RV4. Hyg ^S , Zeo ^S .	Laboratorio de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Tabla 1 (continuación)

S. cerevisiae

S288c	Cepa haploide silvestre	ATCC 204508
YBR112C BY4741 (o <i>Scyc8</i>)	Cepa haploide mutante <i>cyc8</i> ⁻ , derivada de la cepa S288c. Genotipo <i>MATa his3delta1 leu2delta0 met15delta0 ura3delta0 deltaCYC8</i> .	Winzeler, 1999 ATCC 4007161
<i>Scyc8</i>-YEpNP-CYC8	Cepa <i>Scyc8</i> ⁻ que expresa el gen <i>CYC8</i> de <i>X. dendrorhous</i> , ya que porta el vector YEpNP-CYC8.	Este trabajo
YCR084C BY4741 (o <i>Sctup1</i>)	Cepa haploide mutante <i>tup1</i> ⁻ , derivada de la cepa S288c. Genotipo <i>MATa his3delta1 leu2delta0 met15delta0 ura3delta0 deltaTUP1</i>	Winzeler, 1999 ATCC 4007198
<i>Sctup1</i>-YEpNP-TUP1	Cepa <i>Sctup1</i> ⁻ que expresa el gen <i>TUP1</i> de <i>X. dendrorhous</i> , ya que porta el vector YEpNP-TUP1.	Este trabajo

Amp^S: sensible a ampicilina; Hyg^S: sensible a higromicina B; Hyg^R: resistente a higromicina B; Zeo^S: sensible a zeocina; Zeo^R: resistente a zeocina. ATCC: *American Type Culture Collection*.

2.2 Determinación del crecimiento celular y biomasa.

El crecimiento celular se determinó midiendo la densidad óptica del cultivo a 600 nm (DO_{600}) con un espectrofotómetro de doble haz Jazco V-630 y las curvas de crecimiento se realizaron por triplicado. En el caso de *X. dendrorhous*, se inocularon matraces con el medio de cultivo correspondiente a partir de un cultivo en fase exponencial tardía o fase estacionaria (DO_{600} : 8-10), dejando una DO_{600} inicial de ~0,1. Luego se incubó con agitación constante a 22 °C y se registró la densidad óptica cada 6-12 h durante al menos 5 días. En el caso de *S. cerevisiae*, también se utilizó una DO_{600} inicial de ~0,1 y luego se incubó a 22 o 30 °C registrando la DO_{600} cada 3-12 h durante al menos 3 días.

Los parámetros de crecimiento como la tasa de crecimiento máxima (μ) y el tiempo generacional (t_g), fueron estimados en base al modelo de crecimiento microbiano de Gompertz (Zwietering y col., 1990), utilizando un mínimo de cinco datos a lo largo de la curva en cada caso.

Adicionalmente, el crecimiento se analizó en cultivos en medios semi-sólido YM (22 °C, *X. dendrorhous*) o SD suplementado con aminoácidos (22 o 30 °C, *S. cerevisiae*) tomando un registro fotográfico cada 1 o 2 días de cultivo.

Para la determinación de pigmento específico, se cuantificó la biomasa mediante la medición del peso seco correspondiente a una alícuota de 1 ml de cultivo en una balanza analítica (Shimadzu). Se tomaron tres medidas independientes para luego obtener un promedio.

2.3 Determinación de glucosa en el medio extracelular.

Para la determinación de glucosa en el medio extracelular, se utilizó el método DNS descrito previamente (Miller, 1959; Fajardo y Sarmiento, 2007). Este último es un método colorimétrico que se basa en la capacidad de la glucosa de reducir el ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS) lo que bajo ciertas condiciones, produce una coloración que se hace más intensa a mayor concentración de azúcar. Para esto, se mezcló la muestra problema con el reactivo DNS (DNS 1 %, NaOH 1,6 % y tartrato de Na y K 15 %) en una relación 1:1 y se calentó a 100 °C por 10 min. Posteriormente, la reacción se detuvo en hielo y se midió la absorbancia a 540 nm.

Para determinar la concentración de glucosa, se construyó una curva estándar (concentración de glucosa vs absorbancia 540 nm) a partir de soluciones acuosas con concentraciones conocidas del azúcar.

2.4 Actividad invertasa extracelular.

La medición de la actividad invertasa extracelular presente en el medio de cultivo se realizó según lo descrito por Goldstein y Lampen (1975). La actividad invertasa consiste en la hidrólisis de sacarosa en fructosa y glucosa. De esta manera, en el ensayo se determinó la glucosa liberada utilizando sacarosa como sustrato.

En el caso de *X. dendrorhous*, se tomó alícuotas de sobrenadante de los cultivos analizados y se mezcló con *buffer* acetato de Na 50 mM-sacarosa 2 % pH 5,4, en una relación 1:1. Como control se mezcló una porción de cada muestra con *buffer* acetato de Na 50 mM pH 5,4 sin sacarosa. Luego se incubó ambas mezclas por 30 min a 45 °C y la reacción se detuvo incubando a -20 °C.

Para *S. cerevisiae*, se tomaron alícuotas directas del cultivo que fueron mezcladas en relación 1:1 con *buffer* acetato de Na 50 mM-sacarosa 2 % pH 5,4 o *buffer* acetato de Na 50 mM pH 5,4 (como control) y posteriormente incubadas durante 30 min a 30 °C. En ambos casos se determinó la glucosa liberada durante la reacción cuantificando azúcares reductores con el método DNS (Miller, 1959; Fajardo y Sarmiento, 2007) descrito anteriormente.

En cada ocasión se tomó tres muestras de cultivo y se realizó tres mediciones independientes a partir de las cuales se obtuvo un promedio. Finalmente, la actividad se normalizó respecto al peso seco de la muestra y se expresó en g glucosa / g levadura.

2.5 Técnicas de biología molecular: plásmidos, ácidos nucleicos y enzimas.

Los plásmidos utilizados y construidos en este trabajo se describen en la Tabla 2. Los oligonucleótidos (partidores) diseñados en esta Tesis se sintetizaron por *Integrated DNA technologies* (IDT) y se describen en las Tablas 3 (para PCR convencional) y 4 (para PCR cuantitativo en tiempo real, qPCR).

El DNA del bacteriófago lambda digerido con la endonucleasa de restricción *HindIII* (Fermentas) se utilizó como marcador de peso molecular y como indicador de concentración de muestras de DNA analizadas por electroforesis en geles de agarosa. En ocasiones, también se utilizó el marcador de peso molecular comercial GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (Fermentas).

Las reacciones de PCR convencional, digestiones con enzimas de restricción, reacciones de ligado y transformación de *E. coli* y *S. cerevisiae*, se realizaron de acuerdo a los protocolos estándar descritos en el manual de clonamiento molecular (Sambrook y Russell, 2001). Las enzimas *Pfu* DNA polimerasa (Agilent), *Taq* DNA polimerasa (GenLab), RNasa A (US Biological), T4 DNA ligasa (Fermentas) y las endonucleasas de restricción fueron utilizadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La integridad y concentración de DNA cromosómico, plasmídico, RNA o fragmentos de PCR se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa 0,7-1 % (dependiendo del tamaño de banda esperado) en *buffer* TAE 1X (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0) con bromuro de etidio 0,5 µg/ml. Las muestras analizadas se mezclaron con *buffer* de carga BCP 1X (rojo cresol (Sigma) 10 mM; glicerol 30 %) y el DNA se visualizó en un transiluminador (Arquimed) que irradia el gel con luz UV.

Tabla 2. Plásmidos utilizados y generados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Fuente /Referencia
PBluescript II SK(+) XR	Vector clonamiento. MCS incluido en el gen <i>lacZ</i> . Amp ^R , ColE1 ori	Stratagene
pMN-Hyg	pBluescript II SK(+) XR con el módulo que confiere resistencia a higromicina B (gen <i>hph</i> de <i>E. coli</i> bajo el promotor del factor de elongación 1 α y el terminador de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de <i>X. dendrorhous</i>) clonado en el sitio <i>EcoRV</i> .	Niklitschek, 2007
pZeo	pBluescript II SK(+) XR con el módulo de resistencia a zeocina (gen <i>ble</i> de <i>Streptoalloteichus hindustanus</i> bajo el promotor del factor de elongación 1 α y el terminador de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de <i>X. dendrorhous</i>) clonado en el sitio <i>EcoRV</i> .	Loto, 2012
PgTUP1C	pBluescript II SK(+) XR con un fragmento de 2,7 kb de la región genómica del gen <i>TUP1</i> de <i>X. dendrorhous</i> clonado en el sitio <i>EcoRV</i> .	Este trabajo
pgTUP1C-Hyg	pgTUP1C con el módulo de resistencia a higromicina B inserto en reemplazo del fragmento <i>EcoRV</i> de 2003 pb de la región clonada del gen <i>TUP1</i> .	Este trabajo
YEpAct4	Vector de expresión para <i>S. cerevisiae</i> . Utilizado para expresión de genes bajo el promotor del gen de actina (Act4). No incluye terminador de la transcripción. Tiene el gen <i>LEU2</i> como marcador de auxotrofia.	Sanchez-Torres y col., 1998. Facilitado por el Dr. Claudio Martinez, Universidad de Santiago de Chile.
YEp-NP	Vector de expresión para <i>S. cerevisiae</i> . Derivado de YEpAct4. Posee un sitio de corte de la enzima <i>XbaI</i> entre el promotor constitutivo Act4 y el terminador TDH3t. Tiene el gen <i>LEU2</i> como marcador de auxotrofia.	Este trabajo
YEp-NP-CYC8	Vector de expresión. Derivado de YEp-NP. Posee el ORF del gen <i>CYC8</i> de <i>X. dendrorhous</i> en el sitio <i>XbaI</i> entre el promotor Act4 y el terminador TDH3t.	Este trabajo
YEp-NP-TUP1	Vector de expresión. Derivado de YEp-NP. Posee el ORF del gen <i>TUP1</i> de <i>X. dendrorhous</i> en el sitio <i>XbaI</i> entre el promotor Act4 y el terminador TDH3t.	Este trabajo

MCS: sitio de múltiple clonamiento; Amp^R: resistencia a ampicilina; ColE1 ori: Origen de replicación del plasmidio ColE1 de *E.coli*. *Gen *ble* fue obtenido desde el plásmido comercial pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen).

Tabla 3. Partidores diseñados y utilizados en este trabajo para PCR convencional.

Partidor	Blanco de hibridación	Secuencia (5' a 3')	Dirección	
GTRORF_ATGfw	Gen <i>CYC8</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	ATGGCGATTGGAAACAGTGTAG	D	
GTRORF_TGARv		TCAGGCTTTGACATCTTCCATTTC	R	
GTR_RT1Fwd		GTGCCACCTCCGCCTCAAG	D	
GTR_RT2Fwd		GGTACGGGATTGGTATTCTG	D	
GTR_RT3Fwd		CACGGTGGAGAAGATCTCC	D	
GTR_RT4Fwd		GACATTGACACACCTACCCTG	D	
GTR_RT5Fwd		CGACTTCCGGTGGAAACAG	D	
GTR_RT6Fwd		CTTCCATCTCTTTCTTCGCC	D	
GTR_RT7Fwd		CTTCCCTTATTACTTCTTGCC	D	
GTR_RT1Rev		CGCGGTCGGGTGAACGTC	R	
GTR_RT2Rev		GAAAGCCTCCTCTGCATGC	R	
GTR_RT3Rev		GGAACGGAGATCTGGCGCC	R	
GTR_RT5Rev		CGACAGCGTCCGAATTAGAC	R	
GTR_RT6Rev		GAGGCCGAAGCATTAGCAG	R	
GTR_RT7Rev		GACACAACATATACACAGCCG	R	
Tup1C1fw		Gen <i>TUP1</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	ATGCTCGACGCCGTCAAAG	D
Tup1C1Rv			CTAATCCCTAACGGAATCATAC	R
Tup1C2fw	GATGCAGATCCAAAATAGCTCC		D	
Tup1 C3fw	GGCACAAGAACTCCCCTCC		D	
Tup1 C4fw	CGAACGATTTGTTTCTCCCC		D	
Tup1 C5fw	GATACGTAGCAGCGGGTTCG		D	
Tup1 C6fw	CCGTTGGAGTTTCAAATGAC		D	
Tup1C2Rv	GCACACTTCTGTCCTTTGAAC		R	
Tup1C3Rv	CGAGCTGAACACCCGTCG		R	
Tup1C4Rv	GTTTGAGAACTTGACGCAGC		R	
Tup1C5Rv	AGTGAGTGGAGGAAGGCTG		R	
Tup1C6Rv	GTCGCAGGTGAGAGATTTG		R	
Tup1g1Rv	CCATAGTTGGAAGATGATTAC		R	
Tup1g2Rv	CCCAATCGCACTCACTTGAC		R	
Tup1g3fw	CACGCATCCAGGCTCGGCG		D	
Tup1g3Rv	CCCCGACCCTTGACCTCG		R	
M13Fw	pBluescriptII SK(+) <i>XR</i>		GTAAAACGACGGCCAG	D
M13Rev		GGAAACAGCTATGACCATG	R	
HF	Gen <i>hph</i> (<i>E. coli</i>)	ATGAAAAAGCCTGAACTCACC	D	
HR		CTATTCCTTTGCCCTCGGAC	R	
ZF	Gen <i>ble</i> (<i>S. hindustanus</i>)	ATGGCCAAGTTGACCAGTGC	D	
ZR		TCAGTCCTGCTCCTCGGCC	R	
zeoc-sense-Fw		ACGACGTGACCCTGTTTCATCA	D	
zeoc-antisense-Rv		TGATGAACAGGGTCACGTCGT	R	

Tabla 4. Partidores utilizados para PCR cuantitativo en tiempo real.

Partidor	Gen (<i>X. dendrohaus</i>)	Secuencia (5' a 3')	Dirección
mactF-RT	<i>ACT</i>	CCGCCCTCGTGATTGATAAC	D
mactR-RT		TCACCAACGTAGGAGTCCTT	R
midif-RT	<i>idi</i>	TCCGAACCGAAGGACTCAGTTT	D
midir-RT		GGACATCAAGTGCCAGGTCT	R
mfpsf2-RT	<i>FPS</i>	TGGTACAAAGTTGAGGGAGTGCT	D
mfpsr2-RT		AGCGGTCAACAGATCGATGAG	R
mcrtEF-RT	<i>crtE</i>	TGTTGGCATGCTACATACCG	D
mcrtER-RT		GTTGGGCGAAGCTTGAAGAT	R
mmcrtYBF2-RT	<i>crtYB</i>	TCGCATATTACCAGATCCATCTGA	D
mmcrtYBR2-RT		GGATATGTCCATGCGCCATT	R
mmcrtIF-RT	<i>crtI</i>	CATCGTGGGATGTGGTATCG	D
mmcrtIR-RT		GGCCCCTGATCGAATCGATAA	R
mcrtSF-RT	<i>crtS</i>	ATGGCTCTTGCAGGGTTTGA	D
mcrtSR-RT		TGCTCCATAAGCTCGATCCCAA	R
mcrtRF-RT	<i>crtR</i>	CTGGGAAACAAGACCTACGA	D
mcrtRR-RT		GGAACCTCGGTTACGACAAA	R
HMGR_Real_2_F	<i>HMGR</i>	GGCCGATCGCTATACATCCGTTT	D
HMGR_Real_2_R		ATCCAGTTGATGGCAGAAGGCT	R
grg2real FW1	<i>grg2</i>	CATCAAGACCTCTGTCACCAAC	D
grg2real RV1		TTGGCGTCAGACGAGGACT	R
Inv real FW1	<i>INV</i>	AGACCATCTGGCCTTCTCAA	D
Inv real RV1		AGGACCGAAACTAGTGGATGTG	R
pdcreal FW1	<i>PDC</i>	TCAACACTGAGCTGCCCACT	D
pdcreal RV1		ATTCCGAATCGGGAAGCACA	R
PDA1_F	<i>PDA1</i>	GGATTCTGCCACTTGACGAT	D
PDA1_R		TCGGCAATAACTCCCTTCAC	R

D: Directo; R: Reverso.

2.6 Extracción de ácidos nucleicos.

2.6.1 Extracción de DNA genómico de *X. dendrorhous*.

Para la extracción de DNA genómico de levadura se tomó con un aza de siembra una "cantidad considerable" de células frescas a partir de un cultivo en placa y se depositaron en un tubo de 2 ml (tapa rosca) que contenía 600 μ l de *buffer* TE (Tris 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8,0) y entre 100 y 250 μ l de perlas de vidrio de 0,5 mm (BioSpec). Luego se agregaron 600 μ l de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó en moedor de células Mini-Beadbeater-16 (BioSpec) por 2 min. Después se centrifugó por 10 min a 18.000 x *g*. La fase acuosa (superior) se transfirió a un tubo Eppendorf limpio de 1,5 ml, se agregó un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se homogeneizó en vórtex y se centrifugó por 1 min como antes. La fase superior, se traspasó a un tubo Eppendorf limpio de 1,5 ml y se agregó 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se homogeneizó y se dejó a -20 °C por al menos 2 h para precipitar el DNA. Luego se centrifugó a 18.000 x *g* por 10 min, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar a 37 °C por 5 min. Finalmente, el DNA se suspendió en 100 a 200 μ l de *buffer* TE-RNasa (Tris 10 mM; EDTA 1 mM, RNasa A 40 μ g/ml, pH 8,0) y se almacenó a -20 °C.

2.6.2 Extracción de RNA total, obtención de cDNA y análisis por RT-qPCR.

La extracción de RNA total se realizó a partir de un *pellet* celular (obtenido a partir de 2 a 10 ml de cultivo) previamente traspasado a tubos de tapa rosca (Axygen) y congelado a -80 °C. En primer lugar, el *pellet* se suspendió en 200 μ l de *buffer* de lisis (acetato de Na 0,02 M, EDTA 1 mM y SDS 0,5 % a pH 5,5) y se le agregó 100 μ l de perlas de vidrio 0,5 mm (BioSpec). La mezcla se agitó en moedor de células Mini-Beadbeater-16 (BioSpec) durante 1 min. Posteriormente se agregaron 800 μ l de reactivo TRIZOL (Ambion) y nuevamente se agitó por 1 min en moedor de células. El lisado celular se incubó durante 10 min en hielo, se agregó 200 μ l de cloroformo y se agitó suavemente durante 1 min, incubando posteriormente a temperatura ambiente durante 5 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugó la muestra a 12.000 x *g*

durante 10 min a 4 °C. Se traspasó la fase acuosa a un tubo limpio y se precipitó el RNA con un volumen de isopropanol y 0,5 volúmenes de *buffer* de precipitación (NaCl 1,2 M y Citrato de Na 0,8 M) -20 °C por 1 h. Una vez precipitado el RNA, se lavó con etanol 75 % y se suspendió en 30 µl de agua libre de RNAsas. Se determinó la concentración y pureza del RNA midiendo la absorbancia a 230, 260 y 280 nm en un espectrofotómetro de doble haz Jazco V-630.

Para la obtención de RNA utilizado en estudios de RT-qPCR, se utilizó el kit Ribopure Yeast (Life Technologies) según las recomendaciones del fabricante.

La síntesis de cDNA (reacción de RT), se realizó con 5 µg de RNA total, partidador oligo-dT¹⁸ 1,25 µM, dNTPs 0,5 µM y 200 U de transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) en un volumen final de 20 µl, de acuerdo al protocolo recomendado por el proveedor. La determinación de los niveles relativos de transcritos por qPCR, se realizó en un termociclador de tiempo real Mx3000P (Stratagene) usando 1 µl de reacción de transcripción reversa, cada partidador a 0,25 µM y 10 µl de kit SensiMix SYBR Green I (Quantace) en un volumen final de 20 µl. Los valores de Ct obtenidos se normalizaron por los respectivos valores de los genes β-actina (*ACT* [Genbank: X89898.1]) y *PDA1* (no publicado, comunicación personal) de *X. dendrorhous* y posteriormente expresados en función de la condición control.

2.6.3 Extracción de DNA plasmidial de *E. coli*.

Para la extracción y purificación de DNA plasmídico desde un cultivo de *E. coli*, se utilizaron los kit comerciales AxyPrepTM Plasmid Miniprep y Midiprep Kit de Axygen, según las instrucciones del fabricante.

2.6.4 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.

La purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se llevó a cabo utilizando el kit comercial Ultra CleanTM 15 DNA Purification Kit (MO BIO), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

2.7 Transformación por electroporación.

2.7.1 Transformación de *E. coli*.

Para obtener células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α se utilizó el protocolo descrito previamente (Sambrook y Russell, 2001). Brevemente, se inoculó 1 l de medio LB con 100 ml de un cultivo bacteriano saturado. Se dejó crecer a 37 °C con agitación constante hasta llegar a una DO₆₀₀ de 0,5-0,8 (fase exponencial de crecimiento). A partir desde este punto en adelante, se trabajó con material mantenido en hielo y centrifugando a 4 °C.

Las células se colectaron por centrifugación a 16.000 x *g* por 15 min. Se lavaron 2 veces con agua destilada fría estéril; el primer lavado con 1 l total y el segundo con 500 ml, y una vez con 20 ml de glicerol 10 %. Posteriormente, el sedimento celular se suspendió en 2-3 ml de glicerol 10 % frío, obteniéndose una concentración de 1-3 x 10¹⁰ células/ml. Finalmente, las células electrocompetentes se almacenaron en alícuotas de 40 μ l a -80 °C hasta el momento de su utilización.

Al momento de transformar, se descongeló una alícuota de células electrocompetentes y se agregó 5-10 μ l de mezcla de ligado (dializado) o 1 ng de vector puro, según correspondía. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,2 cm enfriada y la electroporación se llevó a cabo con el equipo BioRad Gene Pulser X Cell, bajo las condiciones de 25 μ F, 200 Ω y 2,5 KV. Posteriormente, las células se suspendieron e incubaron durante 1 h a 37 °C en 1 ml de medio LB. Transcurrido este tiempo, se sembraron alícuotas de 100 μ l en medio LB semi-sólido suplementado con el antibiótico ampicilina (100 μ g/ml) y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido, 80 μ g/ml), y se incubaron durante la noche a 37 °C. Luego se evaluó la aparición de colonias transformantes, resistentes a ampicilina, y recombinantes blancas que no metabolizan el X-gal (Sambrook y Russell, 2001).

2.7.2 Transformación de *X. dendrorhous*.

La obtención de células electrocompetentes de *X. dendrorhous* se llevó a cabo según el protocolo descrito por Adrio y Veiga (1995). Brevemente, se sembró 2 ml de un cultivo de 2 días en 200 ml de medio YM y se dejó crecer a 22 °C con agitación constante hasta una DO₆₀₀ de 2-4 (aproximadamente 24 h). Luego de alcanzar la DO₆₀₀ deseada, las células se cosecharon por centrifugación a 4 °C a 16.000 x *g* por 5 min. El sedimento celular se suspendió en 25 ml de

buffer fosfato de potasio 50 mM (pH 7,0) con DTT 25 mM y se incubó por 15 min a 22 °C. A partir de este paso todos los procedimientos se realizaron a 4 °C con material enfriado en hielo. Las células se lavaron 2 veces con 25 ml de solución STM (sacarosa 270 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 7,0; MgCl₂ 1 mM) y el sedimento celular se suspendió en 500 µl de solución STM. Para electroporar se mezcló 60 µl de la suspensión de células electrocompetentes y 10 µl de DNA transformante (a una concentración mínima de 1 µg/µl), la mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,2 cm enfriada. La electroporación se llevó a cabo con el equipo BioRad Gene Pulser X Cell bajo las condiciones 125 µF, 600 Ω y 450 V. Una vez realizada la electroporación, las células se diluyeron con 1 ml de medio YM y se incubaron por 4 h. Luego, se sembraron alícuotas de 100 µl en medio YM semi-sólido suplementado con higromicina B y/o zeocina, dependiendo del vector utilizado y de la cepa transformada. Las placas se incubaron a 22 °C por al menos 2 días y se evaluó la aparición de colonias resistentes a los antibióticos utilizados. Para la confirmación del origen de cada transformante, se secuenció la región IGS con los partidores 5SRNA y LR12R (Tabla 3) y se comparó con la base de datos disponible en el laboratorio la cual posee las secuencias IGS características de todas las cepas utilizadas en este trabajo y de la mayoría de las cepas de *X. dendrorhous* disponibles en el laboratorio.

2.7.3 Transformación de *S. cerevisiae*.

Para la obtención de células electrocompetentes de *S. cerevisiae* se inoculó un matraz con 30 ml de medio líquido YEP y se incubó durante una noche a 22 °C con agitación constante. Posteriormente, al mismo cultivo se agregó 30 ml de medio YEP fresco y se incubó durante 3 h más bajo las mismas condiciones. Transcurrido ese tiempo, las células se colectaron por centrifugación a 2.700 x g durante 5 min y se lavaron tres veces con 40 ml de agua destilada estéril fría y una vez con 4 ml de sorbitol 1 M. Finalmente, las células se suspendieron en 200 µl de sorbitol 1 M y se dividieron en alícuotas de 40 µl que se almacenaron a 4 °C por un máximo de dos días.

Para transformar, se mezcló una alícuota de células competentes de *S. cerevisiae* con 4 µl de DNA plasmídico preparado previamente a una concentración de 30 ng/ µl. La mezcla se

depositó en una cubeta de electroporación de 2 mm y se dio un pulso eléctrico en el electroporador GenePulser Xcell™ (BioRad) bajo las condiciones, 25 μ F, 200 Ω , 1,5 kV. Posteriormente, las células recuperadas luego de electroporar se suspendieron en 1 ml de medio YEP y se incubaron a 30 °C por 1 h. Luego de transcurrido el tiempo, las células se lavaron una vez con sorbitol 1 M y se suspendieron en 1 ml de sorbitol para luego sembrar alícuotas de 100 μ l en placas Petri con SD-agar suplementado con los metabolitos correspondientes. Las placas se incubaron a 30 °C hasta el desarrollo de colonias.

2.8 Secuenciación y análisis bioinformático.

La secuenciación de DNA se realizó en un secuenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) con el kit de terminadores fluorescentes BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Se utilizó un mínimo de 200 o 50 ng totales de DNA para la secuenciación de plásmidos o de fragmentos de DNA purificados, respectivamente.

Para el análisis de secuencias se utilizaron las herramientas ContigExpress y AlignX del paquete de programas Vector NT Advance v.11 (Invitrogen) y herramientas disponibles en línea como BLAST u ORF Finder del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Los alineamientos múltiples de secuencias se realizaron con la aplicación ClustalW2 (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2), y su edición se realizó usando la aplicación Jalview, descargable gratuitamente desde el sitio www.jalview.org.

Además, las secuencias del genoma y los diferentes transcriptomas de la cepa UCD 67-385 y cepas mutantes derivadas de ésta disponibles en nuestro laboratorio, se analizaron con el programa CLC Genomics Workbench. Los transcriptomas analizados se obtuvieron a partir de RNA total extraído de células cosechadas luego de 36 h de crecimiento a 22 °C en tres medio de cultivo con distintas fuentes de carbono: MMv-glucosa 2 %, MMv-maltosa 2 % o MMv-succinato 2 %. La identificación de los distintos genes y sus respectivos ORFs se realizó con el programa CLC Genomics Workbench y los genes identificados se confirmaron por comparación con secuencias disponibles en la base de datos de hongos (*Fungi*) de la herramienta BLAST y también mediante la herramienta SMART BLAST del NCBI. La clasificación de los genes

identificados según su función o proceso biológico en que participan se realizó utilizando la base de datos UniProt (*Universal Protein Resource*) disponible en internet (www.uniprot.org).

La expresión a nivel de transcrito de los distintos genes analizados se estimó a partir de su representación en cuanto a "número de lecturas o *Reads*" en cada transcriptoma y se expresó con el valor de RPKM (*Reads Per Kilobase per Million Mapped reads*) que refleja la concentración molar del transcrito en la muestra inicial, normalizando por la longitud del RNA y el número total de "lecturas o *reads*" (Mortazavi y col., 2008). Este valor se calculó con la siguiente fórmula:

$$RPKM_g = \frac{r_g * 10^9}{fl_g * R}$$

Donde: **RPKM_g**: *reads per kilobase per million mapped reads* del gen g, **r_g**: *reads* del gen g, **R**: *reads* totales, **fl_g**: longitud del gen g.

2.9 Extracción de carotenoides totales de *X. dendrorhous* y análisis por RP-HPLC.

Los carotenoides totales se obtuvieron mediante extracción con acetona según el protocolo descrito previamente por An y colaboradores (An y col., 1989; Wozniak y col., 2011). Brevemente, se extrajo carotenoides desde muestras entre 20 y 40 ml de cultivo. Las células se cosecharon por centrifugación a 4.000 x g por 5 min y se lavaron una vez con 10 ml de agua destilada. Se descartó el sobrenadante y el sedimento celular se suspendió en 1 ml de agua destilada, se transfirió la mezcla a un tubo de 7 ml (tapa rosca), se agregó 0,5 ml de perlas de vidrio de 0,5 mm (BioSpec) y se agitó por 3 min en el equipo Mini-bead beater-16 (BioSpec). Luego se agregó 1 ml de acetona y se agitó nuevamente por 3 min. El homogeneizado se centrifugó por 5 min a 4.000 x g y se recuperó la fase líquida. Al tubo de 7 ml que contenía los restos celulares, se agregó 2 ml de acetona, se agitó por 3 min, se centrifugó a 4.000 x g por 5 min y se recuperó la fase líquida en el mismo tubo utilizado anteriormente. Este paso se repitió hasta que los restos celulares quedaron blancos. Posteriormente se midió el volumen de extracto de acetona finalmente recuperado y se agregó una quinta parte del volumen de éter de

petróleo, se homogeneizó en vórtex por 5 min y centrifugó a 4.000 x *g* por 5 min. Se transfirió la fase superior a un tubo limpio y se agregó 1 ml de agua para retirar los restos de acetona. Se agitó en vórtex y se centrifugó a 4.000 x *g* por 5 min. Finalmente, se recuperó el éter de petróleo (fase donde se encontraban disueltos los carotenoides), se traspasó a un tubo limpio de vidrio y se registró su volumen y densidad óptica a 474 nm. La concentración de carotenoides totales contenidos en cada muestra procesada se determinó con la siguiente fórmula:

$$\text{Carotenoides totales} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g de peso seco}} \right) = \left(\frac{E_p * Abs_{474} * 100 * Vol PS}{PS * 21 * Vol muestra} \right)$$

Donde E_p : volumen de éter de petróleo recuperado (ml); Abs_{474} : absorbancia a 474 nm; Vol PS: volúmen utilizado para determinar el peso seco; PS: peso seco (g) y Vol muestra: volumen de muestra utilizado para extraer los carotenoides. Para la cuantificación se utilizó el coeficiente de extinción molar de astaxantina correspondiente a 2100 ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Se dejó evaporar el éter de petróleo a temperatura ambiente cubriendo los tubos con papel aluminio y una vez que éste se evaporó completamente, los carotenoides se suspendieron en acetona (80-200 μl) y se analizó su composición en un equipo de cromatografía líquida de fase reversa (RP-HPLC, Shimadzu SPD-M10VP). Para ello se utilizó una columna Lichrosper RP18 125-4 (Merck) y como fase móvil, una mezcla de acetonitrilo: metanol: isopropanol (75: 20: 5) con un flujo de 1ml/min. Cada compuesto se identificó de acuerdo a su tiempo de retención y su espectro de absorción, en comparación a estándares (Mercadante y Egeland, 2004).

3. RESULTADOS.

3.1- Aislamiento y caracterización de los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous*.

En este primer objetivo se incluyeron actividades que permitieron una caracterización general del proceso de represión catabólica en *X. dendrorhous*, por lo que se divide en dos partes:

3.1.1- Parte I: crecimiento diáuxico en *X. dendrorhous*.

Antes de llevar a cabo la caracterización específica de los genes *TUP1* y *CYC8*, se realizó una caracterización general del proceso de represión catabólica de *X. dendrorhous*. Con el objetivo de evaluar si efectivamente la levadura utiliza preferentemente la glucosa restringiendo el uso de una segunda fuente de carbono sólo hasta que la primera se haya agotado en el medio de cultivo, se cultivó la cepa silvestre UCD 67-385 de la levadura en medio mínimo Vogel (MMv) suplementado con glucosa 1% (fuente de carbono fermentable y preferida) y con glicerol 1% (fuente de carbono no fermentable) (MMv-glucosa-glicerol). Paralelamente, como control, se evaluó el crecimiento de la levadura en medio MMv suplementado sólo con glucosa 1% (MMv-glucosa) o glicerol 1% (MMv-glicerol) (Figura 4, A y B). En los tres casos, el crecimiento se evaluó midiendo la DO_{600} de los cultivos en el tiempo. Con los datos obtenidos se estimaron las tasas de crecimiento (μ) y los respectivos tiempos generacionales (t_g) utilizando el modelo de Gompertz (Zwietering y col., 1990).

Como resultado se observó que al cultivar la levadura en MMv-glucosa-glicerol, la curva de crecimiento es del tipo diaúxica (Figura 4C) lo que es característico de un mecanismo de represión catabólica funcional (Poutou y col., 2005). La curva presentó dos pendientes diferentes sugiriendo un cambio de uso de fuente de carbono con distintas tasas de crecimiento (Figura 4C). En concordancia, se obtuvieron dos tasas de crecimiento μ_1 : $0,116 \pm 0,004$ y μ_2 : $0,039 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$ y tiempos generacionales (t_g) correspondientes t_{g1} : $6,1 \pm 0,3$ y t_{g2} : $16,7 \pm 0,6 \text{ h}$.

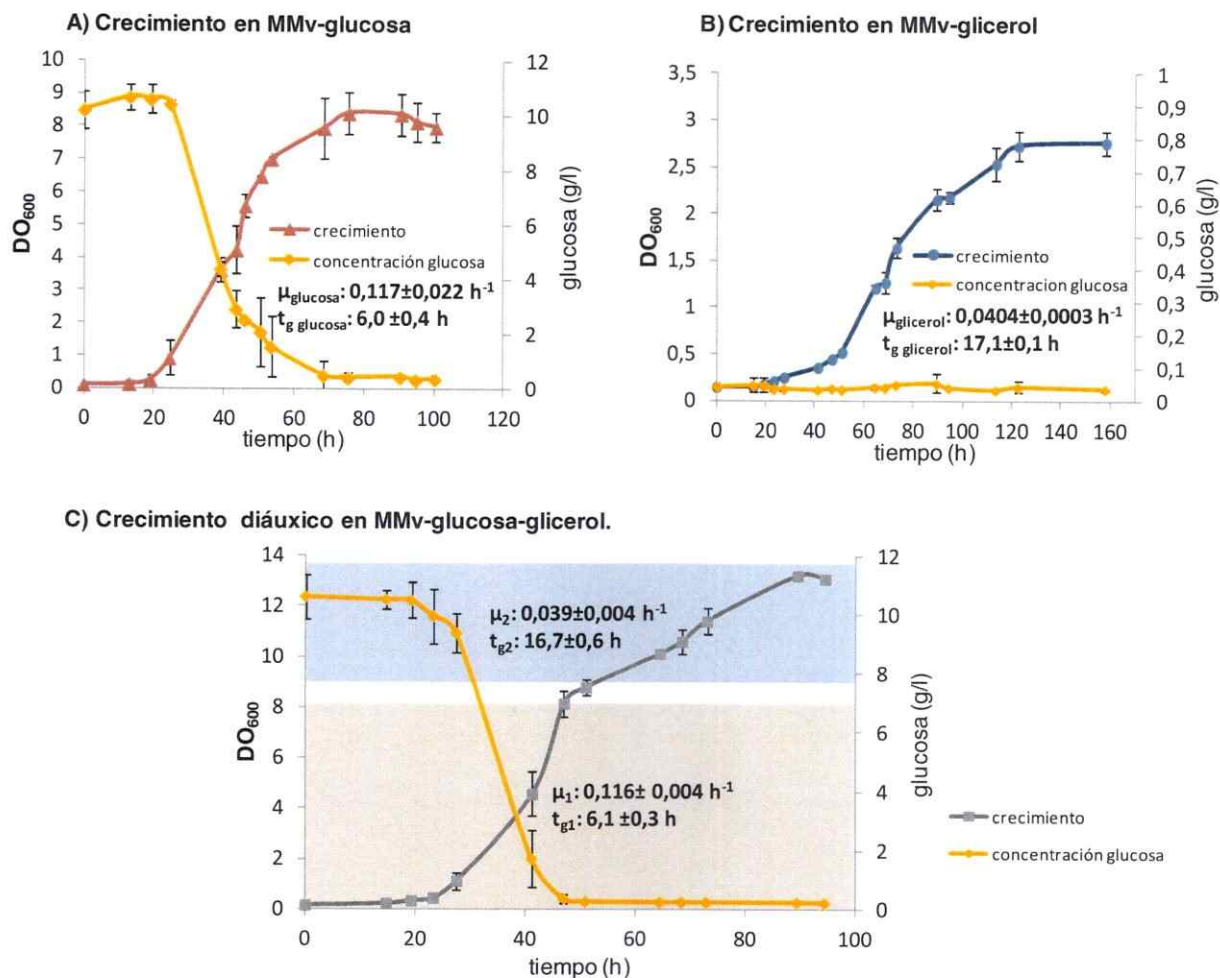


Figura 4. Crecimiento diáuxico de *X. dendrorhous* cultivada en MMv suplementado con glucosa y/o glicerol. Curvas de crecimiento en MMv suplementado con A) glucosa 1%, B) glicerol 1% y C) glucosa 1% y glicerol 1%. En A, B y C además se determinó la glucosa remanente en el medio de cultivo. μ : tasa de crecimiento, t_g : tiempo generacional. MMv: medio mínimo Vogel. Los datos son el valor promedio de tres cultivos independientes y las barras de error corresponden a la desviación estándar. La tasa de crecimiento se calculó en base al modelo de crecimiento microbiano de Gompertz (Zwietering y col., 1990), utilizando un mínimo de cinco datos a lo largo de la curva en cada caso.

En concordancia con lo anterior, al incubar la levadura en MMv-glucosa o MMv-glicerol de manera independiente (Figura 4, A y B), se obtuvieron tasas de crecimiento para glucosa y glicerol de $0,117\pm 0,022$ y $0,0404\pm 0,0003$ h⁻¹, respectivamente, lo que coincide con las tasas μ_1 y μ_2 observadas en el cultivo con ambas fuentes de carbono (Figura 4A). Por otra parte, cabe destacar que el cambio en la velocidad de crecimiento coincide con el momento en que la glucosa se ha agotado del medio de cultivo, lo que ocurre cuando la levadura alcanza una densidad óptica a 600nm (DO₆₀₀) de ~ 8, tanto en MMv con glucosa y glicerol como en MMv suplementado sólo con glucosa (Figura 4, A y B). Estos resultados permiten concluir que existe un mecanismo de represión catabólica funcional en la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*.

3.1.2.- Parte II: caracterización genética y funcional de los genes *CYC8* y *TUP1*.

En esta segunda parte se caracterizó genética y funcionalmente los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous* que estarían involucrados en el mecanismo de represión catabólica.

3.1.2.1.- Caracterización genética de los genes *CYC8* y *TUP1*.

Previamente en nuestro laboratorio se aisló y caracterizó genéticamente el gen *CYC8* de *X. dendrorhous* (Córdova, 2012). En dicho trabajo se demostró que la cepa mutante *cyc8* de *X. dendrorhous* se encuentra desregulada en la carotenogénesis ya que produce carotenoides desde el inicio de la curva de crecimiento, incluso en presencia de elevadas concentraciones de glucosa. En la Figura 5 se muestra la caracterización bioinformática del gen *CYC8* de *X. dendrorhous* realizada en trabajos previos (Córdova, 2012). El gen se compone de 9 intrones y 10 exones (Figura 5A) y el análisis de la secuencia del cDNA reveló la presencia de un ORF de 4.410 pb que codificaría una proteína de 1.469 aminoácidos (Figura 5B). La búsqueda de motivos conservados utilizando la herramienta BLASTp del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), permitió identificar 10 repetidos TPR (Figura 5C) que son característicos y esenciales en la función de proteínas Cyc8 presentes en otros organismos, como por ejemplo *S. cerevisiae* (Smith y Johnson, 2000).

