

IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**“El Factor GATA Gln3 está Involucrado en la
Regulación de los Genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3* en
Saccharomyces cerevisiae”**

Tesis que presenta

Francisco Javier Pérez de los Santos

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz

Vo. Bo. Lina Raquel Riego Ruiz

San Luis Potosí, S.L.P., noviembre de 2010

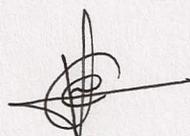


Constancia de aprobación de la tesis

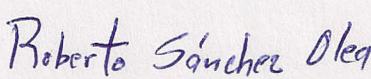
La tesis "**El Factor GATA Gln3 está Involucrado en la regulación de los genes TDH1, TDH2 y TDH3 en *Saccharomyces cerevisiae***" presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Francisco Javier Pérez de los Santos** y aprobada el **dd de mm de aaaa** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



Dra. Lina Raquel Riego Ruiz



Dr. J. Sergio Casas Flores



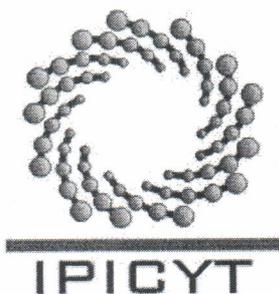
Dr. Roberto Sánchez Olea



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Genómica Funcional y Comparativa de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Lina Raquel Riego Ruiz

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (223330) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. Parte de este trabajo se realizó con apoyo de los proyectos CONACYT-Fondos Sectoriales-SEP-2005-49039, del Macroproyecto “Tecnologías para la Universidad de la Información y la Computación”, UNAM y del Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal, México (PIFUTP08-165).



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 077 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 22 días del mes de noviembre del año 2010, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. J. Sergio Casas Flores	Presidente	IPICYT
Dra. Lina Raquel Riego Ruiz	Secretaria	IPICYT
Dr. Roberto Sánchez Olea	Sinodal externo	UASLP

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Francisco Javier Pérez de los Santos

sobre la Tesis intitulada:

El Factor GATA Gln3 está Involucrado en la Regulación de los Genes TDH1, TDH2 y TDH3 en Saccharomyces cerevisiae

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 13:45 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 22 días del mes de noviembre de 2010.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Bonilla
Secretario Académico



Dedicatorias

A Lina, de manera especial por su paciencia y dedicación.

A mis padres Francisco y Ana.

A mis hermanos Cecilia, Sergio y Alejandro

A mis sobrinos José, Karen, Mónica y Sofía.

A todos mis compañeros del laboratorio 8

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	II
Créditos institucionales	III
Acta de examen	IV
Dedicatorias	V
Abreviaturas	X
Resumen	XI
Abstract	XII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	14
III. OBJETIVO	18
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	19
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
VI. CONCLUSIONES	51
VII. PERSPECTIVAS	52
VIII. ANEXOS	52
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	80

Lista de tablas

1. Genes que dependen del dominio de activación de Gln3 en glutamina como fuente de nitrógeno	17
2. Especies y cepas de levaduras utilizadas en este trabajo	19
3. Oligonucleótidos diseñados para este trabajo	20
4. Plásmidos generados en este trabajo	21
5. Número de genes que codifican para proteínas GAPDH en distintas especies de levaduras	37

Lista de figuras

1. Cladograma del sub-phylum Saccharomycotina	2
2. Rutas centrales del metabolismo de nitrógeno	4
3. Modelo que describe como la vía Tor desfosforila a Gln3 , su localización y la activación NCR-sensible	8
4. Metabolismo de levadura en respiración y fermentación	10
5. Esquema que muestra el número de genes sobreexpresados entre los experimentos de microarreglos	16
6. Análisis de las regiones promotoras de los genes encontrados en los experimentos de microarreglos	24
7. Expresión relativa de <i>DAL5</i> en glutamina como fuente de nitrógeno	26
8. Expresión relativa de <i>DAL5</i> en prolina como fuente de nitrógeno	27
9. Especificidad de los oligonucleótidos diseñados para las reacciones de RT-PCR	28
10. Expresión relativa de <i>TDH1</i> en glutamina como fuente de nitrógeno	29
11. Expresión relativa de <i>TDH2</i> en glutamina como fuente de nitrógeno	30
12. Expresión relativa de <i>TDH3</i> en glutamina como fuente de nitrógeno	31
13. Expresión relativa de <i>TDH1</i> en prolina como fuente de nitrógeno	32
14. Expresión relativa de <i>TDH2</i> en prolina como fuente de nitrógeno	33
15. Expresión relativa de <i>TDH3</i> en prolina como fuente de nitrógeno	34
16. Interconversión de Gliceraldehído-3-fosfato a 1,3-Bifosfoglicerato	36
17. Caracterización del crecimiento de las distintas especies y/o cepas de levaduras en medios sólidos con diferentes fuentes de carbono	43
18. Caracterización del crecimiento de las especies y/o cepas de levaduras en medios líquidos	50

Anexos

1. Crecimiento de las distintas especies de levadura analizadas en medios nutritivos con diferentes fuentes de carbono	53
2-3. Crecimiento de las distintas especies de levadura analizadas en medio mínimo con diferentes fuentes de carbono	55
4. Curvas de crecimiento para la especie probadas en YPD	58
5. Curvas de crecimiento para la especie probadas en YP+EtOH	59
6. Curvas de crecimiento para la especie probadas en YP+Gal	60
7. Curvas de crecimiento para la especie probadas en YP+Gli	61
8. Curvas de crecimiento para la especie probadas en YP+Sac	62
9. Curvas de crecimiento para la especie probadas en MM+D	63
10. Curvas de crecimiento para la especie probadas en MM+EtOH	64
11. Curvas de crecimiento para la especie probadas en MM+Gal	65
12. Curvas de crecimiento para la especie probadas en MM+Gli	66
13. Curvas de crecimiento para la especie probadas en MM+Sac	67
14. Curvas de crecimiento para la especie <i>D. hansenii</i> en medios nutritivos	68
15. Curvas de crecimiento para la especie <i>D. hansenii</i> en medios mínimos	69
16. Alineamiento de 166 aminoácidos hacia el extremo N-terminal de la proteína Gln3	70
17-22. Ligación del producto de PCR en pGEM-T Easy	71
23. Amplificaciones sobre las construcciones realizadas para estandarizar condiciones de PCR en tiempo real	77
24. Estandarización de ciclos para realizar RT-PCR	78
25. Geles representativos de los RT-PCRs	79

Abreviaturas

cDNA	<u>c</u> omplementary <u>d</u> eoxiribon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid
ADH	<u>a</u> lcohol <u>d</u> e <u>h</u> ydrogenase
D	<u>d</u> extrose
DNA	<u>d</u> eoxyribon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid
EtOH	<u>e</u> tanol
Gal	galactosa
GAPDH	glyceral <u>a</u> ldehyde-3-phosphate <u>d</u> e <u>h</u> ydrogenase
Gli	glicerol
Kb	<u>K</u> ilo <u>b</u> ase
Mb	<u>M</u> ega <u>b</u> ase
NADH	<u>n</u> icotinamide <u>a</u> denine <u>d</u> inucleotide
NADPH	<u>n</u> icotinamide <u>a</u> denine <u>d</u> inucleotide <u>p</u> hosphate
NCR	<u>n</u> itrogen <u>c</u> atabolite <u>r</u> epression
ORF	<u>o</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame
PCR	<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
RNA	<u>r</u> ibon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid
Sac	<u>s</u> acarosa
sRNA	<u>s</u> mall <u>r</u> ibon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid
tRNA	<u>t</u> ransfer <u>r</u> ibon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid
UAS	<u>u</u> pstream <u>a</u> ctivator <u>s</u> equence
WGD	<u>w</u> hole <u>g</u> enome <u>d</u> uplication

Resumen

Saccharomyces cerevisiae es una levadura que posee un genoma relativamente pequeño, distribuido en 16 cromosomas, que contienen aproximadamente 6000 marcos de lectura abierta (ORFs). Se sabe que el carbono y el nitrógeno son nutrientes esenciales para los organismos unicelulares. La levadura *S. cerevisiae* es capaz de utilizar una amplia variedad de compuestos como fuente de nitrógeno. Estos compuestos se pueden clasificar como buenas fuentes (como glutamina o asparagina) o malas fuentes (como prolina o GABA). Cuando la levadura crece en buenas fuentes de nitrógeno mantiene reprimidos genes que codifican para transportadores y enzimas catabólicas de malas fuentes. A este mecanismo se le conoce como represión catabólica nitrogenada (NCR). La NCR se encuentra coordinada por cuatro factores transcripcionales: dos activadores Gln3 y Gat1 y dos represores Gzf3 y Dal80. Los activadores Gat1 y Gln3 son más activos cuando las células crecen en malas fuentes de nitrógeno, por lo que incrementan la expresión de sus genes blanco, que en buenas fuentes se encuentran reprimidos. Sin embargo, existen genes cuya expresión depende de Gln3, pero no de NCR: *GDH3*, *UGA3* y *GLT1*. Para determinar qué otros genes son activados por Gln3 en una buena fuente de nitrógeno, se diseñaron microarreglos en medios que contenían glutamina como fuente de nitrógeno. Se encontró la sobreexpresión de 15 genes en una cepa parental con respecto de una cepa *gln3Δ*. De estos genes se seleccionaron los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3* para analizar su expresión. Estos genes tienen secuencias consenso de tipo GATA (5'-GATWA-3') en sus regiones intergénicas. Al evaluar la expresión dependiente de Gln3, se observó que estos tres genes sí están regulados por dicho activador, tanto en glutamina como en prolina.

PALABRAS CLAVE. Represión catabólica nitrogenada, NCR, glutamina, prolina, nitrógeno, GAPDH, *TDH1*, *TDH2*, *TDH3*.

Abstract

Saccharomyces cerevisiae is an organism that contains a relatively small genome, comprised in 16 chromosomes containing around 6000 open reading frames (ORFs). It's accepted that carbon and nitrogen compounds are the basic nutrients of the cellular living forms. The yeast *S. cerevisiae* is able to use a broad variety of nitrogen compounds as nitrogen sources, these compounds can be classified as good sources (glutamine, asparagine) or bad sources (proline, GABA). When yeasts are grown in a good nitrogen source, genes encoding proteins involved in transport and catabolism of bad nitrogen sources are repressed. This mechanism is known as nitrogen catabolite repression (NCR). NCR is coordinated by four transcriptional factors: two activators, Gln3 and Gat1; and two repressors, Gzf3 and Dal80. Gat1 and Gln3 are active when cells are grown in bad nitrogen sources; consequently, the expression of their target genes is de-repressed. However, there are some genes which expression depends on Gln3, but not necessary on NCR (e.g. *GDH3*, *UGA3* and *GLT1*). To determine the genes that are activated by Gln3 in a good nitrogen source, we designed and performed microarray experiments in minimal medium with glutamine as nitrogen source. The expression profile of a wild type strain was compared with the one obtained from a *gln3Δ* mutant strain. Noteworthy, we found the over-expression of 15 genes among which we chose the genes *TDH1*, *TDH2* and *TDH3* to analyze their expression by RT-PCR. These genes contain, in their intergenic region, consensus sequences of the GATA core (5'-GATWA-3'). Our results show that these genes certainly depend on Gln3 for its expression when glutamine or proline are used as nitrogen sources.

KEY WORDS. Nitrogen Catabolite Repression, NCR, glutamine, proline, nitrogen, GAPDH, *TDH1*, *TDH2*, *TDH3*.

I. INTRODUCCIÓN

1. Generalidades de *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae se introdujo como sistema experimental para la biología molecular a inicios de la década de los 60's. En el año 1996 fue el primer organismo eucarionte del cual se hizo pública y accesible la secuencia de su genoma. En los años que siguieron, esta levadura se convirtió en una útil referencia contra la cual secuencias de humanos, plantas o animales y una inmensa variedad de organismos unicelulares, podían ser comparados [1].