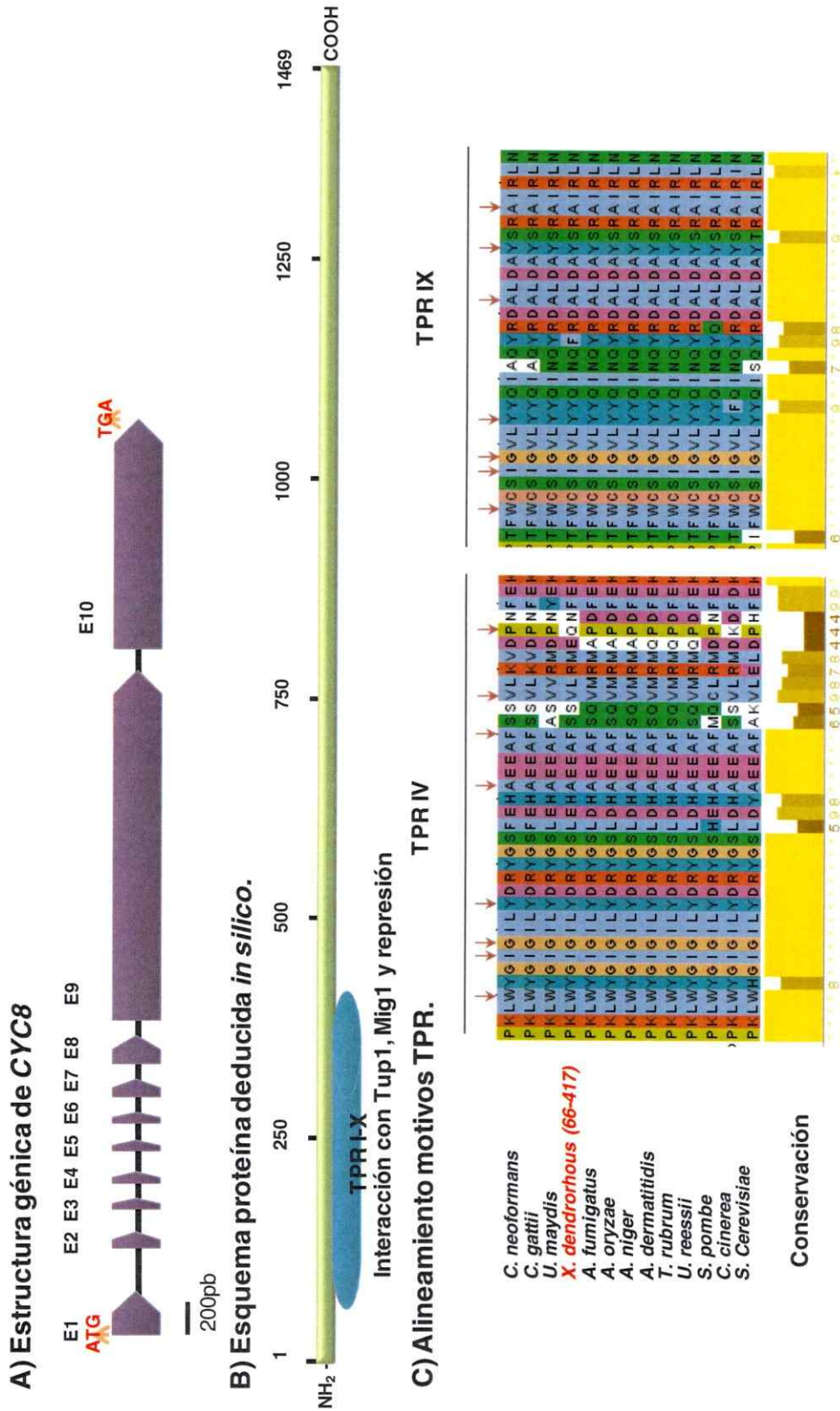


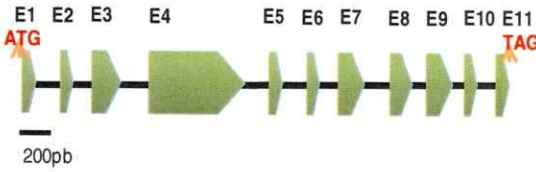
Figura 5. Análisis de la secuencia del gen *CYC8* de *X. dendrorhous*. A) Estructura génica de *CYC8*. B) Esquema de la proteína *Cyc8* deducida. C) Alineamiento de motivos conservados. Se muestran 2 de los 10 repetidos TPR presentes en la proteína indicando la conservación de cada residuo en escala de 1 a 10. Sobre el alineamiento, con flechas rojas se indican aquellos residuos esenciales para la formación de estructura secundaria tipo HTH (*helix turn helix*) característica de los motivos TPR (D'Andrea y Regan, 2003).

En el caso del gen *TUP1*, a partir de secuencias disponibles del genoma de *X. dendrorhous* se diseñaron partidores específicos y se amplificó una región genómica de 3.500 pb que contiene al gen *TUP1*, cuya secuencia se confirmó con la secuencia disponible del genoma de la levadura. Además se aisló, clonó y secuenció completamente su cDNA, permitiendo determinar su estructura génica que está compuesta por 11 exones y 10 intrones (Figura 6A). Se identificó un ORF de 2.037 pb que al ser traducido *in silico* da origen a una proteína de 678 residuos (Figura 6B) y al analizar su secuencia proteica (secuencia 1, ANEXO) con la herramienta SMART BLAST, se confirmó que corresponde a un homólogo de proteínas Tup1 descritas en otros organismos (análisis de secuencia 1B, ANEXO). Posteriormente, mediante análisis de la secuencia aminoacídica con la herramienta BLASTp, se identificó el dominio TupN (Figura 6, B y C) presente en el N-terminal de la proteína que es característico de proteínas Tup1 presentes en otros organismos. Además, como se observa en la Figura 6 (B y D), se identificó en la región C-terminal el dominio funcional compuesto por 7 repetidos tipo WD40 (Zhang y col., 2002). Se realizaron alineamientos de secuencia aminoacídica con proteínas Tup1 de otros organismos y los resultados muestran que los aminoácidos requeridos para la estructura y función de la proteína también se encuentran presentes en la proteína Tup1 deducida de *X. dendrorhous* (Figura 6, B, C y D).

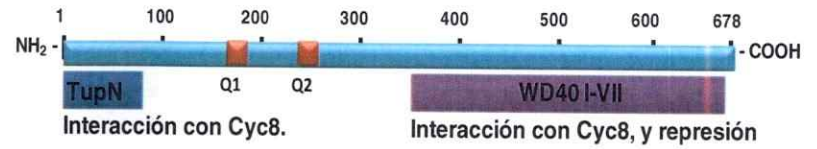
3.1.2.2.- Caracterización funcional de los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous*: complementación heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae*.

Con el objetivo de avanzar en la caracterización funcional de los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous*, se realizaron ensayos de complementación heteróloga en cepas de *S. cerevisiae* mutantes de los respectivos genes. Para ello se construyeron vectores de expresión que poseen los ORF de *CYC8* o *TUP1* de *X. dendrorhous* bajo el control del promotor constitutivo del gen de actina y el terminador *TDH3t* de *S. cerevisiae*. Estos vectores se denominaron YEpNP-CYC8 y YEpNP-TUP1, respectivamente. Se confirmó la secuencia del gen clonado y se transformó la cepa mutante *cyc8*⁻ o *tup1*⁻ de *S. cerevisiae*, según correspondía.

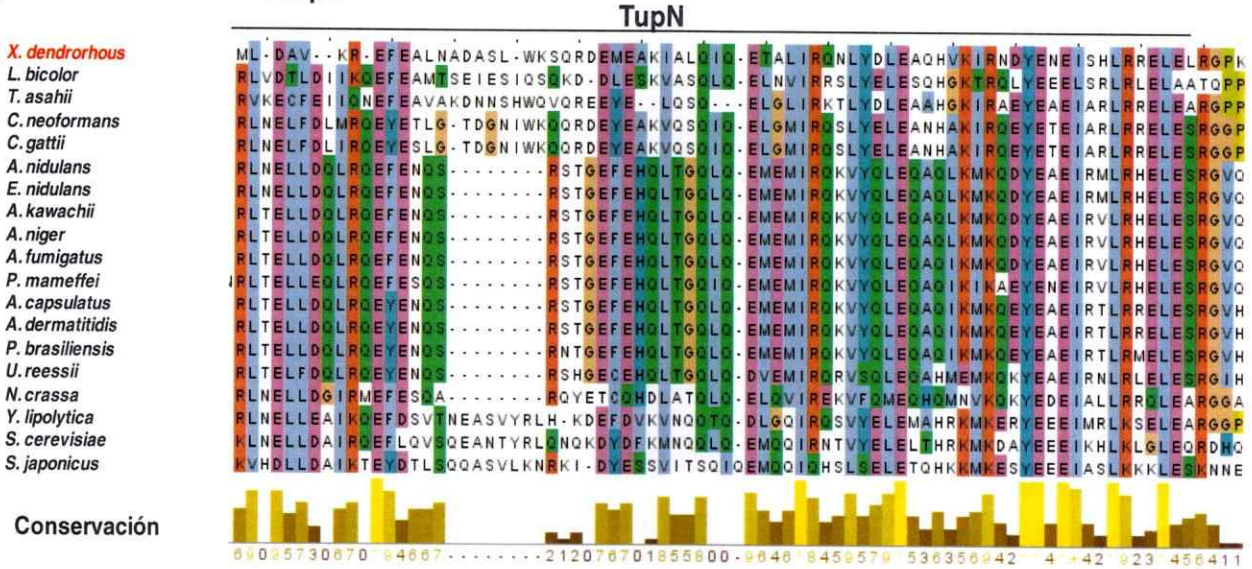
A) Estructura génica de *TUP1*



B) Esquema proteína deducida *in silico*.



C) Alineamiento dominio *tupN*



D) Alineamiento motivos WD40

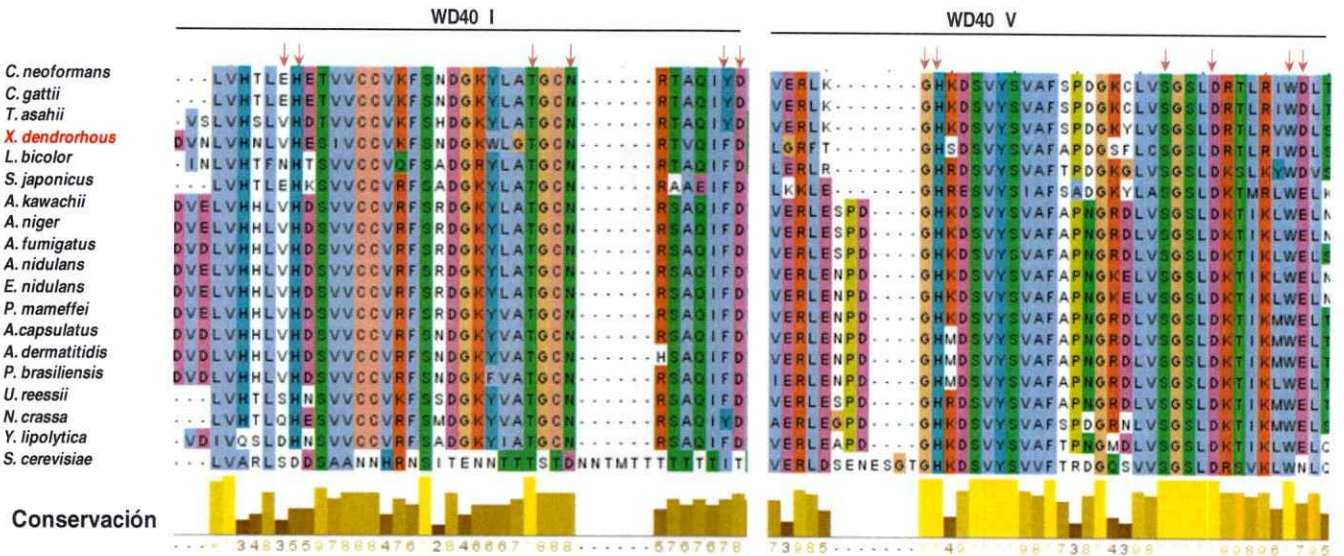


Figura 6. Análisis de la secuencia del gen *TUP1* de *X. dendrorhous*. A) Estructura génica. B) Esquema de la proteína obtenida por traducción *in silico*. Se muestran los motivos TupN y WD40 característicos de la proteína Tup1. Q1 y Q2 representan dos regiones poliglutamina conservadas. C) Alineamiento de motivos conservados. En la parte superior se observa el motivo TupN de unión a Cyc8 y en la parte inferior se muestran 2 de los 7 repetidos WD40 identificados. Con flechas rojas se destacan los residuos necesarios para la formación de estructura secundaria (cuatro hojas β antiparalelas) de cada repetido tipo WD40 (Zhang y col., 2002). Se muestra la conservación de cada residuo en escala de 1 a 10.

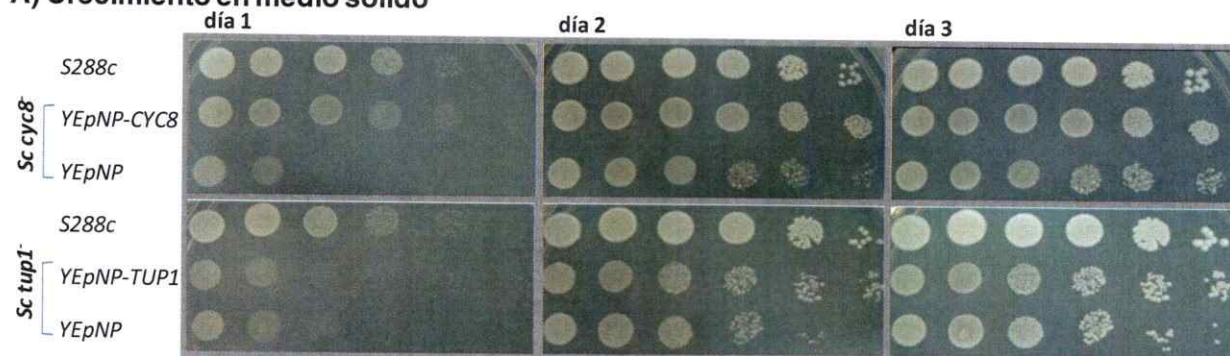
Como marcador de selección se utilizó el gen *LEU2*, ya que las cepas utilizadas son auxótrofas para leucina.

Se ha descrito que las mutaciones *cyc8*⁻ y *tup1*⁻ en *S. cerevisiae* causan un retraso en el crecimiento y actividad invertasa constitutiva (la cual normalmente es sensible a la represión por glucosa) (Trumbly, 1992; Gancedo y col., 1998; Smith y Johnson, 2000). Es por ello que para determinar si el gen de *X. dendrorhous* complementa o no las mutaciones en este hospedero, se evaluaron ambos aspectos en las cepas de *S. cerevisiae* (*cyc8*⁻ o *tup1*⁻) transformadas con los vectores de expresión descritos, utilizando como control las mismas cepas transformadas con el vector YEpNP sin inserto.

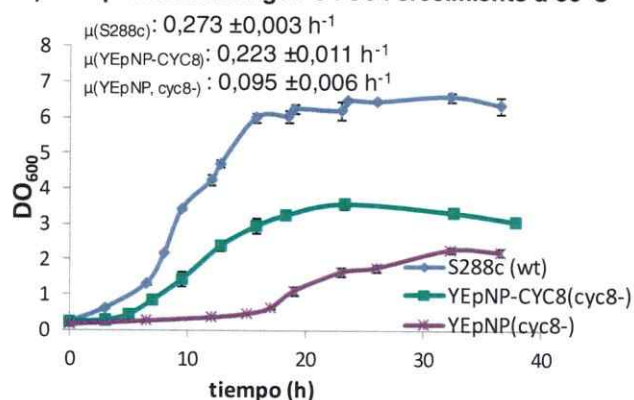
Como una primera aproximación cualitativa se evaluó el crecimiento en placas. Para esto se hicieron diluciones seriadas a partir de cultivos en fase exponencial de las distintas cepas y se sembraron alícuotas en placas con medio SD suplementado con aminoácidos. Posteriormente las placas se incubaron a 30 °C y se registró el crecimiento durante 3 días. Mediante esta aproximación se observó claramente que el crecimiento de las cepas de *S. cerevisiae* mutantes transformadas con los vectores YEpNP-CYC8 y YEpNP-TUP1 es más rápido que el de las cepas control (Figura 7A).

Posteriormente, para poder cuantificar lo observado en el crecimiento en placas, se cultivaron las cepas a 30 °C (Figura 7, B y C) y 22 °C (Figura, 7 D y E) en medio líquido SD suplementado con aminoácidos según requerimientos y el crecimiento se evaluó de acuerdo a la DO₆₀₀ del cultivo en el tiempo. Con los datos obtenidos se calcularon las tasas de crecimiento (μ) para las distintas cepas en cada condición. Como se observa en la Figura 7 (B y C) al incubar las cepas a 30 °C las mutantes transformadas con los vectores YEpNP-CYC8 y YEpNP-TUP1 tienen μ de $0,223 \pm 0,011$ y $0,148 \pm 0,011$ h⁻¹, respectivamente, lo que se refleja en tiempos generacionales calculados (t_g) de aproximadamente $3,1 \pm 0,2$ y $4,7 \pm 0,4$ h.

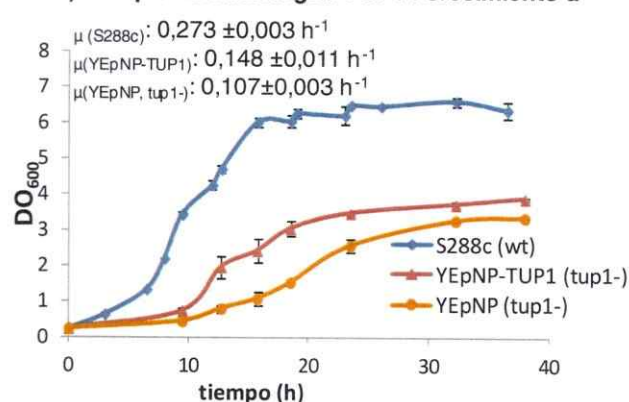
A) Crecimiento en medio sólido



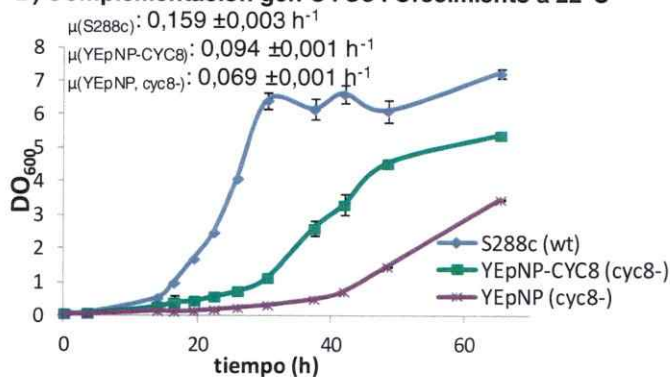
B) Complementación gen *CYC8* : crecimiento a 30°C



C) Complementación gen *TUP1* : crecimiento a 30°C



D) Complementación gen *CYC8* : Crecimiento a 22°C



E) Complementación gen *TUP1* : Crecimiento a 22°C

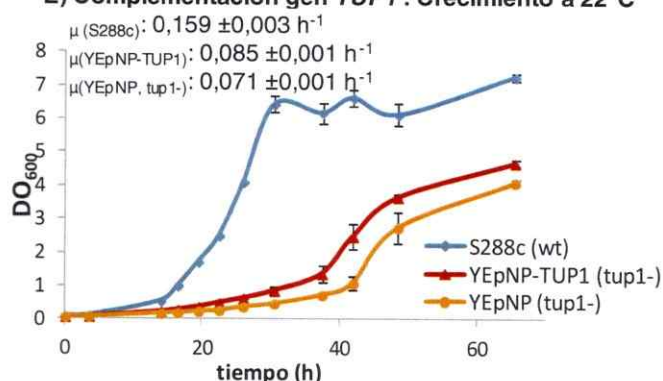


Figura 7. Evaluación de la funcionalidad de los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous* en *S. cerevisiae*: evaluación del crecimiento de las cepas mutantes (*cyc8* o *tup1*) de *S. cerevisiae* complementadas con los genes *CYC8* o *TUP1* de *X. dendrorhous*. A) Se cultivaron las cepas a 30 °C en placas: se sembraron las cepas en placas con medio mínimo SD-uracilo-metionina-histidina. El crecimiento se registró a los 1, 2 y 3 días de incubación a 30 °C. En cada caso se sembró diluciones seriadas de un cultivo de las distintas cepas. B) y C) Curvas de crecimiento de DO₆₀₀ vs tiempo de las distintas cepas cultivadas en medio mínimo SD suplementado con aminoácidos a 22 °C. D) y E) Curvas de crecimiento a 30 °C. Los datos corresponden al promedio de tres cultivos independientes con sus respectivas desviaciones estándar. S288c: cepa silvestre, YEpNP-CYC8 (*cyc8*-): cepa *Sc cyc8* transformada con el vector YEpNP-CYC8 que contiene el gen *CYC8* de *X. dendrorhous* y YEpNP (*cyc8*-): cepa control transformada con el vector vacío; YEpNP-TUP1 (*tup1*-): cepa *Sc tup1* transformada con el vector YEpNP-TUP1 que contiene el gen *TUP1* de *X. dendrorhous* y YEpNP (*tup1*-): cepa control transformada con el vector vacío. μ : tasa de crecimiento, calculada según el modelo de Gompertz (Zwietering y col., 1990) utilizando al menos cinco datos en cada caso.

Cabe destacar que las tasas de crecimiento de las cepas que expresan los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous* son ~2,4 y ~1,5 veces mayores en comparación a las respectivas cepas control *Scycyc8* y *Sctup1* transformadas solo con el vector YEpNP (μ de $0,095 \pm 0,006$ y $0,107 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$, respectivamente). Sin embargo, la cepa silvestre aún presenta un valor μ de $0,273 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$ ($t_g \sim 2,52 \pm 0,03 \text{ h}$) que es mayor que el del resto de las cepas. Paralelamente, al cultivar las cepas a $22 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 7, D y E), se observó una disminución de las tasas de crecimiento en todas las cepas. En este caso, similar a lo observado previamente, las cepas control *Scycyc8* (con YEpNP) y *Sctup1* (con YEpNP), presentaron tasas de crecimiento ~1,3 veces menores en comparación a las mismas cepas transformadas con los vectores que portan los genes de *X. dendrorhous*. Es importante destacar que en ambas condiciones de crecimiento, las cepas complementadas alcanzan una mayor DO_{600} final que las cepas control, lo que también sugiere que estas crecen más que las cepas control al menos durante el tiempo y en las condiciones estudiadas.

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, una de las consecuencias de la represión catabólica, es la represión (en presencia de glucosa) de genes involucrados en la utilización de fuentes alternativas de carbono como la sacarosa. Es así que al cultivar una levadura (con su mecanismo de represión catabólica funcional) en presencia de un análogo no hidrolizable de glucosa como la 2-desoxi-D-glucosa y una fuente alternativa de carbono, ésta no debiera ser capaz de utilizar exitosamente dicha fuente ya que los mecanismos necesarios se encontrarían mayormente reprimidos. Considerando lo anterior, las distintas cepas de *S. cerevisiae* se incubaron a $22 \text{ }^\circ\text{C}$ con agitación constante en medio mínimo SD suplementado con los aminoácidos correspondientes, 2-desoxi-D-glucosa 0,02% y sacarosa 2% para evaluar si en las cepas transformadas con los vectores YEpNP-CYC8 y YEpNP-TUP se producía una inhibición o al menos un retraso en el crecimiento. Como control también se evaluó el crecimiento de las distintas cepas cultivadas en medio mínimo SD-sacarosa 2% (Figura 8).

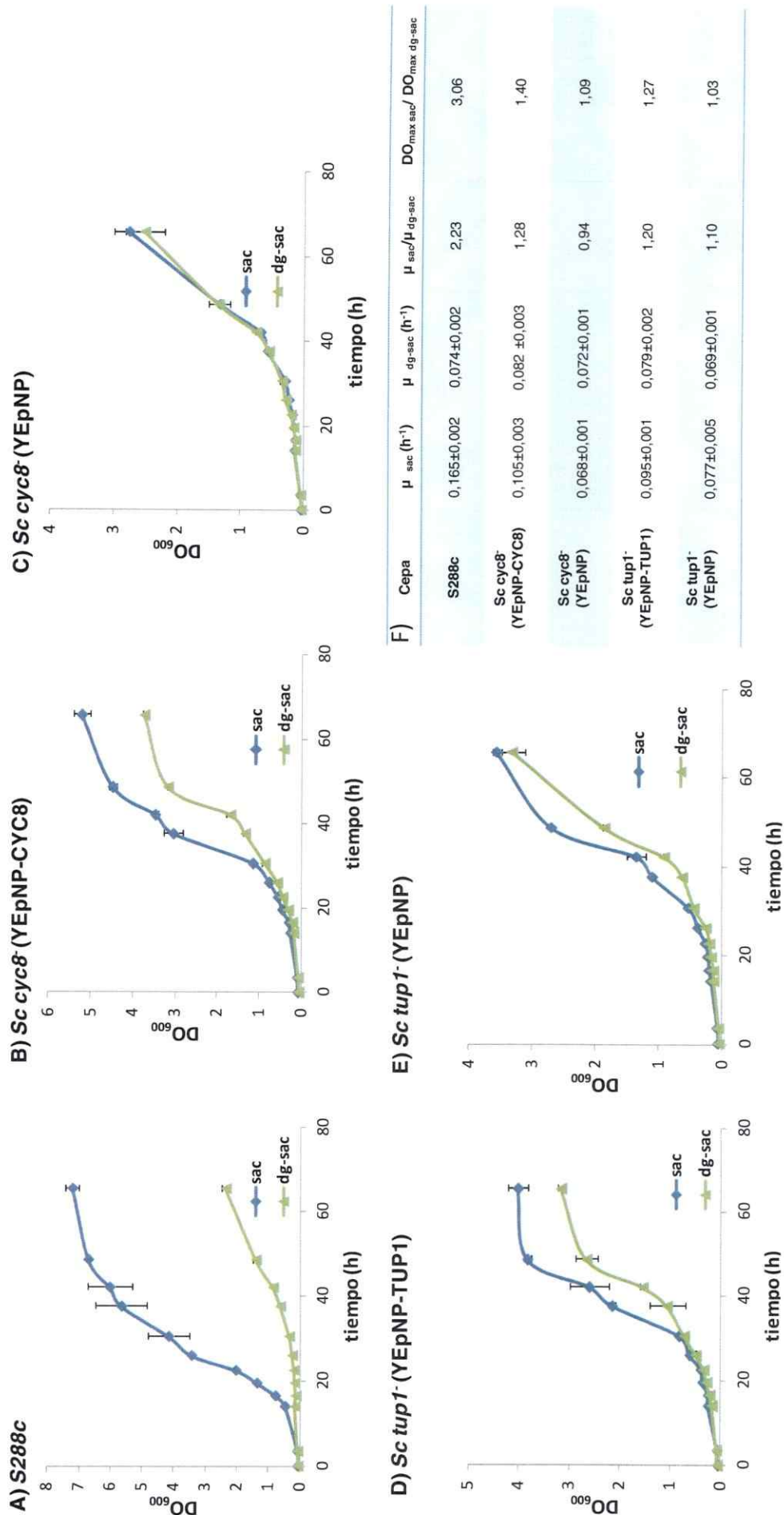


Figura 8. Evaluación de la funcionalidad de los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous* en *S. cerevisiae*: determinación del efecto de 2-desoxi-D-glucosa sobre el crecimiento en medio mínimo SD con sacarosa como única fuente de carbono. Se evaluó el crecimiento a 22 °C en medio mínimo SD suplementado con los aminoácidos requeridos y sólo sacarosa 2%. Se muestran los resultados obtenidos para las cepas A) S288c (silvestre), las cepas que portan los vectores con el gen de *X. dendrorhous* B) *Scyc8*⁻ (YE_{NP}-CYC8) y D) *Sc_{tup1}*⁻ (YE_{NP}-TUP1), junto a sus respectivos controles C) *Scyc8*⁻ (YE_{NP}) y E) *Sc_{tup1}*⁻ (YE_{NP}). F) Análisis de los datos obtenidos; μ : tasa de crecimiento, calculada según modelo de Gompertz (Zwietering y col., 1990) y utilizando al menos seis datos a lo largo de la curva en cada caso; sac: sacarosa; dg-sac: 2-desoxi-D-glucosa y sacarosa; DO_{max}: valor máximo alcanzado de densidad óptica a 600 nm durante el tiempo estudiado.

La cepa silvestre mostró un μ ~2,2 veces mayor cuando ésta se cultivó sólo con sacarosa en comparación al cultivo en presencia de 2-desoxi-D-glucosa (Figura 8B). Lo anterior también se ve reflejado en la DO_{600} máxima alcanzada luego de 65 h de cultivo, la que es ~3 veces mayor en el cultivo control (solo con sacarosa) (Figura 8B). Las cepas *Scyc8* y *Sctup1* transformadas con los vectores YEpNP-CYC8 y YEpNP-TUP, mostraron un menor crecimiento con μ ~1,3 y ~1,2 veces menores al incubarse en presencia de 2-desoxi-D-glucosa en comparación a las observados en los cultivos incubados sólo en presencia de sacarosa (Figura 8, B, C y E). Por otra parte, la DO_{600} máxima alcanzada por las cepas *Scyc8* (YEpNP-CYC8) y *Sctup1* (YEpNP-TUP1) cultivadas sólo con sacarosa son ~1,4 y ~1,3 veces mayores, respectivamente, en comparación a las mismas cepas crecidas en presencia de 2-desoxi-D-glucosa (Figura 8 B). Finalmente, cabe destacar que las cepas usadas como control *Scyc8* y *Sctup1* que portan el vector YEpNP sin inserto, prácticamente no presentaron diferencias en sus μ ni DO_{600} máximas alcanzadas al comparar su crecimiento en las dos condiciones descritas previamente (Figura 8, B, D y F). Los resultados descritos sugieren que expresar los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous* tendría un efecto represor sobre la capacidad de las respectivas cepas mutantes de *S. cerevisiae* para utilizar sacarosa en presencia de 2-desoxi-D-glucosa, entregando evidencia adicional que los productos de los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous* participan en la regulación por represión catabólica.

Adicionalmente se determinó el efecto de la glucosa en la actividad invertasa de las distintas cepas (Figura 9). Para ello, las cepas se cultivaron en dos condiciones: i) medio SD suplementado con glucosa 2% (condiciones de represión) y ii) en medio SD suplementado con sacarosa 2% (condiciones de no represión). Las distintas cepas fueron inoculadas a una DO_{600} inicial de ~0,1, y se incubaron a 22 °C con agitación constante. Cuando los distintos cultivos alcanzaron una DO_{600} entre 1 y 2 (fase exponencial temprana: ~12-18 h de crecimiento y glucosa residual en el medio de ~15 g/l), se tomaron muestras y se determinó la actividad invertasa.

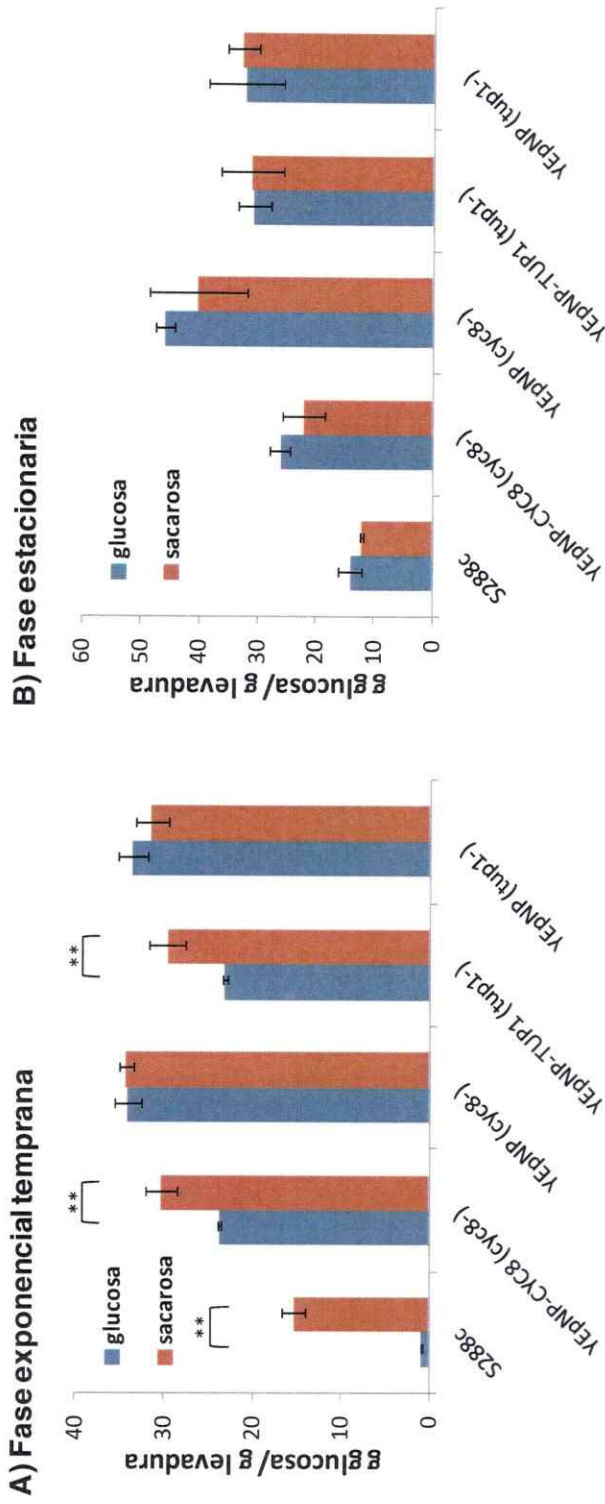


Figura 9. Evaluación de la funcionalidad de los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous* en *S. cerevisiae*: determinación de la actividad invertasa en fase exponencial temprana y estacionaria de crecimiento. Las cepas se cultivaron en medio mínimo SD glucosa 2% (glucosa) o SD sacarosa 2% (sacarosa) y se midió la actividad invertasa en A) fase exponencial temprana (~12-18 h de cultivo a 22 °C; DO₆₀₀~1-2) donde la glucosa remanente en el medio fue de ~15 g/l y en B) fase estacionaria (~36 h de cultivo a 22 °C; DO~3,5-6 dependiendo de cada cepa) donde la glucosa residual en el medio fue en todos los casos menor a 3 g/l. S288c: silvestre, YE_{NP}-CYC8 (cyc8-): cepa *Sc cyc8* transformada con el vector YE_{NP}-CYC8 que contiene el gen de *X. dendrorhous* y YE_{NP} (cyc8-): cepa control transformada con el vector vacío; YE_{NP}-TUP1 (tup1-): cepa *Sc tup1* transformada con el vector YE_{NP}-TUP1 que contiene el gen de *X. dendrorhous* y YE_{NP} (tup1-): cepa control transformada con el vector vacío. Se muestra el valor promedio de tres cultivos independientes. **: p < 0,01, prueba t-student.

También se tomó un segundo conjunto de muestras cuando los cultivos llegaron a fase estacionaria de crecimiento (etapa en que la glucosa remanente en el medio fue menor a 3 g/l) para determinar la actividad invertasa.

En las muestras tomadas en fase exponencial temprana (Figura 9A), se observó claramente que en la cepa silvestre (*S288c*) hay represión de la actividad invertasa en presencia de glucosa. Al comparar sólo las muestras cultivadas en medio SD suplementado con glucosa 2% se observó que las cepas complementadas con los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous* tienen una actividad invertasa ~30% menor a la de sus respectivas cepas control (Figura 9A, barras azules). Adicionalmente, al comparar los cultivos con glucosa y los con sacarosa, se observó que en las cepas que portan los genes de *X. dendrorhous*, hay una disminución de un ~25% de la actividad invertasa en las muestras cultivadas en SD-glucosa 2% respecto a los cultivos en SD-sacarosa 2%. Por otra parte, en las cepas control (transformadas con el vector YEpNP sin inserto) no se observa una diferencia significativa en la actividad invertasa de las muestras cultivadas en presencia o ausencia de glucosa. Estos resultados indican que efectivamente los genes de *X. dendrorhous* estudiados, complementan las respectivas mutaciones en *S. cerevisiae*. Finalmente, como se esperaba, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad invertasa entre los cultivos con o sin glucosa en las muestras tomadas en fase estacionaria (Figura 9B), ya que en esta etapa de crecimiento la glucosa del medio ha sido mayormente consumida y por ende se esperaba que no hubiese represión.

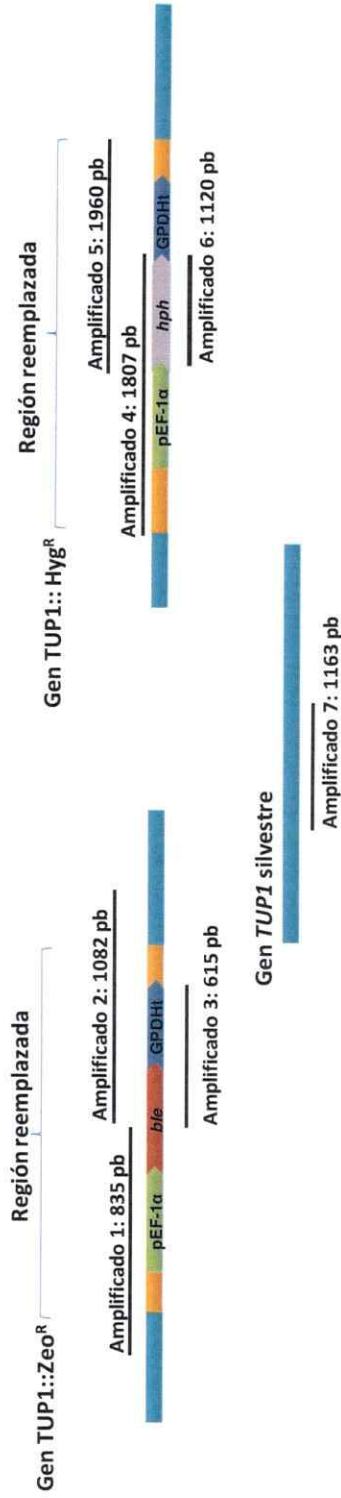
En conjunto, los resultados observados en las Figuras 7, 8 y 9 sugieren que los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous* complementan las mutaciones de los genes correspondientes en *S. cerevisiae*, ya que las cepas que expresan los genes de *X. dendrorhous* muestran una tasa de crecimiento mayor que las cepas control y evidencian una represión de la actividad invertasa extracelular en presencia de glucosa (como consecuencia del fenómeno de represión catabólica en el que participa el co-represor Cyc8-Tup1).

3.1.2.3.- Caracterización funcional de los genes *CYC8* y *TUP1* en *X. dendrorhous*.

Para evaluar la funcionalidad de los genes *CYC8* y *TUP1* en *X. dendrorhous*, se construyeron mutantes *cyc8*⁻ y *tup1*⁻ derivadas de la cepa tipo UCD 67-385 (385) que es diploide (Miller y col., 1976). La mutante *cyc8*⁻ se obtuvo como parte de un trabajo previo (Córdova, 2012), por lo que en el presente trabajo se construyó el mutante *tup1*⁻ de *X. dendrorhous*.

La cepa mutante *tup1*⁻ se obtuvo mediante la técnica de mutagénesis de reemplazo por recombinación homóloga (Niklitschek y col., 2008), donde una parte del gen se reemplazó por un módulo que confiere resistencia a antibiótico. Para esto, se insertó 2,7 kb de la región genómica del gen *TUP1* de *X. dendrorhous* en el vector pBluescript II SK(+)_{XR}, obteniéndose el plásmido pgTUP1C. Posteriormente, pgTUP1C se digirió con la enzima *EcoRV*, lo que permitió escindir un fragmento de 2.003 pb del gen *TUP1*. Finalmente, al vector digerido se le ligó un módulo que confiere resistencia al antibiótico higromicina B o a zeocina, obteniendo los plásmidos pgTUP1C-Hyg y pgTUP1CZeo, respectivamente. De esta manera, los módulos de resistencia quedaron flanqueados por secuencias del gen *TUP1* que permiten dirigir su integración por recombinación homóloga en el *locus TUP1* y así mutar dicho gen (Figura 10A). Utilizando el inserto de pgTUP1Czeo, se realizaron experimentos de transformación mediante electroporación de *X. dendrorhous* y se seleccionaron transformantes resistentes al antibiótico zeocina. Se extrajo DNA genómico de las transformantes seleccionadas y mediante análisis de PCR (Figura 10), se confirmó la mutación de uno de los alelos del gen *TUP1* (Figura 10B, mutante heterocigoto). Posteriormente, la cepa mutante heterocigota (*tup1*⁻/*TUP1*) se transformó con el inserto de pgTUP1C-Hyg y los transformantes se seleccionaron por su resistencia tanto a zeocina como a higromicina B. Finalmente, el análisis por PCR del DNA genómico de las transformantes confirmó la obtención de una cepa mutante homocigota (*tup1*⁻/*tup1*⁻) en que ambos alelos del gen *TUP1* fueron reemplazados por un módulo que confiere resistencia a antibiótico (Figura 10B, mutante homocigoto).

A) Esquema de los genotipos posibles en el locus del gen *TUP1*.



B) Análisis genómico mediante PCR de los mutantes heterocigoto y homocigoto del gen *TUP1*.

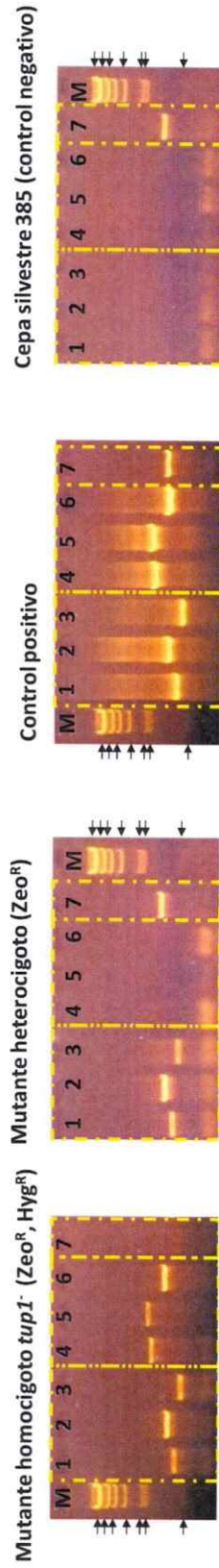


Figura 10. Análisis genómico mediante PCR de los mutantes homocigoto y heterocigoto del gen *TUP1*. Utilizando partidores específicos se confirmó el reemplazo del gen *TUP1* silvestre por el gen interrumpido por módulos de resistencia a antibiótico. A) Esquema de los amplificadores esperados para las distintas combinaciones de partidores (designados como amplificadores del 1 al 7) en los distintos genotipos posibles. Arriba izquierda: gen *TUP1* con el módulo de resistencia a zeocina; arriba derecha: gen *TUP1* con el módulo de resistencia a higromicina B. Abajo: gen *TUP1* silvestre B) Análisis de PCR: las reacciones en los carriles del 1 al 7 se corresponden con la numeración de los amplificadores 1 a 7 esquematizados en A). De izquierda a derecha: mutante homocigoto (Zeo^R , Hyg^R); positivo para reacciones 1 a 6; no posee alelo silvestre), mutante heterocigoto (Zeo^R); positivo para reacciones 1 a 3 y 7; posee un alelo silvestre), control positivo: se usaron los plásmidos pgTUP1CZeo (reacciones 1, 2 y 3) y pgTUP1C-Hyg (reacciones 4, 5 y 6) o gDNA de la cepa UCD 67-385 (reacción 7) y control negativo: cepa silvestre (solo posee alelos silvestres; positivo para reacción 7); Hyg^R : resistente a higromicina B; Zeo^R : resistente a zeocina; M: DNA del fago lambda digerido con la enzima *HindIII*; tamaños en pb de menor a mayor: 564, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416, 23130.

Una vez obtenida la mutante *tup1*⁻ se procedió a evaluar el efecto tanto de esta mutación como de la mutación *cyc8* en la represión mediada por glucosa de la actividad invertasa extracelular en *X. dendrorhous*. Para esto, se cultivaron las cepas mutantes y la cepa silvestre en medio MMv suplementado con 2% de maltosa (MMv-maltosa 2%, condiciones de no represión) o con 2% de glucosa (MMv-glucosa 2%, condiciones de represión) y se midió la actividad invertasa a lo largo del crecimiento a 22 °C. Los resultados muestran que en condiciones de represión (MMv-glucosa 2%) las cepas mutantes tuvieron una mayor actividad invertasa que la cepa silvestre durante todo el tiempo estudiado siendo la mutante *tup1*⁻ la que presentó mayor actividad. Ambas cepas mutantes *cyc8* y *tup1*⁻ presentaron valores máximos de actividad invertasa que son ~2 y ~4 veces mayores, respectivamente, que la actividad máxima observada para la cepa silvestre en presencia de glucosa (Figura 11). Estos resultados sugieren que en ambas cepas mutantes el mecanismo por el cual se reprime la actividad invertasa se encuentra afectado. Además, cabe destacar que en ausencia de glucosa, las cepas mutantes y principalmente la cepa *cyc8*, también alcanzan una mayor actividad que la cepa silvestre, lo que indicaría que incluso en ausencia de glucosa los genes *CYC8* y *TUP1* estarían participando de alguna manera en la regulación de dicha actividad.

Anteriormente, en nuestro laboratorio se determinó que la mutación *cyc8* causa retraso en el crecimiento y aumento en la producción de carotenoides en *X. dendrorhous* (Córdova, 2012) (Figura 12). En atención a esto, se evaluaron los mismos parámetros en la cepa mutante *tup1*⁻. Para evaluar el crecimiento, se cultivó la cepa mutante *tup1*⁻ y la cepa silvestre en medio líquido YM-glucosa y se construyeron curvas de crecimiento midiendo la DO₆₀₀ a lo largo del tiempo. Con los datos obtenidos se calcularon las tasas de crecimiento (μ) para las distintas cepas, siendo de $0,151 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$ (que corresponde a un t_g de $4,6 \pm 0,1 \text{ h}$) y $0,108 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$ (t_g de $6,4 \pm 0,3 \text{ h}$) para la cepa silvestre y mutante *tup1*⁻, respectivamente, comprobando que la mutante *tup1*⁻ presenta un crecimiento más lento que la cepa silvestre al igual que lo observado previamente para la cepa *cyc8* (μ : $0,105 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$ y t_g : $6,5 \pm 0,1 \text{ h}$) (Figura 12A).

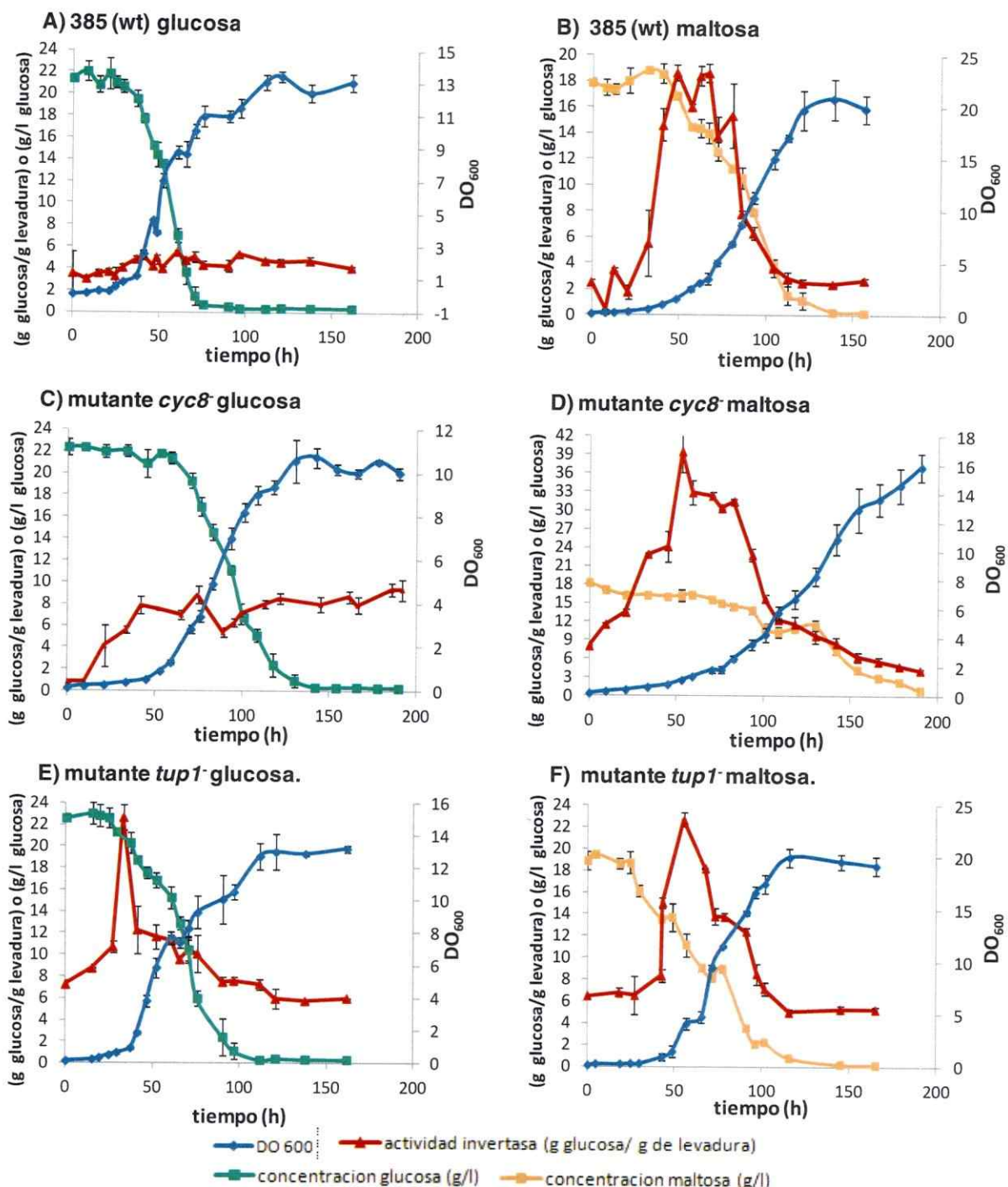
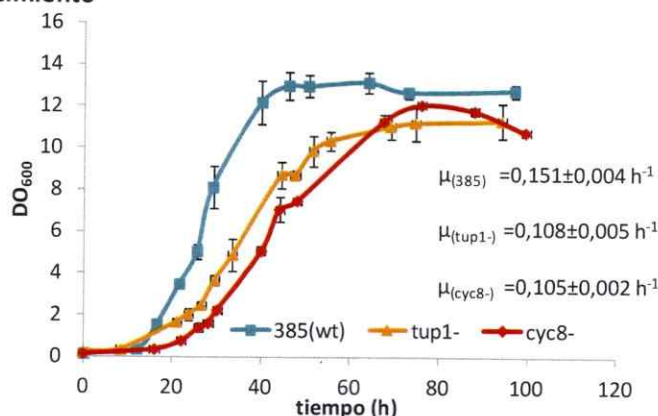
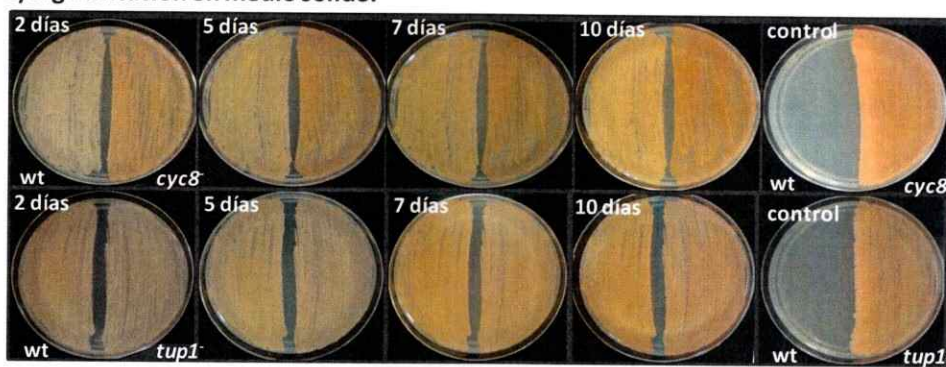


Figura 11. Determinación de la actividad invertasa en las cepas silvestre y mutantes *cyc8* y *tup1* de *X. dendrorhous* en presencia y ausencia de glucosa. Se cultivaron las cepas mutantes y la cepa silvestre en medio mínimo Vogel suplementado con maltosa 2% o glucosa 2%. Se midió la actividad invertasa a lo largo del crecimiento a 22 °C. La actividad se normalizó respecto al peso seco de la levadura. Se muestra el valor promedio de tres cultivos independientes y las barras representan la desviación estándar. A), C) y E) crecimiento y actividad invertasa en glucosa; B), D) y F) crecimiento y actividad invertasa en maltosa en las cepas indicadas en la figura.

A) Crecimiento



B) Pigmentación en medio sólido.



C) Carotenoides

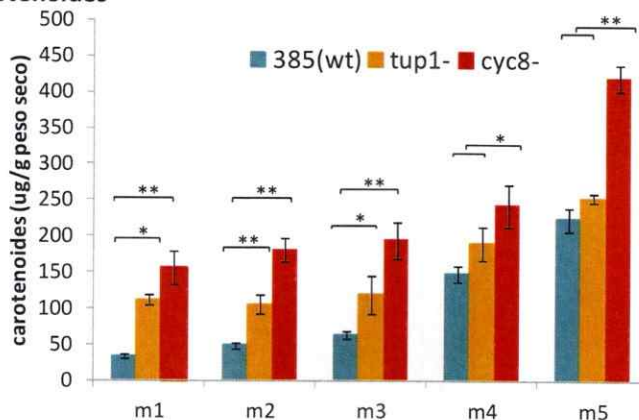


Figura 12. Crecimiento y producción de carotenoides de las cepas *cyc8*, *tup1* y silvestre de *X. dendrorhous*. A) Curvas de crecimiento en medio YM-glucosa. μ : tasa de crecimiento B) Pigmentación de las cepas sembradas en placas con medio YM-glucosa e incubadas a 22 °C durante 10 días. Al lado izquierdo de cada placa se sembró la cepa silvestre y al derecho la cepa mutante. Control: cepas cultivadas en medio suplementado con los antibióticos higromicina B y zeocina. C) Carotenoides producidos en: m1: fase exponencial temprana, m2: fase exponencial media, m3: fase exponencial tardía, m4: fase estacionaria temprana, m5: fase estacionaria tardía. Se muestra el valor promedio de tres cultivos independientes *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, prueba t-student. Las tasas de crecimiento fueron calculadas según modelo de Gompertz utilizando como mínimo 6 datos a lo largo de la curva.

Para evaluar si la mutación *tup1*⁻ tiene un efecto similar a lo observado con la mutación *cyc8* sobre la producción de carotenoides, se evaluó la pigmentación de las distintas cepas sembradas en placas con medio YM-glucosa e incubadas a 22 °C durante 10 días (Figura 12B).

En la figura 12B, se observa claramente que la cepa *cyc8* tiene una pigmentación mayor que la cepa silvestre, siendo esta diferencia evidente desde los 2 días de incubación. Sin embargo, no se observó lo mismo para la cepa *tup1*⁻ donde sólo se observa una leve diferencia de tonalidad con la cepa silvestre luego de 10 días.

Paralelamente, para analizar cuantitativamente la producción de pigmentos en medio YM-glucosa, se colectaron muestras en 5 fases distintas de crecimiento: i) exponencial temprana (DO₆₀₀~1-2), ii) exponencial media (DO₆₀₀~4-5), iii) exponencial tardía (DO₆₀₀~6-8), iv) estacionaria temprana (DO₆₀₀~9-10), y v) estacionaria tardía (DO₆₀₀~10-12) (Figura 12C). Se observó que no hay una diferencia significativa en la producción de carotenoides en la cepa *tup1*⁻ en comparación a la cepa silvestre. Sin embargo, cabe destacar que existe una mayor producción de carotenoides durante las etapas tempranas de crecimiento a diferencia de la cepa *cyc8* que presenta mayor producción de carotenoides durante toda la curva de crecimiento llegando a producir ~90% más que la cepa silvestre en fase estacionaria tardía (Figura 12C) (Córdova, 2012).

Los carotenoides purificados también fueron analizados mediante RP-HPLC (cromatografía líquida de fase reversa) para evaluar si existían diferencias en la composición de carotenoides entre las cepas mutantes y la silvestre (Tabla 5). En el caso de la cepa *tup1*⁻, se observó que las mayores diferencias están en la etapa exponencial tardía, donde los carotenoides obtenidos de la cepa mutante muestran una mayor proporción de astaxantina junto con una menor proporción de beta-caroteno e intermediarios tardíos que la cepa silvestre.

Tabla 5. Composición porcentual de carotenoides en las cepas silvestre (385) y mutantes *tup1* y *cyc8* de *X. dendrorhous* cultivadas en medio YM-glucosa.

Cepas	Carotenoides	Etapas curva de crecimiento				
		M1	M2	M3	M4	M5
385 (wt)	Astaxantina	56,3 ±5,5	61,4±7,1	55,4±4,3	56±7,7	66,8±2,1
	Beta-caroteno	7,2 ±1,1	8,3±1,2	16±1,3	10,3±3,7	7,2±2,9
	l. tempranos	ND	ND	ND	3,0±1,7	2,6±0,6
	l. tardíos	36,5 ±4,4	28,6±3,6	31,6±1,4	32,7±4,3	29,0±4,4
Mutante <i>tup1</i>	Astaxantina	65,9±4,1 *	66,3±3,9	63,6±4,3**	58,0±3,2	55,0±8,0 *
	Beta-caroteno	6,5±1,9	6,9±1,9	7,3±0,9 **	7,1±1,0	14,4±4,0 *
	l. tempranos	ND	ND	2,5±1,0	2,6±0,5	3,4±0,4 *
	l. tardíos	22,5±3,8 **	26,1±1,9	25,6±2,2**	30,4±2,8	31,1±2,0
Mutante <i>cyc8</i> ***	Astaxantina	60,3 ±3	62,4 ±1,8	67,6 ±6*	60,2 ±16	54 ±2,7*
	Beta-caroteno	8,1 ±0,3	4,2 ±2*	7,0 ±2*	9,0 ±4,1	7,7 ±1*
	l. tempranos	6,5 ±2,7**	12,1 ±2**	4,1 ±1,4**	9,7 ±1,2**	3,9 ±2*
	l. tardíos	25,1 ±0,5**	21,3 ±1,8*	21,2 ±2,5*	27,7 ±0,1*	34,6 ±3,8

Intermediarios tempranos (i. tempranos): carotenoides monocíclicos anteriores a beta-caroteno en la ruta de síntesis como: gamma-caroteno y neurosporeno. Intermediarios tardíos (i. tardíos): carotenoides producidos en los pasos que llevan de beta-caroteno a astaxantina que incluyen: equinenona, hidroxiequinenona y fenicoxantina. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$, prueba t-student (comparación con la cepa silvestre). ND: no detectado. *** También se incluyeron los valores para la mutante *cyc8* determinados en trabajos previos (Córdova, 2012).

Luego en la etapa estacionaria tardía se observa que la situación se invierte. Esta observación se podría deber a que los intermediarios acumulados en la cepa silvestre se transforman finalmente en astaxantina, pero la síntesis de carotenoides continúa aumentando en la cepa mutante y junto a ello la proporción de intermediarios tempranos y beta-caroteno por lo que el porcentaje de astaxantina disminuye. En la Tabla 5 también se incluye el análisis de composición de carotenoides para la cepa *cyc8* obtenidos previamente (Córdova, 2012) y se puede observar que las mayores diferencias también se presentan en las fases exponencial y estacionaria tardía.

Adicionalmente, se construyó la curva de crecimiento de las cepas mutantes y silvestre en medio mínimo líquido suplementado con glucosa (MMv-glucosa 2%) como única fuente de carbono (Figura 13). Bajo estas condiciones se observó una disminución general en la tasa de crecimiento respecto a cuando las cepas son cultivadas en medio rico (YM-glucosa 1%) siendo de $0,099 \pm 0,003$, $0,051 \pm 0,003$, $0,075 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$ para las cepas silvestre, *cyc8* y *tup1*, respectivamente. Además, se observó que la DO_{600} alcanzada al final de la curva es menor en la cepa *cyc8*, en comparación a las otras dos cepas. En este caso, se observó una mayor producción de carotenoides desde el inicio de la curva de crecimiento en ambas cepas mutantes. Los carotenoides producidos en fase estacionaria tardía son ~90% y ~40% mayores en las cepas *cyc8* y *tup1*, respectivamente, en comparación con la cepa silvestre (Figura 13B).

También se analizó la composición de los carotenoides purificados a partir de las distintas cepas cultivadas en MMv-glucosa 2% (Tabla 6). En este caso, cabe destacar que la cepa mutante *tup1* muestra una proporción mayor de astaxantina que la cepa silvestre a lo largo de toda la curva de crecimiento, lo que en general va acompañado de un menor porcentaje de intermediarios tardíos (en la cepa mutante). Por otra parte, la cepa *cyc8* muestra una mayor proporción de beta-caroteno en fase exponencial y de astaxantina en etapa estacionaria (Tabla 6) (Córdova, 2012).

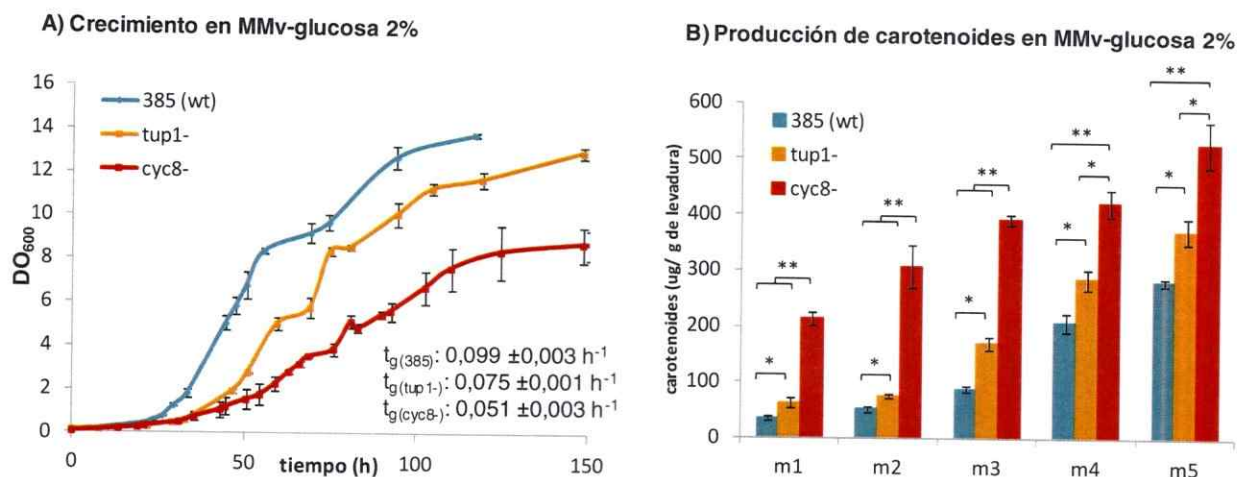


Figura 13. Crecimiento y producción de pigmentos de las cepas *cyc8*⁻, *tup1*⁻ y silvestre de *X. dendrorhous* cultivada en MMv-Glucosa 2%. A) Curvas de crecimiento. Las μ se calcularon utilizando al menos 6 datos a lo largo de la curva. B) Carotenoides producidos en: m1: fase exponencial temprana (DO_{600} : 1-2), m2: fase exponencial media (DO_{600} : 4-5), m3: fase exponencial tardía (DO_{600} : 6-7), m4: fase estacionaria temprana (DO_{600} : 8-10, dependiendo de la cepa), m5: fase estacionaria tardía (DO_{600} : 9-13, dependiendo de la cepa). Se muestra el valor promedio de tres cultivos independientes *: $p < 0,05$ y **: $p < 0,01$ prueba t-student.

Tabla 6. Composición porcentual de carotenoides en las cepas silvestre (385) y mutantes *tup1*⁻ y *cyc8*⁻ de *X. dendrorhous* cultivadas en medio MMv-glucosa 2%.

Cepas	Carotenoides	Etapas curva de crecimiento				
		M1	M2	M3	M4	M5
385 (wt)	Astaxantina	79,2±9,4	76,1±7,6	67,9,2±3,6	69,7±8,0	71,0±2,1
	Beta-caroteno	11,2±6,0	3,9±2,0	7,6±2,6	3,4±1,3	6,4±3,1
	I. tempranos	ND	2,7±0,6	10,9±0,8	8,7±1,0	8,1±0,5
	I. tardíos	10,4±0,7	16,1±2,7	16,7±2,8	15,4±1,4	16,1±1,3
Mutante <i>tup1</i> ⁻	Astaxantina	95,4±1,8 *	86,7±1,8 *	80,9±0,4 *	82,1±5,9 *	79,8±4,0 *
	Beta-caroteno	ND	4,5±0,3	6,3±1,0	4,0±0,8	6,4±1,9
	I. tempranos	4,6±1,8 **	ND *	5,7±1,2 **	6,9±1,2	6,6±0,6
	I. tardíos	ND **	8,8±1,6 *	7,1±0,6 *	5,0±1,6 **	7,1±2,1 **
Mutante <i>cyc8</i> ⁻ ***	Astaxantina	68±3,5	71,2±8	74,7±2,2	83,5±2,5*	86,5±3,2*
	Beta-caroteno	11,4±1,7	8,27±1,2*	13±2,5*	6,6±0,6*	4,8±0,5
	I. tempranos	14,8±4,1**	8,5±1**	9±0,2*	8,1±1,4	6,4±2,3
	I. tardíos	4,4±1,2*	2,2±0,6**	3,5±1,5*	1,7±0,5**	2,3±0,4**

Intermediarios tempranos (i. tempranos): carotenoides monocíclicos anteriores a beta-caroteno en la ruta de síntesis. Intermediarios tardíos (i. tardíos): carotenoides producidos en los pasos que llevan de beta-caroteno a astaxantina. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$, prueba t-student (comparación con la cepa silvestre). ND: no detectado. *** También se muestran los valores para la mutante *cyc8*⁻ determinados en trabajos previos (Córdova, 2012).

3.2 Determinación del efecto de la glucosa sobre la expresión de genes involucrados en carotenogénesis en las cepas mutantes *cyc8* y *tup1* derivadas de la cepa silvestre UCD 67-385.

Para evaluar si el efecto represor que tiene la glucosa sobre la transcripción de genes involucrados en carotenogénesis (Objetivo II) y en la producción de carotenoides (Objetivo III) en la cepa silvestre se ve aliviado en las cepas mutantes *cyc8* y *tup1*, éstas se cultivaron a 22 °C con agitación constante en medio completo YM sin glucosa hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. Luego, cada cultivo se dividió en dos: i) una fracción se suplementó con glucosa a una concentración final de 20 g/l y la otra fracción ii) no recibió tratamiento (control). Cada fracción se incubó bajo las mismas condiciones y se colectaron alícuotas luego de 0, 1, 2, 4, 6, 12 y 24 h post-tratamiento para extraer RNA (Objetivo II) y/o carotenoides (Objetivo III). En la Figura 14 se muestra el crecimiento y concentración de glucosa remanente en el medio de cultivo a lo largo del experimento. Se observó que en todos los casos en la fracción tratada se reanudó el crecimiento como consecuencia del consumo de la glucosa añadida; sin embargo, las dos cepas mutantes mostraron un menor crecimiento que la cepa silvestre durante el tiempo estudiado lo que se vio reflejado en la menor DO_{600} final alcanzada.

A partir de las muestras obtenidas se purificó RNA total que se utilizó para la síntesis de cDNA con el que se pudo determinar la expresión a nivel de mRNA de los genes de interés (*HMGR*, *idi*, *FPS*, *crtE*, *crtI*, *crtYB*, *crtS* y *crtR*) mediante RT-PCR cuantitativo (RT-qPCR). Para verificar que el experimento se realizó de manera adecuada y que los resultados obtenidos son confiables, se determinó como control de represión la expresión a nivel de transcrito de los genes *GRG2* e *INV* y como control de inducción, se usó el gen *PDC* (Marcoleta y col., 2011b; Wozniak y col., 2011).

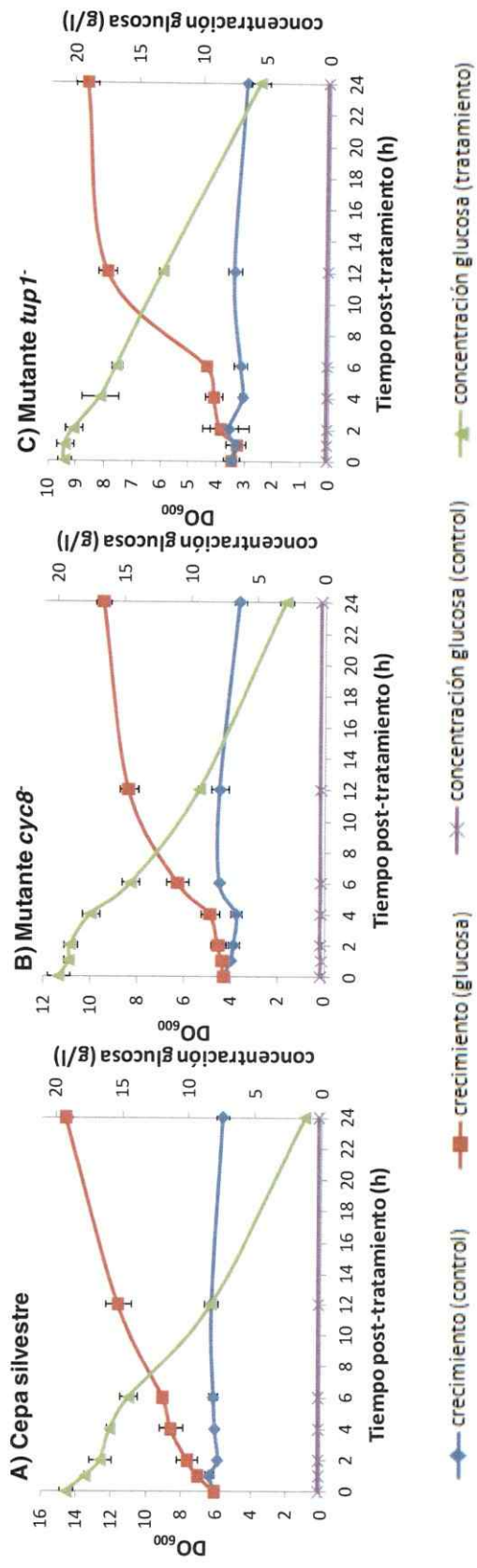


Figura 14. Crecimiento y concentración de glucosa residual en la fracción tratada (glucosa) y control. A) cepa silvestre, B) mutante *cyc8*, C) mutante *tup1*.

En la Figura 15 se observa que existe una diferencia en el efecto que provoca la glucosa en los niveles de transcrito de algunos de los genes estudiados en la cepa mutante *cyc8* en comparación con la cepa silvestre. Las mayores diferencias se observan durante las primeras 6 h post-tratamiento, cuando aún la glucosa es elevada en el medio de cultivo (~15-16 g/l) (Figura 14).

En los genes utilizados como control de represión: *INV* y *GRG2* (Figura 15, A y B) se observan algunas diferencias evidentes entre la cepa silvestre y las mutantes *cyc8* y *tup1*. En el caso del gen *INV* (Figura 15A), en la cepa silvestre sus niveles disminuyen ~13 veces en presencia de glucosa, mientras que en ambas mutantes sólo llega a ser 5 veces menor y en el caso de la cepa *cyc8* aumenta hasta llegar a ser ~9 veces mayor que el control a las 6 h. En el caso del gen *GRG2* se observa una disminución de ~400 veces respecto al control sin tratar en la cepa silvestre y en la mutante *tup1*, mientras que en la cepa mutante *cyc8* (tratada con glucosa) hay una disminución de sólo ~25 veces (Figura 15B). En cuanto al control de inducción por glucosa (*PDC*, Figura 15C), se observa que los niveles de su transcrito aumenta en presencia de glucosa en las tres cepas, pero cabe destacar que este aumento es significativamente mayor en las cepas *cyc8* y *tup1* con un aumento de ~25 y ~11 veces de los niveles del control, respectivamente, mientras que la cepa silvestre sólo mostró un aumento de ~5 veces durante las primeras 6 h.

Cabe destacar que se observan mayores diferencias en genes que están involucrados en pasos tempranos de la síntesis de carotenoides (Figura 1) como lo son *HMGR*, *idi* y *FPS*. En el caso del gen *HMGR*, que codifica la enzima 3-hidroxi-3 metilglutaril-CoA reductasa que participa en la ruta de síntesis de mevalonato de la cual deriva la ruta de carotenogénesis (Loto y col., 2012), se observa que la adición de glucosa tanto en la cepa silvestre como en la cepa *tup1* no tiene un efecto evidente observándose una leve represión durante las primeras 6 h, mientras que en la cepa mutante *cyc8* se produce un aumento en sus niveles de transcrito alcanzándose un máximo de ~25 veces respecto al control (Figura 15D).

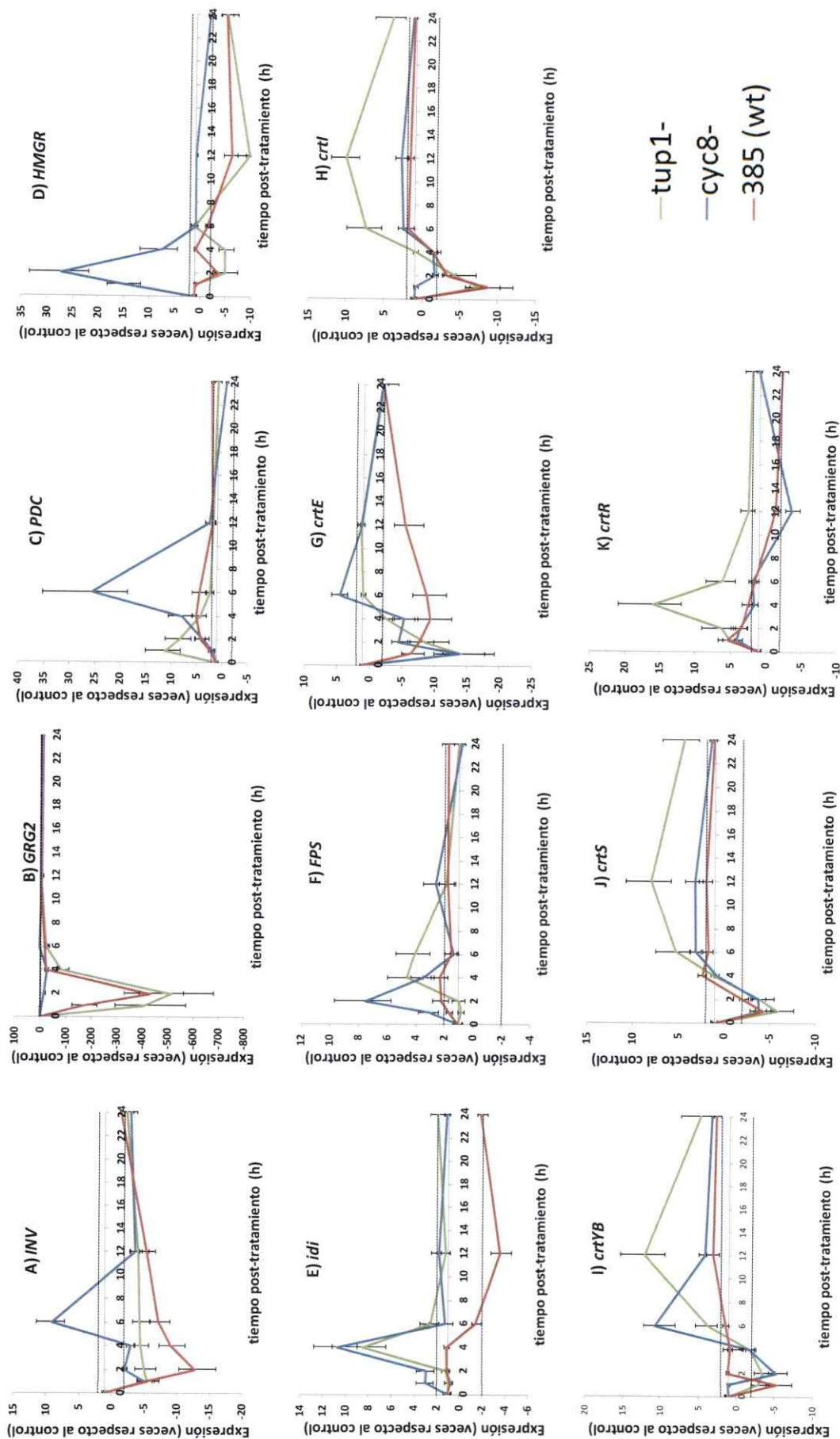


Figura 15. Efecto de la glucosa sobre la expresión a nivel de mRNA de genes involucrados en carotenogénesis en las cepas silvestre y mutantes *cyc8* y *tup1* de *X. dendrorhous*. La cinética de expresión a nivel de mRNA en la cepa silvestre (385) y mutantes *cyc8* y *tup1*, después de la adición de glucosa (20 g/l de concentración final) se determinó respecto al control (sin glucosa) para diferentes genes implicados en la carotenogénesis y para los genes utilizados como control. Genes control: A) *INV* (control represión), B) *GRG2* (control represión) y C) *PDC* (control de inducción). Genes que participan en etapas tempranas de la carotenogénesis: D) *HMGGR*, E) *idi*, F) *FPS*, G) *crtE*. Genes de etapas tardías de la carotenogénesis: H) *crtI*, I) *crtYB*, J) *crtS* y K) *crtR*. El eje horizontal de los gráficos se fijó en 1. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes y las barras representan el error estándar asociado. Los valores dentro del área entre las líneas punteadas no representan un cambio significativo en los niveles de transcrito.

También se observan diferencias en los genes *idi* y *FPS*, cuyos transcritos no se ven mayormente afectados durante las primeras 6 h luego del tratamiento con glucosa en la cepa silvestre; sin embargo, en la cepa mutante *cyc8*⁻ se observa un aumento en los transcritos de estos genes en la fracción tratada llegando a ser ~10 y ~7 veces mayores que en la fracción control, para *idi* y *FPS* respectivamente (Figura 15, E y F). En el caso de la cepa *tup1*⁻ también se observaron diferencias evidentes en estos genes ya que en ambos casos hay un aumento en los niveles de transcrito respecto al control, llegando a ser ~9 y ~5 veces mayor para *idi* y *FPS* respectivamente, lo que no ocurre en la cepa silvestre (Figura 15, E y F).

Por otra parte, en el caso de los genes carotenogénicos *crtE*, *crtI* y *crtYB* (Figura 15, G, H e I), tanto en la cepa silvestre como en ambas cepas mutantes se observa una represión en la fracción tratada con glucosa durante las primeras horas; sin embargo, en el caso del gen *crtE* esta represión se va perdiendo en ambas mutantes luego de 6 h llegando incluso, en el caso de la mutante *cyc8*⁻, a sobrepasar los niveles del control (~5 veces) (Figura 15G), lo que no se observa en la cepa silvestre. Los transcritos del gen *crtI* (Figura 15H), disminuyen tanto en la cepa silvestre como en ambas cepas mutantes en la fracción tratada. En las tres cepas, se recuperan los niveles del control luego de 4 h manteniéndose hasta las 24 h; sin embargo, en la cepa silvestre durante las primeras horas post-tratamiento se observa una disminución en los transcritos de ~9 veces respecto al control, mientras que en la mutante *cyc8*⁻ sólo se observa una disminución de ~2 veces respecto al control y la cepa *tup1*⁻ muestra una recuperación de los niveles de transcrito luego de 6h, alcanzando incluso niveles mayores que el control, lo que no se observa en la cepa silvestre que sólo recupera los niveles del control (Figura 15H). Como se mencionó anteriormente, también se observa en las tres cepas una represión del gen *crtYB* (Figura 15I) al agregar glucosa. En este caso luego de 2 h la cepa silvestre alcanza los niveles del control, mientras que en la cepa mutante *cyc8*⁻ los niveles del control se recuperan luego de ~4 h, observándose posteriormente un aumento en los niveles de transcrito de ~10 veces respecto al control. En el caso de la cepa *tup1*⁻, los niveles de transcrito del gen *crtYB* en la fracción tratada se recuperan luego de 4h, observándose un posterior aumento respecto al



control (Figura 15I). En el caso del gen *crtS*, no existen diferencias evidentes entre la cepa silvestre y ambas cepas mutantes (Figura 15J), observándose una represión de ~4 veces respecto al control. Por otra parte, en las tres cepas se observa un aumento en los niveles de transcrito del gen *crtR* durante las primeras 6 h post-tratamiento; sin embargo, dicho aumento fue de ~ 4-5 veces en la cepa silvestre y *cyc8*, mientras que en la cepa *tup1* el aumento es de ~15 veces los del control (Figura 15K).

En resumen, las diferencias encontradas entre la cepa silvestre y las mutantes *cyc8* y *tup1* en cuanto al efecto que tiene la glucosa en la expresión a nivel de transcritos de algunos genes involucrados en carotenogénesis, podrían explicar en parte el aumento en la producción de carotenoides en éstas últimas.

3.3 Estudiar el efecto de la glucosa sobre la producción de carotenoides en las cepas mutantes *cyc8* y *tup1* derivadas de la cepa silvestre UCD 67-385.

En este objetivo se evaluó si el efecto represor que tiene la glucosa sobre la producción de carotenoides en la cepa silvestre se ve aliviado en las cepas mutantes *cyc8* y *tup1*. Para ello, se realizó el mismo experimento descrito en el objetivo II; sin embargo, cabe destacar que sólo se procesaron las muestras de los tiempos 0, 4, 6, 12 y 24 h post-tratamiento para la extracción de carotenoides. Aún siendo experimentos muy similares, debido a aspectos técnicos y prácticos para el objetivo III, se obtuvieron nuevas muestras para la extracción de carotenoides de un experimento independiente al realizado para el objetivo II. El crecimiento y concentración de glucosa remanente en el medio de cultivo durante el experimento realizado para la extracción de carotenoides se muestran en la Figura 16 (A, B y C).

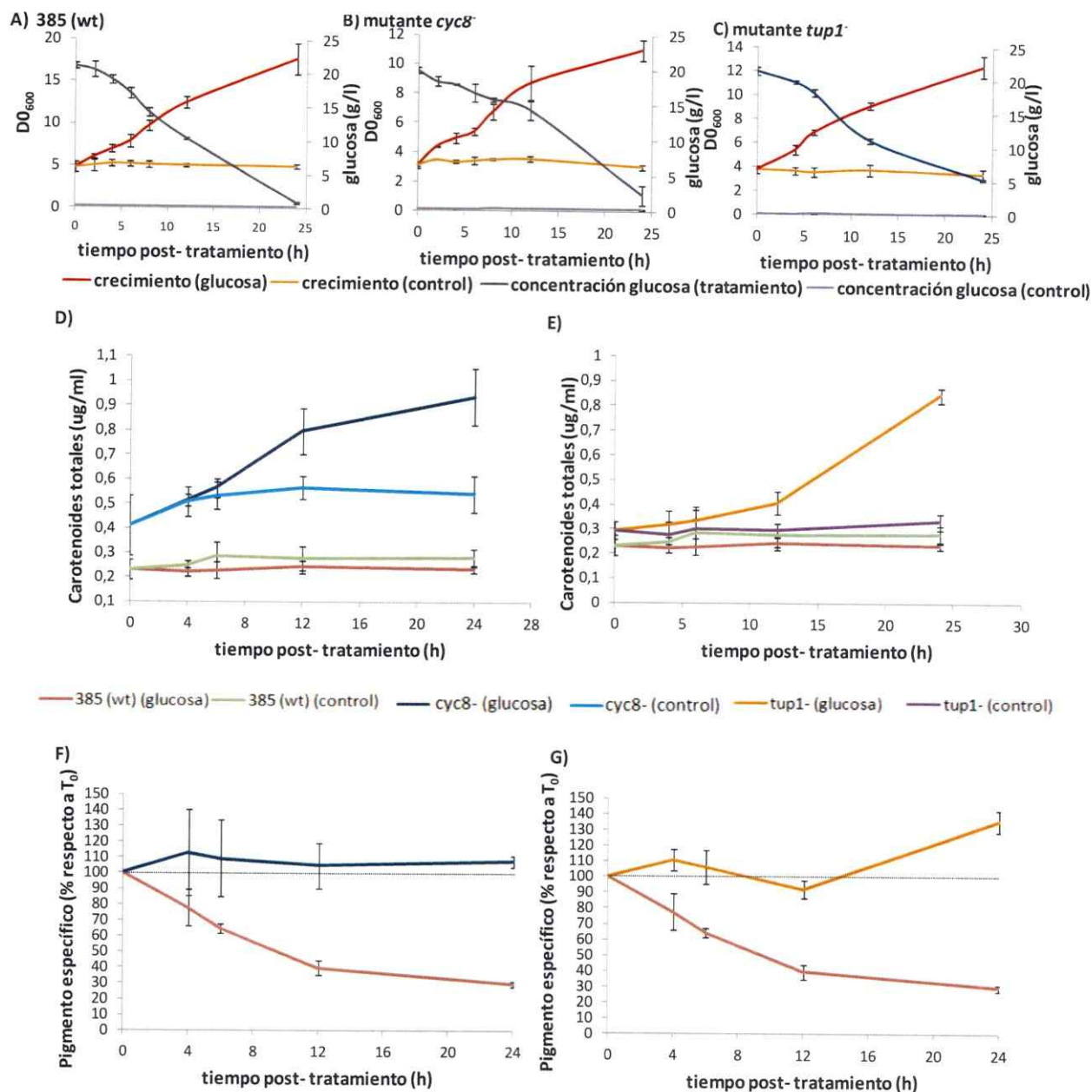


Figura 16. Efecto de la adición de glucosa en la producción de carotenoides en las cepas mutantes *cyc8* y *tup1* de *X. dendrorhous*. Se muestra el crecimiento y concentración de glucosa residual en la fracción tratada (glucosa) y control para A) la cepa silvestre, B) la cepa mutante *cyc8* y C) la cepa mutante *tup1*. La producción de carotenoides totales post-tratamiento para la fracción tratada (glucosa) y control se presenta en D) para la cepa mutante *cyc8* y la silvestre (385) y en E) para la cepa mutante *tup1* y la silvestre (385). Finalmente, se muestra la variación porcentual de la producción de pigmento específico (μg pigmentos/g de peso seco de levadura) respecto a la producción en tiempo 0 (T_0 , antes del tratamiento) en F) para la cepa mutante *cyc8* y la silvestre (385) y en G) para la cepa mutante *tup1* y la silvestre (385), para las fracciones tratadas (glucosa). La línea puntuada corresponde al 100%. Los datos corresponden al promedio de tres cultivos independientes y las barras corresponden a la desviación estándar.