S. cerevisiae: posee un genoma relativamente pequeño, 12.8 Mb distribuidos en 16 cromosomas, siendo cerca de 200 veces menor que el de los humanos y solo 4 veces mayor que el de *E. coli*. El genoma de *S. cerevisiae* contiene aproximadamente 6000 marcos de lectura abierta (ORFs). Un gen codificante para una proteína se encuentra aproximadamente cada 2 Kb cubriendo así cerca del 70% del genoma. Su genoma contiene unos 120 genes para RNAs ribosomales dispuestos en el cromosoma XII, 40 genes codificantes para RNAs pequeños nucleares (sRNAs), 274 genes de tRNAs (pertenecientes a 42 familias) que se encuentran distribuidos a lo largo del genoma y 50 copias de retrotransposones de levadura (elementos Ty). Finalmente, deben ser consideradas como parte del acervo de DNA de la levadura, las secuencias no cromosomales, como el plásmido de DNA 2 μ de aproximadamente 6 Kb, los plásmidos killer presentes en algunas cepas, y el genoma mitocondrial de 75 Kb [1].

2. *Saccharomyces cerevisiae* y las especies de levaduras con las que se encuentra más relacionada

Saccharomyces cerevisiae y las especies de levaduras con las que se encuentra estrechamente relacionada pertenecen al phylum Ascomycota, sub-phylum Saccharomycotina. Algunas de las particularidades del grupo Saccharomycotina son: a) presenta un clado que contiene organismos que traducen CTG como serina en lugar de leucina, este clado es conocido como clado CTG (Figura 1). Como se observa en la Figura 1 se evidencian dos grupos en el clado CTG, uno conteniendo las especies homotéticas *Candida lusitanae*, *Candida guilliermondii* y *Debaryomyces hansenii* y un segundo grupo compuesto por *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis*. b) el segundo clado de importancia del sub-phylum Saccharomycotina agrupa a las especies cuyo ancestro estuvo sujeto a la duplicación completa del genoma (clado WGD) (Figura 1) [2].

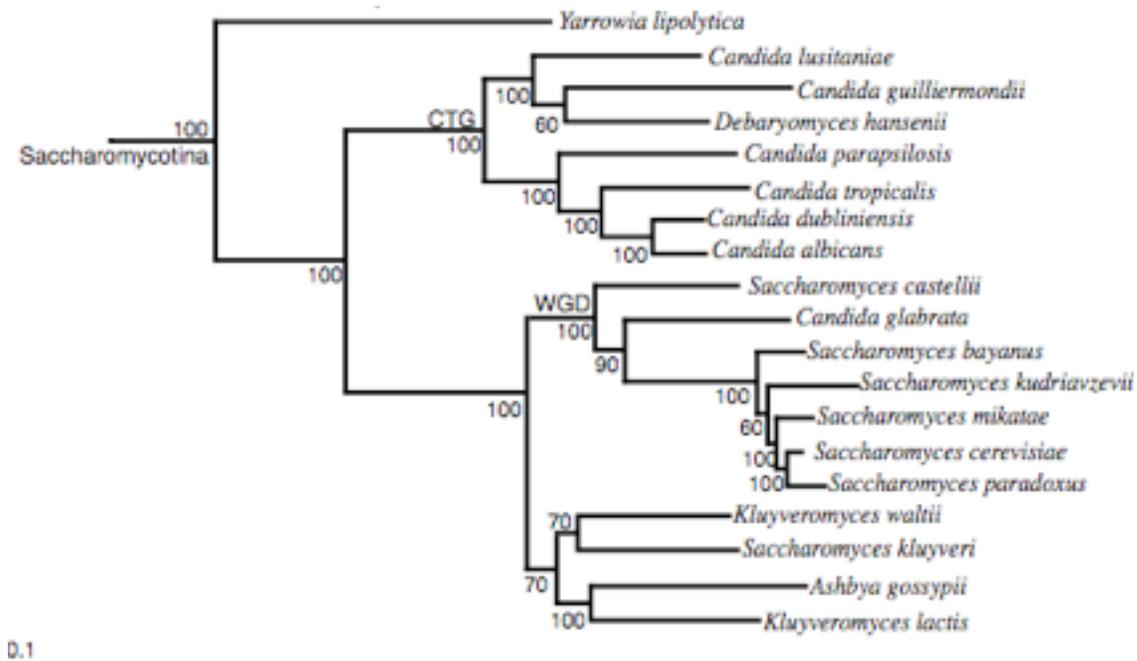


Figura 1. Cladograma del sub-phylum Saccharomycotina. Filogenia reconstruida con el alineamiento concatenado de 153 genes de hongos distribuidos universalmente. Modificado de [2].

3. El metabolismo de la levadura

Los compuestos de carbono o nitrógeno son los nutrientes básicos para los organismos unicelulares. Estos son usados para producir energía y una gran variedad de biomoléculas [3]. Las células vivas son excelentes ejemplos de cómo la producción precisa de ciertos metabolitos en tiempo y momento en el que son necesarios está finamente regulada por interfaces entre diferentes rutas metabólicas como el metabolismo del carbono y el del nitrógeno [4]. Las levaduras son hongos unicelulares ampliamente distribuidos en el ambiente (tierra, aire y agua); el éxito de estos microorganismos para colonizar esta íntimamente ligado a su capacidad para adaptarse a condiciones ambientales variables [5].

3.1. Metabolismo de nitrógeno

S. cerevisiae es capaz de utilizar una amplia diversidad de compuestos nitrogenados, por lo que las fuentes de nitrógeno se pueden agrupar como buenas fuentes o malas fuentes. Una buena fuente de nitrógeno en comparación de una mala fuente, es aquella que es transportada al interior de la célula y que requiere menos pasos biosintéticos y/o catabólicos para llegar a glutamina o glutamato, que son los principales donadores de nitrógeno en las reacciones biosintéticas. La degradación de los compuestos nitrogenados conduce a la formación de tres compuestos clave en la célula: amonio (vía desaminación), glutamato (vía transaminación) y glutamina que es sintetizada por la condensación de glutamato y amonio en una reacción catalizada por la glutamina sintetasa (*GNL1*) (Figura 2) [6]. La interconversión entre amonio, glutamato y glutamina es conocida como el metabolismo central de nitrógeno.

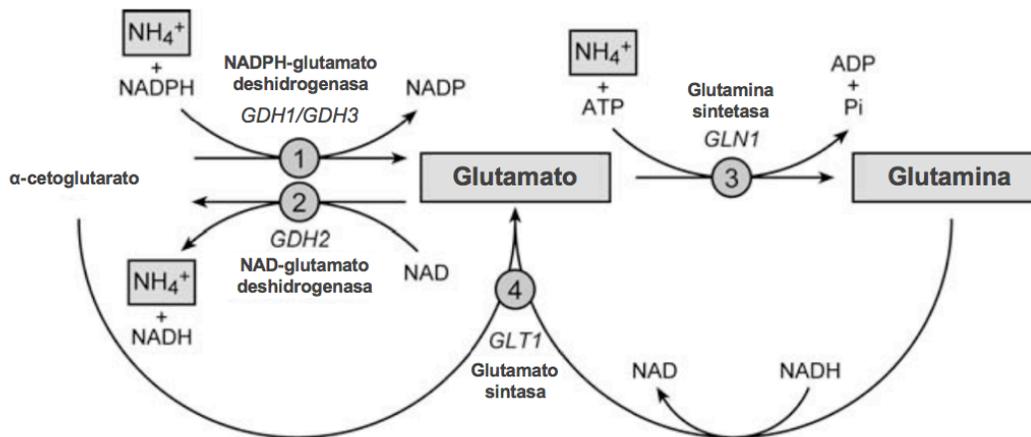


Figura 2. Rutas centrales del metabolismo de nitrógeno. Desaminación dependiente de NADP por la glutamato deshidrogenasa codificada por los genes *GDH1* y *GDH3* (amonio → glutamato, reacción 1), transaminación dependiente de NAD por la glutamato deshidrogenasa codificada por el gen *GDH2* (glutamato → amonio, reacción 2) y los sistemas de glutamina sintetasa y glutamato sintasa reacciones, 3 y 4. Modificada de [7].

3.2. Represión catabólica nitrogenada (NCR)

La represión catabólica nitrogenada (NCR) en *S. cerevisiae* es el mecanismo a través del cual las células responden a la disponibilidad ambiental de nitrógeno y selectivamente utilizan buenas fuentes de nitrógeno (asparagina, glutamina) en preferencia a malas fuentes de nitrógeno (prolina, GABA). Esta habilidad para sentir y responder a cambios constantes y en ocasiones hostiles requiere la reprogramación metabólica celular que ocurre principalmente a dos niveles: i) postraduccionalmente, afectando la actividad de permeasas de aminoácidos a través de su internalización y degradación en la vacuola [8]; y ii) transcripcionalmente, restringiendo la capacidad de las células para transcribir genes codificantes para enzimas y permeasas requeridas para usar malas fuentes de nitrógeno cuando buenas fuentes se encuentran disponibles en el medio [9]. La expresión de los genes NCR-sensibles se encuentra coordinada por la proteína Ure2p y cuatro proteínas de la familia GATA con dominios de unión a DNA de tipo dedos de zinc: dos activadores (Gln3 y Gat1/Nil1) y dos represores (Dal80/Uga43 y Gzf3/Deh1p/Nil2) (revisado en [10]).

3.2.1. Factores transcripcionales GATA

En *S. cerevisiae* la familia GATA de factores de transcripción esta compuesta por al menos ocho miembros de los cuales cuatro han mostrado claramente regular la expresión de genes NCR-sensibles: Gln3, Gat1/Nil1, Dal80/Uga43 y Gzf3/Deh1/Nil2. Cada uno posee motivos de unión a DNA de tipo dedo de zinc. El blanco de la familia de proteínas GATA son secuencias consenso UAS_{GATA} en la región promotora de sus genes blanco (clásicamente genes NCR-sensibles).

3.2.1.1. Gln3

Minehart et al., en 1991 [11] encontraron que *GLN3* es un gen no esencial para el crecimiento, pero un aumento en su número de copias conduce a una disminución drástica de la tasa de crecimiento de la levadura. *GLN3* codifica para un polipéptido de 730 aminoácidos, con un peso molecular de aproximadamente 80,000 Da. Además, la proteína posee un dedo de zinc Cys₂-Cys₂ con homología a la proteína Nit2 de *Neurospora crassa*. Ahora se sabe que ese dedo de zinc es responsable de la unión de Gln3 a secuencias consenso GATA en la región promotora de sus genes blanco. Gln3 es un regulador positivo de los genes NCR-sensibles. Además, Gln3 posee un dominio de activación (QQNGEIAQLWDFN) localizado en la región N-terminal (aminoácidos 126 a 138) [12].

Cuando la levadura crece en una buena fuente de nitrógeno (asparagina, glutamina), Gln3 se encuentra fosforilado y secuestrado en el citoplasma por la proteína Ure2 formando el complejo Gln3:Ure2. Por otro lado, cuando las células son crecidas en una mala fuente de nitrógeno (prolina, GABA) Gln3 es desfosforilado y disociado del complejo Gln3:Ure2; Gln3 entra al núcleo donde activa la transcripción de sus genes blanco (NCR-sensibles).

3.2.1.2. Gat1

Aunque Gln3 es considerado un elemento clave en la NCR, Georis et al., [9] proponen a Gat1 como otro elemento de gran importancia en el control de la expresión de genes NCR-sensibles por las siguientes razones: i) Gat1 aparenta ser un factor limitante en la expresión de genes NCR-sensibles, ii) la expresión de *GAT1* está regulada por los cuatro factores GATA en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno, iii) los dos factores negativos Dal80 y Gzf3 interfieren con la unión de Gat1 al DNA, y iv) la unión de Gln3 a algunos promotores NCR-sensibles requiere de Gat1 [9]. Aunque la transcripción mediada por Gat1 está negativamente regulada por Ure2 (al igual que en el caso de Gln3) no se ha podido aislar el complejo Gat1:Ure2.

3.2.1.3. Represores transcripcionales Dal80 y Gzf3

Dal80 y Gzf3 son represores de la transcripción y comparten un dominio de tipo cierre de leucina en el carboxilo terminal que permite que estas proteínas puedan conformarse como homo o heterodímero [13].