De manera similar a lo observado anteriormente, se observó que en todos los casos la adición de glucosa tiene como consecuencia que se reanude el crecimiento, lo cual se ve reflejado en un aumento de la DO_{600} , aunque luego de 24 h post-tratamiento, las DO_{600} alcanzadas por las mutantes (DO_{600} ~11 y ~13 para *cyc8* y *tup1*, respectivamente) son menores que en la cepa silvestre (DO_{600} ~18) (Figura 16, A, B y C). Se extrajeron los carotenoides y fueron cuantificados por espectrofotometría. Al analizar los carotenoides totales por volumen de cultivo producidos post-tratamiento, es claro que incluso luego de 24 h no se detecta producción de pigmentos en la cepa silvestre (Figura 16, D y E), lo que indica que aunque haya crecimiento al agregar glucosa, éste no va acompañado de la producción de pigmentos. En cambio, al analizar lo que ocurre en las cepas mutantes (fracción tratada) se ve que luego de 24 h post-tratamiento es evidente la producción de carotenoides, siendo aproximadamente 2 y 2,5 veces mayor respecto al control para las cepas mutantes *cyc8* y *tup1* respectivamente (Figura 16, D y E). Paralelamente, al analizar la cantidad específica de carotenoides (pigmento producido por unidad de biomasa) se observó que en la fracción tratada de la cepa silvestre hubo una disminución progresiva llegando a ser aproximadamente 70% menor respecto de la producción antes del tratamiento (tiempo 0) (Figura 16, F y G), lo que puede explicarse por un aumento en la biomasa en ausencia de síntesis de carotenoides. Por otra parte, en el caso de las mutantes *cyc8* y *tup1*, se observó que luego de la adición de glucosa la producción de pigmentos por unidad de biomasa permanece relativamente constante para ambas cepas durante el intervalo de tiempo estudiado (Figura 16, F y G), sugiriendo que en ambos casos el aumento de biomasa va acompañado de producción de carotenoides, lo que no ocurre en la cepa silvestre.

Los resultados obtenidos sugieren que la mutación de los genes *CYC8* y *TUP1* en *X. dendrorhous* causa la pérdida de la represión mediada por glucosa sobre la carotenogénesis en esta levadura.

3.4 Identificación de genes regulados por glucosa y genes de reguladores que interactúan con el complejo Cyc8-Tup1 y comparación de su expresión por análisis bioinformático comparativo de transcriptomas de las cepas silvestre UCD 67-385 y las mutantes *cyc8* y *tup1* de *X. dendrorhous* cultivadas en distintas fuentes de carbono.

Este objetivo se dividió en dos partes, en la primera se analizaron los distintos transcriptomas en busca de genes regulados por glucosa y que tengan una expresión diferente entre la cepa silvestre y las mutantes *cyc8* y *tup1*. En la segunda parte, el análisis se enfocó en identificar genes de posibles reguladores descritos en la literatura que podrían interactuar con el complejo Cyc8-Tup1 afectando diferentes procesos en *X. dendrorhous*.

3.4.1 Parte I: identificación de posibles genes regulados por glucosa.

En este estudio se analizó y comparó los transcriptomas de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* y de las mutantes *cyc8* y *tup1* (derivadas de dicha cepa), obtenidos a partir de RNA de cultivos crecidos durante 36 h en MMv suplementado con glucosa, maltosa o succinato como única fuente de carbono. En primera instancia, se analizaron genes de interés previamente identificados en nuestro laboratorio entre los que destacan aquellos que controlan la carotenogénesis, genes de la vía del mevalonato y síntesis de ergosterol. La expresión de cada gen se estimó determinando su valor RPKM (*Reads Per Kilobase per Million Mapped reads*) (Mortazavi y col., 2008) en cada transcriptoma analizado y se evaluó la diferencia en expresión (de acuerdo a los valores de RPKM) en las distintas cepas en las diferentes condiciones estudiadas. De los distintos genes analizados, se seleccionaron aquellos que en la cepa silvestre tenían una representación mayor en los transcriptomas obtenidos en succinato o maltosa en comparación a su representación en el transcriptoma obtenido en glucosa; además, se comparó los resultados obtenidos para dichos genes en las cepas mutantes *cyc8* y *tup1*. En la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 7. Genes de *X. dendrorhous* potencialmente regulados por glucosa, homólogos a los descritos en otras levaduras.

gen/producto	Proceso biológico	385	<i>cyc8</i>	<i>tup1</i>	Glucosa	
		g/s	g/s	g/s	<i>cyc8/385</i>	<i>tup1/385</i>
<i>crtE/</i> geranil geranil pirofosfato sintasa	Síntesis de esteroides/isoprenoides	0,1	0,2	0,2	1,3	0,9
<i>crtS/</i> astaxantina sintasa	Síntesis de carotenoides	0,5	1,3	1,2	2,1	2,0
<i>crtR/</i> citocromo p450 oxidoreductasa		0,8	1,3	0,4	1,1	0,7
<i>FBP1/</i> fructosa 1,6 bisfosfatasa	Gluconeogenesis	0,2	0,5	0,4	1,0	1,7
<i>PCK1/</i> PEP carboxiquinasa		0,01	1,0	0,04	19,7	2,5
<i>MLS1/</i> malato sintasa	Ciclo del glioxilato	0,8	0,7	0,2	0,4	0,3
<i>ICL1/</i> Isocitrato liasa		0,2	1,1	0,2	0,5	0,7
<i>GAA/</i> glucan 1,4 α glucosidasa (glucoamilasa)		0,5	2,1	0,8	1,0	2,2
<i>GSY1/</i> glicógeno sintasa	Metabolismo de carbohidratos	0,7	1,9	1,1	0,8	1,4
<i>treS/</i> trehalosa sintasa		0,3	0,4	2,2	1,2	6,3
<i>INV/</i> β -fructofuranosidase		0,4	0,5	0,8	2,4	2,8
<i>SNF4/</i> Complejo quinasa SNF1, subunidad γ	Regulación del metabolismo de carbohidratos	0,7	1,4	1,1	1,0	1,5
<i>SNF3/</i> sensor de glucosa	Señalización por glucosa	0,7	1,9	0,9	4,3	2,0
<i>ADH/</i> Alcohol deshidrogenasa	Metabolismo de alcoholes	0,4	0,5	2,0	4,3	3,4
<i>POX1/</i> acyl CoA oxidasa	Metabolismo de ácidos grasos.	0,4	0,7	1,2	2,3	2,9
<i>ERG10a/</i> cetoacil CoA tiasa		0,3	0,4	1,1	2,3	3,3
<i>GRG2/</i> gen represible por glucosa 2	Desconocido	0,6	1,1	1,0	0,9	2,0

Los genes se encuentran agrupados según el proceso en que participan. La expresión de cada gen se determinó según su valor RPKM en los diferentes transcriptomas analizados. Razón g/ s: razón entre la representación en glucosa y succinato. Las relaciones entre los valores obtenidos en glucosa en comparación a succinato o a maltosa, son muy similares por lo que en la Tabla 7 sólo se muestra la comparación entre glucosa y succinato (análisis con maltosa en Tabla 1, ANEXO). En las últimas dos columnas se compara lo obtenido en glucosa entre la cepa silvestre y las dos cepas mutantes. PEP: fosfoenolpiruvato.

Entre los transcritos analizados, destaca el del gen carotenogénico *crtS*, donde hay una represión por glucosa en la cepa silvestre, que no se observa en las cepas mutantes. El efecto de la glucosa es más claro en los transcritos de los genes *FBP1* y *PCK1* que codifican enzimas necesarias para la gluconeogénesis. En ambos casos, se observa que sus transcritos se encuentran menos representados en el transcriptoma en presencia de glucosa en comparación al transcriptoma en succinato de la cepa silvestre, mientras que en las cepas mutantes, la diferencia entre ambas condiciones es menor, sobre todo en la cepa *cyc8* que no muestra diferencias en los niveles de transcrito del gen *PCK1* en las distintas condiciones. Por otra parte, se observó que en ambas cepas mutantes la representación de estos dos transcritos en glucosa es mayor que en la cepa silvestre. En el caso de los genes *MLS1* y *ICL1*, que codifican enzimas involucradas en el ciclo del glioxilato, se observó una posible represión por glucosa en la cepa silvestre; sin embargo, no hay grandes diferencias en las cepas mutantes, excepto en la cepa *cyc8* donde el transcrito del gen *ICL1* se ve igualmente representado en los transcriptomas en glucosa o succinato. Además, se puede mencionar que transcritos de genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos, tales como aquellos involucrados en la utilización de otros azúcares (distintos de glucosa) y en la síntesis de polisacáridos de almacenamiento, acorde a lo esperado, se ven en su mayoría reprimidos en presencia de glucosa en la cepa silvestre, lo que se ve aliviado al menos en parte en una o ambas cepas mutantes. Algo similar se observa también para el transcrito del gen *ADH* involucrado en la utilización de etanol. Por otra parte, se analizaron los transcritos de genes involucrados en el metabolismo de ácidos grasos (posiblemente en la degradación de éstos) como *POX1* y *ERG10a* (este último está siendo actualmente estudiado en una Tesis en curso; datos no publicados), que son reprimidos en presencia de glucosa en la cepa silvestre al igual como ocurre en *S. cerevisiae* (Zimmerman y Entian, 1997). Finalmente, en el caso de los transcritos del gen *GRR2*, de función desconocida, el resultado coincide con lo esperado, existiendo una menor representación en glucosa en la cepa silvestre en comparación a las cepas mutantes.

Con el objetivo de encontrar más genes que pudiesen verse afectados al mutar los genes *CYC8* o *TUP1* en *X. dendrorhous*, se analizó la expresión de distintos ORFs identificados en los transcriptomas. Previamente, en el análisis de los transcriptomas se identificaron 9.669 ORFs presentes en todos los transcriptomas estudiados, posteriormente al realizar el análisis de BLAST (utilizando el programa CLC Workbench) de estos ORFs, sólo 5.332 mostraron tener similitud con alguna de las secuencias disponibles en la base de datos del NCBI. Se obtuvo los valores de RPKM para todos los ORFs analizados y se determinó cuales de estos posibles genes se encontraban mayormente representados en los transcriptomas obtenidos en glucosa en las mutantes *cyc8* o *tup1* en comparación a la cepa silvestre. Para esto se determinó cuales ORFs tenían un valor de RPKM mayor o igual a 2,5 veces el valor en la cepa silvestre. Se encontraron 284 y 161 ORFs cuyos transcritos estaban mayormente representados en los transcriptomas en glucosa de las cepas *cyc8* y *tup1*.

Para identificar qué estarían codificando los distintos ORFs, se obtuvieron las secuencias aminoacídicas de las posibles proteínas codificadas mediante traducción *in silico* y posteriormente se analizaron con la herramienta BLASTp utilizando la base de datos *Fungi*. Como criterio para asignar una posible función se utilizó un E-value menor a $1,0 \cdot 10^{-3}$ y un porcentaje de identidad mayor a 35%. La cobertura de las secuencias se analizó caso a caso, procurando que se incluyera en el análisis el dominio funcional o motivo característico de la proteína identificada. Entre los ORFs analizados, ~90 mostraron similitud sólo con proteínas hipotéticas o de función desconocida, mientras que otros 85 no cumplieron con los criterios establecidos, por lo que fueron descartados. Es así, que de los ORFs analizados se pudo asignar una posible función a 259; de éstos, 166 se encuentran mayormente representados en el transcriptoma de glucosa de la mutante *cyc8* y 93 en la cepa *tup1*. Sólo 30 de ellos fueron comunes para ambas cepas mutantes. Los posibles genes identificados se clasificaron según el proceso biológico en el que participaría el correspondiente producto génico según la base de datos UniProt disponible en internet (www.uniprot.org). De esta manera se definieron 14 grupos de genes relacionados con los siguientes procesos biológicos: Transporte transmembrana,

transcripción y regulación de la transcripción, metabolismo de carbohidratos, metabolismo de lípidos/esteroles/isoprenoides, metabolismo de alcoholes, síntesis y metabolismo de aminoácidos, metabolismo y modificación de proteínas, transducción de señales, ciclo de Krebs/cadena respiratoria/metabolismo de NAD y NADP, respuesta a estrés, reparación de DNA, metabolismo del DNA/RNA, metabolismo de hierro y metabolismo de compuestos nitrogenados y otros compuestos orgánicos.

Entre los 166 ORFs que se encontraron mayormente representados en el transcriptoma (en glucosa) de la cepa *cyc8* en comparación a la cepa silvestre, la mayoría se encontró involucrado en procesos de transporte de transmembrana, particularmente aquellos identificados como transportadores pertenecientes a la familia MFS (*Major Facilitator Superfamily*) entre los que destacan transportadores de glucosa (de alta afinidad), de galactosa, de aminoácidos y transportadores asociados con la resistencia a drogas. También destacan ORFs de genes involucrados en transcripción y regulación de la transcripción que en su mayoría codifican diversos reguladores transcripcionales principalmente activadores tales como nit-4 (para la asimilación de nitratos) (Yuan y Marzluf, 1992), CAT8 (activador de genes de gluconeogénesis) (Hedges y col., 1995) y factores tipo velvet involucrados principalmente en desarrollo morfológico y vías defensivas (Ahmed y col., 2013). Por otra parte, se encontraron ORFs de genes del metabolismo de carbohidratos, como diversas glucósido hidrolasas, entre ellas, la α -amilasa para la utilización de almidón y también de genes involucrados en catabolismo de aminoácidos. Cabe mencionar que también se encontraron en menor cantidad ORFs de genes pertenecientes a los otros grupos definidos anteriormente como de respuesta a estrés, entre los que destacan algunos de glutaredoxinas involucrados en respuesta a estrés oxidativo (Luikenhuis y col., 1998).

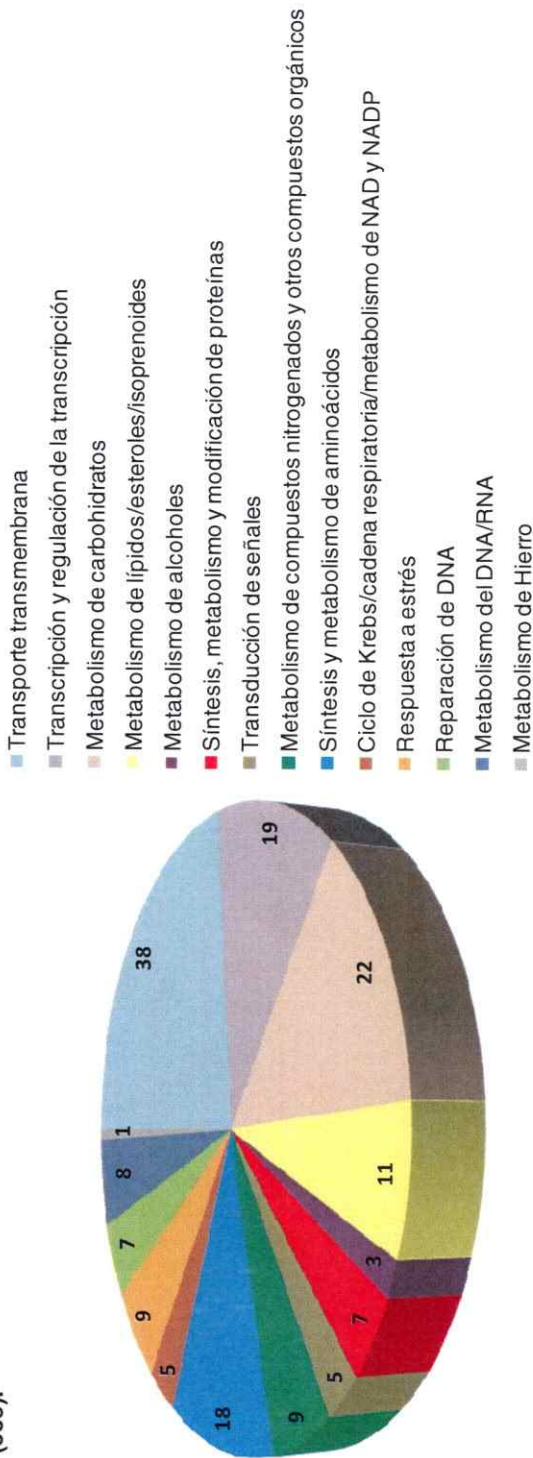
La distribución en cuanto al proceso biológico en que participan los potenciales genes se muestra en la figura 17A y el detalle de todos los posibles genes identificados se encuentra en la Tabla II (ANEXO). Es importante mencionar que en el transcriptoma (en glucosa) de la cepa *cyc8* se encontró 113 transcritos de genes cuyo valor de RPKM fue entre 2,5 y 5 veces mayor

que el valor correspondiente en la cepa silvestre (Figura 17B), 32 transcritos con una representación entre 5 y 10 veces mayor (Figura 17C) y 21 transcritos que tuvieron un RPKM mayor o igual a 10 veces el de la cepa silvestre (Figura 17D). En este último grupo de ORFs, destaca el ORF que codificaría la enzima mevalonato quinasa que participa en la ruta del mevalonato y cuyo producto IPP es el precursor de todos los isoprenoides, entre ellos los carotenoides (Loto y col., 2012).

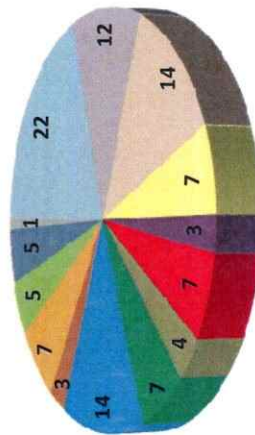
Paralelamente, en el análisis de los 93 ORFs que se encontraron mayormente representados en el transcriptoma (en glucosa) de la cepa *tup1* en comparación a la cepa silvestre, se encontró nuevamente que la mayoría se encontraban involucrados en procesos de transporte de transmembrana como transportadores de hexosas, aminoácidos e involucrados en la resistencia a drogas, también en transcripción y regulación de la transcripción como activadores del ciclo del glioxilato (para la utilización de ácido acético) (Augstein y col., 2003), del catabolismo de proteínas y de la respuesta a estrés. Dentro de este último grupo de regulación de la transcripción cabe destacar el ORF que codificaría la proteína CreC involucrada en represión catabólica, específicamente en el alivio de la represión en ausencia de glucosa (Todd y col., 2000; Lockington y Kelly, 2001). También se encontraron ORFs que codificarían genes del metabolismo de carbohidratos y del metabolismo de lípidos, destacando en el primer caso que se encontraron los de 3 enzimas (UDP-galactosa 4-epimerasa, galactosa 1 fosfato uridilil transferasa y galactosa mutarotasa) de las 5 necesarias para la utilización de galactosa (Timson, 2007).

La distribución de los distintos procesos biológicos en que participarían las proteínas codificadas por los distintos ORFs se muestra en la Figura 18A y el detalle de todos los posibles genes identificados se encuentra en la Tabla III (ANEXO).

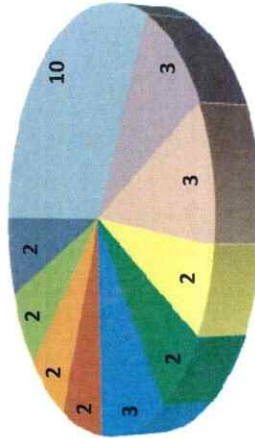
A) Distribución de genes mayormente representados en el transcriptoma de glucosa de la cepa *cyc8* en comparación con el de la cepa silvestre (385).



B) Cepa mutante *cyc8*: distribución de genes con RPKM entre 2,5 y 5 veces mayor que el valor en la cepa silvestre (385).



C) Cepa mutante *cyc8*: distribución de genes con RPKM entre 5 y 10 veces mayor que el valor en la cepa silvestre (385).



D) Cepa mutante *cyc8*: distribución de genes con RPKM 10 o más veces mayor que el valor en la cepa silvestre (385).

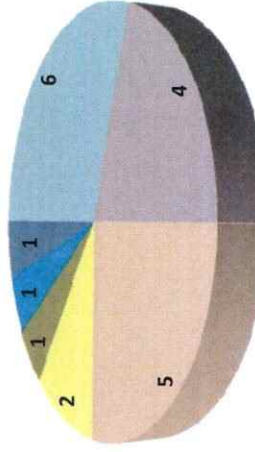
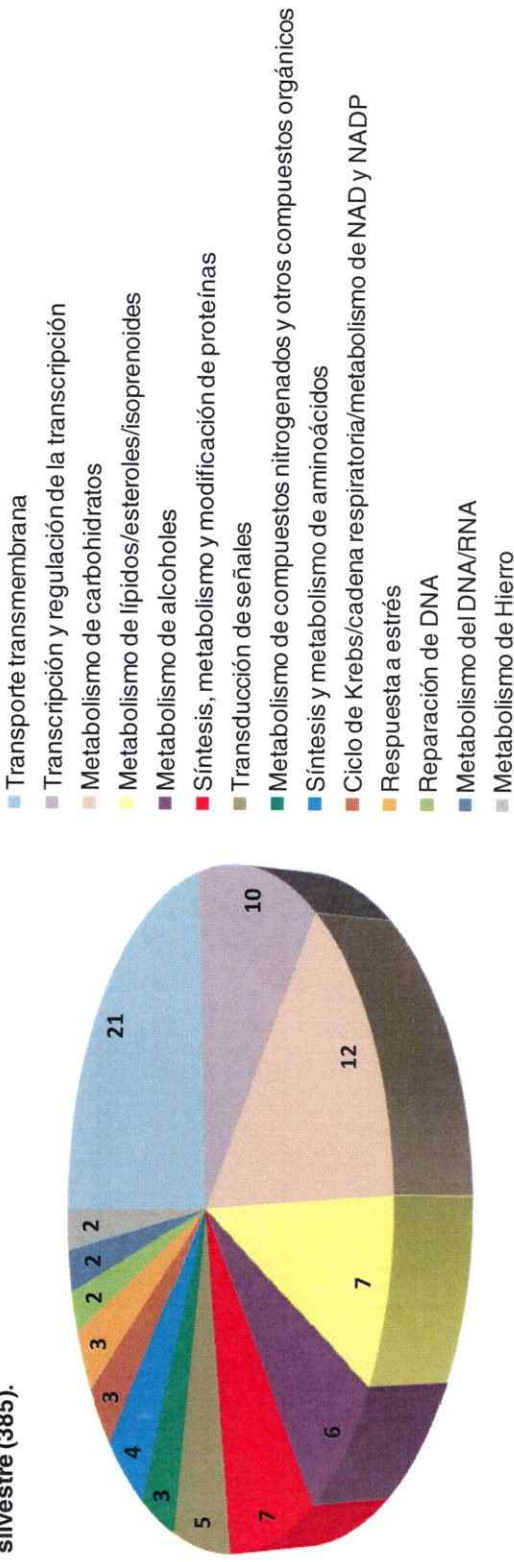
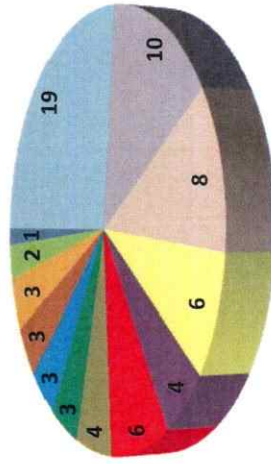


Figura 17. Distribución de la participación en diferentes procesos biológicos de los posibles genes identificados que se encuentran mayormente representados en el transcriptoma en glucosa de la cepa *cyc8* en comparación a la cepa silvestre (385). A) Distribución del total de los genes (166), B) distribución de genes con RPKM entre 2,5 y 5 veces mayor que el valor en la cepa silvestre (113 genes), C) distribución de genes con RPKM entre 5 y 10 veces mayor que el valor en la cepa silvestre (32 genes) y D) distribución de genes con RPKM 10 o más veces mayor que el valor en la cepa silvestre (21 genes). Los números indican la cantidad de genes dentro de cada categoría. Los gráficos fueron contruidos en base a los datos de la tabla II (A,B y C) del ANEXO. La clave de colores que se muestra en A es válida para los cuatro gráficos.

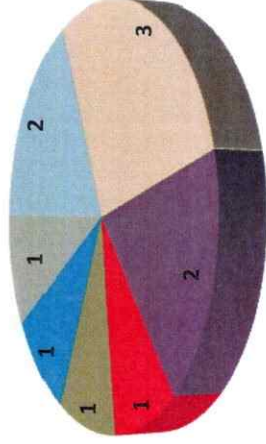
A) Distribución de genes mayormente representados en el transcriptoma de glucosa de la cepa *tup1⁻* en comparación con el de la cepa silvestre (385).



B) Cepa mutante *tup1⁻*: distribución de genes con RPKM entre 2,5 y 5 veces mayor que el valor en la cepa silvestre (385).



C) Cepa mutante *tup1⁻*: distribución de genes con RPKM entre 5 y 10 veces mayor que el valor en la cepa silvestre (385).



D) Cepa mutante *tup1⁻*: distribución de genes con RPKM 10 o más veces mayor que el valor en la cepa silvestre (385).

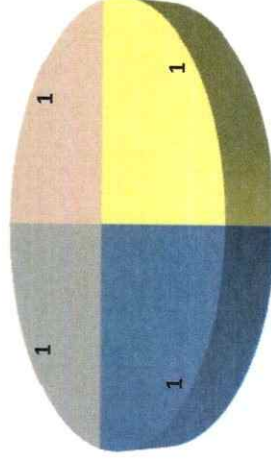


Figura 18. Distribución de la participación en diferentes procesos biológicos de los posibles genes identificados que se encuentran mayormente representados en el transcriptoma de glucosa de la cepa *tup1⁻* en comparación a la cepa silvestre (385). A) Distribución del total de los genes (93 genes), B) distribución de genes con RPKM entre 2,5 y 5 veces mayor que el valor en la cepa silvestre (75 genes), C) genes con RPKM entre 5 y 10 veces mayor que el valor en la cepa silvestre (14 genes) y D) distribución de genes dentro de cada categoría. Los gráficos fueron contruidos en base a los datos de la tabla III (A,B y C) del ANEXO. La clave de colores que se muestra en A es válida para los cuatro gráficos.

En el transcriptoma (en glucosa) de la cepa *tup1*⁻ se encontraron 75 ORFs cuyo valor de RPKM fue entre 2,5 y 5 veces mayor que el valor correspondiente en la cepa silvestre (Figura 18B), 14 ORFs con una representación entre 5 y 10 veces mayor (Figura 18C) y 4 ORFs que tuvieron un RPKM mayor o igual a 10 veces el de la cepa silvestre (Figura 18D). Dentro de los ORFs en estos últimos dos grupos, destacan algunos que codificarían enzimas involucradas en metabolismo de carbohidratos y respuesta a estrés, tales como las enzimas del metabolismo de trehalosa y una proteína de respuesta universal a estrés similar a UspA que en la cepa silvestre estarían reprimidas en presencia de glucosa al igual que lo observado en *S. cerevisiae* (Rolland y col., 2002). Finalmente, destaca la enzima metilesterol monooxigenasa involucrada en síntesis de ergosterol y ácidos grasos, que se ha observado en estudios previos que se relacionan con la síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous* (Miao y col., 2011; Loto y col., 2012).

Como se mencionó previamente hubo 30 ORFs que en ambas cepas mutantes se vieron mayormente representados en el transcriptoma en glucosa en comparación a la cepa silvestre (Tabla IV, ANEXO). Entre éstos, la mayoría se encontraron dentro del grupo de transporte de transmembrana, pertenecientes en su mayoría a transportadores de la familia MFS dentro de los cuales hay transportadores de sustratos en general, transportadores de azúcares y transportadores involucrados en la resistencia a drogas (Saier y col., 1999; Law y col., 2008). También se encontraron ORFs que codificarían enzimas involucradas en metabolismo de carbohidratos como α y β glucosidasas necesarias para la utilización de distintos polisacáridos. Por otra parte, ORFs que codificarían 3 factores de transcripción, uno de ellos relacionado con la respuesta a estrés, se encuentran afectados en las cepas mutantes *cyc8*⁻ y *tup1*⁻ (Figura 19).

Según el análisis de los diferentes transcriptomas se puede destacar que en ambas cepas mutantes la mayoría de los genes cuyos transcritos se encuentran mayormente representados están involucrados en transporte transmembrana de diversos sustratos, metabolismo de carbohidratos, principalmente azúcares y polisacáridos, también en el metabolismo de lípidos, aminoácidos y en respuesta a estrés, siendo estos últimos un blanco conocido de la represión catabólica (Rolland y col., 2002).

A) Distribución de los genes afectados en ambas cepas mutantes: *cyc8* y *tup1*

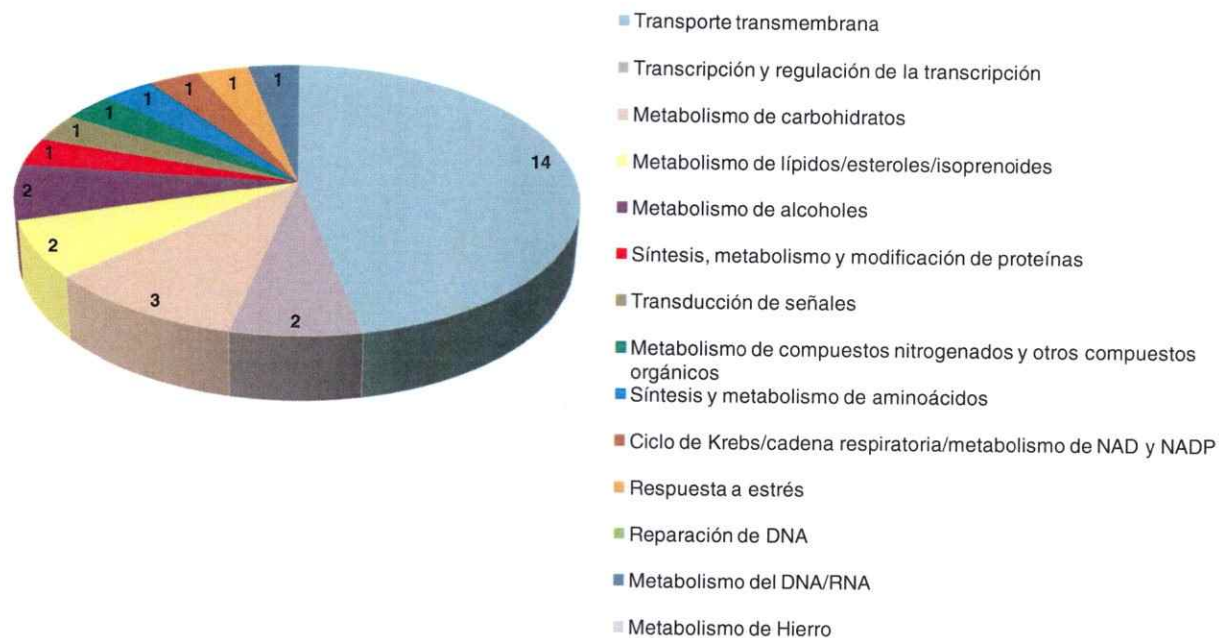


Figura 19. Distribución de la participación en diferentes procesos biológicos de los genes comunes que se encuentran mayormente representados en el transcriptoma en glucosa en ambas cepas mutantes en comparación a la cepa silvestre (385). Los números indican la cantidad de genes dentro de cada categoría. El gráfico fue construido en base a los datos de la tabla IV del ANEXO.

Además se encontraron ORFs que codificarían diversos reguladores de la transcripción, principalmente activadores involucrados en diversos procesos que estarían regulados por glucosa en la cepa silvestre tales como gluconeogénesis, asimilación de compuestos nitrogenados y respuesta a estrés.

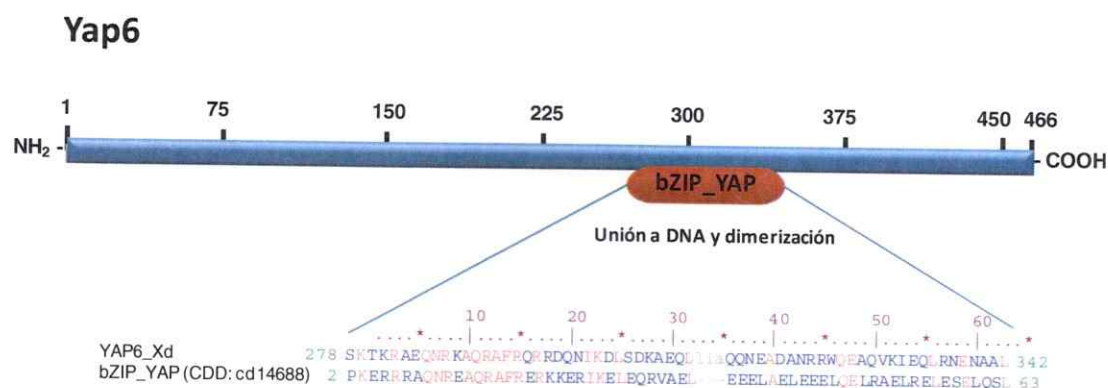
3.4.2 Parte II: identificación de posibles genes de reguladores que interactúan con el complejo Cyc8-Tup1.

Con el objetivo de continuar caracterizando la función del complejo Cyc8-Tup1 en *X. dendrorhous*, se analizaron los distintos transcriptomas en búsqueda de ORFs que codificarían reguladores que al igual que Mig1 interactuarían con el complejo, dirigiéndolo hacia los promotores de determinados genes. Para esto se obtuvo secuencias de los reguladores de interés descritas en otros organismos que estaban disponibles en la base de datos del NCBI. A partir de estas secuencias y ocupando el programa CLC Workbench se analizaron los transcriptomas en búsqueda de ORFs que estarían codificando proteínas con secuencia aminoacídica de alta identidad con los distintos reguladores de interés. Tomando como base los reguladores que se han descrito en otros organismos como *S. cerevisiae* que interactúan con el complejo Cyc8-Tup1, se buscó identificar principalmente genes de factores de transcripción involucrados en la regulación de distintos grupos de genes, entre ellos: Crt1 (Rfx1) que regula genes inducidos por daño en el DNA (Huang y col., 1998; Smith y Johnson, 2000; Zhang y Reese, 2005), Rox1 regulador de genes inducidos en hipoxia (Balasubramanian y col., 1993), Sko1 regulador de genes inducidos en respuesta a estrés osmótico (Proft y Struhl, 2002), Aft1 regulador genes implicados en la utilización de hierro (Yamaguchi-Iwai y col., 1995; Fragiadakis y col., 2004), Cup9 regulador de genes para la captación de péptidos (Xia y col., 2008), Rgt1 regulador de genes de transportadores de glucosa (Rolland y col., 2002; Polish y co, 2004; Roy y col., 2014), Opi1 regulador de la biosíntesis de fosfolípidos (White y col., 1991; Jaschke y col., 2011), Yap4 (Cin5) y Yap6 involucrados en regulación de genes de tolerancia salina y estrés osmótico y Skn7 regulador de genes de respuesta a estrés oxidativo (Hanlon y col., 2011).

Luego del análisis de los transcriptomas disponibles en nuestro laboratorio, sólo se pudo identificar posibles ORFs de los reguladores Yap6, Skn7, Rox1, Crt1 (Rfx1), Rgt1 y Opi1 (Secuencias 2 a 7, ANEXO). Los resultados de los análisis respectivos se observan en las figuras 20 a 25. En primera instancia se utilizó la secuencia aminoacídica deducida de cada uno de los ORFs seleccionados y se analizó mediante BLASTp para la identificación de dominios conservados. Paralelamente se realizó un análisis utilizando la herramienta SMART BLAST del NCBI la cual proporciona un resumen de los mejores alineamientos con secuencias de la base de datos y también utiliza como referencia genes caracterizados de organismos modelo, lo que permite una identificación más precisa de la secuencia que se está analizando. De acuerdo a lo anterior, en la Figura 20 se muestran los resultados del análisis de la secuencia aminoacídica del posible regulador Yap6 de *X. dendrorhous*. En este caso, la proteína Yap6 deducida consta de 466 aminoácidos y tiene un dominio de unión a DNA tipo cremallera de leucina básico (bZIP) (Figura 20A), característico de factores de transcripción tipo YAP involucrados en respuesta a diversos tipos de estrés. Adicionalmente, tanto el análisis de BLASTp como el de SMART BLAST sugieren que la proteína analizada correspondería al factor Yap6 y podría estar involucrada en la regulación de genes de respuesta a estrés osmótico (tolerancia salina) mediante la interacción con el complejo Cyc8-Tup1 (Hanlon y col., 2011) (Figura, 20, B y C).

Como se mencionó anteriormente, también se logró identificar un ORF que codificaría el factor Skn7. La proteína Skn7 deducida de *X. dendrorhous* consta de 1.016 aminoácidos y hacia su extremo carboxilo terminal se identificó un dominio receptor de señal (REC) (Figura 21A) característico de proteínas que forman parte de un sistema de señalización de dos componentes y que también es necesario para la formación de homodímeros. Además, hacia el extremo amino terminal se identificó un dominio de unión a DNA tipo HSF el cual es necesario para el reconocimiento de secuencias específicas de DNA y la función efectora del factor de transcripción (Xin-Jian y col., 2009).

A) Esquema proteína Yap6 de *X. dendrorhous* deducida *in silico*



B) Análisis mediante *BLASTp*

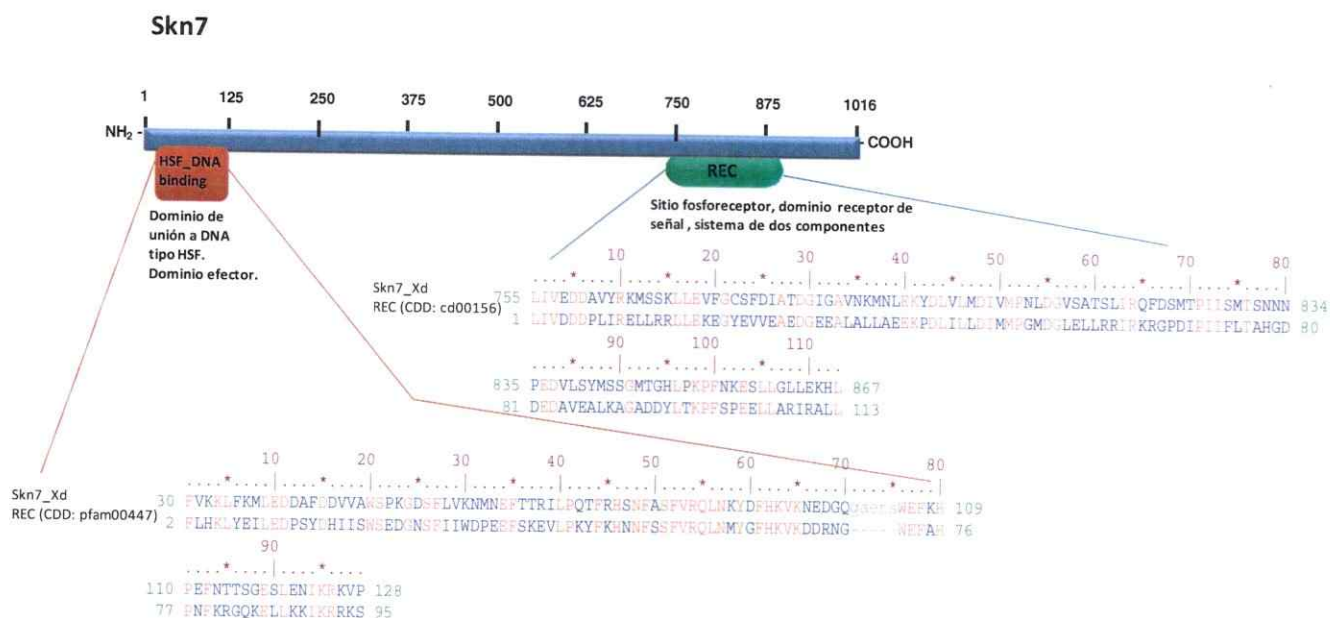
Descripción	Cobertura	E value	identidad
Basic-leucine zipper domain [<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>]	99%	0.0	93%
bZIP transcription factor domain-containing protein [<i>Rhizoctonia solani</i>]	19%	2E-19	51%
bZIP transcription factor [<i>Rhizoctonia solani</i>]	19%	1E-16	47%
bZIP transcription factor [<i>Talaromyces cellulolyticus</i>]	21%	1E-06	36%
Yap6p [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]	18%	8E-06	37%

C) Análisis mediante SMART BLAST

Descripción	Cobertura	E value	identidad
Basic-leucine zipper domain [<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>]	99%	0.0	93%
bZIP transcription factor domain-containing protein [<i>Rhizoctonia solani</i>]	19%	2E-19	51%
bZIP transcription factor [<i>Rhizoctonia solani</i>]	19%	1E-16	47%
bZIP transcription factor [<i>Talaromyces cellulolyticus</i>]	21%	1E-06	36%
Yap6p [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]	18%	8E-06	37%

Figura 20. Identificación y análisis bioinformático del regulador Yap6 de *X. dendrorhous*. A) Esquema de la secuencia aminoacídica deducida de la proteína Yap6 de *X. dendrorhous*, se muestra el alineamiento de motivos conservados identificados con la herramienta *BLASTp*, utilizando como referencia la secuencia cd14688 disponible en la base de datos CDD (*NCBI's conserved domain database*) (Marchler-Bauer y col., 2015), B) Resumen del resultado del análisis de *BLASTp*, C) Resumen del resultado del análisis de SMART BLAST.

A) Esquema proteína Skn7 de *X. dendrorhous* deducida *in silico*



B) Análisis mediante BLASTp

Descripción	Cobertura	E value	identidad
hypothetical response regulator receiver protein [<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>]	99%	0.0	99%
SKN7, two-component response regulator [<i>Serpula lacrymans</i>]	27%	6E-90	55%
SSK1, response regulator [<i>Serpula lacrymans</i>]	27%	2E-87	55%
response regulator receiver [<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>]	27%	1E-76	53%
related to SKN7-transcription factor [<i>Ustilago hordei</i>]	49%	1E-68	51%

C) Análisis mediante SMART BLAST

Descripción	Cobertura	E value	identidad
hypothetical response regulator receiver protein [<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>]	99%	0.0	93%
stress-responsive transcription factor SKN7 [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]	18%	1E-06	37%

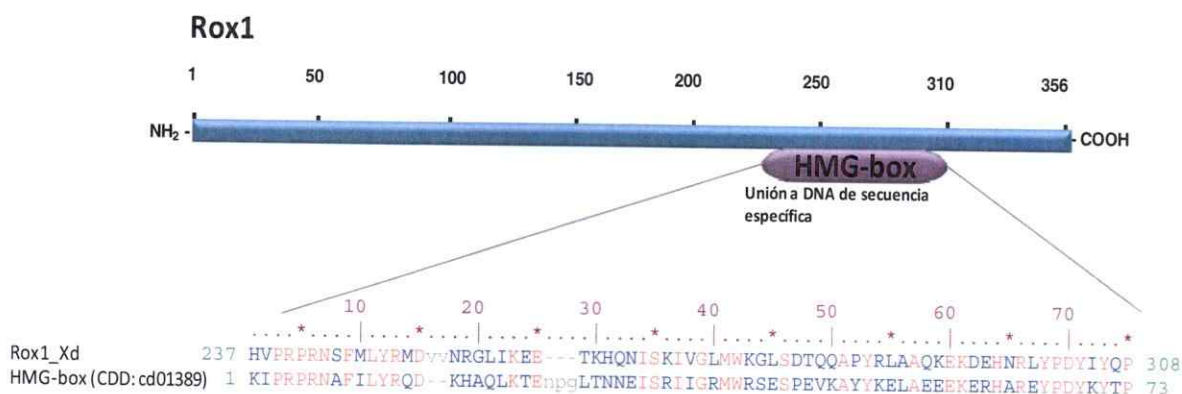
Figura 21. Identificación y análisis bioinformático del regulador Skn7 de *X. dendrorhous*. A) Esquema de la secuencia aminoacídica deducida de la proteína Skn7 de *X. dendrorhous*, se muestra el alineamiento de motivos conservados identificados con la herramienta BLASTp, utilizando como referencia la secuencias pfam00447 y cd00156 disponibles en la base de datos CDD (*NCBI's conserved domain database*) (Marchler-Bauer y col., 2015), B) Resumen del resultado del análisis de BLASTp, C) Resumen del resultado del análisis de SMART BLAST.

Adicionalmente, los análisis de BLASTp y SMART BLAST (Figura 21, B y C) sugieren que la secuencia aminoacídica analizada podría ser identificada como factor Skn7 y junto con el complejo Cyc8-Tup1 estaría involucrado en la regulación de genes de respuesta a estrés oxidativo y osmótico (Hanlon y col., 2011).

Por otra parte, también se identificó un ORF que posiblemente codifica el factor Rox1, el cual en la levadura *S. cerevisiae* en conjunto con el complejo Cyc8-Tup1 reprime genes involucrados en funciones de hipoxia y se caracteriza por tener un motivo HMG (*high mobility group*) que es necesario para la unión a DNA de secuencia específica (Balazubramanian y col., 1993). Acorde a lo anterior, mediante los análisis de la secuencia aminoacídica de la potencial proteína Rox1 de *X. dendrorhous*, se logró identificar un motivo de unión a DNA tipo HMG (Figura 22A). Además el tamaño de la proteína deducida en *X. dendrorhous* es muy similar al de la proteína descrita en *S. cerevisiae*. Estas características junto con el resultado de los análisis de BLASTp y SMART BLAST (Figura 22, B y C) sugieren que el gen identificado en *X. dendrorhous* estaría codificando el factor Rox1 y este regularía genes inducidos durante condiciones de hipoxia o anaerobiosis parcial (Balazubramanian y col., 1993).

Otro regulador que llevaría a cabo su función en conjunto con el complejo Cyc8-Tup1 es Crt1, también conocido como Rfx1, que está involucrado en la represión de genes de respuesta a daño en el DNA como los genes RNR (ribonucleotido reductasas). La potencial proteína Rfx1 de *X. dendrorhous* consta de 642 aminoácidos y acorde a lo descrito en *S. cerevisiae*, posee un dominio RFX de unión a DNA (Figura 23 A). Según los análisis de su secuencia aminoacídica con las herramientas BLASTp y SMART BLAST (Figura 23, B y C), esta presenta similitud con factores de transcripción de la familia RFX. Los resultados de los análisis realizados, apoyan la hipótesis de que el ORF identificado en el transcriptoma de *X. dendrorhous* estaría codificando el factor Crt1 (Rfx1) en esta levadura.

A) Esquema proteína Rox1 de *X. dendrorhous* deducida *in silico*



B) Análisis mediante *BLASTp*

Descripción	Cobertura	E value	identidad
HMG-box transcription factor [<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>]	99%	0.0	98%
HMG (high mobility group) box protein [<i>Rhizoctonia solani</i>]	25%	8E-20	47%
specific transcriptional repressor [<i>Rhodosporidium torulooides</i>]	28%	4E-18	46%
Repressor ROX1 [<i>Rhizoctonia solani</i>]	40%	4E-18	33%
specific transcriptional repressor [<i>Cryptococcus gattii</i>]	42%	4E-15	34%

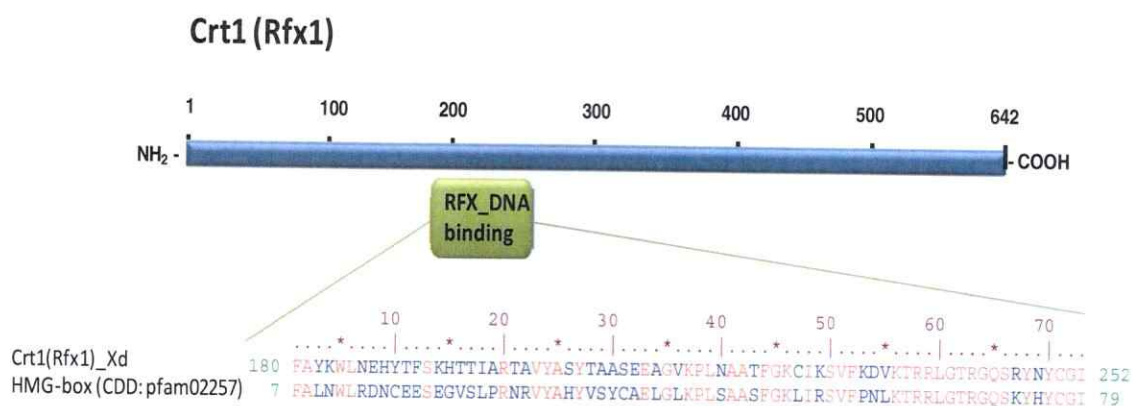
C) Análisis mediante SMART BLAST

Descripción	Cobertura	E value	identidad
HMG-box transcription factor [<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>]	99%	0.0	98%
Rox1p [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]	20%	2E-10	44%

Figura 22. Identificación y análisis bioinformático del regulador Rox1 de *X. dendrorhous*.

A) Esquema de la secuencia aminoacídica deducida de la proteína Rox1 de *X. dendrorhous*, se muestra el alineamiento de motivos conservados identificados con la herramienta *BLASTp*, utilizando como referencia la secuencia cd01389 disponible en la base de datos *CDD* (*NCBI's conserved domain database*) (Marchler-Bauer y col., 2015), B) Resumen del resultado del análisis de *BLASTp*, C) Resumen del resultado del análisis de *SMART BLAST*.

A) Esquema proteína Crt1 de *X. dendrorhous* deducida *in silico*



B) Análisis mediante BLASTp

Descripción	Cobertura	E value	identidad
RFX family transcription factor [<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>]	98%	0.0	99%
RFX DNA-binding domain-containing protein [<i>Mitosporidium daphniae</i>]	23%	2E-13	35%
DNA-binding RFX-type winged-helix domain-containing protein [<i>Rozella allomycis</i>]	16%	2E-13	39%
RFX family DNA-binding protein [<i>Schizosaccharomyces pombe</i>]	14%	3E-12	37%
regulatory factor RFX1 [<i>Rhizoctonia solani</i>]	21%	5E-12	31%

C) Análisis mediante SMART BLAST

Descripción	Cobertura	E value	identidad
RFX family transcription factor [<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>]	98%	0.0	99%
regulatory factor RFX1 [<i>Danio rerio</i>]	13%	8E-14	40%

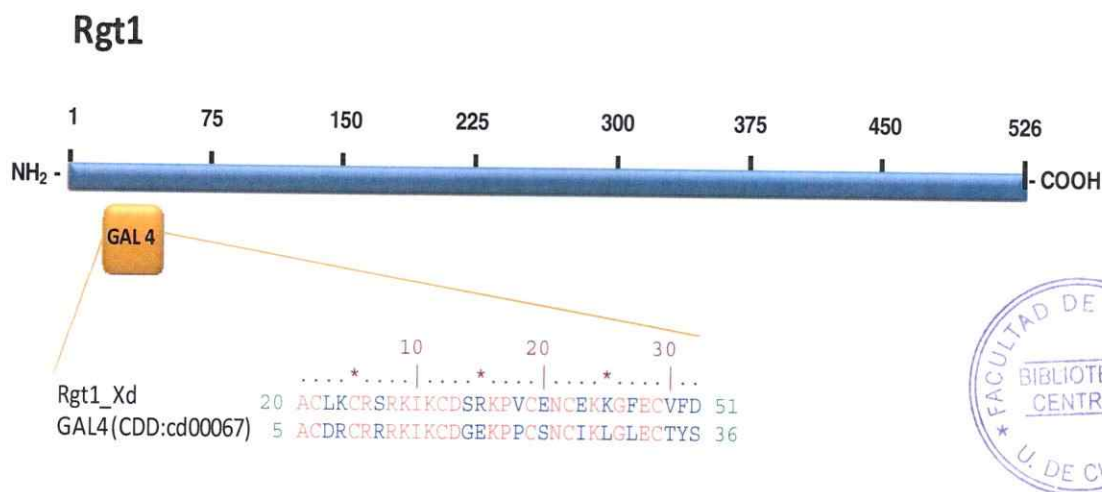
Figura 23. Identificación y análisis bioinformático del regulador Crt1 de *X. dendrorhous*. A) Esquema de la secuencia aminoacídica deducida de la proteína Crt1 de *X. dendrorhous*, se muestra el alineamiento de motivos conservados identificados con la herramienta BLASTp, utilizando como referencia la secuencia pfam02257 disponible en la base de datos CDD (*NCBI's conserved domain database*) (Marchler-Bauer y col., 2015), B) Resumen del resultado del análisis de BLASTp, C) Resumen del resultado del análisis de SMART BLAST.

En adición a los factores previamente descritos, también se logró identificar un ORF que codificaría el factor Rgt1 en el transcriptoma de *X. dendrorhous*. El factor Rgt1 en *S. cerevisiae* regula la expresión de una familia de transportadores de glucosa denominados HXT (hexose transporter). La proteína deducida de *X. dendrorhous* consta de 526 aminoácidos y los análisis de BLASTp y SMART BLAST (Figura 24) de la secuencia sugieren que ésta efectivamente corresponde a un ortólogo del factor Rgt1 de *S. cerevisiae*, principalmente porque se logró identificar el dominio característico de unión a DNA (tipo GAL4) en la posición amino terminal de este regulador (Figura 24A).

Finalmente, el último de los reguladores identificados es el factor Opi1 involucrado en la represión de genes estructurales involucrados en la síntesis de fosfolípidos en presencia de las moléculas precursoras colina e inositol (White y col., 1991; Jaschke y col., 2011). Los análisis mediante BLASTp y SMART BLAST (Figura 25) de la secuencia aminoacídica de la posible proteína Opi1 de *X. dendrorhous* que consta de 374 aminoácidos, sugieren que posee las características necesarias para ser identificada como un ortólogo del factor Opi1 descrito en *S. cerevisiae* y junto con el complejo Cyc8-Tup1 estaría regulando los genes de biosíntesis de fosfolípidos.

En conjunto, los resultados obtenidos en la parte I y II de este objetivo, sugieren que el complejo Cyc8-Tup1 estaría involucrado en la regulación de diferentes grupos de genes en respuesta a diferentes condiciones fisiológicas, afectando de esta manera diferentes procesos en *X. dendrorhous* que en algunos casos estarían afectando la síntesis de carotenoides en esta levadura.

A) Esquema proteína Rgt1 de *X. dendrorhous* deducida *in silico*



B) Análisis mediante *BLASTp*

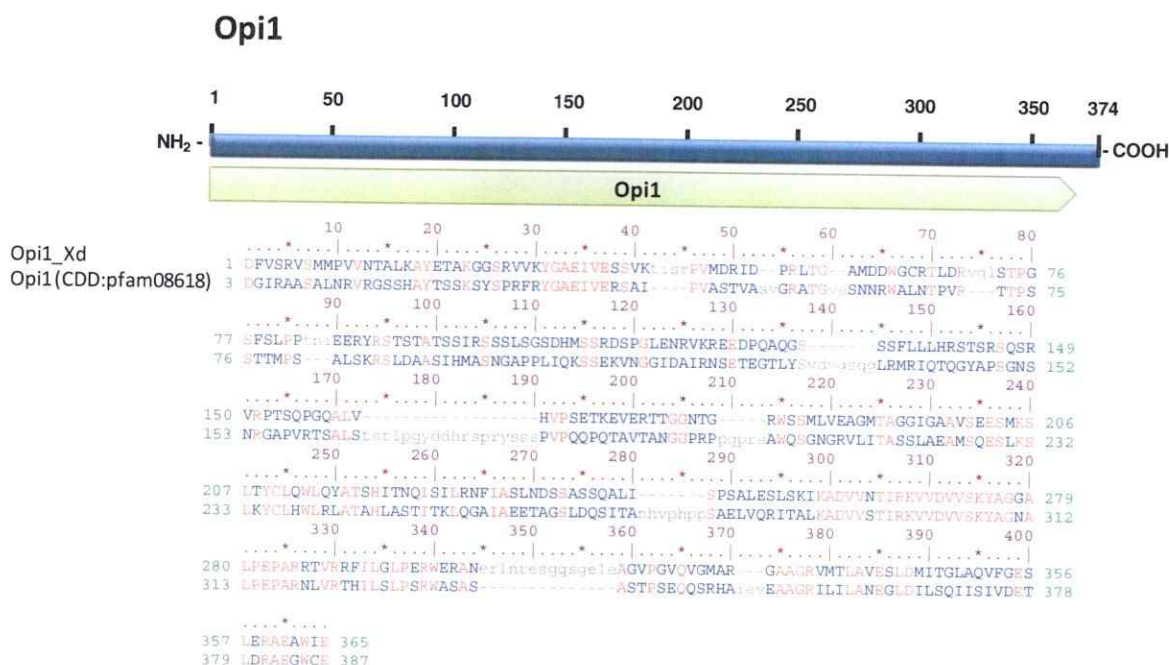
Descripción	Cobertura	E value	identidad
Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain [<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>]	99%	0.0	100%
C6 transcription factor [<i>Coccidioides posadasii</i>]	14%	4E-10	38%
Fungal transcriptional regulatory protein, N-terminal [<i>Penicillium camemberti</i>]	12%	1E-08	40%
Transcription factor, fungi [<i>Penicillium expansum</i>]	12%	2E-08	40%
fungal specific transcription factor [<i>Colletotrichum orbiculare</i>]	11%	3E-08	47%

C) Análisis mediante SMART BLAST

Descripción	Cobertura	E value	identidad
Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain [<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>]	99%	0.0	100%
Rgt1p [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]	13%	7E-09	43%

Figura 24. Identificación y análisis bioinformático del regulador Rgt1 de *X. dendrorhous*. A) Esquema de la secuencia aminoacídica deducida de la proteína Rgt1 de *X. dendrorhous*, se muestra el alineamiento de motivos conservados identificados con la herramienta *BLASTp*, utilizando como referencia la secuencia cd00067 disponible en la base de datos CDD (*NCBI's conserved domain database*) (Marchler-Bauer y col., 2015), B) Resumen del resultado del análisis de *BLASTp*, C) Resumen del resultado del análisis de SMART BLAST.

A) Esquema proteína Opi1 de *X. dendrorhous* deducida *in silico*



B) Análisis mediante BLASTp

Descripción	Cobertura	E value	identidad
Transcription factor Opi1 [<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>]	100%	0.0	99%
Opi1-domain-containing protein [<i>Auricularia delicata</i>]	100%	4E-88	47%
transcription factor Opi1 [<i>Rhizoctonia solani</i>]	100%	6E-78	42%
Opi1-domain-containing protein [<i>Schizopora paradoxa</i>]	100%	3E-76	40%
Opi1-domain-containing protein [<i>Trametes versicolor</i>]	99%	2E-67	39%

C) Análisis mediante SMART BLAST

Descripción	Cobertura	E value	identidad
Transcription factor Opi1 [<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>]	100%	0.0	99%
transcriptional regulator Opi1 [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]	27%	1E-06	29%

Figura 25. Identificación y análisis bioinformático del regulador Opi1 de *X. dendrorhous*. A) Esquema de la secuencia aminoacídica deducida de la proteína Opi1 de *X. dendrorhous*, se muestra el alineamiento de motivos conservados identificados con la herramienta BLASTp, utilizando como referencia la secuencia pfam08618 disponible en la base de datos CDD (NCBI's conserved domain database) (Marchler-Bauer y col., 2015), B) Resumen del resultado del análisis de BLASTp, C) Resumen del resultado del análisis de SMART BLAST.

3.5 Evaluación del fenómeno de represión por glucosa en cepas desreguladas sobreproductoras de carotenoides obtenidas por mutagénesis al azar.

En este objetivo se escogieron cuatro cepas desreguladas en la carotenogénesis que son sobreproductoras de carotenoides: atxS1, atxS2, AVHN2.4.8 y RV4_M1, las que fueron previamente obtenidas en el laboratorio por mutagénesis química al azar con el reactivo NTG a partir de las cepas silvestres UCD 67-385, AVHN2 y RV4, respectivamente, siendo las dos últimas nativas de Chile. Las cepas atxS1, atxS2 y AVHN2.4.8 se seleccionaron porque estudios preliminares mostraron que producen mayor cantidad de carotenoides que sus respectivas cepas parentales a lo largo de toda la curva de crecimiento incluso en medios de cultivo suplementados con glucosa, mientras que la cepa RV4_M1 no ha sido estudiada en ese aspecto pero se seleccionó por su característica de sobreproductora. En primer lugar se buscó entre estas cepas una que no mostrara un efecto inhibitorio en la producción de carotenoides al dar un pulso de glucosa al medio de cultivo realizando el mismo experimento descrito para los objetivos II y III. Como se esperaba, los resultados mostraron que las cepas mutantes produjeron mayor cantidad de pigmentos que sus respectivas parentales. Además, se observó que en todas las cepas ensayadas aumenta la biomasa al agregar glucosa al medio de cultivo (Figura 26); sin embargo, la producción de carotenoides no es evidente durante el mismo período de tiempo en las cepas mutantes ni en sus respectivas cepas parentales (Figura 26, C, F, J y K). Lo anterior además se ve reflejado en una disminución progresiva del pigmento específico, debido a un aumento en la biomasa sin producción de carotenoides (Figura 27). Por ello, no fue posible seleccionar una buena candidata para evaluar si se encuentra desregulada en la expresión de los genes carotenogénicos, ya que los resultados obtenidos sugieren que la característica de sobreproductoras de carotenoides de las cepas evaluadas no estaría directamente relacionada con una alteración del mecanismo de represión catabólica, como se planteó inicialmente en este objetivo.

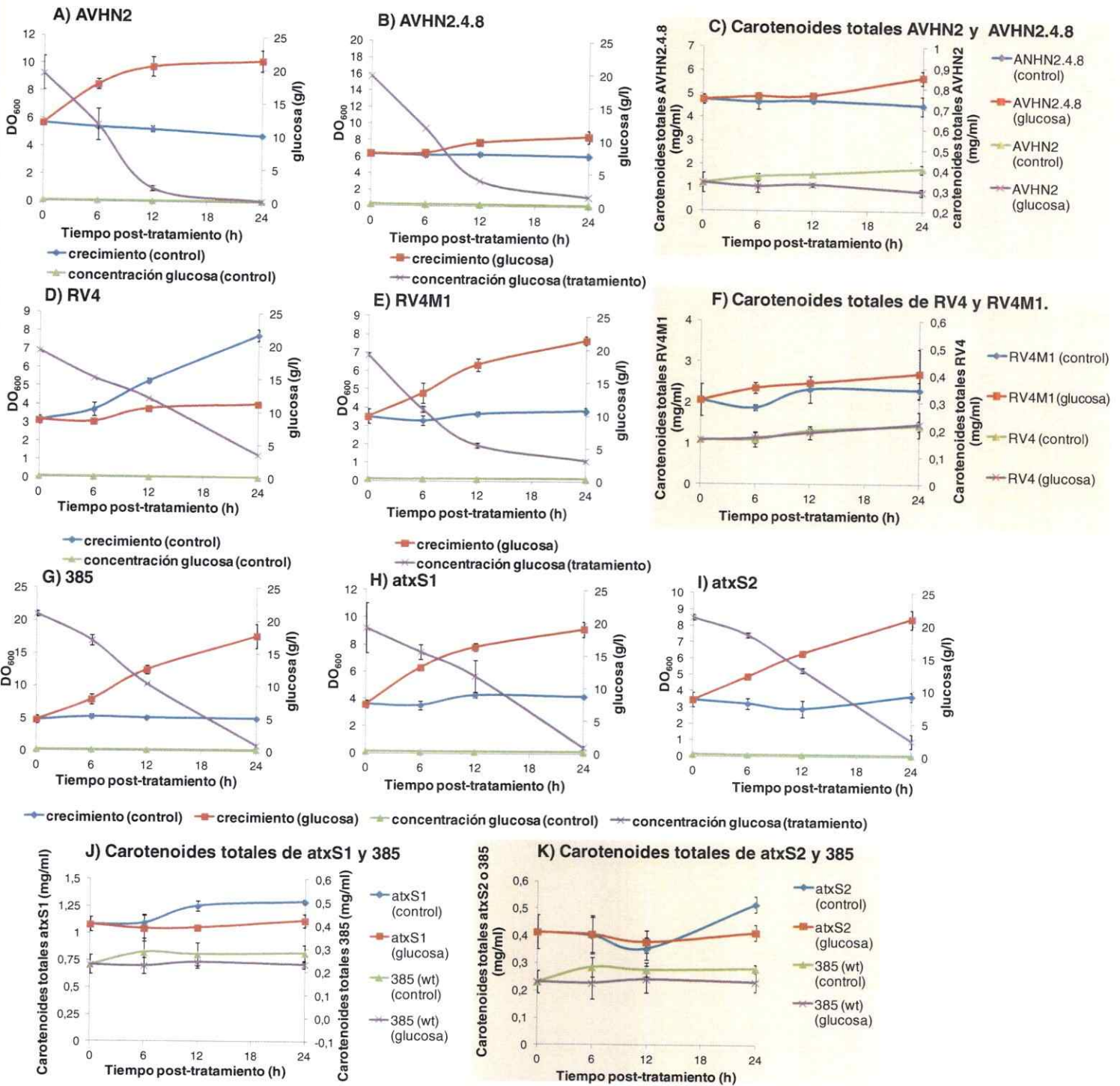


Figura 26. Inhibición de la carotenogénesis en presencia de glucosa. Se muestra el crecimiento y concentración de glucosa residual en el medio de cultivo post- tratamiento en A) AVHN2 (silvestre), B) AVHN2.4.8 (mutante derivada de AVHN2), D) RV4 (silvestre), E) RV4M1 (mutante derivada de RV4), G) 385 (silvestre), H) atxS1 (mutante derivada de 385), I) atxS2 (mutante derivada de 385). Los carotenoides totales post-tratamiento para las cepas silvestres AVHN2, RV4 y 385 y sus mutantes respectivas se muestran en C), F), J) y K), respectivamente, para las fracciones tratadas (glucosa) y control. Los datos corresponden al promedio de tres cultivos independientes y las barras corresponden a la desviación estándar.

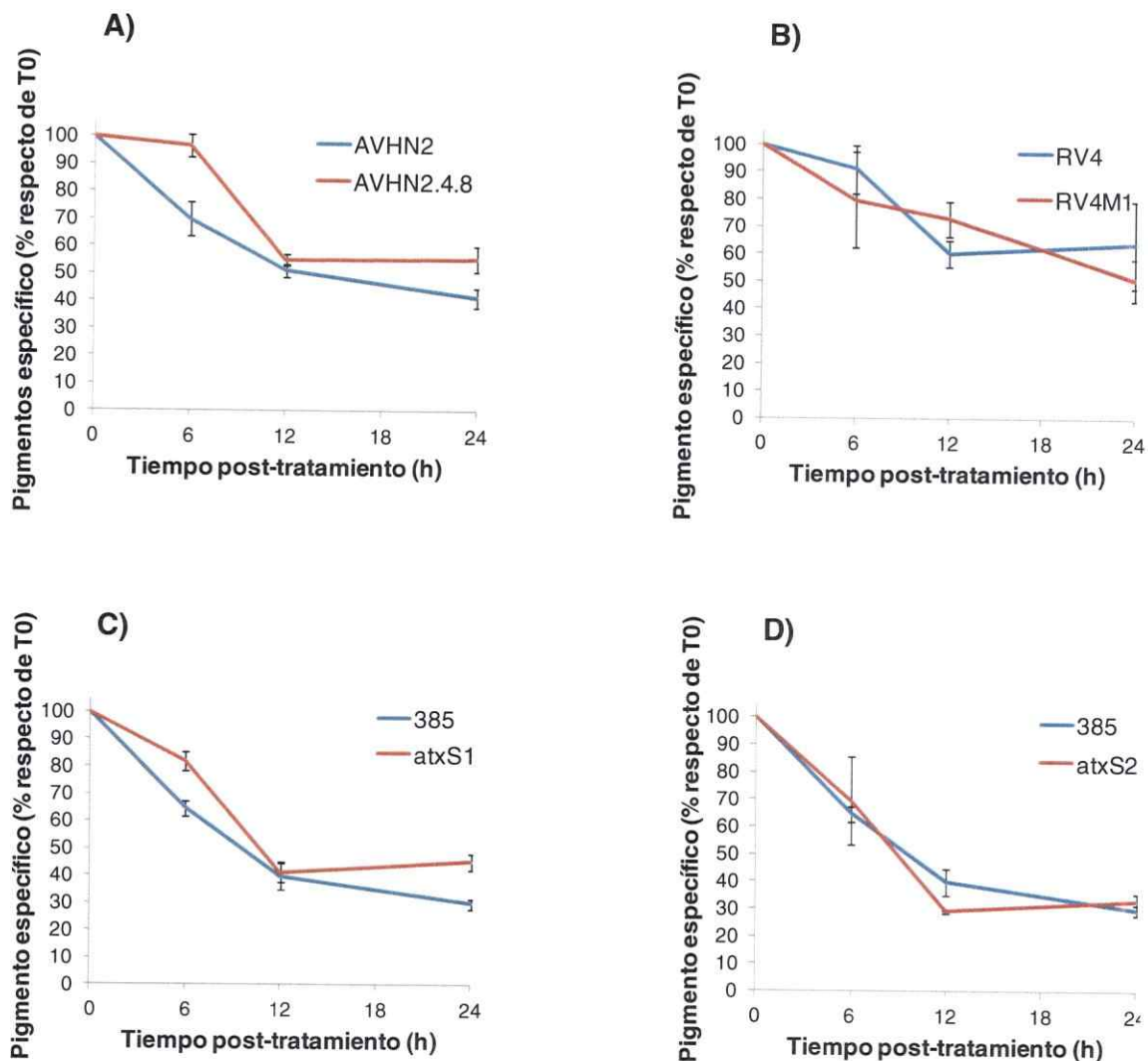


Figura 27. Pigmento específico post-tratamiento de las cepas mutantes sobreproductoras y sus parentales. Se muestra la variación porcentual post-tratamiento de la producción de pigmento específico (μg pigmentos/g de peso seco de levadura) en la fracción tratada (glucosa) respecto a la producción en tiempo 0 (T_0 , antes del tratamiento) en A) para la cepa sobreproductora AVHN2.4.8 y su parental AVHN2; en B) para la cepa sobreproductora RV4M1 y su parental RV4 y en C) y D) para las cepas sobreproductoras atxS1 y atxS2 con su parental 385, respectivamente. Los datos corresponden al promedio de tres cultivos independientes y las barras corresponden a la desviación estándar.

En resumen, los resultados obtenidos en los objetivos I a V permiten concluir que los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous* son funcionales y de acuerdo a lo observado se sugiere que a través de su asociación con distintos reguladores transcripcionales afectarían la expresión de diferentes grupos de genes. Además, a través de su participación en el mecanismo de represión catabólica, regularían, al menos en parte, la síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*.

4. DISCUSIÓN

4.1 Caracterización genética de los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous*.

En primer lugar se caracterizó genéticamente los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous*. El gen *CYC8* codifica una proteína de 1.469 aminoácidos (Figura 5B) (Córdova, 2012), mientras que el gen *TUP1* da origen a una proteína de 678 residuos (Figura 6B) que al ser analizada con las herramientas BLASTp y SMART BLAST se confirmó que corresponde a un homólogo de proteínas Tup1 descritas en otros organismos (análisis de secuencia 1B, ANEXO).

Cabe mencionar que la proteína Cyc8 de *X. dendrorhous* sería de un tamaño bastante mayor a lo descrito en otras levaduras como *S. cerevisiae* (966 residuos aminoacídicos) (Trumbly, 1988) teniendo alrededor de quinientos aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal. Este fenómeno no es un caso aislado, pues también la proteína Mig1 deducida de *X. dendrorhous* mostró una diferencia de tamaño de alrededor de trescientos aminoácidos respecto a la proteína descrita en *S. cerevisiae* (Marcoleta, 2011a). Sin embargo, la proteína Tup1 presenta un tamaño acorde a lo descrito en otros organismos (Zhang y col., 2002). Respecto a los dominios funcionales y motivos estructurales característicos de ambos componentes del complejo Cyc8-Tup1, éstos fueron identificados mediante la búsqueda de dominios conservados usando la herramienta BLASTp utilizando como referencia secuencias disponibles en la base de datos CDD del NCBI. En el caso de la proteína Cyc8 se identificaron en el extremo N-terminal motivos TPR que son esenciales para la estructura y función de esta proteína, permitiendo la interacción tanto con Tup1 como con distintos reguladores de unión DNA (Figura 5C) (Tzamarias y Struhl, 1995; Smith y Johnson, 2000; D'Andrea y Regan, 2003). Por otra parte, en la región N-terminal de la proteína Tup1 de *X. dendrorhous* se identificó el dominio TupN (Figura 6, B y C) característico de proteínas Tup1 presentes en otros organismos y necesario para la interacción con Cyc8. También se identificó en la región C-terminal el dominio funcional compuesto por 7 repetidos tipo WD40 (Figura 6, B y D) que son necesarios

para la formación de estructura secundaria de esta proteína y su interacción con la proteína Cyc8 durante la formación del complejo corepresor (Zhang y col., 2002).

Acorde a los análisis descritos anteriormente, se sugiere que los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous* identificados, codificarían proteínas ortólogas de los corepresores Cyc8 y Tup1 descritos en otros organismos.

4.2 Caracterización funcional de los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous*.

Inicialmente se estudió si la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* tiene un mecanismo de represión catabólica funcional en el cual potencialmente estaría participando el complejo Cyc8-Tup1. Para esto se cultivó la levadura en presencia de glucosa (preferida) y glicerol como segunda fuente de carbono (no preferida y no fermentable). De acuerdo a lo descrito en otras levaduras, como consecuencia de la represión catabólica la utilización de una segunda fuente de carbono adicional a la glucosa se ve postergada hasta que la glucosa haya sido consumida completamente, lo que puede ser evidenciado en una curva de crecimiento con un cambio en la tasa de crecimiento lo que se denomina crecimiento diáuxico (Poutou y col., 2005). De acuerdo a los resultados presentados en esta Tesis, la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* preferencialmente utiliza glucosa frente a glicerol, restringiendo el uso de este último para cuando la glucosa se ha agotado en el medio de cultivo, lo que se ve reflejado en un cambio en la tasa de crecimiento. Acorde a lo anterior, en estas condiciones la levadura presentó una curva de crecimiento de tipo diáuxica. Esto concuerda completamente con lo observado en un estudio paralelo de nuestro laboratorio, donde se observó que al cultivar la levadura en presencia de glucosa y sacarosa, esta última fuente de carbono comenzó a utilizarse luego que la glucosa se agotó en el medio de cultivo presentando nuevamente un crecimiento diáuxico. Cabe destacar que el agotamiento de la glucosa fue acompañado por un aumento en la actividad invertasa necesaria para la utilización de sacarosa (Bravo, 2015). En conjunto, estos resultados permiten afirmar que la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* tiene un mecanismo de represión catabólica funcional donde el complejo Cyc8-Tup1, junto al regulador Mig1, tendrían una función esencial.

Para evaluar la funcionalidad de los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous* se realizaron ensayos de complementación heteróloga en cepas mutantes de los respectivos genes en *S. cerevisiae*. En *S. cerevisiae* las mutaciones *cyc8* y *tup1* tienen efectos pleiotrópicos entre los que se encuentra un retraso en el crecimiento y pérdidas de algunos aspectos de la represión catabólica como la represión del gen *SUC2* que codifica la enzima β -fructofuranosidasa o invertasa que es necesaria para la utilización de sacarosa presente en el medio de cultivo. Es así que las cepas mutantes de dichos genes presentan actividad invertasa constitutiva incluso en presencia de glucosa (Williams y Trumbly, 1990; Smith y Johnson, 2000). En atención a lo anterior, se evaluaron estos aspectos (crecimiento y represión de actividad invertasa) en las cepas mutantes *cyc8* y *tup1* de *S. cerevisiae* complementadas con los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous*, respectivamente. En cuanto al crecimiento, los resultados presentados en la figura 7 muestran que las cepas de *S. cerevisiae* que portan un vector de expresión con los genes *CYC8* o *TUP1* de *X. dendrorhous* presentaron un crecimiento más rápido que las respectivas cepas mutantes que portan el mismo vector sin dichos genes. Sin embargo, presentan tasas de crecimiento menores a las de la cepa silvestre, presentando un fenotipo intermedio. Una posible explicación para esto es el hecho que la cepa silvestre no porta un vector de expresión, mientras que las cepas complementadas portan múltiples copias del vector (~50 copias por célula) (Sánchez-Torres y col., 1998; Chan y col., 2013) que las células deben mantener y replicar para complementar mutaciones adicionales de auxotrofia generando un retraso en el crecimiento que no depende de las mutaciones *cyc8* o *tup1* y que no estaría afectando a la cepa silvestre.

Paralelamente, cuando se evaluó la represión de la actividad invertasa o la utilización de sacarosa en presencia de glucosa o un análogo de éste azúcar (condiciones de represión) (Figuras 8 y 9), se obtuvo resultados que evidencian que la actividad invertasa en condiciones de represión es menor en las cepas de *S. cerevisiae* que expresan los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous* en comparación a las cepas control y a condiciones de ausencia de glucosa (no represión). Sin embargo, nuevamente no se alcanzan los niveles de represión de la cepa

silvestre. En cuanto a esto, cabe mencionar que en estudios previos de complementación de estos mismos genes en *S. cerevisiae* se ha observado consistentemente que incluso al utilizar vectores de expresión tanto multicopia como simple copia que contienen los genes *CYC8* o *TUP1* aislados de la misma cepa silvestre original, no complementan en un 100% las respectivas mutaciones, utilizando como criterio la represión de la actividad invertasa y floculación (Williams y Trumbly, 1990). Acorde a lo anterior, no resulta sorprendente que los genes aislados de *X. dendrorhous* complementen sólo parcialmente las mutaciones *cyc8* y *tup1* en *S. cerevisiae*. Por otra parte, es necesario tener en cuenta que las proteínas Cyc8 y Tup1 deben establecer interacciones proteína-proteína entre sí y con reguladores de unión a DNA, por lo que es posible que las proteínas codificadas por los genes de *X. dendrorhous* tengan conformaciones diferentes que no permitan establecer exitosamente una o más interacciones con otras proteínas necesarias para llevar a cabo su función.

En conjunto, estos antecedentes y los resultados obtenidos sugieren que los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous* complementan las mutaciones respectivas en *S. cerevisiae*, aportando evidencia de que éstos estarían participando en el mecanismo de represión catabólica.

De manera complementaria se evaluó la funcionalidad de los genes *CYC8* y *TUP1* mediante la obtención de mutantes de estos genes derivadas de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*. En ambos casos las regiones mutadas son esenciales para la funcionalidad de ambas proteínas, correspondiendo a la región N-terminal que contiene los motivos TPR (Córdova, 2012) y la región C-terminal portadora de los motivos estructurales WD40 de las proteínas Cyc8 y Tup1, respectivamente. Diversos estudios demuestran que las regiones nombradas son especialmente sensibles a distintos tipos de mutaciones provocando la pérdida de función de las proteínas respectivas (Williams y Trumbly, 1990; Tzamarias y Struhl, 1995).

De manera similar a lo descrito en *S. cerevisiae*, se esperaba que las mutaciones *cyc8* y *tup1* causaran un aumento en la actividad invertasa extracelular de *X. dendrorhous* en presencia de glucosa. Por esto se evaluó dicha actividad en la cepa silvestre y las cepas

mutantes *cyc8* y *tup1* utilizando maltosa (no represión) o glucosa (represión) como única fuente de carbono (Figura 11). Los resultados mostraron que en condiciones de represión, las cepas mutantes tuvieron una mayor actividad invertasa que la cepa silvestre, siendo la mutante *tup1* la que presentó mayor actividad sugiriendo que en ambas cepas mutantes, al igual que lo descrito en *S. cerevisiae*, el mecanismo de represión de la actividad invertasa se encuentra afectado. En concordancia a lo anterior, al estudiar el efecto de la glucosa sobre los niveles de transcrito del gen *INV* (que codifica la enzima invertasa) (Figura 15), se observó una represión de ~13 veces en la cepa silvestre, mientras que en ambas cepas mutantes se observa una represión bastante menor cercana ~5 veces, indicando que el aumento en actividad invertasa observado en las cepas mutantes puede ser un reflejo de un alivio de la represión a nivel transcripcional del gen *INV*.

En atención a lo expuesto, es posible concluir que los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous* son funcionales y participan en el mecanismo de represión catabólica.

4.3 Regulación de la carotenogénesis: participación del complejo Cyc8-Tup1.

Una de las características principales por las que se ha estudiado *X. dendrorhous* es por su capacidad natural de producir carotenoides como β -caroteno y astaxantina. Como se mencionó previamente, se conoce la ruta de síntesis y los genes que la controlan; sin embargo, aún no se descifran los mecanismos regulatorios involucrados. Respecto a esto, diversos estudios sugieren que la presencia de glucosa tiene un efecto represor sobre la síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous* (Marcoleta y col., 2011; Wozniak y col., 2011). Adicionalmente, la presencia de secuencias tipo cajas Mig1 en la región promotora de algunos genes carotenogénicos (Marcoleta y col., 2011; Bravo, 2015) apuntan a la posibilidad de que el mecanismo de represión catabólica esté involucrado en la regulación a nivel transcripcional de genes que participan en el proceso de síntesis de carotenoides. Acorde a lo anterior, se evaluó la producción de pigmentos en las cepas mutantes *cyc8* y *tup1* de *X. dendrorhous*. Se observó que ambas cepas mutantes *cyc8* y *tup1* producen una mayor cantidad de carotenoides (~90 y

40% mayor, respectivamente) respecto de la cepa silvestre al ser cultivadas en presencia de glucosa como única fuente de carbono (Figura 13), lo que sugiere que la represión de la carotenogénesis mediada por glucosa requiere de ambos corepresores (Cyc8 y Tup1) funcionales, viéndose afectada en las mutantes *cyc8* o *tup1*. En concordancia, al evaluar el efecto de la adición de glucosa a un cultivo desprovisto de este azúcar (Figura 16), se observó que en la cepa silvestre se detiene la síntesis de carotenoides, mientras que en ambas cepas mutantes, la producción de carotenoides continúa, sugiriendo que tanto Cyc8 como Tup1 están involucrados en la represión mediada por glucosa de la carotenogénesis.