Los dos represores GATA juegan papeles muy diferentes en la modulación de los genes NCR-sensibles. Mientras que Dal80 es sensible a NCR y limita la expresión sus genes blanco en malas fuente de nitrógeno (prolina, GABA) [14], Gzf3, parece inhibir la expresión de genes en condiciones represivas de nitrógeno (glutamina, asparagina) [15].

3.2.2. Grados de fosforilación de los activadores transcripcionales Gln3 y Gat1

En la actualidad se sabe, que en células crecidas en una buena fuente de nitrógeno (glutamina), Tor (TorC1) fosforila a su proteína asociada Tap42 promoviendo la interacción de ésta, con cualquiera de las serina/treonina fosfatasas: Sit4 o con alguna de las subunidades catalíticas de PP2A (que existe como heterotrímero Pph21/22-Tpd3-Cdc55/Rts1) como puede verse en la Figura 3. El heterotrímero está compuesto por una subunidad catalítica Pph21 o Pph22, una subunidad estructural Tpd3 y una de las subunidades regulatorias Cdc55 o Rts1. Los complejos TorC1:^PTap42:Sit4 y TorC1:^PTap42:PP2A son inactivos y no desfosforilan a Gln3 o a Gat1, por lo que Gln3 y Gat1 se mantienen acomplejados con Ure2 y son incapaces de entrar al núcleo. Pero cuando la actividad de cinasa de TorC1 es inhibida por una mala fuente de nitrógeno o por el tratamiento con rapamicina (macrólido lipofílico producido por la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*, que es un potente compuesto inmunosupresor, anticancerígeno y antifúngico), ^PTap42:Sit4 o ^PTap42:PP2A son disociados de TorC1 y se vuelven transitoriamente activos. Cuando estos complejos se encuentran activos desfosforilan a Gln3 o a Gat1, promoviendo que éstas se disocien de Ure2 y por lo tanto puedan entrar al núcleo para activar la transcripción de sus genes blanco (Figura 3, revisado en [16,17]).

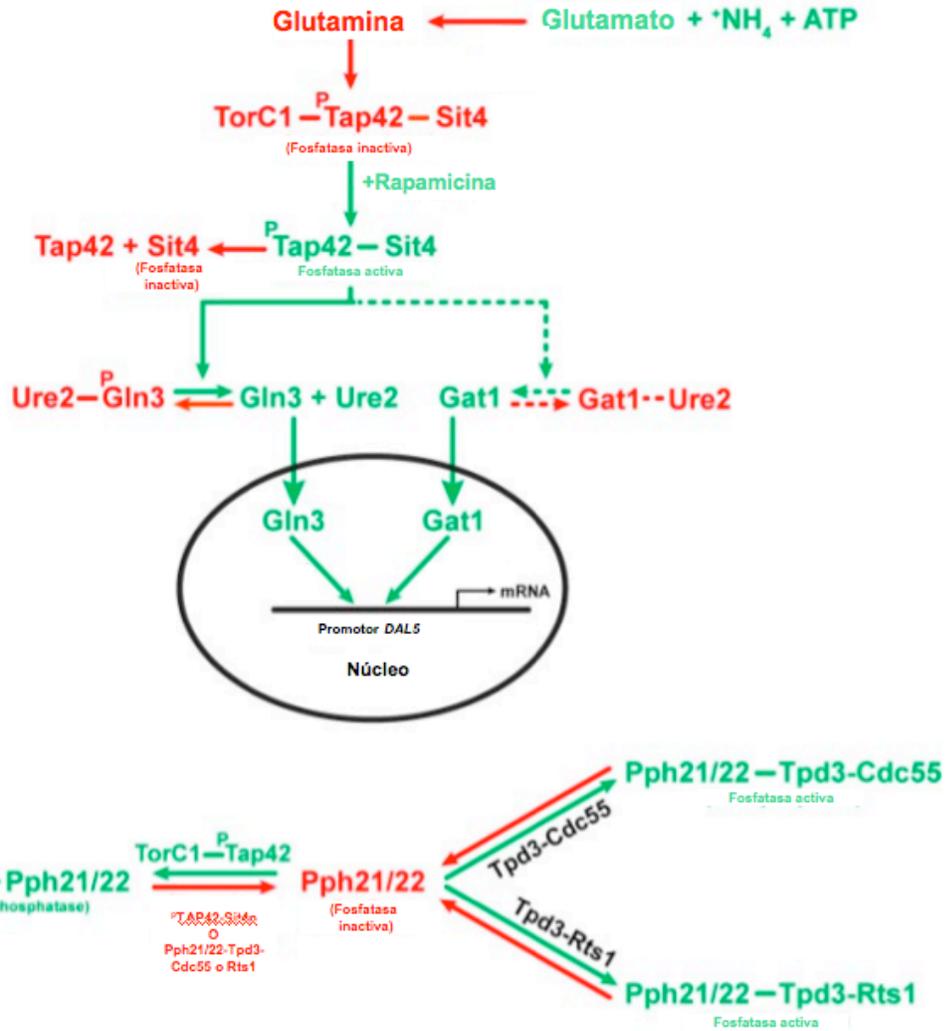


Figura 3. Modelo que describe cómo la vía Tor desfosforila a Gln3, su localización y la activación NCR-sensible. Este modelo incorpora las conclusiones de múltiples laboratorios. Las flechas verdes indican regulación positiva mientras que las flechas rojas y las barras indican regulación negativa. Las letras rojas y verdes indican formas inactivas y activas de las proteínas, respectivamente. Las líneas punteadas indican relaciones regulatorias débiles. Modificado de [16].

3.3. Destino de los azúcares en levadura

Los azúcares son utilizados por todas las levaduras conocidas. La característica común en el metabolismo de las levaduras es la conversión de glucosa 6-fosfato o fructosa 6-fosfato a piruvato a través de la glucólisis. El destino del piruvato es diferente dependiendo de la especie de levadura y las condiciones de crecimiento (Figura 4) [18].

Se distinguen dos principales vías para el uso del piruvato para la posterior producción de energía: la respiración y la fermentación (Figura 4). En la respiración, el piruvato entra a la matriz mitocondrial donde es descarboxilado por oxidación a acetil CoA por el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa. Esta reacción liga la glucólisis al ciclo de los ácidos tricarboxílicos, en el cual la acetil CoA es completamente oxidada para producir dos moléculas de CO₂ (dióxido de carbono) y equivalentes reductivos en la forma de NADH y FADH₂. En la fermentación, la levadura re-oxida NADH a NAD⁺ en una reacción de dos pasos a partir de piruvato. Primero, el piruvato es descarboxilado por la piruvato descarboxilasa seguido por la reducción de acetaldehído, catalizado por la alcohol deshidrogenasa (ADH) [1].

Por último, un modo alternativo para la oxidación de la glucosa es el ciclo de las pentosas, el cual provee a la célula con azúcares de pentosa y NADPH citosólico necesario para las reacciones biosintéticas, como lo son la producción de ácidos grasos, aminoácidos y alcoholes de azúcar. El primer paso en esta ruta es la deshidrogenación de glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconolactona y la generación de una mol de NADPH. Subsecuentemente, el 6-fosfogluconato es descarboxilado por la acción de la fosfogluconato deshidrogenasa para producir ribulosa-5-fosfato y una segunda mol de NADPH. Así, además de la generación de NADPH, se producen azúcares de ribosa que sirven en la biosíntesis de precursores de ácidos nucleicos y coenzimas nucleicas [1].

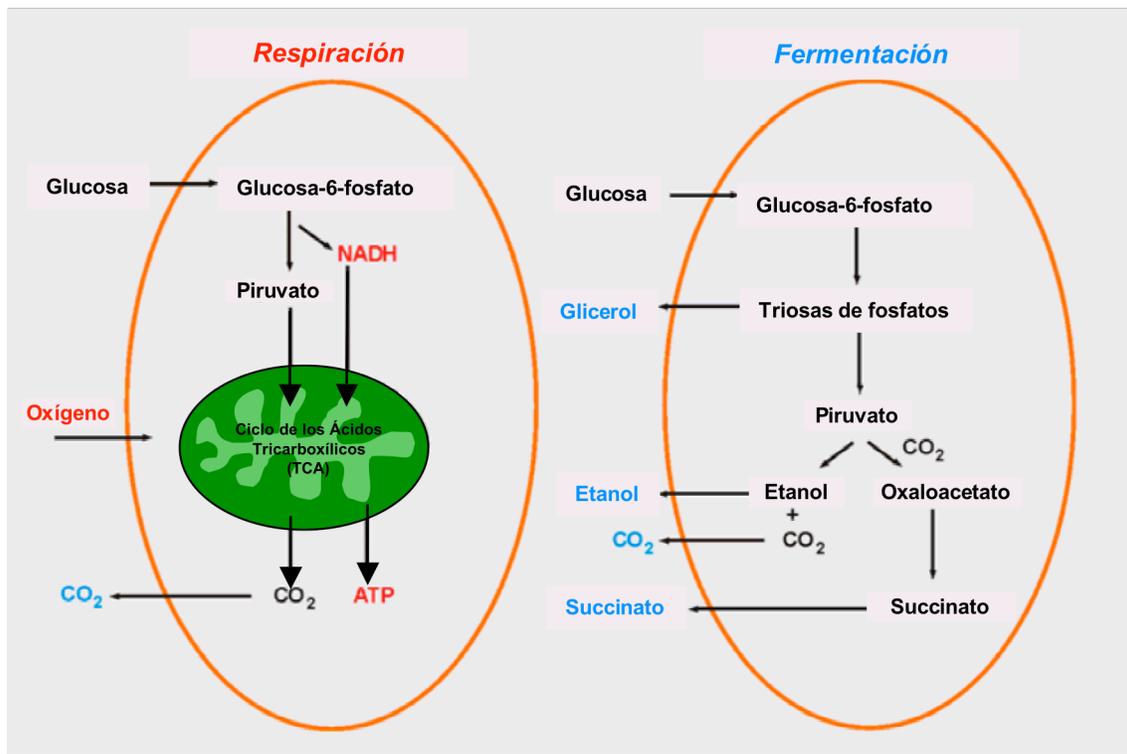


Figura 4. Metabolismo respiratorio y fermentativo de la levadura. Modificado de [1].

3.3.1. Fuentes de carbono no convencionales

Algunas levaduras, entre ellas *S. cerevisiae*, prefieren una fuente de carbono fermentable (glucosa, galactosa o sacarosa, entre otros), sobre una fuente no fermentable (glicerol o etanol, entre otros) [19]. Algunos azúcares son llamados nutrientes no convencionales pues en ausencia de glucosa pueden ser usados como fuente de carbono. La levadura hace esto transformándolos en alguno de los intermediarios glucolíticos y, además otros intermediarios pueden ser aprovechados por la levadura en procesos no glucolíticos (gluconeogénesis).

3.3.1.1. Etanol

Algunas especies de levaduras tienen la capacidad de metabolizar etanol. Estas especies son conocidas como metilotróficas y son por ejemplo, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, algunas especies de *Candida* y *Torulopsis sonorensis*. En estos organismos, el etanol es primero metabolizado por una oxidasa dependiente de oxígeno a formaldehído, el cual es después convertido a dihidroxi-acetona (DAH) por la acción de una DAH sintasa. La DAH puede después ser utilizada para sintetizar fructosa-6-fosfato [1]. Por otro lado, cuando *S. cerevisiae* ha agotado la glucosa disponible en el medio es capaz de adaptar su metabolismo para consumir etanol [19]. La levadura *S. cerevisiae* es capaz de metabolizar el etanol por una vía conocida como PDH-bypass que requiere la actividad metabólica de: alcohol deshidrogenasas (ADH) que catalizan la reacción reversible de acetaldehído a etanol [18], posteriormente las enzimas aldehído deshidrogenasas (ALD) convierten el gliceraldehído a acetato, éste último después es convertido a acetil-CoA citosólico por la enzima acetil CoA sintasa (ACS), el acetil-CoA es transportado al interior de la mitocondria vía el sistema de la carnitina acetiltransferasa [5].