Cabe destacar que en todas las aproximaciones experimentales realizadas, la cepa *cyc8* produjo una cantidad de carotenoides significativamente mayor que la cepa *tup1* y la cepa silvestre, lo que sugiere que ambos componentes del complejo corepresor tienen diferentes funciones en cuanto a la regulación de la carotenogénesis. Esto no resulta extraño puesto que se ha descrito previamente en *S. cerevisiae* que la importancia de cada componente del complejo corepresor para la represión de cada gen blanco puede variar dependiendo del caso (Cooper y col., 1994; Tzamarias y Struhl, 1995; Fagerstrom-Billai y col., 2007). Por otra parte, el mayor efecto de la mutación *cyc8*, también puede deberse a que en ausencia de Cyc8, es posible que la proteína Tup1 no sea reclutada a los promotores de los genes blanco al no establecer una interacción con Cyc8. De esta manera, la función represora de Tup1 también se estaría perdiendo en la cepa mutante *cyc8*, ya que se ha descrito que Cyc8 formaría una especie de puente entre el regulador de unión a DNA y Tup1, para lo que serían esenciales los motivos TPR presentes en su N-terminal (Tzamarias y Struhl, 1995; Palaiomylitou y col., 2008). Bajo este mismo criterio, debe considerarse que en el mutante *tup1* la proteína Cyc8 permanece intacta y podría estar ejerciendo alguna función represora residual al interactuar con reguladores de unión a DNA como Mig1, esto último podría explicar por qué el efecto de la mutación *tup1* en la síntesis de carotenoides es menor que el observado con la mutación *cyc8*. Adicionalmente, existen antecedentes que indican que en ciertos casos particulares las proteínas Tup1 o Cyc8 son necesarias para la activación o el reclutamiento de co-activadores

una vez que la "señal represora" ha cesado (Conlan y col., 1999; Proft y Struhl, 2002), por lo que es posible que en el mutante *tup1*⁻ se esté viendo afectada la activación de algunos genes involucrados en carotenogénesis teniendo como resultado una menor producción de carotenoides en comparación con la cepa mutante *cyc8*.

Al analizar el efecto de las mutaciones *cyc8* y *tup1*⁻ a nivel de la transcripción de genes involucrados en síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous* (Figura 15), se observó un efecto evidentemente mayor sobre genes que están involucrados en la síntesis de precursores de la carotenogénesis, es decir, genes que participan en etapas tempranas de este proceso como la ruta del mevalonato o las etapas comunes entre la carotenogénesis y la síntesis de ergosterol (Loto y col., 2012). Entre estos genes destacan *HMGR*, *idi* y *FPS*. El gen *HMGR* codifica la enzima 3-hidroxi-3 metilglutaril-CoA reductasa que cataliza la síntesis de mevalonato a partir del cual se sintetiza IPP precursor general de isoprenoides como los carotenoides (Schmidt y col., 2011; Loto y col., 2012). En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio se identificó una secuencia de unión (URS) del represor Rox1 en la región promotora del gen *HMGR* de *X. dendrorhous* (Loto, 2015). Rox1 es un factor de unión a DNA que requiere del complejo Cyc8-Tup1 para llevar a cabo la represión de sus genes blanco (Balasubramanian y col., 1993), lo que sugiere que el complejo Cyc8-Tup1 regula el gen *HMGR* de *X. dendrorhous* a través de el regulador Rox1.

En el caso de la cepa *cyc8* se observó que luego de la adición de glucosa al medio de cultivo, los niveles de transcrito del gen *HMGR* aumentan evidentemente respecto al control, lo que no se observa en la mutante *tup1*⁻ ni en la cepa silvestre. Este aspecto también podría dar cuenta de la diferencia en la producción de carotenoides observada entre ambas cepas mutantes, ya que se tienen antecedentes que indican que el aumento del mevalonato disponible o incluso agregar mevalonato al medio de cultivo genera un aumento en la producción de carotenoides en *X. dendrorhous* (Schmidt y col., 2011).

Por otra parte, al analizar el transcriptoma de la cepa *cyc8*, se encontró que uno de los genes mayormente representados en comparación a la cepa silvestre (más de 10 veces) es el

de la enzima mevalonato quinasa que participa en la síntesis de IPP (Loto y col., 2012) que es el precursor general de isoprenoides, entre ellos los carotenoides, lo que concuerda con una mayor producción de carotenoides en dicha cepa mutante en respuesta a un aumento de los precursores disponibles.

En el caso de los genes *idi* y *FPS*, su expresión nivel de mRNA se ve afectada en ambas cepas mutantes, mostrando un aumento de entre 5 y 10 veces respecto al control, en los niveles de transcrito luego de la adición de glucosa al medio de cultivo, lo que no se observa en la cepa silvestre (Figura 15). El incremento en los niveles de transcrito del gen *FPS* también puede explicar el aumento en la síntesis de carotenoides, ya que se ha demostrado que sobreexpresar este gen en *X. dendrorhous* lleva a una mayor producción de carotenoides (Alcaíno y col., 2014).

Por otra parte, en los genes carotenogénicos *crtE*, *crtI* y *crtYB*, se observó una represión en respuesta a la adición de glucosa tanto en las cepas mutantes como en la silvestre. Sin embargo, en el caso del gen *crtE* esta represión se ve aliviada durante las primeras horas en las cepas mutantes lo que no se observa en la cepa silvestre. Además, en la cepa mutante *cyc8*, la represión del gen *crtI* es menor que en la cepa silvestre (~2 veces en *cyc8* versus ~9 veces menos en la cepa silvestre) y por su parte la cepa *tup1* luego de recuperarse de la represión tiene niveles de transcrito incluso mayores al control, lo que no se observa en la cepa silvestre. Algo similar a esto último se observa para el gen *crtYB* en ambas cepas mutantes que luego de la represión muestran una recuperación y aumento de los niveles de transcrito, observándose un mayor aumento en la cepa *cyc8*. Mientras que para el gen *crtS* no se hubo diferencias entre las distintas cepas, en el caso del gen *crtR*, se observó que agregar glucosa al medio de cultivo generó un aumento en sus niveles de transcrito en las tres cepas, siendo este aumento tres veces mayor en la cepa mutante *tup1* en comparación a las otras dos cepas. Respecto a esto último, se debe tener en cuenta que en levaduras generalmente existe una sola citocromo p450 reductasa, que en el caso de *X. dendrorhous* es codificada por el gen *crtR*, la que funciona como dador de electrones a diferentes enzimas citocromo p450 monooxigenasas (Alcaíno y

col., 2008). En *X. dendrorhous* se han descrito tres enzimas citocromo p450 monooxigenasas codificadas por los genes *crtS* involucrado en carotenogénesis y los genes *CYP51* (Leiva y col., 2015) y *CYP61* (Loto y col., 2012) implicados en la biosíntesis de ergosterol. De acuerdo con esto, el hecho que el gen *crtR* en la cepa mutante *tup1* tenga una mayor inducción en presencia de glucosa, también podría estar favoreciendo la síntesis de otros compuestos como ergosterol que compiten por los precursores de la ruta de carotenogénesis (Loto y col., 2012), lo que puede afectar negativamente la síntesis de carotenoides aun cuando el mecanismo de represión catabólica no esté funcional. Esto último también puede ser una de las causas de la diferencia observada entre las cepas mutantes *cyc8* y *tup1* en cuanto a la producción de carotenoides.

Finalmente, es necesario mencionar que si bien se observó un aumento en la producción de carotenoides en las cepas mutantes *cyc8* y *tup1*, ésta no alcanza los niveles de producción observado en algunas cepas sobreproductoras obtenidas por mutagénesis al azar, lo que estaría indicando que además del mecanismo de represión catabólica existirían mecanismos adicionales de regulación posiblemente a nivel transcripcional, traduccional o post-traduccional. Esto no sería sorprendente puesto que en otras levaduras se ha descrito que la presencia de glucosa tiene efectos tanto a nivel transcripcional, post-transcripcional (estabilidad del mRNA), traduccional (tasa de traducción) y post-traduccional (inactivación catabólica) (Trumbly, 1992; Horak y Wolf, 1997; Gancedo, 1998; Rolland y col., 2002). Aún así, las diferencias encontradas entre la cepa silvestre y ambas cepas mutantes a nivel de la expresión de los distintos genes involucrados en la carotenogénesis, sugieren que el complejo Cyc8-Tup1 participa en la regulación de dicho proceso.

4.4 Identificación de posibles funciones del complejo Cyc8-Tup1 en *X. dendrorhous* mediante análisis bioinformático de transcriptomas de la cepa silvestre y las mutantes *cyc8* y *tup1*.

Con el objetivo de obtener más información sobre los posibles genes regulados por el complejo Cyc8-Tup1, se analizaron transcriptomas obtenidos de las distintas cepas (silvestre,

cyc8 y *tup1*) cultivadas en presencia de glucosa, maltosa o succinato como única fuente de carbono, enfocándose en identificar transcritos que en presencia de glucosa se encontraban menos representados en la cepa silvestre en comparación a alguna de las cepas mutantes, sugiriendo que dichos transcritos regulados por glucosa, corresponderían a genes blanco del complejo Cyc8-Tup1. Se encontró un total de 259 transcritos (probables genes) que se encuentran mayormente representados en los transcriptomas de glucosa de la cepa mutante *cyc8* o *tup1* respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, es necesario mencionar que es posible que el efecto observado en alguno de estos transcritos sea una consecuencia indirecta de alguna de las mutaciones *cyc8* o *tup1*. También es importante destacar que la mayoría de los posibles genes que se encuentran mayormente representados en las cepas mutantes, en la cepa silvestre tienen una razón entre los valores de RPKM en el transcriptoma en glucosa y el respectivo RPKM en el transcriptoma en succinato o maltosa menor a 1, lo que sugiere que se encuentran menos expresados en presencia de glucosa, lo que en la mayoría de los casos no se observa en el análisis de los transcriptomas de las cepas mutantes (Tabla II,III y IV, ANEXO). Según lo descrito en trabajos previos, en *S. cerevisiae* existen alrededor de 180 genes que son blanco de regulación por parte del complejo Cyc8-Tup1 a través de su interacción con distintos factores de unión a DNA (Smith y Johnson, 2000), lo que concuerda con la cantidad de genes que serían regulados por este complejo en *X. dendrorhous*.

Entre los potenciales genes (ORFs) identificados con un valor de RPKM mayor al de los genes respectivos en la cepa silvestre en ambas cepas mutantes, se identificaron grupos que estarían involucrados en el transporte transmembrana de diferentes sustratos, transcripción y regulación de la transcripción, metabolismo de carbohidratos, metabolismo de lípidos/esteroles/isoprenoides, metabolismo de alcoholes, síntesis y metabolismo de aminoácidos, metabolismo y modificación de proteínas, transducción de señales, ciclo de Krebs/cadena respiratoria/metabolismo de NAD y NADP, respuesta a estrés, reparación de DNA, metabolismo del DNA/RNA, metabolismo de hierro y metabolismo de compuestos nitrogenados y otros compuestos orgánicos. La mayoría de estas categorías coincide con lo

observado en otros microorganismos donde en presencia de glucosa se reprimen la mayoría de los genes de respuesta a estrés, incluyendo los de reparación de DNA y todos aquellos involucrados en el metabolismo aerobio y utilización de fuentes de carbono alternativas a la glucosa como algunos polisacáridos, lípidos, alcoholes y compuestos nitrogenados, incluyendo transportadores, enzimas e incluso activadores de la transcripción de los distintos genes blanco (DeRisi y col., 1997; Rolland y col., 2002). Aparentemente, muchos de los posibles genes identificados podrían ser blancos de Mig1 (Zimmermann y Entian, 1997; Rolland y col., 2002; Bravo, 2015), sin embargo, no se descarta la participación de otros reguladores que recluten el complejo Cyc8-Tup1.

Entre los reguladores con los que Cyc8-Tup1 interactúa y lleva a cabo su función reguladora se encuentra a Crt1 (Rfx1) (regula genes inducidos por daño en el DNA; Huang y col., 1998; Zhang y Reese, 2005), Rox1 (regulador de genes inducidos en hipoxia; Balasubramanian y col., 1993), Sko1 (regulador de genes de respuesta a estrés osmótico; Proff y Struhl, 2002), Aft1 (regulador genes implicados en la utilización de hierro; Fragiadakis y col., 2004), Cup9 (regulador de genes para la captación de péptidos; Xia y col., 2008), Rgt1 (regulador de genes de transportadores de glucosa; Rolland y col., 2002; Roy y col., 2014), Opi1 (regulador de la biosíntesis de fosfolípidos ;White y col., 1991; Jaschke y col., 2011), Yap4 (Cin5) y Yap6 (regulación de genes de tolerancia salina y estrés osmótico) y Skn7 (regulador de genes de respuesta a estrés oxidativo) (Mendizabal y col 1998; Hanlon y col., 2011). Es importante mencionar que algunos de estos reguladores han sido descritos inicialmente como activadores de la transcripción. Sin embargo, en los últimos años ha ido tomando fuerza la hipótesis de que los reguladores que actúan a través del complejo Cyc8-Tup1 actuarían como represores-activadores que luego de un cambio conformacional o una modificación perderían su interacción con el complejo Cyc8-Tup1 y podrían activar la transcripción posiblemente junto a otros activadores. Es por esto que en ausencia de un complejo Cyc8-Tup1 funcional, se verían inducidos genes regulados por los distintos reguladores mencionados (Treitel y Carlson, 1995; Papamichos-Chronakis y col., 2004; Parnell y Stillman; 2011; Wong y Struhl, 2011).

Durante el análisis de los transcriptomas en búsqueda de ORFs que posiblemente codificaran estos distintos reguladores de unión a DNA, fue posible identificar candidatos de genes que codificarían los reguladores Yap6, Skn7, Rox1, Crt1 (Rfx1), Rgt1, Opi1 (Figuras 20 a 25) y Mig1 (Marcoleta, 2011).

El regulador Yap6 igual que otros factores de tipo YAP actúa generalmente como homo o heterodímero, para lo que requiere un dominio estructural bZIP que es importante para la dimerización y por ende para su función de estos factores (Fernandes y col., 1997). En concordancia, la proteína Yap6 de *X. dendrorhous* posee este dominio característico y además tanto el tamaño de la proteína como la posición del dominio bZIP a lo largo de ésta son similares a lo descrito en proteínas Yap6 de otros organismos como *S. cerevisiae*.

Por otra parte, la proteína Skn7 en *S. cerevisiae* forma parte de un sistema de señalización de dos componentes actuando como proteína receptora y efectora. Este factor regula genes de respuesta a estrés osmótico y oxidativo, para lo cual requiere de un dominio receptor o fosforeceptor (REC) y un dominio de unión a DNA (HSF) (Xin-Jian y col., 2009). Cabe destacar que ambos dominios fueron identificados en la proteína Skn7 de *X. dendrorhous* y que éstos serían esenciales para su función permitiendo la formación de dímeros y el reconocimiento de secuencias específicas de DNA.

En el caso del potencial regulador Rox1 de *X. dendrorhous*, éste cuenta con el dominio HMG característico y necesario para su función y tiene un tamaño similar al de la proteína Rox1 de *S. cerevisiae*.

En estudios previos se ha demostrado que el regulador Rox1 junto al complejo Cyc8-Tup1 estaría reprimiendo genes involucrados en la síntesis de ergosterol y que este proceso sería esencial para la resistencia bajo condiciones de estrés hiperosmótico (Martínez y col., 2011). Además, en su rol de regulador bajo condiciones de hipoxia, Rox1 también afecta genes de enzimas que utilizan oxígeno como aceptor de electrones que nuevamente incluyen algunas involucradas en la síntesis de esteroides (como *ERG11*), ácidos grasos (*OLE1*) y grupo hemo (*HEM13*) (Balasubramanian y col., 1993). Respecto de lo anterior, precisamente en el

transcriptoma de glucosa de la mutante *tup1* dos de los ORFs que tienen una representación de más de diez veces respecto al mismo ORF en la cepa silvestre, son los que codificarían la coproporfirinógeno oxidasa que en *S. cerevisiae* participa en la síntesis de grupo hemo y es codificada por el gen *HEM13* que es blanco de Rox1 y la metilesterol monooxigenasa involucrada en la síntesis de ergosterol y ácidos grasos. Esto último resulta interesante, puesto que se ha demostrado que existe una relación inversa entre la síntesis de ergosterol y ácidos grasos, y la carotenogénesis en *X. dendrorhous*. Es así que mutar algún componente del complejo Cyc8-Tup1 que pudiese ser más relevante para alguno de estos procesos, puede tener de manera indirecta efectos negativos sobre la síntesis de carotenoides. Esto último podría dar cuenta de que el aumento en la síntesis de carotenoides en la mutante *tup1* no fuese de la misma magnitud que en la mutante *cyc8*, como se comentó anteriormente.

Otro de los reguladores identificados fue Crt1 (Rfx1) que en *S. cerevisiae* regula genes inducidos por daño en el DNA. El análisis estructural de la proteína Rfx1 de *S. cerevisiae* (que consta de 811 aminoácidos) reveló que la región amino terminal es requerida para la interacción con el complejo Cyc8-Tup1 y por ende para la represión de los genes blanco. Además, luego del dominio represor (que abarca una región de 240 aminoácidos desde el extremo amino terminal), dicha proteína posee un dominio característico de unión a DNA denominado RFX. Este dominio es esencial para la función de la proteína y permite el reconocimiento de secuencias específicas de DNA y también la formación de homodímeros. En concordancia, la proteína Crt1 de *X. dendrorhous* posee un dominio RFX y presenta similitud con reguladores de la familia RFX. Esta familia es altamente conservada e incluye miembros desde proteínas de levaduras, nemátodos, ratones y humanos. En humanos se han identificado factores RFX1-3, mientras que en el caso de las levaduras *S. cerevisiae* y *S. pombe* sólo se ha identificado un integrante de esta familia en cada caso, denominados Crt1 y Sak1 respectivamente, considerados ortólogos de los factores descritos en humanos aunque regulan genes involucrados en funciones diferentes (Katan-Khaykovic y col., 1999; Zhang y Reese., 2005).

Estos antecedentes y los resultados obtenidos sugieren que el regulador identificado en *X. dendrorhous* corresponde a un ortólogo del factor Crt1 de *S. cerevisiae*.

También se identificó el factor Rgt1 que en *S. cerevisiae* media la represión de transportadores de glucosa de mediana y baja afinidad en ausencia de glucosa. Mientras que en elevadas concentraciones de glucosa es el factor Mig1 el que media la represión de transportadores de glucosa de alta afinidad. El factor Rgt1 descrito en *S. cerevisiae* se caracteriza por poseer cuatro dominios funcionales: en su extremo amino terminal tiene un dominio de unión a DNA tipo GAL seguido por un dominio de interacción con el corepresor Cyc8, un tercer dominio necesario para la activación de los genes blanco en presencia de glucosa y un cuarto dominio necesario para evitar la represión en condiciones de inducción de los mismos genes (Polish y col., 2004). En el caso de la proteína Rgt1 (deducida por traducción *in silico*) de *X. dendrorhous*, se logró identificar el dominio de unión a DNA tipo GAL característico y necesario para su función, sin embargo, cabe mencionar que la proteína deducida a partir del transcriptoma de *X. dendrorhous* constaría de 526 aminoácidos, teniendo aproximadamente la mitad del tamaño de la proteína descrita en *S. cerevisiae* y otras levaduras (Polish y col., 2004), por lo que serían necesarios estudios complementarios para confirmar la identidad de este posible gen.

Finalmente, se identificó el regulador Opi1 represor de los genes estructurales de la síntesis de fosfolípidos. En *S. cerevisiae* el factor Opi1 es capaz de interactuar con los corepresores pleiotrópicos Sin3 y Cyc8 (junto a Tup1) teniendo como consecuencia el reclutamiento de proteínas histonas deacetilasas (HDACs) y la represión de genes blanco. Es importante mencionar que el regulador Opi1 no une DNA sino que lleva a cabo la represión interactuando, a través de un motivo tipo cierre de leucina, con el dominio activador del regulador Ino2 inhibiendo su función y a la vez reclutando los corepresores antes mencionados. Para la interacción con los distintos corepresores y con el activador Ino2, Opi1 posee un dominio denominado OSID que abarca la mayor parte de la proteína (Jaschke y col., 2011) y

que también fue identificado en la proteína Opi1 de *X. dendrorhous*, lo que sugiere que corresponde a un ortólogo del regulador Opi1 de *S. cerevisiae*.

Por otra parte, el hecho de no haber identificado ORFs que codificaran los reguladores Aft1, Sko1, Cup9 y Yap4 se puede deber a la escasez de secuencias disponibles pertenecientes a organismos más cercanos a *X. dendrorhous* (basidiomicete), ya que la mayoría de estos genes se han descrito en *S. cerevisiae* (ascomicete) y en general no presentan mucha identidad o similitud con los genes de *X. dendrorhous*, dificultando su identificación. Es por esto que no haberlos identificado no significa que estos no se encuentren en esta levadura. Lo anterior es apoyado por los resultados de los análisis de los transcriptomas en que se lograron identificar ORFs de posibles genes que se encuentran mayormente representados en las cepas mutantes *cyc8* y *tup1* que posiblemente serían blancos de algunos de los reguladores de unión a DNA que no se logró identificar. Dentro de estos últimos encontramos genes de captación y metabolismo del hierro, transportadores de péptidos y genes de respuesta a estrés osmótico que posiblemente serían blancos de los reguladores Aft1, Cup9 y Sko1 (Proft y Struhl, 2002; Fragiadakis y col., 2004; Xia y col., 2008), respectivamente (Tablas II y III, ANEXO). Adicionalmente, cabe mencionar que se identificaron ORFs de proteínas de respuesta a estrés osmótico, oxidativo y de reparación de daños en el DNA en cuya regulación debiesen estar participando los reguladores Yap6, Skn7 y Crt1, respectivamente (Mendizabal y col 1998; Zhang y Reese, 2005; Hanlon y col., 2011).

El complejo Cyc8-Tup1 estaría involucrado en la regulación de diversos procesos en *X. dendrorhous* y uno de estos sería la carotenogénesis aparentemente a través del regulador Mig1; sin embargo, en estudios que se desarrollaron paralelamente en nuestro laboratorio y se analizó la producción de carotenoides en una cepa mutante *mig1*, se observó que la cepa mutante *mig1* produce una cantidad levemente mayor (~20% más) de carotenoides en comparación a la cepa silvestre (Bravo, 2015). Por otra parte, al estudiar los niveles de transcritos de dichos genes, éstos si se encuentran desreprimidos en presencia de glucosa en la mutante *mig1* en comparación a la cepa silvestre, lo que indica que Mig1 efectivamente

regula los genes carotenogénicos en *X. dendrorhous* (Bravo, 2015). Estas observaciones sugieren que los niveles de transcrito de los genes carotenogénicos (*crtI*, *crtYB*, *crtS*) no sería un punto limitante en la producción de carotenoides o también podría ser que el complejo Cyc8-Tup1 estuviese actuando junto a otro regulador de unión a DNA diferente de Mig1 regulando genes que incidan en la producción de carotenoides. En concordancia, en el análisis de transcriptomas no se identificaron transcritos correspondientes a genes exclusivamente carotenogénicos (*crtI*, *crtYB* y *crtS*) cuyo valor de RPKM en las cepas mutantes *cyc8* o *tup1* fuese evidentemente mayor que en la cepa silvestre al menos en presencia de glucosa. Lo anterior también coincide con lo observado mediante análisis de los niveles de transcrito de dichos genes por RT-qPCR, en que si bien las diferencias entre la cepa silvestre y ambas mutantes son significativas, son más bien limitadas en comparación a lo observado en otros genes analizados como *idi* y *FPS*.

En la Figura 28 se resumen las diferentes funciones que estaría cumpliendo el complejo Cyc8-Tup1 en *X. dendrorhous*. Cabe destacar que los reguladores Mig1 y potencialmente Rox1 reprimen genes que están directamente relacionados tanto con la disponibilidad de precursores para la carotenogénesis como con la síntesis de carotenoides en sí. Mientras que otros reguladores, afectan variados genes cuya expresión es necesaria bajo condiciones específicas.

Finalmente, los resultados obtenidos a lo largo de todo este estudio sugieren que los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous* serían funcionales y estarían codificando los componentes del complejo corepresor Cyc8-Tup1 que está involucrado en represión catabólica a través de su interacción con el regulador Mig1 como también en la regulación de diversos procesos a través de su interacción con otros reguladores de unión a DNA como Rox1, Crt1, Skn7 y Yap6, entre otros. Dentro de estos procesos destaca la carotenogénesis en *X. dendrorhous*, que estaría regulada a nivel transcripcional por un mecanismo en el que participa el complejo Cyc8-Tup1.

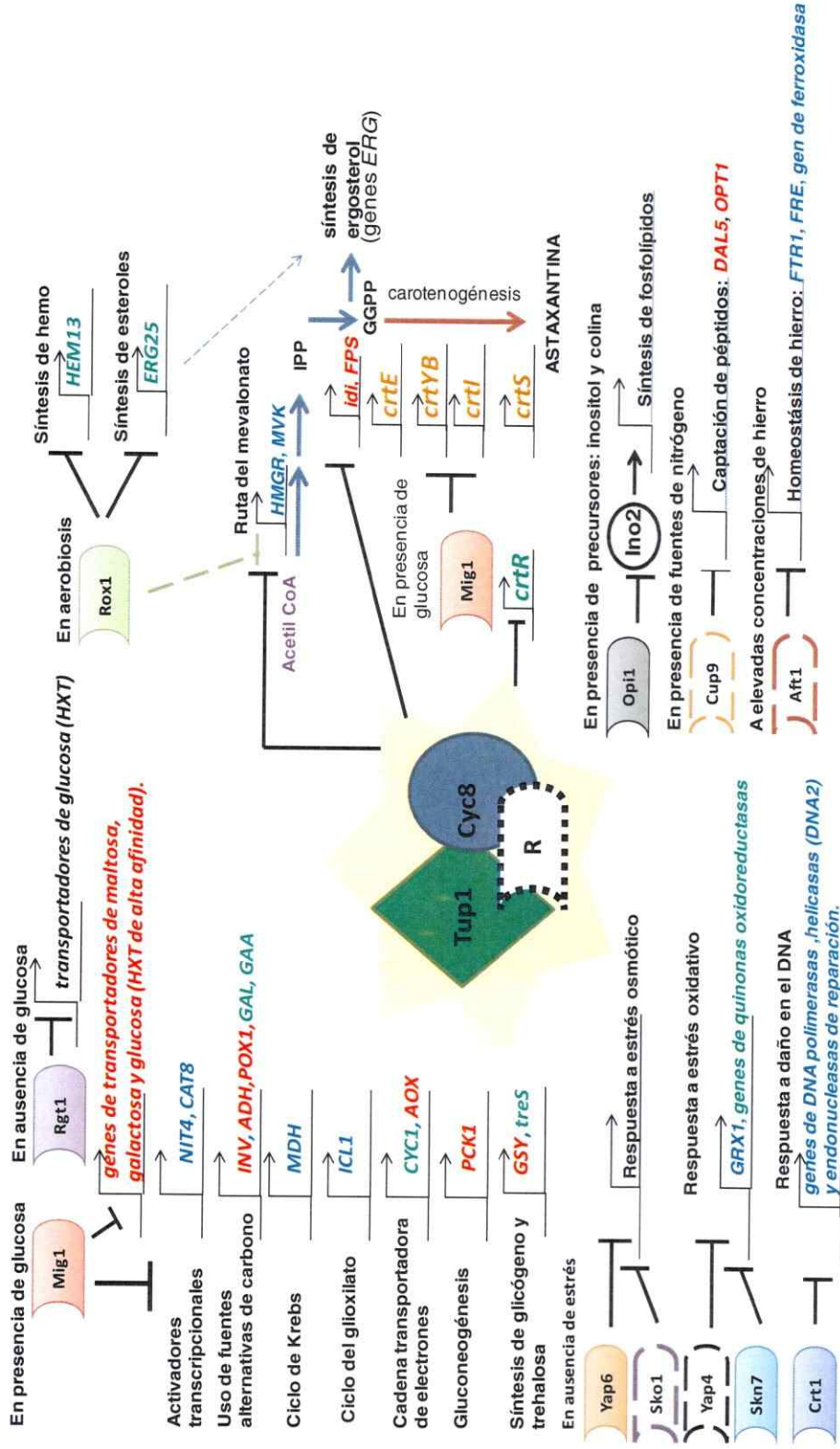


Figura 28. Funciones del complejo Cyc8-Tup1 en X. dendrorhous. El complejo Cyc8-Tup1 interactúa con distintos reguladores (R) causando la represión de diversos genes blanco bajo condiciones específicas. Se muestran los distintos reguladores que posiblemente se asocian con el complejo y los genes que éstos estarían regulando en X. dendrorhous. Entre los distintos reguladores están: Mig1, Rox1, Crt1, Skn7, Yap6, Opi1 y Rgt1 que fueron identificados en el transcriptoma de esta levadura y los reguladores Sko1, Yap4, Cup9 y Aft1 que no fueron identificados pero que se determinó que algunos de sus genes blanco descritos en otros organismos, se ven afectados por las mutaciones *cyc8* o *tup1* en X. dendrorhous. Los genes que se encuentran desreprimidos en las mutantes *cyc8* o *tup1* (identificados por análisis de los transcriptomas o por los experimentos de RT-qPCR) se destacan en azul y verde, respectivamente. En rojo se destacan aquellos desreprimidos en ambas mutantes. Los genes carotenogénicos se muestran en naranja y el efecto de ambas mutaciones sobre éstos se discute en el texto. Genes: *NIT4*: activador Nit-4 (para la asimilación de nitratos), *CAT8*: activador de genes gluconeogénicos Cat8, *INV*: invertasa, *ADH*: alcohol deshidrogenasa, *POX1*: Acil CoA oxidasa, *AOX*: oxidasa alternativa, *PCK1*: PEP carboxiquinasa, *MDH*: malato deshidrogenasa, *ICL*: isocitrato liasa, *CYC1*: subunidad 1 citocromo c oxidasa, *ERG25*: metilesterol monooxigenasa, *HMGR*: HMG-CoA reductasa, *MVK*: mevalonato sintasa, *treS*: trehalosa sintasa, *GRX1*: glutaredoxina, *HEM13*: coproporfirinógeno oxidasa, *ERG25*: metilesterol monooxigenasa, *HMGR*: HMG-CoA reductasa, *MVK*: mevalonato sintasa, *treS*: trehalosa sintasa, *GRX1*: glutaredoxina, *FPP* sintasa, *crtE*: GGPP sintasa, *crtYB*: fitoeno-β-caroteno sintasa, *crtI*: astaxantina sintasa, *crtS*: astaxantina sintasa, *idi*: IPP isomerasa, *FPS*: permeasa DAL5, *OPT1*: Transportador de oligopéptidos OPT1, *FTR1*: permeasa de hierro, *FRE*: reductasa ferrica. Ino2: activador de la síntesis de fosfolípidos.

5. CONCLUSIONES

- Los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous* son funcionales y ortólogos a los descritos en otras levaduras como *S. cerevisiae*. Éstos codifican las proteínas componentes del complejo corepresor Cyc8-Tup1 que regula la expresión de distintos grupos de genes a nivel de la transcripción, entre ellos, algunos involucrados en etapas tempranas de la síntesis de carotenoides.
- El complejo Cyc8-Tup1 participa en el mecanismo de represión catabólica y a través de éste regula la carotenogénesis en *X. dendrorhous*, lo que se ve reflejado en un aumento en la producción de carotenoides en las mutantes *cyc8*⁻ y *tup1*⁻.
- Finalmente, mediante el análisis de los transcriptomas de las cepas silvestre UCD 67-385, *cyc8*⁻ y *tup1*⁻ de *X. dendrorhous* cultivadas se concluye que el complejo Cy8-Tup1 está involucrado en la regulación de distintos grupos de genes involucrados en diversos procesos biológicos. Lo anterior es posible porque en *X. dendrorhous* existen distintos reguladores de unión a DNA que reclutarían el complejo a los promotores de los distintos genes blanco.

6. REFERENCIAS

- Adrio, J.L. y Veiga, M. (1995). Transformation of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnology Techniques*, 9: 509-512.
- Ahmed, YL., Gerke, J., Park H-S, Bayram, O., Neumann, P., et al. (2013) The velvet family of fungal regulators contains a dna-binding domain structurally similar to NF-kB. *PLOS Biology*, 11: e1001750.
- Alcaíno, J., Barahona, S., Carmona, M., Lozano, C., Marcoleta, A., Niklitschek, M., Sepúlveda, D., et al. (2008). Cloning of the cytochrome p450 reductase (*crtI*) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiology*, 8: 169.
- Alcaíno, J., Romero, I., Niklitschek, M., Sepulveda, D. y Rojas, C. (2014). Functional characterization of the *Xanthophyllomyces dendrorhous* farnesyl pyrophosphate synthase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase encoding genes that are involved in the synthesis of isoprenoid precursors, *PLoS ONE*, 9: 1-12.
- An, G.H., Schuman, D.B. y Johnson, E.A. (1989). Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 116-124.
- Augstein A., Barth K., Gentsch M., Kohlwein S.D. y Barth G. (2003). Characterization, localization and functional analysis of Gpr1p, a protein affecting sensitivity to acetic acid in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology*, 149: 589-600.
- Baeza, M., Retamales, P., Sepúlveda, D., Lodato, P., Jiménez, A. y Cifuentes, V. (2009). Isolation, characterization and long term preservation of mutant strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of Basic Microbiology*, 49: 135-141.
- Balasubramanian, B., Lowry, C.V. y Zitomer, R.S. (1993). The Rox1 repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic genes is a specific dna-binding protein with a high-mobility-group motif. *Molecular and Cellular Biology*, 13: 6071-6078.
- Bjerkeng, B. (2000). Carotenoid pigmentation of salmonid fishes - recent progress. En Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R. *Avances en Nutrición Acuícola V*. pp 71-89. *Memorias del V Simposium Internacional de nutrición Acuícola 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.*
- Bravo, N. (2015). Participación de la proteína Mig1 en la represión por glucosa de los genes carotenogénicos de *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis de Doctorado en ciencias mención Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Chan, K.M., Liu, Y.T., Ma, C.H., Jayaram M. y Sau S. (2013). The 2 micron plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*: a miniaturized selfish genome with optimized functional competence. *Plasmid*, 70: 2-17

- Chen, K., Wilson, M.A., Hirsch, C., Watson, A., Liang, S., Lu, Y. y Dent, S.Y. (2013). Stabilization of the promoter nucleosomes in nucleosome-free regions by the yeast Cyc8-Tup1 corepressor. *Genome Research*, 23: 312-322.
- Cifuentes, V., Hermosilla, G., Martínez, C., León, R., Pincheira, G. y Jiménez, A. (1997). Genetics and electrophoretic karyotyping of wild-type and astaxanthin mutant strains of *Phaffia rhodozyma*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 72: 111-117.
- Conlan, R.S., Gounalaki, N., Hatzis, P. y Tzamarias, D. (1999). The Tup1-Cyc8 protein complex can shift from a transcriptional co-repressor to a transcriptional co-activator. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 205-210.
- Contreras, G., Barahona, S., Sepúlveda, D., Baeza, M., Cifuentes, V. y Alcaíno, J. (2015). Identification and analysis of metabolite production with biotechnological potential in *Xanthophyllomyces dendrorhous* isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31: 517-526.
- Cooper, J.P., Roth, S.Y. y Simpson, R.T. (1994). The global transcriptional regulators SSN6 and TUP1, play distinct roles in the establishment of a repressive chromatin structure. *Genes y Development*, 8: 1400-1410.
- Córdova, P. (2012) Caracterización genético-funcional del gen de un represor general de la transcripción en la levadura carotenogénica *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Seminario de Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- D'Andrea, L. y Regan, L. (2003). TPR proteins: The versatile helix. *Trends in Biochemical Sciences*, 28: 655-662.
- Davie, J.K., Trumbly, R.J. y Dent, S.Y. (2002). Histone-dependent association of Tup1-Ssn6 with repressed genes *in vivo*. *Molecular and Cellular Biology*, 22: 693-703.
- DeRisi, J.L., Iyer, V.R. y Brown, P.O. (1997). Exploring the Metabolic and genetic control of exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 278: 680-686.
- Fagerstrom-Billai, F., Ekwall, K. y Wright, A.P.H. (2007). Individual subunits of the Ssn6-Tup11 / 12 corepressor are selectively required for repression of different target genes. *Molecular and Cellular Biology*, 27: 1069-1082.
- Fajardo, E. y Sarmiento, S. (2007). Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de Tesis para obtener el grado de Microbiólogo Industrial. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C.
- Fernandes L., Rodrigues-Pousada C. y Struhl K. (1997). Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Molecular and Cellular Biology*, 17: 6982-6993.

- Fragiadakis, G.S. y Alexandraki, D. (2004). Nhp6 facilitates Aft1 binding and Ssn6 recruitment, both essential for FRE2 transcriptional activation, *The EMBO Journal*, 23: 333-342.
- Frengova, G.I. y Beshkova, D.M. (2009). Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36: 163-180.
- Gancedo, J. M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 334-361.
- Goldstein, A. y Lampen, J.O. (1975). Beta-D-fructofuranoside fructohydrolase from yeast. *Methods in Enzymology*, 42: 504-511.
- Gu, W.L., An, G.H. y Johnson, E.A. (1997). Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19: 114-117.
- Hanlon, S.E., Rizzo, J.M., Tatomer, D.C., Lieb, J.D. y Buck, M.J. (2011). Direct targeting of the conserved co-repressor Tup1-Ssn6 in *S. cerevisiae*. *PLoS ONE*, 6: e19060.
- Hara, K.Y., Morita, T., Mochizuki, M., Yamamoto, K., Ogino, C., Araki, M. y Kondo, A. (2014). Development of a multi-gene expression system in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Microbial Cell Factories*, 13: 175.
- Hedges D., Proft M. y Entian K.D. (1995). *CAT8*, a new zinc cluster-encoding gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 15: 1915-1922.
- Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L. y Goycoolea, F.M. (2006). Astaxanthin: a review of its chemistry its applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46: 185-196.
- Horak, J. y Wolf, D.H. (1997). Catabolite inactivation of the galactose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: ubiquitination, endocytosis, and degradation in the vacuole, *Journal of Bacteriology*, 179: 1541-1549.
- Hu, Z.-C., Zheng, Y.-G., Wang, Z. y Shen, Y.C. (2006). pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 586-590.
- Huang, M., Zhou, Z. y Elledge, S.J. (1998). The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor. *Cell*, 94: 595-605.
- Jaschke, J., Schwarz, J., Clausnitzer, D., Muller, C. y Schuller, H. (2011). Pleiotropic corepressors Sin3 and Ssn6 interact with repressor Opi1 and negatively regulate transcription of genes required for phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics*, 285:91-100.

- Kajiwara, S., Fraser, P.D., Kondo, K. y Misawa, N. (1997). Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*, 426: 421-426.
- Katan-khaykovich, Y., Spiegel, I. y Shaul, Y. (1999). The Dimerization / repression domain of RFX1 is related to a conserved region of its yeast homologues Crt1 and Sak1 : a new function for an ancient motif. *Journal of Molecular Biology*, 294: 121-137.
- Kim, S.K., Lee, J.H., Lee, C.H. y Yoon, Y.C. (2007). Increased carotenoid production in *Xanthophyllomyces dendrorhous* G276 using plant extracts. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 45: 128-132.
- Law, C.J., Maloney, P.C. y Wang, D. (2008). Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annual Review of Microbiology*, 62: 289-305.
- Libkind, D., Moliné, M., de García, V., Fontenla, S. y Van Broock, M. (2008). Characterization of a novel South American population of the astaxanthin producing yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*, 35: 151-158.
- Libkind, D., Ruffini, A., van Broock, M., Alves, L. y Sampaio, J.P. (2007). Biogeography, host specificity, and molecular phylogeny of the basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma* and its sexual form, *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 1120-1125.
- Lockington, R.A. y Kelly, J.M. (2001). Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans* involves deubiquitination. *Molecular Microbiology*, 40:1311-1321.
- Lodato, P., Alcaíno, J., Barahona, S., Niklitschek, M., Carmona, M., Wozniak, A., Baeza, M., Jiménez, A. y Cifuentes V. (2007). Expression of the carotenoid biosynthesis genes in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biological Research*, 40: 73-84.
- Lodato, P., Alcaíno, J., Barahona, S., Retamales, P., Jiménez, A. y Cifuentes, V. (2004). Study of the expression of carotenoid biosynthesis genes in wild-type and deregulated strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Ex.: *Phaffia rhodozyma*), *Biological Research*, 37: 83-93.
- Loto, I., Gutiérrez, M. S., Barahona, S., Sepúlveda, D., Martínez-Moya, P., Baeza, M., Cifuentes, V., et al. (2012). Enhancement of carotenoid production by disrupting the C22-sterol desaturase gene (*CYP61*) in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiology*, 12: 235-250.
- Loto, I. (2015). Identificación y caracterización del gen HMGR que codifica la enzima HMG-CoA reductasa en *Xanthophyllomyces dendrorhous* y su rol en la síntesis de carotenoides. Tesis de Doctorado en Ciencias mención Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

- Luikenhuis S., Perrone G., Dawes I.W. y Grant C.M. (1998). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Molecular Biology of the Cell*, 9: 1081-1091.
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M.K., Gonzales, N.R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L.Y. y Bryant, S.H. (2015). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research*, 43: 222-226.
- Marcoleta, A. (2011a). Regulación transcripcional de la ruta de biosíntesis de astaxantina de *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis de Doctorado en Ciencias mención Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Marcoleta, A., Niklitschek, M., Wozniak, A., Lozano, C., Alcaíno, J., Baeza, M. y Cifuentes, V. (2011b). Glucose and ethanol-dependent transcriptional regulation of the astaxanthin biosynthesis pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiology*, 11: 190.
- Meijer, M.M., Boonstra, J., Verkleij, A.J. y Verrips, C.T. (1998). Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is related to the glucose concentration rather than the glucose flux. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 24102-24107.
- Melillo, E., Setroikromo, R., Quax, W. J. y Kayser, O. (2013). Production of α -cuprenene in *Xanthophyllomyces dendrorhous*: a step closer to a potent terpene biofactory. *Microbial Cell Factories*, 12: 13.
- Mendizabal, I., Rios, G., Mulet, J.M. y Larrinoa, F.D. (1998). Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS Letters*, 425: 323-328.
- Mercadante, A.Z. y Egeland, E.S. (2004). Carotenoids. Handbook. Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. Birkhäuser Verlag Basel-Boston-Berlin.
- Miao, L., Chi, S., Tang, Y., Su, Z., Yin, T., Guan, G. y Li, Y. (2011). Astaxanthin biosynthesis is enhanced by high Carotenogenic gene expression and decrease of fatty acids and ergosterol in a *Phaffia rhodozyma* mutant strain. *FEMS Yeast Research*, 11: 192-201
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426.
- Miller, M.W., Yoneyama, M. y Soneda, M. (1976). *Phaffia*, a new yeast genus in the deuteromycotina (blastomycetes). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 26: 286-291.
- Mortazavi, A., Williams, B.A., Mccue, K., Schaeffer, L. y Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 5: 621-628.
- Niklitschek, M. (2007). Desarrollo de un casete de resistencia a antibiótico en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Seminario de Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

- Niklitschek, M., Alcaíno, J., Barahona, S., Sepúlveda, D., Lozano, C., Carmona, M., Marcoleta, A., Martínez, C., Lodato, P., Baeza, M y Cifuentes, V. (2008). Genomic organization of the structural genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biological Research*, 41: 93-108.
- Ojima, K., Breitenbach, J., Visser, H., Setoguchi, Y., Tabata, K., Hoshino, T., Van den Berg, J., et al. (2006). Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a beta-carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. *Molecular Genetics and Genomics*, 275: 148-158.
- Osterlie, M., Bjerken, B. y Liaaen-Jensen, S. (1999). Accumulation of Astaxanthin all-E, 9Z and 13Z geometrical isomers and 3 and 3' RS optical isomers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is selective. *The Journal of Nutrition*, 129: 391-398.
- Palaomylytú, M., Tartas, A., Vlachakis, D., Tzamarias, D. y Vlassi, M. (2008). Investigating the structural stability of the Tup1-interaction domain of Ssn6: Evidence for a conformational change on the complex. *Proteins*, 70: 72-82.
- Parnell, E.J. y Stillman, D.J. (2011). Shields up: the Tup1-Cyc8 repressor complex blocks coactivator recruitment. *Genes y Development*, 25: 2429-2435.
- Phaff, H.J., Miller, M.W., Yoneyama, M. y Soneda, M. (1972). A comparative study of the yeast flora associated with trees on the Japanese Island and on the West Coast of North America. *Fermentation Technology Today: Proceedings IV IFS*, (Ed.): G. Terui: 759-774.
- Polish, J.A., Kim, J.-ho. y Johnston, M. (2005). How the Rgt1 transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by glucose. *Genetics*, 169: 583-594.
- Poutou, R., Quevedo B., Córdoba H., Sáenz, H. y Barrera, L. (2005). Influencia de la fuente de carbono sobre la expresión de proteínas AOX1-reguladas en *Pichia pastoris*. *NOVA*, 3: 75-87.
- Proft, M., y Struhl, K. (2002). Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI / SNF in response to osmotic stress. *Molecular Cell*, 9: 1307-1317.
- Rodríguez-Sáiz, M., de la Fuente, J.L. y Barredo, J.L. (2010). *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88: 645-658.
- Rolland, F., Winderickx, J. y Thevelein, J.M. (2002). Glucose-sensing and signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Research*, 2: 183-201.
- Roy, A., Jouandot, D., Cho, K.H. y Kim, J.H. (2014). Understanding the mechanism of glucose-induced relief of Rgt1-mediated repression in yeast. *FEBS Open Bio*, 4:105-111.

- Saier, M.H., Beatty, J.T., Goffeau, A., Harley, K.T., Heijne, W.H.M., Huang, S., Jack, D.L., et al. (1999). The major facilitator superfamily. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1: 257-279.
- Sambrook, J. y Russell D.W. (2001). *Molecular Cloning. A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez-Torres, P., González-Candelas, L. y Ramón, D. (1998). Heterologous expression of a *Candida molischiana* anthocyanin-beta-glucosidase in a wine yeast strain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 354-360.
- Sandmann, G. (2001). Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385: 4-12.
- Schmidt, I., Schewe, H., Gassel, S., Jin, C., Buckingham, J., Hübelin, M., Sandmann, G., et al. (2011). Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89: 555-571.
- Schroeder, A. y Johnson, E.A. (1993). Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia Rhodozyma*. *Food Microbiology*, 139: 907-912.
- Schroeder, W.A. y Johnson, E.A. (1995). Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *The Journal of Biological Chemistry*, 270: 18374-18379.
- Schüller, H.-J. (2003). Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 43: 139-160.
- Smith, R.L. y Johnson, A.D. (2000). Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*, 25: 325-330.
- Timson, D.J. (2007). Galactose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dynamic Biochemistry. Process Biotechnology and Molecular Biology*, 1: 63-73.
- Todd R.B., Lockington R.A. y Kelly J.M. (2000). The *Aspergillus nidulans creC* gene involved in carbon catabolite repression encodes a WD40 repeat protein. *Molecular & General Genetics*, 263: 561-570.
- Treitel, M.A. y Carlson, M. (1995). Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92: 3132-3136.
- Trumbly, R.J. (1988). Cloning and characterization of the *CYC8* gene mediating glucose repression in yeast. *Gene*, 73: 97-111.
- Trumbly, R. J. (1992). Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 6: 15-21.

- Tzamarias, D. y Struhl, K. (1995). Distinct TPR motifs of Cyc8 are involved in recruiting the Cyc8-Tup1 corepressor complex to differentially regulated promoters. *Genes y Development*, 9: 821-831.
- Ukibe, K., Katsuragi T., Tani, Y. y Takagi, H. (2008). Efficient screening for astaxanthin-overproducing mutants of the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* by flow cytometry. *FEMS Microbiology Letters*, 286: 241-248.
- Verdoes, J.C., Krubasik, K.P., Sandmann, G. y Van Ooyen, A.J. (1999a). Isolation and functional characterization of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Molecular General Genetics*, 262, 453-461.
- Verdoes, J.C., Misawa, N. y van Ooyen, A.J. (1999b). Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnology and Bioengineering*, 63: 750-755.
- Verdoes, J. C., Sandmann, G., Visser, H., Diaz, M., Mossel, M. V. y Van Ooyen, A. J. (2003). Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 3728-3738.
- Wang, W., Yu, L. y Zhou, P. (2006). Effects of different fungal elicitors on growth, total carotenoids and astaxanthin formation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Bioresource Technology*, 97: 26-31.
- Weber, R.W.S., Becerra, J., Silva, M.J. y Davoli, P. (2008). An unusual *Xanthophyllomyces* strain from leaves of *Eucalyptus globulus* in Chile. *Mycological Research*, 112: 861-867.
- White, M.J., Hirsch, J.P. y Henry S.A. (1991). The *OPI1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a negative regulator of phospholipid biosynthesis, encodes a protein containing polyglutamine tracts and a leucine zipper. *The Journal of Biological Chemistry*, 266: 863-872.
- Williams, F.E. y Trumbly, R.J. (1990). Characterization of *TUP1*, a mediator of glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular and Cellular Biology*, 10: 6500-6511.
- Winzeler, E.A. (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, 285: 901-906.
- Wong, K.H. y Struhl, K. (2011). The Cyc8-Tup1 complex inhibits transcription primarily by masking the activation domain of the recruiting protein. *Genes & Development*, 25: 2525-2539.
- Wozniak, A., Lozano, C., Barahona, S., Niklitschek, M., Marcoleta, A., Alcaíno, J., Sepulveda, D., et al. (2011). Differential carotenoid production and gene expression in *Xanthophyllomyces dendrorhous* grown in a nonfermentable carbon source. *FEMS Yeast Research*, 11: 252-262.

- Xia, Z., Turner, G.C., Hwang, C.-sang, Byrd, C. y Varshavsky, A. (2008). Amino acids induce peptide uptake via accelerated degradation of CUP9 , the transcriptional repressor of the PTR2 pepetide transporter. *The Journal of Biological Chemistry*, 283: 28958-28968.
- Xin.-jian, H Mulford, K.E. y Fassler, J.S. (2009). Oxidative stress function of the *Saccharomyces cerevisiae* Skn7 receiver domain. *Eukaryotic Cell*, 8: 768-778.
- Yamaguchi-Iwai Y., Dancis A. y Klausner R.D. (1995). AFT1: a mediator of iron regulated transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 14: 1231-1239.
- Yamane, Y., Higashida, K., Nakashimada, Y., Kakizono, T. y Nishio, N. (1997). Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 4471-4478.
- Yuan, G.F y Marzluf, G.A. (1992). Molecular characterization of mutations of nit-4, the pathway-specific regulatory gene which controls nitrate assimilation in *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*, 6: 67-73.
- Zhang, Z., Varanasi, U. y Trumbly, R.J. (2002). Functional dissection of the global repressor Tup1 in yeast: dominant role of the C-terminal repression domain. *Genetics*, 161: 957-969.
- Zhang, Z., y Reese, J.C. (2005). Molecular genetic analysis of the yeast repressor Rfx1 / Crt1 reveals a novel two-step regulatory mechanism. *Molecular and Cellular Biology*, 25: 7399-7411.
- Zimmerman, F.K. y Entian, K.D. (1997). Yeast sugar metabolism. *Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications 1° Edición*. Technomic Publishing Company.
- Zwietering, M.H.,Jongenburger, I., Rombouts, F.M. y Van 't riet, K. (1990) . Modeling of the bacterial growth curve .*Applied and Environmental Microbiology*, 56: 1875-1881.

ANEXO

En este anexo se presenta información complementaria a la descrita en la sección de resultados.

Secuencias.

Secuencia 1. Secuencia nucleotídica del gen *TUP1* de *X. dendrorhous* y su respectiva secuencia aminoacídica deducida (utilizadas para análisis en el objetivo específico I).

Secuencia nucleotídica ORF del gen *TUP1* de *X. dendrorhous*.

ATGCTCGACGCCGTCAAAGAGAGTTTGAAGCACTCAACGCCGATGCCAGTCTCTGAAAAAGTCAACGAGACGAGATGGAAGCAAAGAT
CGCGCTACAGATCCAAGAGACCGCTTTGATCAGACAGAATCTCTACGACCTCGAAGCCCAACACGTCAAATCAGAAACGACTACGAAA
ACGAAATCTCTACCTGCGACGAGAACTCGAACTCCGAGGACCAAAGGTCTGCCCCGGAATCCCCCTTCCCCATCAACAACACCAGGCT
CCCATCTTCCCTCCGTCTCGTCCCCCTCACGGCAGAGAAGACCGAGGGAGAAACAGCACCGGCTTATGGGTGCCCGCCAGGCTTGGC
CGGCAAATCCAAGATTCAGTCGGACTCCCTGGTCAACAATTCCAGCTCCACATCATCCACCAACTCCCAACCGCTTCAACACCCCTC
TGCCAGTCTTTCCAACGGFTCCGTGAGCTCCAACACACCCCTCACTCCCTCCGATGCAGATCCAAAATAGCTCCATTCCCGGTTTGCTC
CCTCACCCAGCAGCAGCAACAGCAACCTCAATCCAGCCTTCTCCACTCACTCCCCCTTGCCCTCGTCTCTCCATCTGGCCGGCTC
GGCCGGTAACACTGGCTCGATCCCCTTGAGGGGTAGTCCGAATCTGTTGAGCGCATCGGCAGGCCCGGCTTGACCGGCCCGTTCGCGT
CCAACCTCCCCACCGCCGAGAGTCGTCGCCAGCTACAACAACAGCAGCAACAGCAACAGCAACAGCAACAGCAACAGCAACAGCAAC
CCCAACTCCCAACAGCAAAGGACATTCATGACCGGCAGGCTCGACTCGGCACAAGAATCCCCTCCCGGCCCTGGTGGTATCCCTCC
TCCCCCTGTTGGAGGGTTCGTGAGAGCAACAGACCGTTCGTTCCGGATATCGATCCAGACGTCACTCCAGAGACCTCAAAGGAAG
GCTCAGACTGGGTTCGTATCTGGAGCCCAAAGCAAAAAGTGTGGAGTCAACCTCGTTCACAATCTCGTCCACGAAAGTATCGTT
TGCTGCGTCAAGTCTCAAACGATGGAAATGGCTCGGCACAGGTTGCAACCGAACCGTCCAGATCTTTGACACAAAGACCGGAGCCAA
AAGCTGTGTGCTGCAAGACGATAGCAGCCTTATAATGGAGACCTTACATCCGAACGATTTGTTTCTCCCGGATGGAAGCTTTTGG
CCACAGGTGCTGAAGATCGACAGATCAGAATCTGGGACATCAAAGCTCGCAGAATCCGACACCTTCTCCAAGGCCACTCGCAAGAGATC
TACTCACTCGAGTTCAGCAGCGACGGCAGACACCTTGTCTCTGGCAGCGGTGACAAGAGCGCTCGGATCTGGGATATCGAGAACGGCGC
TTGCGTGTGATCTTCGGGTCGAAGACTTTGTTATCGGAGAGTCCGGACCGGTCGATGCCGGCCCTCACCAGTGTGGCTGTCTCGCCCG
ATGGTCGATACGTAGCAGCGGTTTCGTTGGACCGCTCGTACGCATCTGGGACACCCAGACGGGTGTTGAGCTCGGTCGATTACCGGT
CATTCCGATTCGGTATACAGTGTGGCGTTTCCCCCTGATGGAAGCTTCCCTTGTCTCGGATCCCTTGACCGAACATTACGAATCTGGGA
TCTATCCCCCCCCTCCTTCCACCGCTTCAAACCTCGCGGACGCTCGAGTTCATGCCCAATGGAGAACC CGGAACAGGGTACGGCGCCT
GCCACAACGTTCTTGCCGGACACAAGGATTATGTTCTTCCGTTGGAGTTTCAAATGACGGGCGATGGATTGCCTCTGTTCAAAGGAC
AGAAGTGTGCTTTCTTTGATCCGCTACGAACCCAGCCAGCTGATGCTCCAAGGCCATAAAAACCTCGGTCACTCGATCGATCTTTC
GAAGTCGTCCGGTCTGTTGGCCACAGGCTCGGAGATCTGAACGCACGGATATGGAGGTATGATTCCGTTAGGGATTAG

Secuencia aminoacídica Tup1 de *X. dendrorhous*.

MLDAVKREFEALNADASLWKSQRDEMEAKIALQIQETALIRQNLVDLEAQHVKIRNDYENEISHLRRELELRGPKVLPGLPLPHQQHQA
PILPSVSSPHGREDRGRNSTGFMGAPPGLAGKSKDSVGLPGHQHSASTSSTNSQPLQHPLPSLSNGSVSSNTPSLPPMQIQNSSIPGLL
PHQQQQQQPQSPSSTHSPLSSSHLAGSAGNTGSIPLRGSNLLSASAGPALTGPFASNPPPPRVPVQLQQQQQQQQHQQMLPPP
PNSQQQRDIHDRQARLGRTPTPGPGGI PPPVGGVVREQQTVVSDIDPDVTSRDLKKEGSDWVVIWSEPKAKKVLVDNLVHNLVHESI
CCVKFSNDGKWLGTGCRNFVQIFDTKTGAKSCVLQDDSTPYNGDLYIRTI CFSPDGKLLATGAEDRQIRIWDIKARRIRHLLQGHSEI
YSLEFSSDGRHLVSGSGDKSARIWDIENGACVFDLRFVDFVIGESGPDVAGLTSVAVSEDRGYVAAGSLDAVRIWDIQTGVQLGRFTG
HSDSVYSVAFAPDGSFLCSGSLDRTLRIWDLSPPPSPPSNSRLEFMPNPEPPTGYGACHNVLAGHKDYVLSVGVSNDRWIASGSKD
RSVLFDSATNQPLMLQGHKNSVVISIDLSKSSGLLATGSGDLNARIWRYDSVRD*

Análisis secuencia 1B.

A) Resumen del resultado del análisis mediante BLASTp de la secuencia aminoacídica de la proteína Tup1 de *X. dendrorhous*.

Descripción	cobertura	E value	identidad
general transcriptional repressor [<i>Trichosporon asahii</i>]	71%	4E-179	62%
general transcriptional repressor [<i>Cryptococcus neoformans</i>]	68%	1E-171	62%
general transcriptional repressor [<i>Cryptococcus gattii</i>]	78%	1E-171	56%
transcriptional repressor TupA/RocA [<i>Aspergillus kawachii</i>]	67%	5E-135	53%
transcriptional repressor rco1 [<i>Aspergillus niger</i>]	67%	6E-135	53%
TPA: transcriptional corepressor [<i>Aspergillus nidulans</i>]	66%	7E-134	53%
TupA protein [<i>Penicillium marneffeii</i>]	68%	8E-134	53%
TupA [<i>Emericella nidulans</i>]	66%	2E-133	53%
transcriptional repressor TUP1 [<i>Ajellomyces capsulatus</i>]	74%	2E-132	51%
transcriptional repressor, TUP1 [<i>Yarrowia lipolytica</i>]	54%	5E-132	54%
chromatin associated protein [<i>Laccaria bicolor</i>]	66%	2E-131	55%
transcriptional repressor TUP1 [<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>]	66%	2E-131	53%
transcriptional repressor TUP1 [<i>Ajellomyces dermatitidis</i>]	64%	1E-130	54%

B) Resumen del resultado del análisis mediante SMART BLAST de la secuencia aminoacídica de la proteína Tup1 de *X. dendrorhous*.

Descripción	cobertura	E value	identidad
WD40 repeat-containing protein [<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>]	75%	0.0	99%
transcriptional repressor TUP1 [<i>Dictyostelium discoideum</i>]	53%	1E-125	53%
transcriptional corepressor Tup11 [<i>Schizosaccharomyces pombe</i>]	99%	1E-113	35%

Secuencia 2. Secuencia aminoacídica de la proteína Yap6 de *X. dendrorhous* y su respectiva secuencia aminoacídica deducida (utilizadas para análisis en el objetivo específico IV).

MQIQNSQGHVEVPSEVLRAYLDRIPRTDDHDQRATDPEQGEHEHGDAPPSASEPTIQDLPLPVSDFSFHSTSTHREDQDHDADDHELDP
RKAGPSKPRVSKRKQSNRPSPSTIYSPSEDHSAPLAGQTYHTLPLSPVSHPHYASNQDHHYAHSSQSTHAHQSAPLGVGQGGHGHQ
PHQHQLNPHLHHTDDLPGYPGPTDDSTGGGQLPLLADRASGVGEDSGIQSSIGEDPYGRELDHFGSADVGGQAHGDLAEAGEGSSGGG
NGRKKGRELSKTKRAEQNRKAQRAFRQRDQNIKDLSDKAEQLLIAQQNEADANRRWQEAQVKIEQLRNENAALRTALTLMRTERS DV
RTNIDPNRSLSHPQELDHPHSHGQDHLQLSLAHHQQQQQQQQQQQQQQVLSASDGAENGAISGTGTGVGDIQSDEKADEDLGLS
GVDVAVGVVTEESGERKDLG*

Secuencia 3. Secuencia aminoacídica de la proteína Skn7 de *X. dendrorhous* y su respectiva secuencia aminoacídica deducida (utilizadas para análisis en el objetivo específico IV).

MSSAMGSRSTSSQGTAPNNIKQVAQGPSEFVKKLFKMLEDDAFDDVVAWSPKGD SFLVKNMNEFTTRILPQTFRHSNFASFVRQLNKYD
FKVKNEDGGGAETSWFKHPEFNTTSGESLENIKRKVPAPKKNAGQTQSTTNPPLGRLVNL SRVSSNPPLATSSDVPGRPI SPLPSI
SNVHSTSNSSPSTVVGPSHHQYQQNQGNQGLNQTLPIDPQAFCALQAQVAALQQSHTTIFRHVQTLQERYQEVNLNDLTRLQRATGG
TEALVSDMVGYLKLENYDQRSNQETPHFTLGSSYQALINPNSNSNQNTSNTNTS PRNTNTNTNSANTNTNSNPNLGAPQGDYV
FQRGNVQPAYEPTQPTQQQSTSNSSPFAQSSQSOTRQYPAYHLPKTSRKGRERHQPGRIGGSAGGGGEGGAGGNTGSAGGGREWE
ENWDRPSSQDQAQAGGQSQQMTATRSQDPLQQQQQQQQQQQQQQQQSQDDPTAAVAAAGISSVQFETANPFPFPYKHNPMQMN
GDLNLSLLPDMGRRGSAI LSETVGPNGLKVLTVGQLRFRESIESDDGGGIGGSGNGKIVDGFESFDWDDHLSRSGQTHEHGSTTKVBR
AIEDGRKTDGTHEQAYIQAGGSRNSSFGGFLNGRNHPSSGGSDGSPATPVNGT SNGAVTVVNPNGNASSNSGVS VSSSSVNAQM
SASTNSTHGHQHRRHSSKSKGLRVRSTYVPGWSVPPRVLIVEDAVYRKMSKLELVFGCSFDIATDGIGAVNKMNLEKYDLVLM
DIVMPNLDGVSATSLIRQFDSMTPIISMTSNNPEDVLSYSSGMTGHLPKPENKESLLGLLEKHLIHLTSVQQLQVLRPPNPGTGPPL
SDPVSDDALLTGAQALQNGEIAEGEEMKNPLIGMGLRDDQYMIQNLISSESVGDGLNSTLFSERRRGSPSIEALGQGNPQASGLGG
PQVQGGGESGLKRHLEEDAFDGPDGSKRHRFEDVTE*

Secuencia 4. Secuencia aminoacídica de la proteína Rox1 de *X. dendrorhous* y su respectiva secuencia aminoacídica deducida (utilizadas para análisis en el objetivo específico IV).

MSDPKPSPTAPPPIRAESFPSSLSDRGQHYHPNPEQSSSALFYEPSSILLPSQSPYITSTASFSSPGLPETVSTFPVAPAITPSSDLH
HSHHHYHQQLPPLPPRQQQQQQSTSTSWPSSSDWKPSAAAAMTMRPSSDHLQNVNSQSSAWSVSSGFPSPRWSSSSSSTTAS
SNSVASASSSSLSGLTLELSNASVTESSPLENGVFKVPVQPGVSAPKKTNSHTKPTPEGHVPRPRNSFMLYRMDVVNRGLIKEETKHQNI
SKI VGLMWKGLSDTQQAPYRLAAQKEKDEHNRLYPDIYIQPAGAKKKPSRLHQGSKASKKAASLLENSKKLKIDKGRAXKTTTEIVP*

Secuencia 5. Secuencia aminoacídica de la proteína Crt1 de *X. dendrorhous* y su respectiva secuencia aminoacídica deducida (utilizadas para análisis en el objetivo específico IV).

MSDNNDALSVLSALASQASLQKASLPSSNHSHPHSSQQDVLHLHDEQDHIHVHIGLDPDGMLLI PNHSAEDDQLSITLGLMEGADDSG
VGPGENGAGQTHNHGHGHNLSYSRRPDQRAENEQQMTEMDHGPIDLSKQLIGEQEGSEENTLVDGSERQQGVHSGKSTPNKDMN
PFAYKWLNEHYTFSKHTIARTAVYASYTAASEEAGVKPLNAATFGKCIKSVFKDVKTRRLGTRGQSRNYCGIAPSSIEBETRLARFG
EVSTVSPSTSNPVSHSMVASTSASTSINSRPTLISNVGHFKRRSSSSAVHLNIVEDDHLLEDDNDGDDGGIEGEYDVEGDSVFSLSLNG
KKRNVDTMTEDEVLDGERDMEGITESNRKKS KRSTSLFSDEGEAANAASTTREGEQVQHEDEALRSLRECIPALRSSASPLPNPQF
PNSQTNLTDPPVPHLSDPDSHSHPLDPPDRLSRLAILTYAKDYILYIRADMEKLRKEKSEWESFARSLDGGAESWRAWQQRQKPPQPF
HQQRQQPSLPIPTPLPISLPLPLPSAQPSAASRIPSRSTHELSSDIRSINPVGSLEISSXRSIRF*

Secuencia 6. Secuencia aminoacídica de la proteína Rgt1 de *X. dendrorhous* y su respectiva secuencia aminoacídica deducida (utilizadas para análisis en el objetivo específico IV).

MDHSDVSDSAKKRMSKFLACLKCRSRKIKCDSRKPVCENCEKKGFEVCFDETPKTRGPDKNPGRKRRTAAQMHAEAKLLRGQGLSETS
KKSSAKAASSLSSIEKNQAFSNQFNHSAEFSSQQIPTFLSPKIDESSDGRRTSSNDMLSASSSSGLLIDSSHVLASNPSPHNSHVA
DLRRPGPPFASGFPSQSADADEGSSDPSSLPFKFHHHQQTRHHHRHQQNHYIHPSAIASSYTYGAPPLSLPPQMFSPHSGTYSSQ
DPSMNARLSYDPQSNNETSQLAESHSMPRQPSQATSVHLALVSPVPSNSNQNTSSQNNYQLGYDNPRTQYQRYQQNDLQQMQASSI
NPSHSGHVYQYPSSAPASGESQLSSGYQHYNQQRALYQQRQSRQSMYQAPTSSSFPYQPRPLTSTPTPVYDQAQHMYYPLHQQQQ
PDFSHQAYQSSPRLLGKRRSEEAFFDQVPEQSAASQVEPVRTNDILKQPDPRPMSRRTREDGQYMLELELSGKEKIEAHK*

Secuencia 7. Secuencia aminoacídica de la proteína Opi1 de *X. dendrorhous* y su respectiva secuencia aminoacídica deducida (utilizadas para análisis en el objetivo específico IV).

DFVSRVSMMPVVNTALKAYETAKGGRVVKYGAIEVSSVKTISRPMVMDRIDPRLTGAMDDWGCRTLDRVGLSTPGSFLPPTNIEERY
RSTSTATSSIRSSSLSGSDHMSRSDSPLENRVKREEDPQAQSSSFLLLHRSTRSRSQSRVPTSQPGQALVHVPSSETKEVERTTGGNT
GRWSSMLVEAGMTAGGIGAAVSEESMKSLEYCLQWLQYATSHITNQISILRNFIASLNDSSASSQALISPSALESLSKIKADVNTIRK
VVDVSKYAGGALPEPARRTVRRFILGLPERWERANERLNRESGQSGELEAGVPGVQVGMARGAAGRVMTLAVESLDMITGLAQVFGES
LERAEAWIERLRIILGPQR*



Tabla I. Análisis completo de genes potencialmente regulados por glucosa presentes en *X. dendrorhous* homólogos a los descritos en otras levaduras. Los genes se encuentran agrupados según el proceso en que participan.

gen/producto	Proceso biológico	385		<i>cyc8</i>		<i>tup1</i>		Glucosa	
		g/s	g/m	g/s	g/m	g/s	g/m	<i>cyc8</i>/385	<i>tup1</i>/385
<i>crtE</i> / geranil geranil pirofosfato sintasa	síntesis de esteroides/isoprenoides	0,1	0,2	0,2	1,4	0,2	0,1	1,3	0,9
<i>crtS</i> / astaxantina sintasa	síntesis de carotenoides	0,5	0,6	1,3	2,2	1,2	2,3	2,1	2,0
<i>crtI</i> / citocromo p450 oxidoreductasa		0,8	2,0	1,3	1,6	0,4	0,9	1,1	0,7
<i>FBP1</i> / fructosa 1,6 bisfosfatasa	gluconeogénesis	0,2	0,9	0,5	0,3	0,4	1,1	1,0	1,7
<i>PCK1</i> / PEP carboxiquinasa		0,01	0,3	1,0	0,9	0,04	0,2	19,7	2,5
<i>MLS1</i> / malato sintasa	ciclo del glioxilato	0,8	1,4	0,7	0,3	0,2	0,7	0,4	0,3
<i>ICL1</i> / Isocitrato liasa		0,2	0,7	1,1	0,2	0,2	0,8	0,5	0,7
<i>GAA</i> / glucan 1,4 α glucosidasa (glucoamilasa)		0,5	1,5	2,1	1,3	0,8	2,9	1,0	2,2
<i>GSY1</i> / glicógeno sintasa	metabolismo de carbohidratos	0,7	0,8	1,9	0,9	1,1	2,7	0,8	1,4
<i>treS</i> / trehalosa sintasa		0,3	0,7	0,4	0,9	2,2	4,3	1,2	6,3
<i>INV</i> / β - fructofuranosidase		0,4	0,3	0,6	0,5	0,8	1,2	2,4	2,8
<i>SNF4</i> / Complejo quinasa SNF1, subunidad γ	Regulación del metabolismo de carbohidratos	0,7	0,8	1,4	0,7	1,1	1,5	1,0	1,5
<i>SNF3</i> / sensor de glucosa	Señalización por glucosa	0,7	0,4	1,9	0,4	0,9	0,9	4,3	2,0
<i>ADH</i> / Alcohol deshidrogenasa	Metabolismo de alcoholes	0,4	0,4	0,5	3,9	2,0	0,7	4,3	3,4
<i>POX1</i> / acyl CoA oxidasa	Metabolismo de ácidos grasos	0,4	0,6	0,7	0,3	1,2	1,5	2,3	2,9
<i>ERG10a</i> / cetoacil CoA tiolasa		0,3	0,4	0,4	0,2	1,1	1,5	2,3	3,3
<i>GRR2</i> / gen represible por glucosa 2	desconocido	0,6	0,7	1,1	0,8	1,0	1,3	0,9	2,0

Razón g/s: razón entre la representación en glucosa y succinato; Razón g/m: razón entre la representación en glucosa y succinato. Se destacan en negrita las razones menores a 1 que sugieren una mayor expresión en succinato a nivel de mRNA en la cepa silvestre. Además en las últimas dos columnas se compara lo obtenido en glucosa entre la cepa silvestre y las cepas mutantes. PEP: fosfoenolpiruvato

Tabla II. A) Genes identificados en el transcriptoma en glucosa de la cepa *cyc8* que tienen un valor de RPKM 2,5 a 5 veces mayor que el valor respectivo en la cepa silvestre. Se detalla el resultado del análisis de BLAST (datos con los que se contruyó la figura 17, A y B).

Descripción/Resultado de análisis de BLAST	Proceso biológico	Organismo	E-value	% Id	385		<i>cyc8</i>		Glucosa
					g/m	g/s	g/m	g/s	<i>cyc8</i> -/385
Transporte de glucosa de alta afinidad	Transporte de azúcares	<i>C. torrendii</i>	1,6 E-105	54	0,2	0,2	0,6	0,5	5,0
Transportador general de sustratos (MFS)	Transporte transmembrana	<i>R. toruloides</i>	1,3 E-143	59	0,7	2,9	2,2	1,3	3,1
MID1, canal de calcio	Transporte de calcio	<i>M. royeri</i>	4,2 E-55	36	1,1	0,9	1,2	1,7	3,8
Transportador general de sustratos (MFS), transportador de ditrosina	Transporte transmembrana	<i>C. gattii</i>	1,9 E-130	49	0,5	0,2	2,7	1,6	2,7
Proteína fosfatidilinositol transferasa /csr1	Transporte de fosfolípidos	<i>H. irregulare</i>	7,5 E-26	28	0,1	0,1	0,3	0,1	2,7
Receptor de señal de direccionamiento a peroxisoma	Importación de proteínas a peroxisoma	<i>M. ambiguus</i>	1,4 E-71	35	0,6	0,8	0,5	1,6	3,5
Transportador general de sustratos (MFS)	Transporte de transmembrana	<i>C. gloeosporioides</i>	1,4 E-24	53	0,7	0,7	0,6	1,5	0,7
FTR1, permeasa de hierro de alta afinidad	Transporte y asimilación de hierro	<i>C. gattii</i>	1,4 E-128	51	6,8	5,3	2,8	1,3	2,5
APC permeasa de aminoácidos	Transporte transmembrana de aminoácidos	<i>T. versicolor</i>	2,9 E-159	53	0,6	0,3	1,4	0,4	2,7
Transportador general de sustratos (MFS)	Transporte transmembrana	<i>A. fumigatus</i>	6,1 E-171	51	2,2	0,6	1,5	1,4	3,3
MFS transportador/ permeasa DAL 5	Transporte de péptidos	<i>M. royeri</i>	5,3 E-151	46	1,8	0,004	0,2	0,04	4,4
Transportador de aminoácidos, familia AAT	Transporte transmembrana de aminoácidos	<i>R. solani</i>	0	66	0,6	0,4	1,2	0,5	3,4
peroxina 14	Importe de proteínas a peroxisomas	<i>C. gattii</i>	7,7 E-31	38	0,4	0,4	0,9	1,0	2,8
Transportador ABC de multiresistencia a drogas	Transporte transmembrana/respuesta a drogas	<i>L. bicolor</i>	0	43	0,5	0,2	3,1	3,4	3,2
transportador de aminoácidos neutros	Transporte de aminoácidos	<i>A. flavus</i>	1,8 E-128	44	0,3	0,2	2,0	0,4	4,4
EncT, proteína de exporte	Transporte transmembrana	<i>C. gattii</i>	5,8 E-149	49	0,2	0,1	1,6	0,6	4,4
Transportador de aminoácidos, familia AAT	Transporte de aminoácidos	<i>R. toruloides</i>	5,9 E-18	48	0,7	0,5	1,1	2,2	3,8
Proteína ABC de multiresistencia a drogas, familia B	Transporte transmembrana/ respuesta a drogas	<i>M. pennsylvanicum</i>	1,1 E-163	41	1,2	0,5	1,5	0,8	2,6
Transportador general de sustratos (MFS)/multiresistencia drogas	Transporte transmembrana/respuesta a drogas	<i>M. guizhouense</i>	2,1 E-127	41	0,5	0,2	0,5	0,5	2,6
Transportador general de sustratos (MFS)/alantoato permeasa	Transporte transmembrana/transporte de péptidos	<i>R. toruloides</i>	1,3 E-143	59	1,1	2,1	2,7	3,2	3,3
Transportador de glucosa/galactosa (MFS)	Transporte de monosacáridos	<i>R. solani</i>	1,0 E-167	57	1,4	1,3	1,4	1,6	4,1
AGP2, permeasa general de aminoácidos	Transporte de aminoácidos	<i>R. solani</i>	8,7 E-26	42	1,0	0,7	0,6	0,5	3,0
l-aminoácido-semialdehído deshidrogenasa	Síntesis de aminoácidos (lisina)	<i>C. puteana</i>	0	39	0,6	0,3	1,1	0,8	3,7
triptófano sintasa Trp1	Síntesis de aminoácidos (triptófano)	<i>G. trabeum</i>	0	69	0,5	0,2	2,3	2,8	3,5
ornitina oxo ácido transaminasa	Catabolismo de arginina	<i>C. gattii</i>	0	69	1,7	0,6	1,5	1,7	2,6
Enzima Piridoxal fosfato, familia YggS	Síntesis de aminoácidos	<i>C. gattii</i>	7,5 E-94	59	0,5	0,4	1,4	2,5	3,9
antranilato sintasa componente I	Síntesis de aminoácidos (triptófano)	<i>R. solani</i>	0	69	0,6	0,5	1,6	3,8	2,5
ornitina carbamoiltransferasa	síntesis de aminoácidos (arginina)	<i>C. gattii</i>	2,6 E-121	53	1,0	1,0	1,4	2,7	2,6
aminotransferasa de aminoácidos aromáticos	metabolismo de aminoácidos aromáticos	<i>M. anisopliae</i>	3,5 E-100	35	0,6	0,3	4,5	5,4	3,5
aspartato aminotransferasa	síntesis de aminoácidos	<i>P. strigosozonata</i>	0	66	1,0	0,5	3,2	3,8	2,8
corismato sintasa	síntesis de corismato y aminoácidos aromáticos	<i>C. gattii</i>	7,9 E-105	73	0,8	0,5	3,4	4,6	2,8
alanina transaminasa	Catabolismo de aminoácidos	<i>C. neoformans</i>	1,6 E-139	62	0,7	0,5	1,5	3,0	2,6
BCAT, aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada	síntesis de aminoácidos	<i>C. gattii</i>	0	67	0,7	0,4	5,6	4,6	4,5
BNA1, ácido 3-hidroxiantranílico dioxigenasa	Catabolismo de triptófano	<i>P. involutus</i>	1,1 E-85	70	0,3	0,2	2,3	1,9	3,8
Aminotransferasa dependiente de PLP	síntesis de aminoácidos	<i>F. hepatica</i>	1,4 E-101	43	0,6	0,7	1,5	3,9	2,9
dihidropicolinato sintasa	síntesis de aminoácidos	<i>C. gattii</i>	1,5 E-45	51	0,3	0,1	0,2	0,3	3,9

Continuación Tabla IIA

proteína glicosiltransferasa, familia 2	metabolismo de carbohidratos	<i>M. royeri</i>	0	45	0,9	1,2	0,9	1,0	4,0
Dihidrodiol deshidrogenasa dimerica	metabolismo de carbohidratos	<i>R. solani</i>	1,6 E-80	42	0,2	0,4	0,9	2,7	3,0
Proteína glicosil transferasa, familia 90	metabolismo de carbohidratos	<i>Tulasnella calospora</i>	5,9 E-120	39	0,6	0,5	1,0	0,6	3,6
β glucosidasa, Proteína glicosido hidrolasa, familia 3	Metabolismo de carbohidratos	<i>Piloderma croceum</i>	7,3 E-129	52	0,5	0,6	0,5	1,0	2,8
proteína glicosido hidrolasa, familia 29 / α -L-fucosidase	metabolismo de carbohidratos	<i>P. involutus</i>	4,8 E-14	48	0,2	0,2	1,0	3,4	3,0
Proteína glicosido hidrolasa, familia 105	metabolismo de carbohidratos	<i>M. royeri</i>	1,0 E-67	43	0,6	0,4	0,8	1,1	3,0
fosfoglicerato mutasa	glicólisis/gluconeogénesis	<i>P. strigosozonata</i>	2,5 E-58	43	0,6	0,5	3,4	6,3	3,1
α -amilasa	metabolismo de carbohidratos	<i>P. antarctica</i>	1,6 E-84	40	1,0	1,8	1,0	4,4	4,5
Gln, Gluconolactonasa	Metabolismo de gluconato	<i>C. coronata</i>	3,5 E-96	46	2,1	1,1	3,4	0,8	3,2
proteína similar a fosfoglicerato mutasa	glicólisis /gluconeogénesis	<i>C. torrendii</i>	5,3 E-106	42	1,3	2,5	4,6	3,3	2,6
Agn1, glucan endo 1,3 α glucosidasa, glicosido hidrolasa familia 71	Metabolismo de carbohidratos/Organización de pared celular	<i>C. gattii</i>	4,0 E-120	42	0,9	1,8	1,1	0,4	3,8
ácido d-galacturónico reductasa	metabolismo de carbohidratos/catabolismo de galacturonato	<i>C. orbiculare</i>	0	64	0,8	0,5	1,4	1,2	3,4
arabinan endo 1,5 α L arabinosidasa	metabolismo de carbohidratos	<i>R. solani</i>	1,3 E-110	57	0,3	1,0	0,3	0,2	4,4
Proteína glicosido hidrolasa, familia 28	metabolismo de carbohidratos	<i>M. royeri</i>	3,4 E-39	46	1,4	1,0	1,0	1,2	2,6
Factor de transcripción nit-4 para asimilación de nitrógeno	Regulación de la transcripción/asimilación de nitrógeno	<i>F. oxysporum</i>	6,0 E-8	36	1,4	0,7	1,2	0,7	4,7
Factor de transcripción CAT8, potencial	Regulación de la transcripción/metabolismo de carbohidratos	<i>C. albicans</i>	5,6 E-7	40	1,1	0,8	0,7	0,4	2,5
Factor de transcripción Swi5	Regulación de la transcripción/ tipo de apareamiento	<i>W. ichthyophaga</i>	2,7 E-14	62	1,9	3,6	1,7	4,0	3,6
RlmA, Factor de transcripción	Regulación de la Transcripción	<i>T. equinum</i>	7,7 E-30	60	1,4	3,7	3,4	4,9	2,9
EGR-1, Factor de transcripción	Regulación de la transcripción	<i>A. flavus</i>	1,2 E-151	39	0,2	0,2	1,1	0,1	3,5
VelB, factor velvet	Regulación de la transcripción (Desarrollo y vías defensivas)	<i>R. solani</i>	2,8 E-9	50	0,6	0,3	1,1	0,5	4,9
Factor de transcripción PacC, Factor de transcripción de respuesta a Ph	Regulación de la transcripción	<i>L. bicolor</i>	3,3 E-29	56	0,5	0,7	0,9	2,3	2,7
Factor de transcripción	Regulación de la transcripción	<i>R. solani</i>	8,6 E-52	72	0,7	0,2	1,0	0,3	4,2
Factor de transcripción	Regulación de la transcripción	<i>C. gattii</i>	1,9 E-27	84	1,8	0,6	0,9	0,7	3,0
Histona deacetilasa	Regulación de la transcripción	<i>P. indica</i>	1,1 E-25	43	0,7	1,5	1,0	2,9	3,3
Factor de transcripción	Regulación de la transcripción	<i>S. borealis</i>	9,2 E-7	42	0,6	0,6	1,0	2,0	3,0
Factor velvet	Regulación de la transcripción (Desarrollo y vías defensivas)	<i>R. microsporus</i>	1,9 E-20	51	1,0	1,2	1,0	1,6	3,7
catecol o -metiltransferasa	metabolismo de catecolamina	<i>C. militaris</i>	1,4 E-62	44	0,4	0,6	1,4	2,3	2,9
amina oxidasa	metabolismo de aminas	<i>C. gattii</i>	1,0 E-61	36	0,6	0,8	1,1	2,4	3,2
Transportador de amonio	Utilización de nitrógeno	<i>P. strigosozonata</i>	0	72	1,2	2,3	1,4	5,3	2,5
Piridoxal quinase	metabolismo de vitaminas	<i>C. gattii</i>	7,9 E-35	45	0,5	0,8	2,0	3,3	2,6
Malato deshidrogenasa, dependiente de NADP	Metabolismo de malato	<i>P. antarctica</i>	0	59	0,3	0,1	1,6	0,4	4,5
copper amine oxidasa	Metabolismo de aminas	<i>R. glutinis</i>	1,6 E-45	66	1,3	1,3	0,7	1,1	3,0
amidohidrolasa	metabolismo de compuestos nitrogenados	<i>G. trabeum</i>	2,2 E-43	46	0,3	0,5	0,8	1,7	2,9
$\alpha\beta$ hidrolasa	metabolismo de lípidos	<i>P. strigosozonata</i>	1,8 E-58	43	0,7	0,9	1,0	1,8	4,8
hidrolasa oxidoreductasa dependiente de zinc	Metabolismo de lípidos	<i>M. royeri</i>	2,1 E-103	45	0,5	0,4	1,7	0,7	2,7
Proteína de unión a esteroides	metabolismo de lípidos /esteroides	<i>C. gattii</i>	3,7 E-33	59	0,1	0,0	0,1	0,1	3,2
3- β hidroxisteroide deshidrogenasa/isomerasa	Síntesis de esteroides	<i>C. gattii</i>	8,7 E-16	40	0,2	0,0	2,6	0,1	3,3
acil CoA tioesterasa	metabolismo de lípidos	<i>R. solani</i>	5,6 E-70	42	0,7	0,5	0,5	0,9	2,8
acil CoA tioesterasa	metabolismo de lípidos	<i>C. gattii</i>	1,9 E-122	44	0,2	0,1	2,0	3,7	4,5