3.3.1.2. Galactosa

Es una fuente de carbono no convencional que puede ser utilizada por la levadura *S. cerevisiae*. Cuando la levadura se encuentra en medio con glucosa, los genes *GAL* están fuertemente reprimidos. En cambio, cuando las células se encuentran en ayuno de glucosa y la galactosa esta presente en el medio, estos genes se encienden en una proporción de hasta mil veces [1]. Para poder ser utilizada la galactosa primero debe convertirse en glucosa 1-fosfato. En la conversión de galactosa a glucosa 1-fosfato, la galactosa disponible en el medio se fosforila por la enzima galactocinasa para producir galactosa 1-fosfato, después en una reacción que requiere glucosa-UDP y que es catalizada por la enzima galactosa-1-fosfatouridiltransferasa, se produce una molécula de glucosa1-fosfato y una de galactosa-UDP. Por último, la enzima glucosa-UDP-4-

epimerasa convierte a la galactosa-UDP en glucosa-UDP. La glucosa-UDP se recicla por otra ronda de la misma reacción, la producción neta de este ciclo es la conversión de galactosa 1-fosfato a glucosa 1-fosfato [20].

3.3.1.3. Glicerol

Es una fuente no fermentable que funciona como soluto compatible en levaduras osmotolerantes capaces de crecer en condiciones ambientales de alta concentración de azúcares o sales. Varias especies de levadura son capaces de desarrollarse en glicerol como única fuente de carbono bajo condiciones aerobias, entre ellas se encuentra *S. cerevisiae*. Para servir como fuente de carbono, el glicerol después de su internalización debe ser convertido por una glicerol cinasa a glicerol-3-fosfato, el cual puede ser transformado a dihidroxiacetona fosfato por la enzima triosa fosfato isomerasa. La dihidroxiacetona y el glicerol-3-fosfato son sustratos en la gluconeogénesis y la glucólisis. Dependiendo de las necesidades de la célula (síntesis de componentes celulares o sustratos glucolíticos) la dihidroxiacetona puede unirse a una molécula de glicerol-3-fosfato por una enzima aldolasa y producir fructosa 1,6-bifosfato que puede seguir la ruta de la gluconeogénesis. Por otro lado el glicerol-3-fosfato puede convertirse a 1,3-bifosfoglicerato por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) e integrarse a la ruta de la glucólisis (revisado en [1,18,20]).

3.3.1.4. Sacarosa

Es un disacárido que puede ser fácilmente aceptado como fuente de carbono. El metabolismo de los disacáridos es precedido por la hidrólisis, que separa el disacárido en sus monómeros básicos. Dependiendo de la especie de levadura, esta hidrólisis puede ocurrir en el exterior de la membrana plasmática, en el espacio periplasmático, o en el interior de la célula después de la internalización del disacárido. Por ejemplo: en la mayoría de las levaduras la sacarosa es hidrolizada en el exterior de la membrana plasmática por una invertasa externa [21]; sin embargo, genes que codifican para

invertasas periplásmicas solo han sido identificados en *Candida utilis* [21] y *Schizosaccharomyces pombe* [22]. Por otro lado, en *C. albicans*, la sacarosa es transportada al interior de la célula por una enzima inducible por sacarosa e hidrolizada por la enzima α -glucosidasa [23]. La hidrólisis de los disacáridos en estos organismos esta acoplada al transporte ya sea del disacárido o de los monosacáridos resultantes [1].

II. ANTECEDENTES

En trabajos previos se determinó que Gln3 regula la expresión de los genes *GDH3*, *UGA3* y *GLT1*, cuando la levadura crece en una mala fuente de nitrógeno como prolina. Sin embargo, la expresión de estos genes también depende de Gln3 cuando las células crecen en una buena fuente de nitrógeno [24,25,26]. Además, en estas condiciones de crecimiento y con la secuencia GATAAG mutada (sitio de unión de Gln3), la expresión de los genes *GLT1* [26] y *UGA3* [25] no se ve alterada. De esta activación atípica de los genes *GDH3*, *UGA3* y *GLT1*, surgió la idea de conocer qué otros genes pudieran regularse por Gln3 en glutamina como fuente de nitrógeno y de saber si su activación dependerá o no de la unión de Gln3 a su secuencia blanco en el DNA.

Para poder contestar esta pregunta, en nuestro grupo se diseñaron experimentos de microarreglos para determinar cuáles genes son regulados por Gln3 cuando la levadura crece en glutamina como fuente de nitrógeno. Se usaron dos cepas mutantes en el gen *GLN3*: la cepa *gln3⁻* que sólo conserva el dominio de activación descrito previamente por Svetlov et al., [12] (Anexo 16). Y la cepa *gln3Δ::kanMX4* nula (*gln3Δ*), donada por el grupo de la Dra. Alicia González [27], en la cual el marco de lectura abierto del gen *GLN3* se reemplazó con el casete que confiere resistencia a geneticina.

El diseño experimental consistió en comparar el perfil transcripcional de microarreglos: i) la cepa parental vs. la cepa mutante nula *gln3Δ* y ii) la cepa mutante *gln3⁻* vs. la cepa mutante nula *gln3Δ*. Los genes que se encontraron sobreexpresados en cada experimento, se compararon entre sí y aquéllos que se encontraron representados en ambas listas fueron clasificados de acuerdo a la función de las proteínas que codifican. Estos genes dependerían del dominio de activación de Gln3 para su expresión pero no así de su dominio de unión a DNA (Riego et al., datos no publicados) (Tabla 1 y Figura 5).

Entre los genes sobreexpresados en los experimentos de microarreglos se encuentran *TDH1*, *TDH2* y *TDH3*. Estos genes codifican para tres isoenzimas de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa involucrada en glucólisis y gluconeogénesis [28]. Los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3* están regulados por el factor transcripcional Gcr1, el cual es un regulador maestro de los genes relacionados con la glucólisis y la gluconeogénesis [29]. Este factor transcripcional se une a secuencias consenso de tipo cajas CT (5'-CTTCC-3') en el DNA [30]. Sin embargo, la activación de la transcripción mediada por Gcr1 es ineficiente si este factor no interactúa con la proteína Gcr2 [31].

Aunque existe información disponible sobre la regulación de los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3*, no tenemos conocimiento de reportes en los que se relacione su transcripción con el factor transcripcional Gln3. Por lo tanto, evaluamos la expresión de estos genes en glutamina y prolina como fuentes de nitrógeno, tanto en una cepa parental como en cepas mutantes en Gln3 y Ure2.

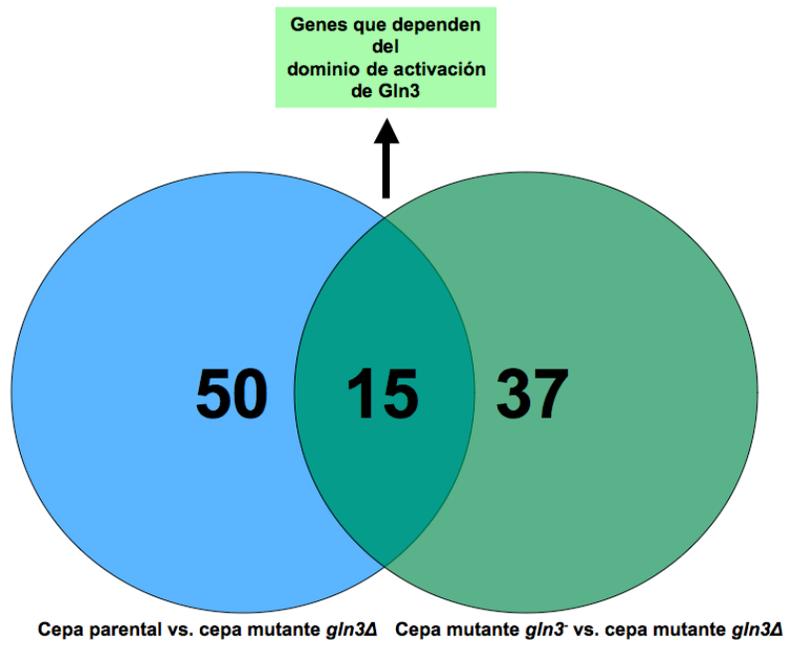


Figura 5. Esquema que muestra el número de genes sobreexpresados entre los experimentos de microarreglos.

Tabla 1. Genes que dependen del dominio de activación de Gln3 en glutamina como fuente de nitrógeno.

Nombre sistemático	Nombre común	Función*
YBR009c	<i>HHF1</i>	Histona H4 componente del nucleosoma requerida para el ensamblaje de la cromatina y la función cromosomal.
YDL121c	<i>YDL121c</i>	Proteína de función desconocida no esencial, localizada en el retículo endoplasmático.
YDL137W	<i>ARF2</i>	Factor de ribosilación ADP, GTPasa de la superfamilia RAS involucrada en la regulación de la formación de vesículas y en el tráfico intracelular del aparato de Golgi.
YGR095C	<i>RRP46</i>	Componente del exosoma no catalítico, involucrado en el procesamiento y degradación del RNA ya sea en núcleo o citoplasma.
YGR192C	<i>TDH3</i>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, isoenzima 3, involucrada en glucólisis y gluconeogénesis; tetramero que cataliza la reacción de gliceraldehído-3-fosfato a 1,3, bifosfoglicerato.
YJL052W	<i>TDH1</i>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, isoenzima 1, involucrada en glucólisis y gluconeogénesis; tetramero que cataliza la reacción de gliceraldehído-3-fosfato a 1,3, bifosfoglicerato.
YJL191W	<i>RPS14B</i>	Proteína de la subunidad pequeña ribosomal, requerida para el ensamblaje y procesamiento 20s de pre-rRNA.
YJR009C	<i>TDH2</i>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, isoenzima 2, involucrada en glucólisis y gluconeogénesis; tetramero que cataliza la reacción de gliceraldehído-3-fosfato a 1,3, bifosfoglicerato.
YLL039C	<i>UBI4</i>	Ubiquitina, marca proteínas para la degradación selectiva vía el 26s-proteosoma ubiquitina, esencial para la respuesta a estrés, codificada como una poliubiquitina comprendida por 5 repeticiones de tipo cabeza a cola.
YLR167W	<i>RPS31</i>	Proteína de fusión que es cortada para producir una proteína ribosomal de la subunidad 40S y una ubiquitina, puede facilitar la unión de la proteína ribosomal a los ribosomas, interactúa físicamente con el factor de traducción eIF2B.
YMR173W-a	<i>YMR173W-a</i>	Marco de lectura abierta dudoso, que se sobrelapa con el gen <i>DDR48/YML137W</i> .
YMR242C	<i>RPL20A</i>	Proteína ribosomal de la subunidad grande 60S.
YNL316C	<i>PHA2</i>	Prefenato deshidrogenasa, cataliza la reacción de prefenato a fenilpiruvato, el cual es un paso en la ruta biosintética de fenilalanina.
YOL109W	<i>ZEO1</i>	Proteína de membrana periférica que interactúa con Mid2, regula la integridad celular mediada por Pkc1 y Sit2, la proteína es detectada en un estado fosforilado en mitocondria.
YOR234C	<i>RPL33B</i>	Proteína ribosomal L37 de la subunidad ribosomal grande 60S, idéntica en 91% a Rpl33A.

(Riego et al., datos no publicados).

*Información obtenida de la base de datos de *Saccharomyces* Genome Database (SGD <http://www.yeastgenome.org>)

III. OBJETIVO

General

- Determinar si la expresión de los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3* en diferentes fuentes de nitrógeno es dependiente de Gln3.

Específicos

- Analizar por RT-PCR la expresión de los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3*, en glutamina y prolina como fuentes de nitrógeno.
- Determinar si los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3*, poseen cajas GATA (5'-GATWA-3') en sus regiones intergénicas.
- Evaluar el crecimiento de las especies de levadura *S. cerevisiae*, *C. glabrata*, *K. lactis*, *S. kluyveri* y *D. hansenii*, en glucosa, etanol, galactosa, glicerol y sacarosa como fuentes de carbono.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepario de levaduras

Las levaduras utilizadas en este trabajo fueron donadas por los investigadores: Irene Castaño Navarro y Alejandro de las Peñas Nava del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, IPICYT A.C.; Alexander De Luna Fors del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, LANGEBIO; y por Alicia González Manjarrez, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Tabla 2. Especies y cepas de levaduras utilizadas en este trabajo.

Nombre	Especie	Genotipo Relevante	Referencia
<i>S. cerevisiae</i> <i>ura3Δ</i> /Parental	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>ura3-1 leu2-3 gal2 hap1</i>	[32]
<i>gln3Δ</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>gln3Δ::kanMX4 ura3-1 leu2-3</i>	[27]
<i>ure2Δ</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>ure2Δ::kanMX4 ura3-1 leu2-3</i>	[33]
<i>gln3 Δure2Δ</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>gln3Δ::natMX4 ure2Δ::kanMX4 ura3-1 leu2-3</i>	Ceparío González, A.
<i>C. glabrata</i> CGM1	<i>Candida glabrata</i> CGM1	<i>ura3Δ::Tn903 G418^R</i>	Ceparío Castaño, I; De Las Peñas, A.
<i>C. glabrata</i> CGM2	<i>Candida glabrata</i> CGM2	<i>Cepa tipo</i>	Ceparío Castaño, I; De Las Peñas, A.
<i>K. lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Cepa tipo</i>	Ceparío De Luna, A.
<i>S. kluyveri</i>	<i>Saccharomyces kluyveri</i>	<i>Cepa tipo</i>	Ceparío De Luna, A.
<i>D. hansenii</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Cepa tipo</i>	Ceparío De Luna, A

2. Oligonucleótidos utilizados

Para cada caso, los oligonucleótidos fueron diseñados sobre la secuencia codificante del gen a estudiar en el DNA de *S. cerevisiae* y amplifican un fragmento menor a 200 pb. El par de oligonucleótidos pUC Fw y pUC Rv fueron diseñados en regiones que flanquean al sitio múltiple de clonación en pGEM-T Easy (Promega) y se usan para comprobar la inserción de los fragmentos amplificados previamente (ver Tabla 3 y Anexos 17-23).

Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para este trabajo.

Nombre oligonucleótido	Secuencia	Sitio donde hibrida	Producto generado (pb)
ARF2 Fw	GTCGGTGGACAAGACAGGAT	YDL137W_216730-216749	172
ARF2 Rv	CGAAGACTAACCAGACAGC	YDL137W_216901-216883	
PHA2 Fw_1	CTGCCAATTGCATAAGGCGTACA	YNL316C_42488-42465	179
PHA2 Rv_1	AGAACCAGGGTCATCTTGACGAGT	YNL316C_42310-42333	
ZEO1 Fw	ACATTGCTGATGGTGTCGAA	YOL109W_110478-110497	113
ZEO1 Rv	GCCTTCCTTCTTGTTTCCT	YOL109W_110590-110571	
TDH1 Fw	GTTACACCGAAGATGCCGTT	YJL052W_339082-339101	159
TDH1 Rv	TCAAGTCAACAACCTGCGG	YJL052W_339240-339221	
TDH2 Fw	GCTTTGCAAAGAAAGAACG	YJR009C_454616-454598	123
TDH2 Rv	GTGGGAAACTTCACCAGCG	YJR009C_454494-454512	
TDH3 Fw	GACCCATTCATCACCAACG	YGR192C_883719-883701	183
TDH3 Rv	GGCGATGTCAACGTTGG	YGR192C_883537-883553	
ACT1 Fw	TCCTACGAACTTCCAGATGG	YFL039C_53673-53654	221
ACT2 Rv	CTTTCGGCAATACCTGGG	YFL039C_53453-53470	
pUC Fw	CCCAGTCACGACGTTGTAACG	Hibrida en secuencia específica de pGEM-T Easy Vector	265
pUC Rv	GCGGATAACAATTTACACAGG		
Dal5 Fw	CTAGCAGTTTATGCAGCC	YJR152W_720775-720792	156
Dal5 Rv	GTACCACAGGTAAGCACC	YJR152W_720930-720913	

Sitio donde hibrida se refiere a las coordenadas cromosómicas del locus correspondiente en el genoma de *S. cerevisiae* (locus_coordenadas cromosómicas), a excepción de los oligonucleótidos empleados para amplificar sobre el plásmido pGEM-T Easy.

3. Plásmidos generados en el presente trabajo

Para la construcción de los plásmidos que se usaran para estandarizar condiciones en el qRT-PCR, se amplificaron fragmentos <250 pb sobre DNA genómico de *S. cerevisiae*, utilizando los oligonucleótidos específicos diseñados en la secuencia codificante de los genes a estudiar. Los fragmentos amplificados se ligaron en el vector pGEM-T Easy (Promega). Los plásmidos se transformaron en *E. coli* DH10B (Invitrogen) y se seleccionaron las colonias resistentes a 100 µg/ml del antibiótico carbenicilina.

Tabla 4. Plásmidos generados en este trabajo.

Plásmidos generados			
Plásmido	Gen de interés	Comprobación en el plásmido generado	
		Específicos a secuencias endógenas del plásmido	Específicos a secuencia endógena de fragmento clonado
pGEM-T Easy ARF2	ARF2	437bp	172bp
pGEM-T Easy PHA2	PHA2	446bp	179bp
pGEM-T Easy ZEO1	ZEO1	380bp	113bp
pGEM-T Easy TDH1	TDH1	426bp	159bp
pGEM-T Easy TDH2	TDH2	390bp	123bp
pGEM-T Easy TDH3	TDH3	450bp	183bp

Los fragmentos clonados son comprobados con oligonucleótidos diseñados sobre: i) secuencias endógenas del plásmido (pUC Fw y pUC Rv) y ii) secuencias endógenas de los fragmentos clonados (ver Tabla 3 y Anexos 17-23).

4. Medios de cultivo

Los medios nutritivos utilizados en este trabajo (Anexos 1, 2, 3), estaban compuestos por extracto de levadura 1% (m/v), peptona de caseína 2% (m/v), y como fuente de carbono según el experimento se utilizaron: dextrosa (D) 2% (m/v); etanol (EtOH) 2% (v/v); galactosa (Gal) 2% (m/v); glicerol (Gli) 2% (v/v); y sacarosa (Sac) 2% (m/v). Cuando fue necesario utilizar marcadores de selección se adicionaron a los medios los antibióticos geneticina 0.02% (m/v) y/o nourseotricina 0.01% (m/v). Los medios mínimos utilizados en este trabajo, contenían sales, elementos traza y vitaminas según la formula de Difco. Dependiendo del experimento y de forma excluyente se adicionó la fuente de nitrógeno: sulfato de amonio 0.5% (m/v), prolina 0.5% (m/v) o glutamina 0.1% (m/v). De la misma manera fue adicionada la fuente de carbono quedando en las mismas proporciones que en los medios nutritivos. Se adicionaron los aminoácidos leucina 0.01% (m/v) y uracilo 0.003% (m/v) cuando fue necesario complementar auxotrofías. Para los medios en los que se calculó el tiempo de duplicación de *D. hansenii* se agregó NaCl 0.5 M.

5. Condiciones de crecimiento para las reacciones de RT-PCR

Se llevaron a saturación precultivos celulares de las diferentes cepas de *S. cerevisiae* (parental, *gln3Δ*, *ure2Δ*, *gln3Δ ure2Δ*) en medio mínimo con la fuente de nitrógeno a evaluar. Posteriormente los precultivos se inocularon a una D.O.₆₀₀ 0.05 en 50 ml de medio mínimo fresco que contenía glutamina o prolina como fuente de nitrógeno y se dejaron crecer a una D.O.₆₀₀ 0.6-0.8 a 30°C, y con agitación a 200 rpm.

6. RT-PCR

El RNA total fue extraído de 50 ml de cultivo de acuerdo a lo descrito previamente por Schmitt et al., [34]. El cDNA fue generado a partir de 5 µg de RNA total con el kit comercial SuperScript II Reverse Transcriptase de Invitrogen y oligonucleótido (dT)₁₈ usando el protocolo recomendado por Invitrogen. El cDNA fue posteriormente usado para las reacciones de PCR, con las que se determinó la expresión relativa de los genes que se estudiaron en este trabajo. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de RT-PCR, se encuentran en la Tabla 3.

7. Cuantificación relativa de la expresión de los genes analizados en el presente trabajo

Se estandarizaron los ciclos de amplificación lineal para cada gen a analizar y para el gen constitutivo *ACT1* sobre cDNA proveniente de células de la cepa parental de *S. cerevisiae* crecidas en medio mínimo con glutamina como fuente de nitrógeno (Anexo 24). Se realizaron reacciones de PCR para cada gen que se analizó y para el gen *ACT1*, usando como molde el cDNA de las cepas de *S. cerevisiae*: parental, *gln3Δ*, *ure2Δ*, *gln3Δ ure2Δ*, obtenido a partir de RNA total aislado de células crecidas en glutamina o prolina como fuente de nitrógeno (Anexo 25 incisos A, B y C). Se cargaron 10 µl de cada reacción de PCR en geles de agarosa 2% (m/v) usando como medio conductivo para la electroforesis, el amortiguador de ácido bórico 1x preparado de

acuerdo a lo descrito por Brody et al., [35]. Las bandas se cuantificaron haciendo uso del software Quantity One de Bio-Rad. Para cada cepa, el grado de expresión de cada gen fue normalizado de acuerdo a la expresión del gen constitutivo *ACT1* en cada condición de crecimiento y se reporta la expresión relativa de los genes que se analizaron con respecto a la expresión normalizada de la cepa parental (Figuras 7, 8, 10 - 15).

8. Caracterización de crecimiento en medio sólido

Se crecieron precultivos celulares en medios nutritivos por 16 h en 5 ml YPD a 30 °C en agitación a 200 rpm. Posteriormente, los cultivos fueron centrifugados a 3500 rpm durante 5 min. Las células fueron resuspendidas en 5 ml de agua destilada estéril y centrifugadas nuevamente, esto se repitió en dos ocasiones más (tres lavados). Posteriormente, se diluyeron a una D.O.₆₀₀ de 0.6 (10^0), de ahí se hicieron diluciones seriadas logarítmicas hasta 10^{-4} . De cada dilución fueron tomados 5 μ l respectivamente y goteados en el medio en que se evaluó el crecimiento. Las cajas se incubaron a 30°C y fueron fotografiadas a las 24, 48 y 72 h.

9. Caracterización de crecimiento en medio líquido

Para caracterizar el crecimiento de las diferentes especies y cepas, se realizaron curvas de crecimiento. Para ello se crecieron precultivos celulares, posteriormente, las células se inocularon a una D.O.₆₀₀ de 0.03 en los medios nutritivos o mínimos con las diferentes fuentes de carbono, y se tomaron lecturas cada 2, 3 ó 4 horas (dependiendo del medio). El tiempo de duplicación fue calculado con la ecuación de la recta ($y=mx+b$), donde; y = logaritmo base 10 de la absorbancia, m = pendiente de la ecuación, x = tiempo en horas, b = la ordenada al origen. Para el cálculo de la ecuación de la recta se tomaron, al menos tres puntos de la curva de crecimiento en fase logarítmica. Para cada punto se calculó un tiempo de duplicación y se obtuvo el tiempo de duplicación medio ($t^{1/2}$) para cada cepa en los diferentes medios de cultivo.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Cuantificación de la expresión relativa de los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3* por RT-PCR

Para identificar secuencias consenso de tipo GATA (5'-GATWA-3') que pudieran ser reconocidas por Gln3, se realizó el análisis de las secuencias intergénicas, río arriba de los sitios de inicio de la traducción de los genes sobreexpresados en los experimentos de microarreglos. Para esto se usó la base de datos *Regulatory Sequence Analysis Tools* (RSAT) [36]. Encontramos que solo dos de los 15 genes no poseen cajas GATA (*RPS14B* y *RPL20A*). Además, los genes *YDL121C*, *RRP46*, *TDH1*, *TDH2* y *PHA2* poseen solo 1 caja GATA. Mientras que *TDH3* y *ZEO1* poseen 2. Los genes *HHF1* y *TDH2* tienen 3 cajas. Por otro lado, *RPL33B* tiene 4 cajas, *UBI4* tiene 5 cajas GATA mientras que *RPS31* tiene 8 y por último *ARF2* tiene 11 cajas GATA.