Continuación Tabla IIA

Lipasa sensible a hormona, $\alpha\beta$ hidrolasa	metabolismo de lípidos	<i>C. gattii</i>	1,0 E-118	49	0,4	0,2	0,5	0,5	2,6
Proteína específica de Esporulación	formación de esporas	<i>W. ichthyophaga</i>	5,1 E-27	38	0,4	0,4	1,3	7,7	3,0
Glutaredoxina 1 GRX1	Respuesta a estrés oxidativo	<i>P. indica</i>	1,0 E-19	47	0,8	1,0	0,9	0,8	2,6
proteína RTA1	Respuesta a estrés	<i>D. squalens</i>	1,1 E-55	45	0,5	0,8	1,1	0,5	3,7
quinona oxidoreductasa, dependiente de NADP	Respuesta a estrés oxidativo	<i>R. toruloides</i>	3,1 E-126	56	0,5	0,7	0,1	0,3	2,7
Glutaredoxina	Respuesta a estrés oxidativo	<i>P. strigosozonata</i>	2,3 E-27	48	0,9	1,0	0,8	1,7	4,0
proteína de la familia VanZ	Resistencia a drogas	<i>R. solani</i>	1,1 E-5	39	1,5	1,2	0,9	0,9	3,2
Hsp70	Respuesta a estrés	<i>M. roseri</i>	1,3 E-58	51	0,2	0,4	0,5	1,1	2,6
Peptidasa Imp2p, subunidad catalítica	maduración de proteínas mitocondriales	<i>R. irregularis</i>	1,4 E-32	44	0,3	0,3	1,9	3,8	4,2
metionil tRNA sintetase	síntesis de proteína	<i>C. gattii</i>	0	65	0,5	0,3	2,5	1,8	3,2
tRNA pseudouridina sintasa	Síntesis de proteínas/Procesamiento de tRNAs	<i>T. versicolor</i>	1,8 E-32	62	1,3	0,8	2,4	2,6	3,0
Rkm3p, proteína con dominio SET	Metilación de proteínas	<i>R. toruloides</i>	1,9 E-27	42	0,4	1,9	0,9	2,8	3,6
Inhibidor del inicio de la Traducción	Traducción (Inhibición)	<i>A. niger</i>	1,7 E-72	91	0,8	0,5	1,4	0,7	2,6
arginil tRNA sintetasa	síntesis de proteínas	<i>R. solani</i>	0	55	0,7	0,5	2,9	3,6	3,0
Endopeptidasa de ácido aspártico	catabolismo de proteínas	<i>C. neoformans</i>	1,6 E-60	42	2,6	0,5	1,2	0,9	4,2
bis (5 -nucleosil)-tetrafosfatasa	catabolismo de adenosina	<i>R. toruloides</i>	8,4 E-21	35	1,0	1,0	0,7	1,3	2,6
nucleasa S1/P1	catabolismo del DNA	<i>C. gattii</i>	6,2 E-87	41	0,5	0,3	4,7	5,6	4,3
guanina deaminasa	catabolismo de guanina	<i>C. torrendii</i>	4,3 E-86	48	0,9	0,9	1,3	1,3	2,8
Ribonucleasa T2	Catabolismo de RNA	<i>S. apiospermum</i>	4,0 E-63	66	0,4	0,8	0,6	0,7	4,9
PSF3 , componente del complejo GINS de replicación del DNA	Replicación del DNA	<i>C. gattii</i>	2,1 E-64	55	0,4	1,7	0,8	2,9	3,0
DNA polimerasa zeta, subunidad catalítica proteína RAD1 de reparación de DNA/endonucleasa de hebra simple	Reparación DNA/replicación DNA	<i>P. indica</i>	0	56	1,0	1,8	0,9	2,7	2,7
Endonucleasa UvdE (daño UV)	Reparación DNA	<i>M. pennsylvanicum</i>	2,9 E-132	55	0,4	0,5	2,7	13,5	3,7
Dna2_DNA helicasa dependiente de ATP	Reparación DNA	<i>C. gattii</i>	2,0 E-78	56	0,5	0,3	1,4	5,2	4,4
DNA polimerasa subunidad kappa	Reparación del DNA	<i>C. gattii</i>	1,5 E-133	42	0,3	0,5	0,9	3,0	3,0
Crg1, regulador de señalización por proteína G	Respuesta a feromonas	<i>C. gattii</i>	7,1 E-159	42	0,9	0,6	0,9	2,6	3,3
Proteína RAN quinasa	regulación del ciclo celular meiotico	<i>R. glutinis</i>	1,0 E-84	41	1,5	0,8	1,4	0,4	2,9
Proteína de la ruta de señalización RAM	Transducción de señales	<i>P. antarctica</i>	1,3 E-41	45	1,2	1,2	3,9	6,2	3,8
SNF3, transportador de glucosa de alta afinidad	Señalización por glucosa	<i>C. neoformans</i>	0	62	0,4	0,7	0,4	1,9	4,3
alcohol deshidrogenasa	metabolismo de alcoholes /etanol	<i>R. toruloides</i>	3,3 E-133	57	0,4	0,4	3,9	0,5	4,3
alcohol deshidrogenasa, dependiente de NADP	Metabolismo de alcoholes /etanol	<i>C. puteana</i>	1,0 E-83	49	0,6	0,4	0,7	0,3	4,7
alcohol deshidrogenase, dependiente de NADPH	Metabolismo de alcoholes /etanol	<i>C. torrendii</i>	2,8 E-107	56	0,4	0,5	0,7	0,6	4,6
glutamina sintetasa, dependiente de NAD	síntesis de NAD	<i>F. pinicola</i>	0	77	0,6	0,5	2,3	2,9	3,0
NADH oxidasa	Homeostasis RedOx	<i>R. toruloides</i>	7,60E-172	65	0,3	0,3	0,9	2,0	4,7
Malato deshidrogenasa, dependiente de NAD	Ciclo de Krebs	<i>R. solani</i>	1,5 E-145	67	0,5	0,2	1,2	1,0	2,6
ferroxidasa	Homeostasis y transporte de hierro	<i>C. neoformans</i>	0	51	2,4	0,8	2,2	0,7	2,5

Razón g/s: razón entre la representación en glucosa y succinato; Razón g/m: razón entre la representación en glucosa y succinato. %Id: porcentaje de identidad. Además en la última columna se compara lo obtenido en glucosa entre la cepa silvestre y la cepa mutante.

Tabla II. B) Genes identificados en el transcriptoma en glucosa de la cepa *cyc8* que tienen un valor de RPKM 5 a 10 veces mayor que el valor respectivo en la cepa silvestre. Se detalla el resultado del análisis de BLAST (datos con los que se contruyó la figura 17, A y C).

Descripción/Resultado de análisis de BLAST	Proceso biológico	Organismo	E-value	% Id	385		<i>cyc8</i>		Glucosa
					g/m	g/s	g/m	g/s	<i>cyc8</i> /385
Transportador de glucosa (MFS), azucar:protón H+ simporte	Transporte de azúcares	<i>S. schenckii</i>	5,22 E-16	61	0,2	0,1	0,6	0,4	7,0
Transportador de aminoácidos	Transporte de aminoácidos	<i>P. strigosozonata</i>	8,36 E-28	38	0,3	0,1	1,2	0,4	8,4
Transportador de oligopéptidos OPT	Transporte transmembrana de oligopéptidos	<i>R. solani</i>	1,54 E-97	44	1,6	1,5	1,5	2,2	7,0
Transportador general de sustratos (MFS)	Transporte transmembrana	<i>R. solani</i>	0	61	1,1	0,4	0,4	0,8	5,6
Transportador general de sustratos (MFS)	Transporte transmembrana	<i>A. delicata</i>	0	57	1,2	0,7	0,8	1,9	9,8
Fsf1p, proteína mitocondrial	Transporte transmembrana de iones	<i>C. neoformans</i>	1,63 E-125	57	0,5	0,3	3,3	5,5	5,7
Transportador general de sustratos (MFS)/transportador de flujo	Transporte transmembrana	<i>D. squalens</i>	1,61 E-108	45	0,2	0,1	2,0	0,4	6,7
Transportador general de sustratos (MFS)	Transporte de transmembrana	<i>M. pennsylvanicum</i>	8,39 E-139	47	1,7	0,8	1,9	0,6	7,4
Str1, transportador sideróforo-hierro	Transporte transmembrana de sideróforos	<i>C. gattii</i>	4,03 E-95	70	1,7	2,0	2,4	5,8	7,8
Transportador general de sustratos (MFS)	Transporte transmembrana	<i>R. solani</i>	0	60	0,9	0,5	1,9	0,7	7,5
acetiltransferasa, familia GNAT	Regulación de la transcripción/Modificación de histonas	<i>R. solani</i>	8,88 E-50	41	0,6	0,3	3,9	6,1	6,4
Regulador transcripcional	Regulación de la transcripción	<i>C. gattii</i>	1,57 E-97	60	0,3	0,2	4,1	7,5	6,7
Factor de transcripción, similar a ERT1 activador de gluconeogénesis	Regulación de la transcripción/gluconeogénesis	<i>P. omohalodes</i>	4,7 E-12	52	1,0	1,0	1,0	0,8	5,6
alginate lyase, polysaccharide lyase familia 14 proteína	Metabolismo de carbohidratos/polisacáridos	<i>C. puteana</i>	1,37 E-50	40	0,3	0,2	1,1	0,3	6,5
difosfonucleótido azúcar transferasa, glicosiltransferasa familia 8	Síntesis de polisacáridos	<i>G. trabeum</i>	6,07 E-98	50	0,5	1,0	2,1	3,3	8,3
Proteína glicosido hidrolasa, familia 125	metabolismo de carbohidratos	<i>C. torrendii</i>	8,65 E-114	49	0,5	0,4	0,4	0,6	8,7
pentafuncional AROM polypeptide	Síntesis de aminoácidos aromáticos	<i>P. brasiliensis</i>	0	59	0,8	0,7	2,0	1,8	5,7
HisHF, imidasol glicerol fosfato sintasa	Síntesis de aminoácidos	<i>C. gattii</i>	0	63	0,4	0,3	2,8	5,3	9,2
histidinol fosfato aminotransferasa	Síntesis de aminoácidos	<i>R. solani</i>	1,9 E-154	60	0,3	0,3	2,3	6,5	5,2
isofosfolipasa	Metabolismo de lípidos/catabolismo de fosfolípidos	<i>C. neoformans</i>	3,75 E-46	46	0,5	0,5	1,4	3,9	5,1
Proteína spo7 específica de esporulación	Metabolismo de lípidos/formación de esporas	<i>W. ichthyophaga</i>	1,01 E-25	40	0,7	0,7	3,0	1,4	7,7
Helicase rad25 de reparación de DNA	Reparación de DNA	<i>R. solani</i>	1,06 E-12	60	1,0	0,4	0,9	1,5	6,9
Rev1, Proteína de reparación de DNA	Reparación del DNA	<i>M. roleri</i>	5,56 E-5	40	0,3	0,4	2,4	10,2	7,1
L-ascorbato oxidasa	Metabolismo del ascorbato	<i>G. clavigera</i>	2,48 E-16	43	0,5	1,9	1,3	3,0	5,5
Ácido malónico semialdehído reductasa	Utilización de nitrógeno/catabolismo de uracilo	<i>C. gattii</i>	7,73 E-106	59	0,1	0,1	2,9	2,9	8,7
Oxidasa alternativa AOX	Transporte de electrones/Cadena respiratoria	<i>C. puteana</i>	2,36 E-26	39	0,1	0,1	2,3	0,2	6,8
NADH oxidoreductasa	Transporte de electrones/Cadena respiratoria	<i>C. gattii</i>	5,91 E-100	47	0,2	0,1	2,8	6,0	5,1
Scn1 DNAsa familia TatD	Catabolismo de DNA	<i>M. roleri</i>	8,99 E-25	29	0,3	0,2	1,9	3,0	6,5
2-nitropropano dioxigenasa	Síntesis de pirimidinas	<i>C. gattii</i>	9,44 E-65	72	0,2	0,2	1,5	2,4	5,3
Rds1, Proteína de respuesta a estrés	Respuesta a estrés/Regulación de la transcripción	<i>P. indica</i>	9,49 e-85	54	0,2	1,3	0,6	0,4	8,1
Factor de transcripción, proteína de respuesta a estrés	Respuesta a estrés	<i>P. indica</i>	1,37 E-90	56	0,4	0,3	1,8	0,7	6,2
Reductasa ferrica	Homeostasis y transporte de hierro	<i>R. solani</i>	1,68 E-86	36	1,4	3,7	2,1	6,9	6,8

Razón g/s: razón entre la representación en glucosa y succinato; Razón g/m: razón entre la representación en glucosa y succinato. %Id: porcentaje de identidad. Además en la última columna se compara lo obtenido en glucosa entre la cepa silvestre y la cepa mutante.

Tabla II. C) Genes identificados en el transcriptoma en glucosa de la cepa *cyc8* que tienen un valor de RPKM 10 o más veces mayor que el valor respectivo en la cepa silvestre. Se detalla el resultado del análisis de BLAST (datos con los que se contruyó la figura 17, A y D).

Descripción/Resultado de análisis de BLAST	Proceso biológico	Organismo	E-value	% Id	385		<i>tup1</i>		Glucosa
					g/m	g/s	g/m	g/s	<i>cyc8</i> /385
Transportador de multiresistencia a drogas (MFS)	Transporte transmembrana/ Respuesta a drogas	<i>F. fujikuroi</i>	1,77 E-76	62	1,1	0,5	0,7	0,5	12,3
Transportador MFS	Transporte transmembrana	<i>P. roqueforti</i>	0	69	0,5	0,1	1,1	0,6	16,1
Transportador de oligopéptidos OPT/MTD1	Transporte transmembrana de péptidos	<i>R. toruloides</i>	2,16 E-98	61	5,1	6,1	2,5	4,3	15,5
Transportador de ácido nicotínico Tna1, transportador MFS,	Transporte transmembrana	<i>C. gattii</i>	0	60	0,1	0,0	3,4	1,1	19,0
droga: protón H+ antiporte	Transporte transmembrana/ respuesta a drogas	<i>C. gattii</i>	1,75 E-73	60	1,5	0,2	1,3	0,5	28,2
Permeasa de aminoácidos, familia AAT	Transporte de aminoácidos	<i>L. bicolor</i>	4,66 e-83	54	0,7	0,6	1,2	1,6	10,8
β glucosidase, proteína glicosido hidrolasa familia 3	Metabolismo de carbohidratos	<i>R. solani</i>	2,21 E-42	50	0,1	0,2	0,1	0,8	227,1
Fosfoenolpiruvato (PEP) carboxiquinasa	Gluconeogénesis	<i>C. gattii</i>	0	83	0,3	0,01	0,9	1,0	19,7
FBA1, fructosa bisfosfato aldolasa	glucólisis/gluconeogénesis	<i>R. solani</i>	0	79	0,2	0,01	1,2	0,9	27,0
Pectina liasa/Proteínopolisacarido liasa familia 1	Metabolismo de polisacáridos/catabolismo de pectina	<i>B. zeicola</i>	1,93 E-22	69	1,0	0,5	0,5	0,6	41,4
Proteína glicosido hidrolasa, familia 16	Metabolismo de carbohidratos	<i>R. solani</i>	0	57	0,7	3,0	1,2	6,1	19,1
acil-CoA N aciltransferasa, familia GNAT	Regulación de la transcripción/Modificación de histonas	<i>P. strigosozonata</i>	4,75 E-41	38	0,1	0,1	6,5	14,7	16,0
Factor de transcripción <i>HMG box</i>	Regulación de la transcripción	<i>M. pennsylvanicum</i>	3,8 E-10	35	0,3	0,2	1,3	0,5	12,4
Acetiltransferasa, familia GNAT	Regulación de la transcripción/Modificación de histonas	<i>R. solani</i>	1,43 E-49	37	0,1	0,1	9,0	23,0	27,5
Factor de transcripción, probable Aro80	Regulación de la transcripción/Catabolismo de aminoácidos aromáticos	<i>F. fujikuroi</i>	8,71 E-4	55	0,6	0,4	1,0	1,3	120,3
αβ hidrolasa	Metabolismo de lípidos	<i>H. irregulre</i>	5,85 E-81	42	0,3	0,2	0,9	0,8	13,5
Mevalonato quinasa	Síntesis de esteroides/isoprenoides	<i>M. ambiguus</i>	7,99 E-48	39	2,1	4,1	2,3	7,3	0,9
Aminotransferasa dependiente de PLP	Síntesis de aminoácidos	<i>C. neoformans</i>	3,27 E-117	44	0,04	0,05	7,1	12,4	30,1
Nitrilasa, hidrolasa carbón-nitrógeno	Metabolismo de compuestos nitrogenados	<i>P. involutus</i>	3,56 E-74	48	0,2	0,2	2,2	4,2	10,6
Proteína priA	Replicación del DNA	<i>R. solani</i>	9,7 E-14	49	0,0	0,2	2,2	4,9	35,4
<i>pcl1</i> , ciclina específica de g1-s	Transducción de señales /división celular	<i>C. neoformans</i>	2,95 E-61	49	1,7	1,6	1,8	0,5	2,0

Razón g/s: razón entre la representación en glucosa y succinato; Razón g/m: razón entre la representación en glucosa y succinato. %Id: porcentaje de identidad. Además en la última columna se compara lo obtenido en glucosa entre la cepa silvestre y la cepa mutante.

Clave de colores para Tabla II, III y IV. Procesos biológicos.

Transporte transmembrana
Transcripción y regulación de la transcripción
Metabolismo de carbohidratos
Metabolismo de lípidos/esteroides/isoprenoides
Metabolismo de alcoholes
Síntesis, metabolismo y modificación de proteínas
Transducción de señales
Metabolismo de compuestos nitrogenados y otros compuestos orgánicos
Síntesis y metabolismo de aminoácidos
Ciclo de Krebs/cadena respiratoria/metabolismo de NAD y NADP
Respuesta a estrés
Reparación de DNA
Metabolismo del DNA/RNA
Metabolismo de Hierro

Tabla III. A) Genes identificados en el transcriptoma en glucosa de la cepa *tup1* que tienen un valor de RPKM 2,5 a 5 veces mayor que el valor respectivo en la cepa silvestre. Se detalla el resultado del análisis de BLAST (datos con los que se contruyó la figura 18, A y B).

Descripción/Resultado de análisis de BLAST	Proceso biológico	organismo	E-VALUE	% Id	385		<i>tup1</i>		Glucosa
					g/m	g/s	g/m	g/s	<i>tup1</i> /385
Transportador de azúcares	Transporte transmembrana	<i>P. hubeiensis</i>	0	55	0,6	0,2	2,3	0,8	3,9
Transportador MFS de multiresistencia a drogas	Transporte transmembrana/respuesta a drogas	<i>F. fujikuroi</i>	1,77 E-76	62	1,1	0,5	1,6	0,6	4,7
Transportador peroxisomal 1 de nucleótidos de adenina	Transporte de nucleótidos	<i>R. solani</i>	2,02 E-115	53	0,4	0,3	1,4	1,0	3,8
galactosa: proton simporte	Transporte transmembrana/transporte de galactosa	<i>R. solani</i>	6,3 E-43	45	1,0	0,3	2,0	0,6	2,5
Transportador MFS/transportador de nicotinamida mononucleotido	Transporte transmembrana	<i>P. roqueforti</i>	0	69	0,5	0,1	0,5	0,2	3,2
Transportador general de sustratos (MFS)	Transporte transmembrana	<i>R. solani</i>	0	61	1,1	0,4	1,2	0,8	3,6
Transporte de oligopeptidos OPT/MTD1	Transporte transmembrana de péptidos	<i>R. toruloides</i>	2,16 E-98	61	5,1	6,1	10,6	6,1	3,6
APC permeasa de aminoácidos	Transporte transmembrana de aminoácidos	<i>T. versicolor</i>	2,95 E-159	53	0,6	0,3	1,3	0,5	2,8
Transportador de azúcar/hexosa/galactosa	Transporte transmembrana/transporte de hexosas	<i>M. roseri</i>	0	68	1,5	0,5	2,7	1,0	2,8
Transportador de glucosa RCO-3	Transporte de glucosa	<i>R. solani</i>	0	66	0,9	1,0	2,9	2,1	2,7
Transportador general de sustratos (MFS)	Transporte transmembrana	<i>A. delicata</i>	0	57	1,2	0,7	1,6	2,1	4,2
Permeasa DAL 5/Transportador MFS	Transporte transmembrana/transporte de péptidos	<i>M. roseri</i>	5,35 E-151	46	1,81	0,004	1,12	0,02	3,11
Proteína translocadora TspO/MBR	Transporte transmembrana/Metabolismo de lípidos	<i>R. solani</i>	2,8 E-31	56	0,3	0,2	1,0	0,9	4,0
Transportador de ácido nicotínico	Transporte transmembrana	<i>C. gattii</i>	0	60	0,1	0,0	0,9	0,3	4,4
Tna1/Transportador MFS	Transporte transmembrana	<i>C. gattii</i>	0	60	0,1	0,0	0,9	0,3	4,4
Droga: protón H+ antiporte	Transporte transmembrana/ respuesta a drogas	<i>C. gattii</i>	1,75 E-73	60	1,5	0,2	0,8	0,4	3,0
Transportador general de sustratos (MFS)	Transporte transmembrana	<i>D. squalens</i>	1,61 E-108	45	0,2	0,1	0,2	0,4	2,9
Transportador MFS de multiresistencia a drogas	Transporte transmembrana/respuesta a drogas	<i>N. parvum</i>	0	51	1,0	0,4	2,7	0,9	2,6
Transportador mitocondrial	Transporte transmembrana	<i>D. squalens</i>	1,21 E-63	47	0,2	0,1	0,8	0,5	2,8
Transportador MFS de multiresistencia a drogas	Transporte transmembrana/respuesta a drogas	<i>M. guizhouense</i>	2,17 E-127	41	0,5	0,2	0,8	0,5	4,3
GPR1,Regulador ruta del glioxilato	Regulación de la transcripción/ Utilización de acetato	<i>F. fujikuroi</i>	9,18 E-28	33	0,5	0,2	1,7	0,6	3,2
Regulador transcripcional	Regulación de la transcripción	<i>R. solani</i>	9,16 E-17	47	1,2	0,3	1,3	0,7	2,8
Factor de transcripción Rtg3p	Regulación de la transcripción	<i>S. cerevisiae</i>	9,66 E-24	62	0,8	0,2	1,3	0,6	2,7
prtT, Activador transcripcional de proteasas	Regulación de la transcripción/catabolismo de proteínas	<i>R. solani</i>	1,03 E-158	57	0,3	0,3	1,0	0,9	2,9
Regulador transcripcional SFP1	Regulación de la transcripción/Biogenesis de ribosomas	<i>R. solani</i>	1,58 E-29	51	0,8	0,7	0,9	0,9	2,9
Proteína de represión catabólica CreC	Regulación de la transcripción/Represión catabólica	<i>P. indica</i>	9,46 E-45	45	1,3	1,1	2,0	3,6	2,7
Factor de inicio de la transcripción, subunidad bdp1	Transcripción	<i>P. antarctica</i>	1,24 E-22	52	0,2	0,4	1,1	1,4	3,7
Factor de transcripción EGR-1 (<i>early growth response protein 1</i>)	Regulación de la transcripción	<i>A. flavus</i>	1,25 E-151	39	0,2	0,2	0,6	1,0	4,0
Proteína de respuesta a estrés Rds1p	Regulación de la transcripción/respuesta a estrés	<i>P. indica</i>	1,37 E-90	56	0,4	0,3	0,5	0,5	2,6
Histona H3	Organización de cromatina	<i>T. mesenterica</i>	7,33 E-53	76	0,6	0,3	1,0	0,8	2,9
glucosido hidrolasa / 1,3 beta glucosidasa	Metabolismo de carbohidratos	<i>P. carmosa</i>	9,7 E-92	45	0,3	0,3	1,5	1,0	2,6
Dihidrodiol deshidrogenasa dimerica	metabolismo de carbohidratos	<i>R. solani</i>	1,69 E-80	42	0,2	0,4	1,2	1,2	2,6
UDP-galactosa 4- epimerasa	Metabolismo de carbohidratos/utilización de galactosa	<i>N. crassa</i>	4,87 E-73	44	0,4	0,4	1,5	1,1	2,7
Galactosa 1 fosfato uridilil transferasa	Metabolismo de carbohidratos/utilización de galactosa	<i>C. gattii</i>	8,09 E-126	51	0,3	0,5	1,6	1,6	2,6
Galactosa mutarotasa	Metabolismo de carbohidratos/utilización de galactosa	<i>T. versicolor</i>	5,72 E-68	39	0,6	0,6	2,0	1,2	3,2
Glucosa y ribitol dehidrogenasa	Metabolismo de carbohidratos/Respuesta a estrés	<i>C. gattii</i>	9,28 e-105	53	0,4	0,3	2,2	0,9	4,3
Proteína de unión a carbohidrato (familia 50)	Metablismo de carbohidratos	<i>M. osmundae</i>	2,71 E-11	55	0,5	0,3	0,6	0,7	2,6
ADP ribosa pirofosfatasa	Metabolismo de ribosas fosfato	<i>C. gattii</i>	2,13 E-60	52	0,2	0,3	1,5	0,8	2,8

Continuación Tabla IIIA

Hidrolasa oxidoreductasa, dependiente de zinc	Metabolismo de lípidos	<i>M. royeri</i>	2,17 E-103	45	0,5	0,4	0,8	0,9	3,7
Proteína de unión a esteroides	metabolismo de lípidos /esteroides	<i>C. gattii</i>	3,75 E-33	59	0,1	0,0	0,3	0,1	2,8
Acil CoA- oxidasa	Metabolismo de lípidos /beta oxidación de ácidos grasos	<i>C. neoformans</i>	0	70	0,2	0,2	1,4	0,7	3,2
Acetil-CoA acetiltransferasa	Síntesis de esteroides	<i>C. gattii</i>	0	70	0,4	0,3	1,5	1,1	3,3
Acil CoA oxidasa I	Metabolismo de lípidos/ beta oxidación de ácidos grasos	<i>C. neoformans</i>	0	72	0,6	0,4	1,5	1,2	2,9
RhIG/oxoacil reductasa	Metabolismo de lípidos/síntesis de ramnolípidos	<i>F. mediterranea</i>	4,35 E-98	56	0,5	0,3	1,7	1,4	3,4
Metiltransferasa dependiente de s-adenosil-metionina	Modificación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos	<i>R. solani</i>	7,56 E-87	53	0,6	0,3	1,4	1,7	3,1
histidina fosfatasa acida	Modificación de proteínas/Difosforilación de proteínas	<i>C. sublineola</i>	4,48 E-53	42	0,3	0,2	1,2	0,6	2,6
Peroxina 14	Importe de proteínas a peroxisomas	<i>C. gattii</i>	7,76 E-31	38	0,4	0,4	1,1	1,4	4,3
Peroxina 5	Importe de proteínas a peroxisomas	<i>C. gattii</i>	9,88 E-76	39	1,0	0,8	1,9	1,4	2,7
Receptor de señal de direccionamiento a peroxisoma	Importación de proteínas a peroxisoma	<i>M. ambiguus</i>	1,46 E-71	35	0,6	0,8	1,5	2,2	3,7
proteína vacuolar VPS55	Transporte intracelular de proteínas	<i>P. hubeiensis</i>	2,47 E-49	65	0,8	0,8	1,9	1,5	3,5
Indol acetaldehído reductasa, dependiente de NAD/NADP	Metabolismo de alcoholes	<i>S. pombe</i>	4,11 E-99	53	0,3	0,2	1,3	0,8	2,8
alcohol deshidrogenasa	Metabolismo de alcoholes	<i>R. toruloides</i>	3,35 E-133	57	0,4	0,4	0,7	2,0	3,4
alcohol deshidrogenasa de unión a zinc	Metabolismo de alcoholes	<i>P. antarctica</i>	1,47 E -108	53	0,3	0,7	0,3	1,5	2,8
Alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH	Metabolismo de alcoholes /etanol	<i>C. torrendii</i>	2,89 E-107	56	0,4	0,5	0,9	0,7	2,9
quinasa asociada a AP2 (serina threonina quinasa)	Endocitosis/Transporte intracelular de proteínas	<i>R. solani</i>	1,02 E-108	54	0,8	0,4	2,9	0,7	3,4
Fosfatidil inositol quinasa 4	Organización de citoesqueleto/pared celular	<i>P. antarctica</i>	6,34 E-25	45	0,4	0,7	1,9	1,3	2,9
Proteína 190 inducida en meiosis	Ciclo celular meiótico	<i>R. solani</i>	0	45	0,4	0,4	2,0	1,2	2,6
MAP quinasa	Transducción de señales/Ciclo celular/respuesta a estrés	<i>P. brasiliensis</i>	8,02 E-172	77	0,6	1,3	1,3	5,6	2,8
aldehído deshidrogenasa	Metabolismo de aldehídos	<i>R. solani</i>	0	66	0,4	0,1	0,9	0,3	3,5
Malato deshidrogenasa, dependiente de NADP	Metabolismo de malato	<i>P. antarctica</i>	0	59	0,3	0,1	0,8	0,8	4,4
carbonil reductasa (unión a NADP)	Metabolismo de ácido araquidónico	<i>C. gloeoporioides</i>	1,78 E-53	40	0,4	0,3	1,1	0,9	2,9
l-aminodipato-semialdehído deshidrogenasa	Síntesis de aminoácidos (lisina)	<i>C. puteana</i>	0	39	0,6	0,3	1,0	1,9	3,7
Aspartato transaminasa/aminotransferasa	Metabolismo de aminoácidos	<i>D. squalens</i>	0	63	0,3	0,4	1,8	1,2	2,8
dihidropicolinato sintasa	Síntesis de aminoácidos	<i>C. torrendii</i>	4,11 E-151	64	0,2	0,2	1,0	0,9	3,4
Citocromo c oxidasa subunidad 1 (mitocondria)	Transporte de electrones/cadena respiratoria	<i>X. dendrorhous</i>	8,34 E-85	99	6,1	9,6	23,6	17,6	4,1
Oxidasa alternativa AOX	Transporte de electrones/Cadena respiratoria	<i>C. puteana</i>	2,36 E-26	39	0,1	0,1	0,4	0,4	3,9
epimerasa/dehidratasa dependiente de NAD	Metabolismo de NADH/NADP	<i>C. gattii</i>	5,69 E-37	49	0,3	0,2	0,4	0,7	2,8
Hsp30 (<i>heat shock protein 30</i>)	Respuesta a estrés	<i>P. antarctica</i>	1,3 E-83	57	1,0	0,8	3,2	2,2	3,9
quinona oxidoreductasa, dependiente de NADPH	Respuesta a estrés oxidativo	<i>R. solani</i>	6,92 E-112	53	0,3	0,2	1,7	0,7	2,9
Quinona oxidoreductasa 6 (unión a NADP)	Respuesta a estrés oxidativo	<i>H. irregulare</i>	8,34 E-77	40	0,2	0,2	0,7	0,5	2,7
DNA glicosilasa/G/T mismatch- timina glicosilasa	Reparación de DNA/reparación por escisión de base	<i>G. trabeum</i>	8,05 E-45	41	0,4	0,2	1,0	0,6	3,4
AP endonucleasa 2	Reparación de DNA	<i>R. solani</i>	3 E-69	65	0,5	0,3	1,0	0,7	2,6
Proteína TSR2 de procesamiento de pre rRNA	Procesamiento de rRNA	<i>C. gattii</i>	2,57 E-13	54	1,1	1,2	1,8	2,5	2,7

Razón g/s: razón entre la representación en glucosa y succinato; Razón g/m: razón entre la representación en glucosa y succinato. %Id: porcentaje de identidad. Además en la última columna se compara lo obtenido en glucosa entre la cepa silvestre y la cepa mutante.

Tabla III. B) Genes identificados en el transcriptoma en glucosa de la cepa *tup1* que tienen un valor de RPKM 5 a 10 veces mayor que el valor respectivo en la cepa silvestre. Se detalla el resultado del análisis de BLAST (datos con los que se contruyó la figura 18, A y C).

Descripción/Resultado de análisis de BLAST	Proceso biológico	organismo	E-VALUE	% Id	385		<i>tup1</i>		Glucosa <i>tup1</i> /385
					g/m	g/s	g/m	g/s	
trehalosa sintasa	Metabolismo de carbohidratos	<i>C. neoformans</i>	0	56	0,7	0,3	4,3	2,2	6,3
glicosido hidrolasa (familia 29)/ α -L- fucosidasa	metabolismo de carbohidratos	<i>P. involutus</i>	4,81 E-14	48	0,2	0,2	1,9	1,2	5,6
fosfocetolasa	Metabolismo de carbohidratos	<i>C. gattii</i>	0	63	0,8	0,4	4,9	1,8	5,3
Transportador general de sustratos (MFS)	Transporte transmembrana	<i>R. solani</i>	0	60	0,9	0,5	1,9	1,2	5,6
Transportador de glucosa/galactosa (MFS)	Transporte transmembrana/Transporte de hexosas	<i>R. solani</i>	1 E-167	57	1,4	1,3	4,4	3,6	6,2
NADPH dependent alcohol dehydrogenase	metabolismo de alcoholes	<i>C. torrendii</i>	6,17 E-135	61	0,2	0,2	1,1	1,1	5,2
alcohol deshidrogenasa de unión a zinc	Metabolismo de alcoholes	<i>M. roleri</i>	0	71	0,3	0,2	1,8	0,7	8,4
Trehalasa	Catabolismo de trehalosa/Respuesta a estrés por desecación	<i>R. solani</i>	0	51	0,1	0,1	1,2	0,3	5,2
Proteína universal de estrés, UspA	Respuesta a estrés	<i>P. brasiliensis</i>	7,86 E-26	35	0,5	0,5	1,8	3,0	7,5
Metiltransferasa dependiente de s-adenosil-l-metionina	Modificación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos	<i>P. strigozonata</i>	1,82 E-40	39	0,2	0,1	0,7	2,0	5,2
Factor de transcripción HMG box	Regulación de la transcripción	<i>M. pennsylvanicum</i>	3,8 E-10	35	0,3	0,2	0,4	0,8	5,2
Aminotransferasa dependiente de PLP	síntesis de aminoácidos	<i>C. neoformans</i>	3,27 E-117	44	0,0	0,0	2,3	0,4	5,3
pcl1, ciclina específica de g1-s	División celular	<i>C. neoformans</i>	2,95 E-61	49	1,7	1,6	0,6	0,7	9,0
isocorismatasa hidrolasa	Síntesis de sideróforos	<i>T. versicolor</i>	4,38 E-56	50	0,3	0,2	2,2	2,3	7,1

Razón g/s: razón entre la representación en glucosa y succinato; Razón g/m: razón entre la representación en glucosa y succinato. %Id: porcentaje de identidad. Además en la última columna se compara lo obtenido en glucosa entre la cepa silvestre y la cepa mutante.

Tabla III. C) Genes identificados en el transcriptoma en glucosa de la cepa *tup1* que tienen un valor de RPKM 10 o más veces mayor que el valor respectivo en la cepa silvestre. Se detalla el resultado del análisis de BLAST (datos con los que se contruyó la figura 18, A y D).

Descripción/Resultado de análisis de BLAST	Proceso biológico	organismo	E-VALUE	% Id	385		<i>tup1</i>		<i>tup1</i> /385
					g/m	g/s	g/m	g/s	
β glucosidasa	metabolismo de carbohidratos	<i>R. solani</i>	2,21 E-42	50	0,1	0,2	0,1	0,8	18,7
Coproporfirinogeno III oxidasa	Síntesis de grupo hemo	<i>G. trabeum</i>	6,86 E-128	54	0,1	0,2	0,7	3,3	14,0
Proteína priA	Replicación del DNA	<i>R. solani</i>	9,7 E-14	49	0,0	0,2	0,9	0,9	17,8
Metilesterol monooxigenasa	Metabolismo de lípidos/Síntesis de ergosterol y ácidos grasos	<i>R. solani</i>	1,29 E-126	58	0,3	0,5	2,7	7,9	10,8

Razón g/s: razón entre la representación en glucosa y succinato; Razón g/m: razón entre la representación en glucosa y succinato. %Id: porcentaje de identidad. Además en la última columna se compara lo obtenido en glucosa entre la cepa silvestre y la cepa mutante.

Tabla IV. Genes comunes que se encuentran mayormente representados en el transcriptoma en glucosa en ambas cepas mutantes en comparación a la cepa silvestre (385) (datos con los que se contruyó la figura 19).

Descripción/Resultado de análisis de BLAST	Proceso biológico	Organismo	E VALUE	%ld	Glucosa	
					cyc8-/385	tup1-/385
Receptor de señal de direccionamiento a peroxisoma	Importación de proteínas a peroxisoma	<i>M. ambiguus</i>	1,46 E-71	35	3,5	3,7
APC permeasa de aminoácidos	Transporte transmembrana de aminoácidos	<i>T. versicolor</i>	2,95 E-159	53	2,7	2,8
MFS transportador/ permeasa DAL 5	Transporte transmembrana/transporte de péptidos	<i>M. roleri</i>	5,35 E-151	46	4,4	3,11
Transportador general de sustratos (MFS)/multiresistencia drogas	Transporte transmembrana/respuesta a drogas	<i>M. guizhouense</i>	2,17 E-127	41	2,6	4,3
Transportador de glucosa/galactosa (MFS)	Transporte de monosacáridos	<i>R. solani</i>	1 E-167	57	4,1	6,2
Transportador general de sustratos (MFS)	Transporte transmembrana	<i>R. solani</i>	0	61	5,6	3,6
Transportador general de sustratos (MFS)	Transporte transmembrana	<i>A. delicata</i>	0	57	9,8	4,2
Transportador general de sustratos (MFS)	Transporte transmembrana	<i>D. squalens</i>	1,61 E-108	45	6,7	2,9
Transportador de multiresistencia a drogas (MFS)	Transporte transmembrana/ Respuesta a drogas	<i>R. solani</i>	0	60	7,5	5,6
Transportador MFS	Transporte transmembrana	<i>F. fujikuroi</i>	1,77 E-76	62	12,3	4,7
Transportador de oligopéptidos OPT/MTD1	Transporte transmembrana de péptidos	<i>P. roqueforti</i>	0	69	16,1	3,2
Transportador de ácido nicotínico Tna1, transportador MFS,	Transporte transmembrana	<i>R. toruloides</i>	2,16 E-98	61	15,5	3,6
Droga: protón H+ antiporte	Transporte transmembrana/ respuesta a drogas	<i>C. gattii</i>	0	60	19,0	4,4
		<i>C. gattii</i>	1,75 E-73	60	28,2	3,0
Dihidrodiol deshidrogenasa dimerica	metabolismo de carbohidratos	<i>R. solani</i>	1,69 E-80	42	3,0	2,6
Proteína glicosido hidrolasa, familia 29 / α -L-fucosidase	metabolismo de carbohidratos	<i>P. involutus</i>	4,81 E-14	48	3,0	5,6
β glucosidase, proteína glicosido hidrolasa familia 3	Metabolismo de carbohidratos	<i>R. solani</i>	2,21 E-42	50	227,1	18,7
Hidrolasa oxidoreductasa dependiente de zinc	Metabolismo de lípidos	<i>M. roleri</i>	2,17 E-103	45	2,7	3,7
Proteína de unión a esteroides	metabolismo de lípidos /esteroides	<i>C. gattii</i>	3,75 E-33	59	3,2	2,8
EGR-1, Factor de transcripción	Regulación de la transcripción	<i>A. flavus</i>	1,25 E-151	39	3,5	4,0
Factor de transcripción HMG box	Regulación de la transcripción	<i>M. pennsylvanicum</i>	3,8 E-10	35	12,4	5,2
Alcohol deshidrogenasa	metabolismo de alcoholes /etanol	<i>R. toruloides</i>	3,35 E-133	57	4,3	3,4
Alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH	Metabolismo de alcoholes /etanol	<i>C. torrendii</i>	2,89 E-107	56	4,6	2,9
Malato deshidrogenasa, dependiente de NADP	Metabolismo de malato	<i>P. antarctica</i>	0	59	4,5	4,4
Oxidasa alternativa AOX	Transporte de electrones/Cadena respiratoria	<i>C. puteana</i>	2,36 E-26	39	6,8	3,9
Factor de transcripción, proteína de respuesta a estrés	Respuesta a estrés	<i>P. indica</i>	1,37 E-90	56	6,2	2,6
Aminotransferasa dependiente de PLP	Síntesis de aminoácidos	<i>C. neoformans</i>	3,27 E-117	44	30,1	5,3
Pcl1, ciclina específica de g1-s	División celular	<i>C. neoformans</i>	2,95 E-61	49	2,0	9,0
Proteína priA	Replicación del DNA	<i>R. solani</i>	9,7 E-14	49	35,4	17,8
Peroxina 14	Importe de proteínas a peroxisomas	<i>C. gattii</i>	7,76 E-31	38	2,8	4,3