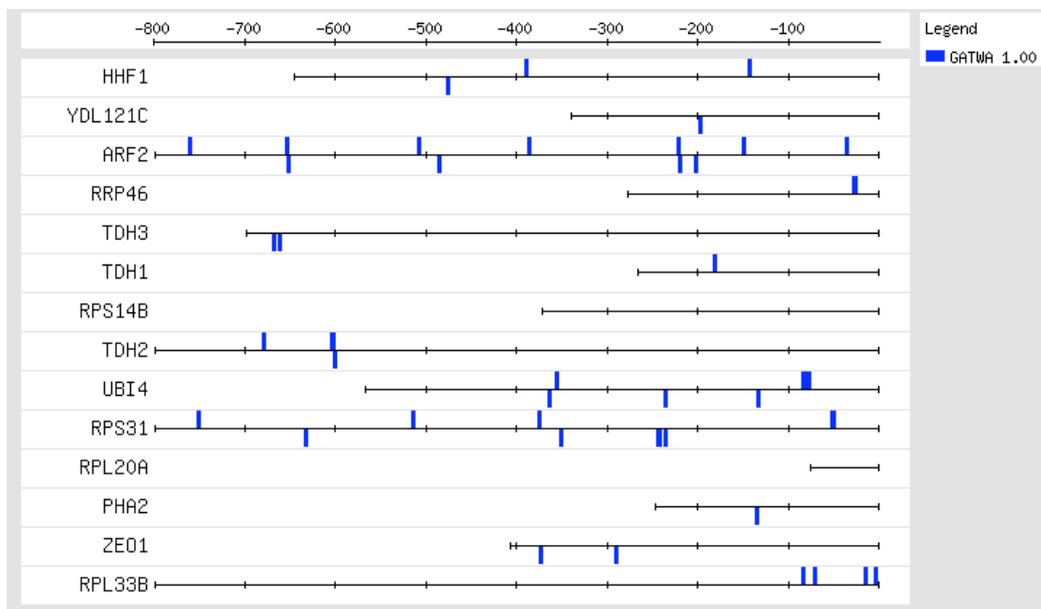


Figura 6. Análisis de las regiones promotoras de los genes encontrados en los experimentos de microarreglos. Se tomaron en cuenta para este análisis solo regiones intergénicas río arriba del sitio de inicio de la traducción. Para el análisis se usó el software de la base de datos de *Regulatory Sequence Analysis Tools* (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>) [36].

Los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3* fueron seleccionados para investigar el papel de Gln3 en la regulación de su transcripción. Por RT-PCR se amplificaron estos genes en la cepa parental y en las cepas mutantes *gln3Δ*, *ure2Δ* y *gln3Δ ure2Δ*, en medios mínimos con diferentes fuentes de nitrógeno. La preparación de los medios y la metodología de crecimiento están descritos en Materiales y Métodos.

El gen *DAL5* fue usado como control positivo de expresión, pues es un gen que previamente se había descrito como NCR-sensible y blanco del factor transcripcional Gln3 [37,38,39]. En la Figura 7 se observa que cuando las células crecen en glutamina como fuente de nitrógeno la expresión de *DAL5* es equivalente entre la cepas parental y *gln3Δ*. Mientras que la expresión de este gen en la cepa *ure2Δ* está aumentada 2 veces con respecto a la observada en la cepa parental. Estos resultados son consistentes con lo descrito previamente para este gen, ya que se sabe que en la cepa *ure2Δ*, la proteína Gln3 es libre de entrar al núcleo y activar la transcripción del gen *DAL5* aún cuando la glutamina es la única fuente de nitrógeno disponible en el medio [39,40]. Como también se observa en la Figura 7, la expresión del gen *DAL5* en las cepas *gln3Δ* y *gln3Δ ure2Δ* se encuentra disminuída con respecto a la de la cepa *ure2Δ*. Este resultado muestra que el aumento en la expresión que se observa en la cepa *ure2Δ* es dependiente de Gln3 en glutamina como fuente de nitrógeno. Por otro lado, la expresión observada entre la cepa parental y las cepas *gln3Δ* y *gln3Δ ure2Δ*, respecto de la cepa *ure2Δ* sugiere que el gen *DAL5* además de activarse por Gln3, mantiene una expresión basal en glutamina como fuente de nitrógeno.

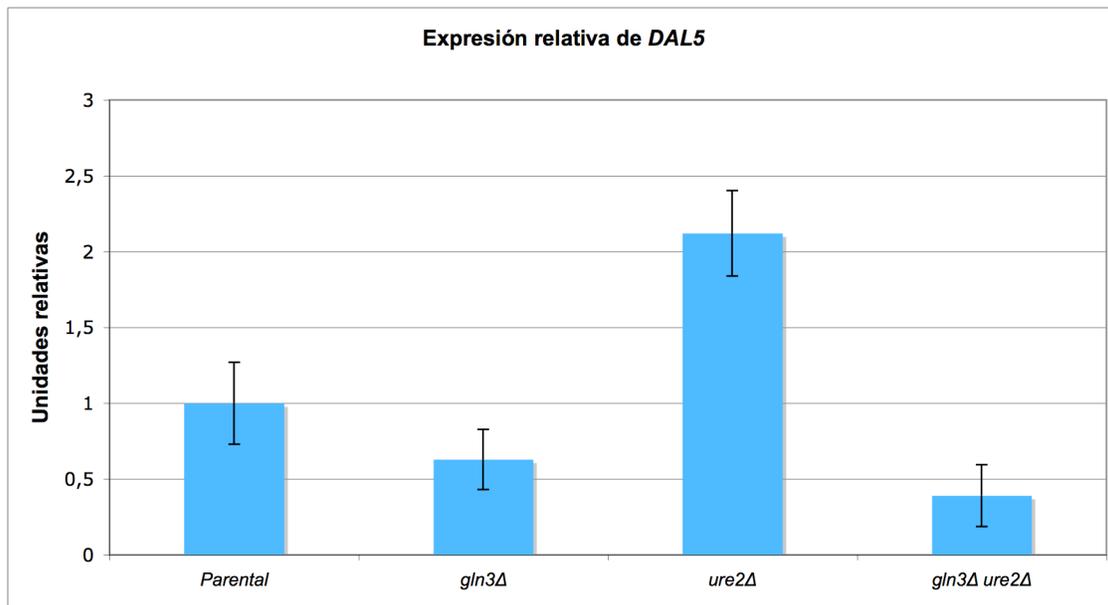


Figura 7. Expresión relativa del gen *DAL5* en glutamina como fuente de nitrógeno. RT-PCR semicuantitativa de datos obtenidos de dos experimentos independientes hechos por duplicado (n= 4). Los datos de cada cepa fueron normalizados de acuerdo a los datos de la expresión del gen constitutivo *ACT1*. Los datos de expresión de *DAL5* para cada cepa mutante fueron divididos entre la expresión relativa de *DAL5* para la cepa parental, la cual fue considerada como la unidad.

De igual manera, analizamos la expresión del gen *DAL5* en células crecidas en prolina como fuente de nitrógeno y encontramos que la expresión de este gen en la cepa *gln3Δ* es menor que la observada en las cepas parental, *ure2Δ* y *gln3Δ ure2Δ*. Además, la expresión del gen *DAL5* en la cepa *ure2Δ* es mayor a la observada en las cepas parental y *gln3Δ ure2Δ*. Mientras que la expresión en la cepa *gln3Δ ure2Δ* es equivalente a la de la cepa parental (Figura 8). Estos resultados están de acuerdo con lo publicado previamente por Coffman et al., [41,42], donde se menciona que la ausencia de *Ure2* resulta en un aumento de la expresión del gen *DAL5* superior al de la cepa parental aún y cuando la prolina es usada como fuente de nitrógeno. Esto puede ser explicado por que en la cepa parental la proteína *Ure2* mantiene retenidas algunas moléculas de *Gln3* y estas quedan libres para entrar al núcleo en la cepa *ure2Δ* (cita?). Por otro lado, la disminución de la expresión de *DAL5* que se observa en la cepa *gln3Δ* con respecto a la de la cepa parental está dada por la ausencia de *Gln3*. Además, se sabe que cuando las células crecen en una mala fuente de nitrógeno existe expresión

del gen *DAL5* en las cepas *gln3Δ* y *gln3Δ ure2Δ* [41,43]. Por otro lado, Georis et al., [9] proponen a la proteína Gat1 como un factor clave en la regulación de los genes NCR-sensibles, ya que este factor transcripcional se expresa más cuando una mala fuente está disponible en el medio y también es retenido por Ure2 en el citoplasma. Esto nos sugiere que la expresión de *DAL5* en las cepas *gln3Δ* y *gln3Δ ure2Δ* está dada por el factor transcripcional Gat1. Sin embargo, para poder comprobar la contribución de Gat1 en la regulación de la transcripción de *DAL5* es necesario generar las mutantes *gat1Δ*, *gat1Δ ure2Δ*, *gat1Δ gln3Δ* y *gat1Δ gln3Δ ure2Δ* en el fondo genético que se usa en nuestro grupo.

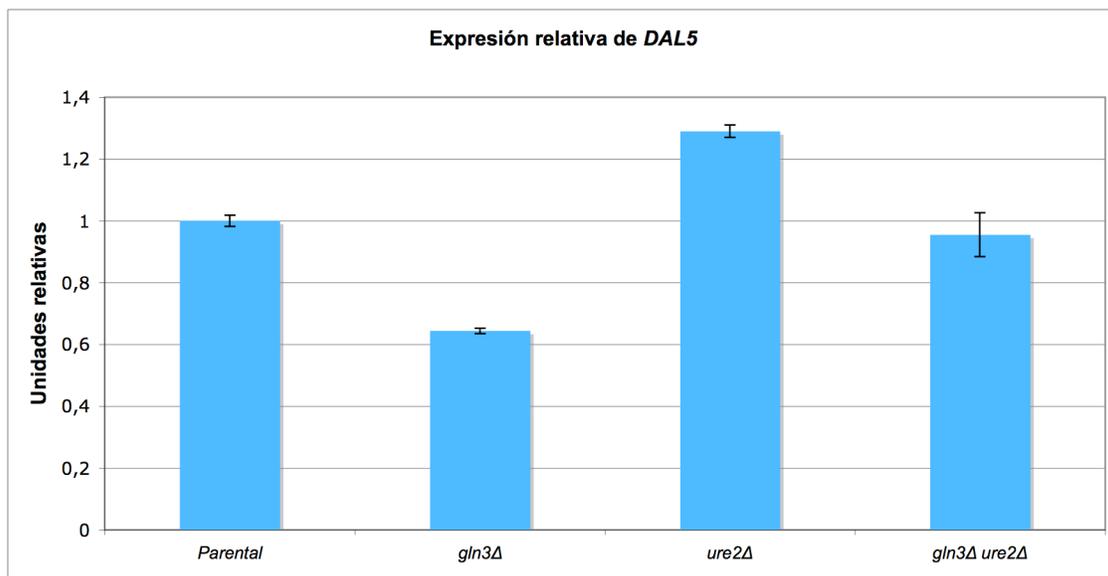


Figura 8. Expresión relativa del gen *DAL5* en prolina como fuente de nitrógeno. RT-PCR semicuantitativa de datos obtenidos de cuatro replicas experimentales (n= 4). Los datos de cada cepa fueron normalizados de acuerdo a los datos de la expresión del gen constitutivo *ACT1*. Los datos de expresión de *DAL5* para cada cepa mutante fueron divididos entre la expresión relativa de *DAL5* para la cepa parental, la cual fue considerada como la unidad.

Una vez que conocimos la expresión del gen control *DAL5*, procedimos con el análisis de la expresión de los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3*, cuando las células crecieron en medio mínimo que contenía glutamina o prolina como fuentes de nitrógeno. Para esto, se diseñaron oligonucleótidos específicos para los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3* y dado que son genes muy conservados entre sí probamos la

especificidad de los oligonucleótidos sobre DNA genómico de la cepa parental y de las mutantes sencillas *tdh1Δ*, *tdh2Δ* y *tdh3Δ* para descartar una probable hibridación cruzada. Observamos que los oligonucleótidos diseñados son específicos para los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3*, dado que no se observa amplificación cuando estos son usados para tratar de amplificar su gen blanco sobre DNA genómico de la correspondiente mutante sencilla (Figura 9).

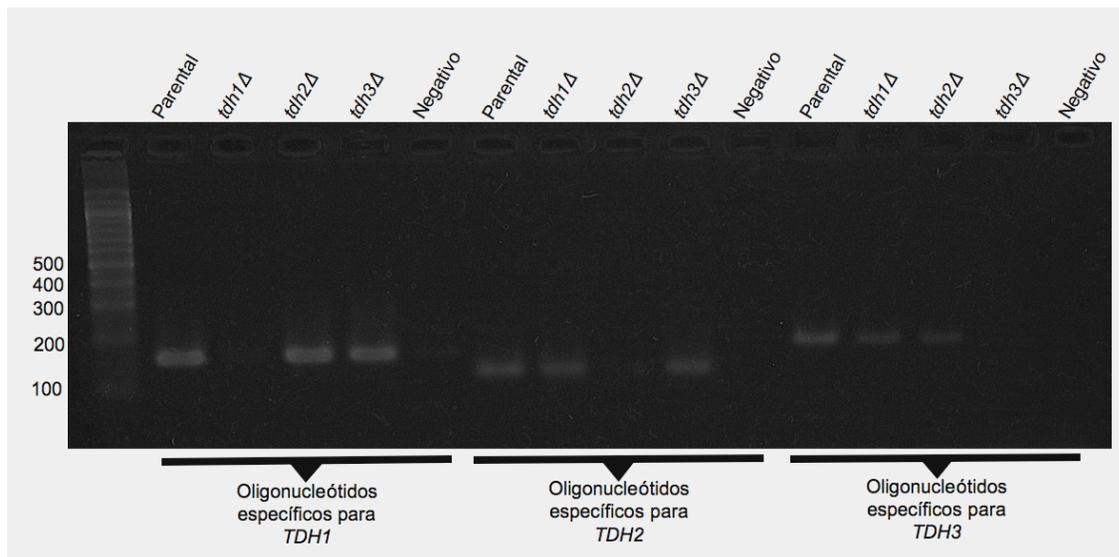


Figura 9. Especificidad de los oligonucleótidos diseñados para las reacciones de RT-PCR. Se probó la especificidad de los oligonucleótidos empleados sobre DNA genómico de la cepa parental y de las mutantes sencillas *tdh1Δ*, *tdh2Δ* y *tdh3Δ*.

Cuando se crecieron las células en glutamina como fuente de nitrógeno, encontramos que la expresión de *TDH1* en la cepa *gln3Δ* es menor que la que se observa en las cepas parental y *ure2Δ* pero mayor que la de la cepa *gln3Δ ure2Δ*. Además, la expresión en la cepa *ure2Δ* es equivalente a la de la cepa parental (Figura 10). Estos resultados nos indican que *TDH1* no es un gen NCR-sensible, ya que se esperaría que en la cepa *ure2Δ* la expresión de este gen fuera mayor que la observada en la cepa parental. Sin embargo, con base en la expresión de *TDH1* en las cepas *gln3Δ* y *gln3Δ ure2Δ* con respecto de la cepa parental, se puede afirmar que el factor transcripcional Gln3 está involucrado en la regulación de *TDH1* aún cuando la glutamina es usada como fuente de nitrógeno. Además, la disminución de la expresión observada

en la cepa *gln3Δ ure2Δ* con respecto de la cepa *gln3Δ* puede deberse a que la proteína Ure2 mantiene retenido a algún regulador negativo y este se encuentra libre para entrar al núcleo en la cepa *gln3Δ ure2Δ*.

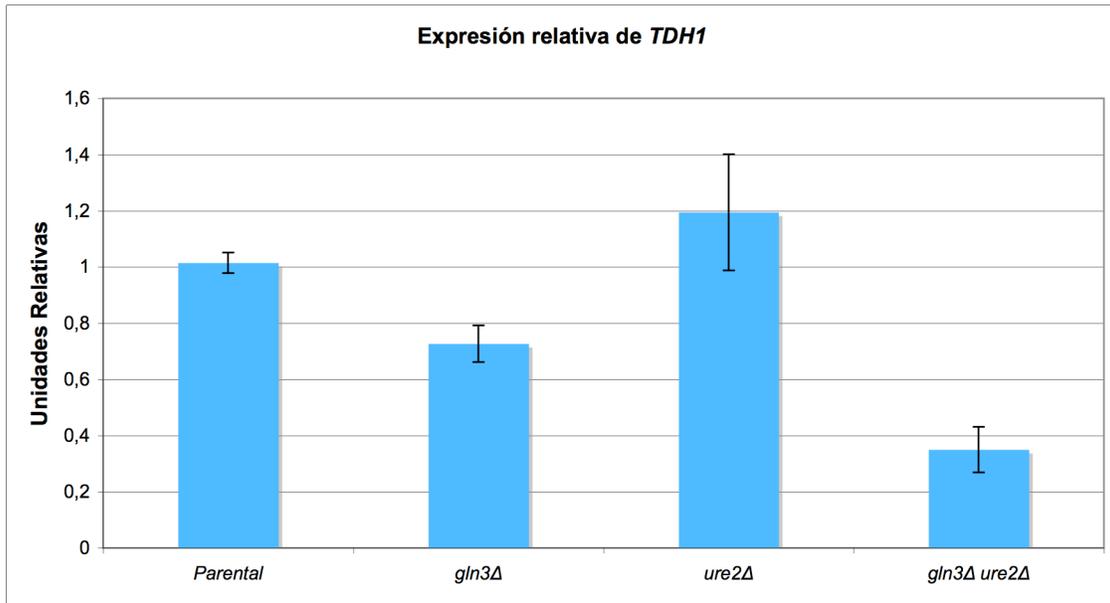


Figura 10. Expresión relativa del gen *TDH1* en glutamina como fuente de nitrógeno. RT-PCR semicuantitativa de datos obtenidos de dos experimentos independientes (uno de los experimentos fue hecho por duplicado) ($n= 3$). Los datos de cada cepa fueron normalizados de acuerdo a los datos de la expresión del gen constitutivo *ACT1*. Los datos de expresión de *TDH1* para cada cepa mutante fueron divididos entre la expresión relativa de *TDH1* para la cepa parental, la cual fue considerada como la unidad.

Por otro lado, cuando la glutamina es usada como fuente de nitrógeno la expresión del gen *TDH2* en la cepa *gln3Δ* es menor que la observada en la cepa parental y es equivalente a la de la cepa *gln3Δ ure2Δ*. Además, la expresión de este gen en la cepa *ure2Δ* es equivalente a la de la cepa parental (Figura 11). Estos resultados muestran que la expresión de *TDH2* no es la esperada para un gen NCR-sensible dado que la expresión de este gen en la cepa *ure2Δ* es equivalente a la que se observa en la cepa parental. Además, la disminución de la expresión en las cepas *gln3Δ* y *gln3Δ ure2Δ* esta dada por la ausencia de Gln3 aún y cuando la glutamina es usada como fuente de nitrógeno.

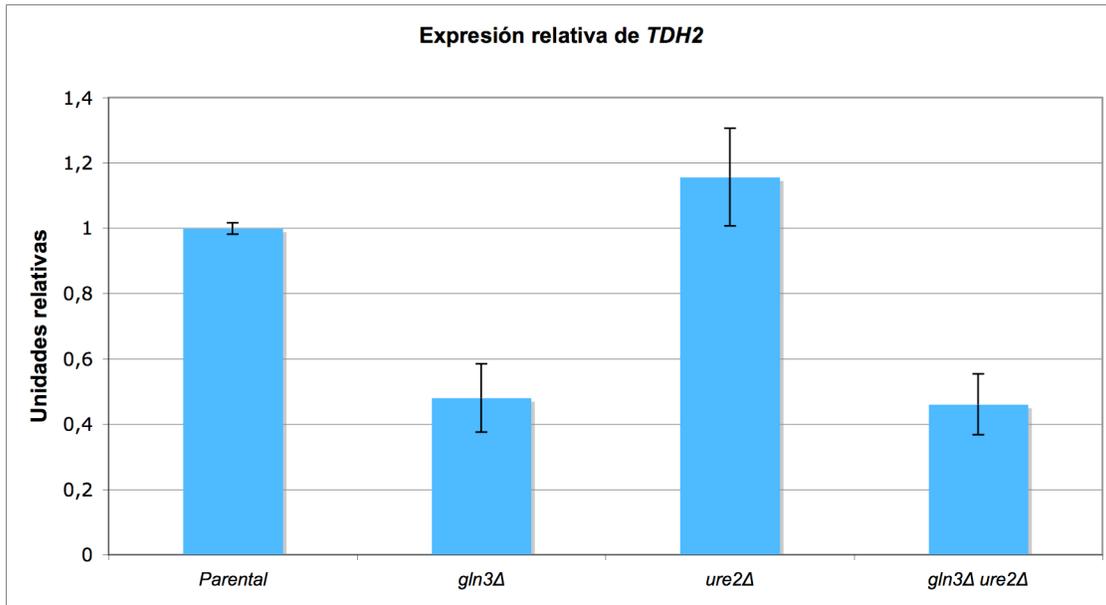


Figura 11. Expresión relativa del gen *TDH2* en glutamina como fuente de nitrógeno. RT-PCR semicuantitativa de datos obtenidos de dos experimentos independientes (uno de los experimentos fue hecho por duplicado) (n= 3). Los datos de cada cepa fueron normalizados de acuerdo a los datos de la expresión del gen constitutivo *ACT1*. Los datos de expresión de *TDH2* para cada cepa mutante fueron divididos entre la expresión relativa de *TDH2* para la cepa parental, la cual fue considerada como la unidad.

En la Figura 12 se observa que cuando la glutamina es usada como fuente de nitrógeno, la expresión relativa de *TDH3* en la cepa *gln3Δ* es menor que la de las cepas parental y *ure2Δ*. Además, es equivalente a la de la cepa *gln3Δ ure2Δ*. Mientras que la expresión en la cepa *ure2Δ* es menor que la de la cepa parental, por lo tanto se puede afirmar que *TDH3* no es un gen NCR-sensible. Además, puede ser que Ure2 mantenga retenido a algún regulador negativo de *TDH3* en el citoplasma. Por otro lado, la disminución de la expresión observada en las cepas *gln3Δ* y *gln3Δ ure2Δ* esta dada por la ausencia de Gln3.

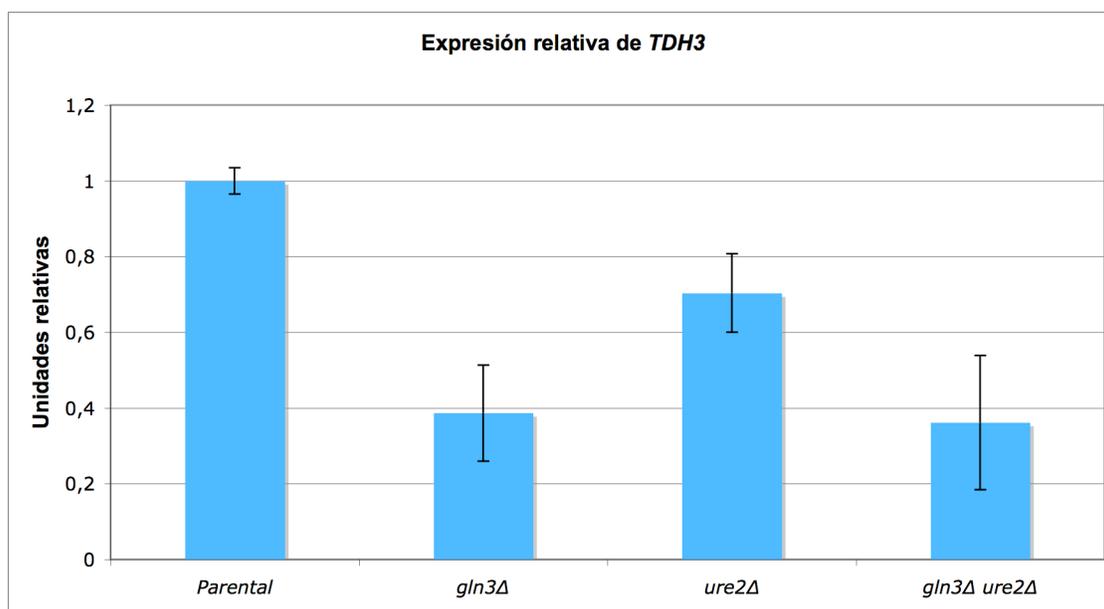


Figura 12. Expresión relativa del gen *TDH3* en glutamina como fuente de nitrógeno. RT-PCR semicuantitativa de datos obtenidos de dos experimentos independientes (uno de los experimentos fue hecho por duplicado) (n= 3). Los datos de cada cepa fueron normalizados de acuerdo a los datos de la expresión del gen constitutivo *ACT1*. Los datos de expresión de *TDH3* para cada cepa mutante fueron divididos entre la expresión relativa de *TDH3* para la cepa parental, la cual fue considerada como la unidad.

Posteriormente, se evaluó la transcripción de estos genes en prolina como fuente de nitrógeno. Se encontró que la expresión del gen *TDH1* en la cepa *gln3Δ* es menor que la observada en las cepas parental, *ure2Δ* y *gln3Δ ure2Δ*. Por otro lado, la expresión en la cepa *ure2Δ* es menor que la expresión en la cepa parental y equivalente a la de la cepa *gln3Δ ure2Δ* (Figura 13). La expresión del gen *TDH1* cuando las células crecen en prolina es diferente de la observada cuando la glutamina es usada como fuente de nitrógeno. Estos resultados sugieren que no se trata de un gen NCR-sensible; sin embargo, la proteína Gln3 se encuentra involucrada en la regulación de su transcripción tanto en glutamina como en prolina. Por otro lado, la disminución de la expresión de este gen en la cepa *ure2Δ* cuando se usa prolina como fuente de nitrógeno puede deberse a un factor negativo que es retenido por Ure2 en el citoplasma aún en esta condición.

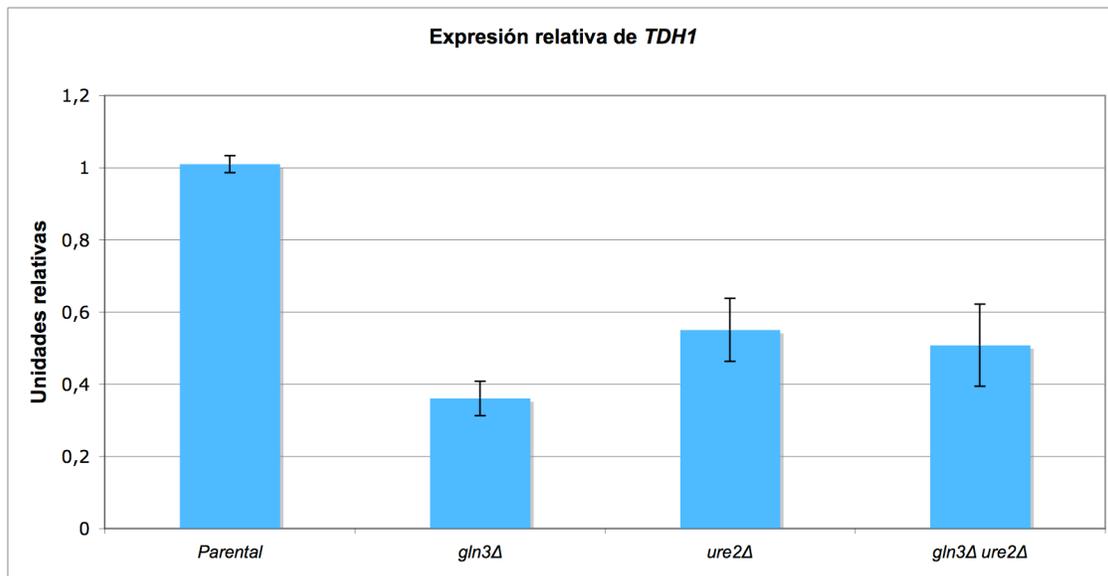


Figura 13. Expresión relativa del gen *TDH1* en prolina como fuente de nitrógeno. RT-PCR semicuantitativa de datos obtenidos de cuatro replicas experimentales (n= 4). Los datos de cada cepa fueron normalizados de acuerdo a los datos de la expresión del gen constitutivo *ACT1*. Los datos de expresión de *TDH1* para cada cepa mutante fueron divididos entre la expresión relativa de *TDH1* para la cepa parental, la cual fue considerada como la unidad.

Como se observa en la Figura 14 cuando las células crecen en prolina como fuente de nitrógeno, la expresión del gen *TDH2* en la cepa *gln3Δ* es aproximadamente un tercio menor que la observada en la cepa parental. Mientras que es ligeramente menor que la que presenta la cepa *ure2Δ*. Sin embargo, es mayor que la expresión en la cepa *gln3Δ ure2Δ*. Por otro lado, la expresión en la cepa *ure2Δ* es menor que la observada en la cepa parental y mayor que la que presenta la cepa *gln3Δ ure2Δ*. De nuevo puede observarse que no se trata de un gen NCR-sensible, pero sí dependiente aunque no totalmente de Gln3 para su expresión. Además, la disminución en la expresión de *TDH2* observada en la cepa *ure2Δ*, a diferencia de la expresión observada cuando la glutamina era usada como fuente de nitrógeno, sugiere que en prolina existe un represor que disminuye la expresión del gen *TDH2*.



Figura 14. Expresión relativa del gen *TDH2* en prolina como fuente de nitrógeno. RT-PCR semicuantitativa de datos obtenidos de cuatro replicas experimentales (n= 4). Los datos de cada cepa fueron normalizados de acuerdo a los datos de la expresión del gen constitutivo *ACT1*. Los datos de expresión de *TDH2* para cada cepa mutante fueron divididos entre la expresión relativa de *TDH2* para la cepa parental, la cual fue considerada como la unidad.

Cuando las células crecen en medio mínimo conteniendo prolina como fuente de nitrógeno la expresión del gen *TDH3* en la cepa *gln3Δ* es equivalente a la de la cepa parental y mayor que la observada en las cepas *ure2Δ* y *gln3Δ ure2Δ*. Además, la expresión de este gen en las cepas *ure2Δ* y *gln3Δ ure2Δ* es equivalente entre sí (Figura 15). Estos resultados son diferentes a los observados previamente para el gen *TDH3* en glutamina y sugieren que la proteína Gln3 no está involucrada en la regulación de este gen cuando la prolina es usada como fuente de nitrógeno. Sin embargo, la disminución de la expresión observada en las cepas *ure2Δ* y *gln3Δ ure2Δ* con respecto de la cepa parental sugiere también la existencia de un represor para *TDH3* que está retenido por Ure2 en el citoplasma.

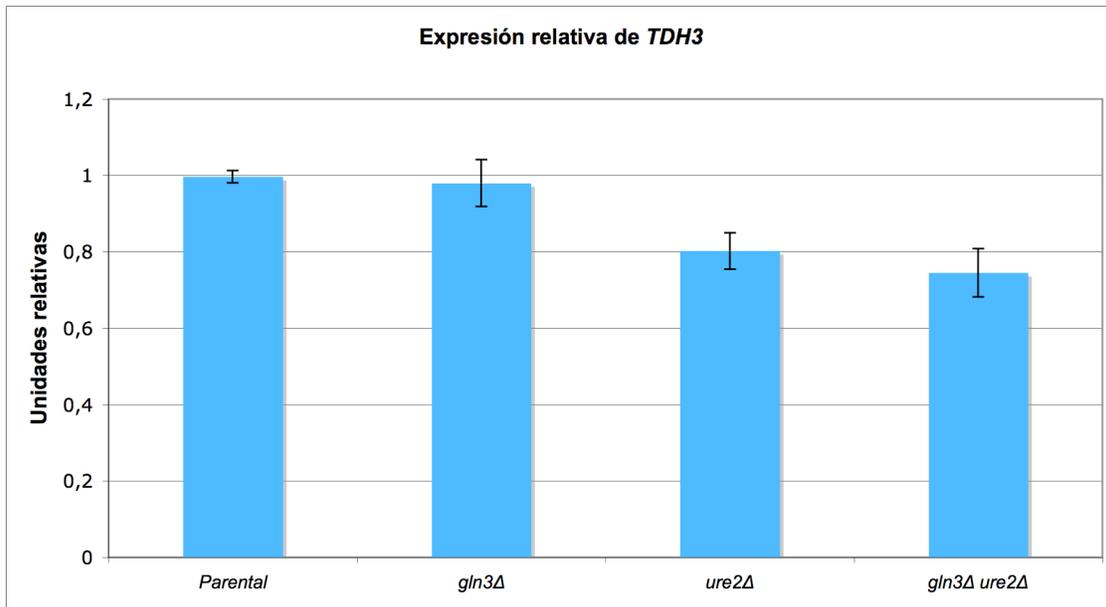


Figura 15. Expresión relativa del gen TDH3 en prolina como fuente de nitrógeno. RT-PCR semicuantitativa de datos obtenidos de cuatro replicas experimentales (n= 4). Los datos de cada cepa fueron normalizados de acuerdo a los datos de la expresión del gen constitutivo *ACT1*. Los datos de expresión de *TDH3* para cada cepa mutante fueron divididos entre la expresión relativa de *TDH3* para la cepa parental, la cual fue considerada como la unidad.

Con base en los datos obtenidos de los experimentos de RT-PCR, podemos afirmar que la proteína Gln3 se encuentra involucrada en la regulación de los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3* cuando la glutamina esta presente en el medio como única fuente de nitrógeno. Además, nuestros datos muestran que en presencia de glutamina existe un regulador negativo de los genes *TDH1* y *TDH3* que puede ser retenido en el citoplasma por Ure2.

Por otro lado, cuando la prolina es usada como fuente de nitrógeno, Gln3 esta involucrado en la regulación de los genes *TDH1* y *TDH2*. Además, encontramos evidencia que sugiere la existencia de un regulador negativo que bajo estas condiciones interviene en la regulación de los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3*.

Sabemos que la levadura *S. cerevisiae* utiliza buenas fuentes de nitrógeno en preferencia de malas fuentes. Esto lo hace por medio de la Represión Catabólica Nitrogenada (NCR), la cual limita la transcripción de genes encargados del transporte y catabolismo de malas fuentes de nitrógeno cuando buenas fuentes están disponibles en el medio [10]. Además, como se mencionó anteriormente la NCR está mediada por los activadores de la transcripción de tipo GATA; Gln3 y Gat1. Por otro lado, tenemos conocimiento de un estudio en el cual se determinó el perfil transcripcional de los genes activados por Gln3 y Gat1 [43]. En este estudio no se encuentran listados los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3*. Por lo tanto, nuestros datos son evidencia de que Gln3 no solo está involucrado en la regulación de genes que participan en el transporte y catabolismo de fuentes de nitrógeno, sino también en la regulación de genes que participan en otras rutas metabólicas como la del carbono.

Aún desconocemos el rol que posiblemente juegue Gat1 en la regulación de estos genes tanto en glutamina como en prolina; por lo tanto, es necesario analizar su expresión en las cepas *gat1Δ*, *gat1Δ ure2Δ*, *gat1Δ gln3Δ* y *gat1Δ gln3Δ ure2Δ*.

Cabe resaltar que a pesar de que ya se cuenta con las mutantes sencillas *tdh1Δ*, *tdh2Δ* y *tdh3Δ*, aún no se ha comenzado con la evaluación de la expresión en estas cepas debido a que son cepas BY4741 por otro lado, estamos trabajando en la generación de dichas mutantes en el fondo genético con el que se trabajó durante la elaboración de esta tesis.

2. Escrutinio de los genes provenientes de los experimentos de microarreglos

Se sabe que los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3* codifican para 3 isoenzimas de la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) que cataliza la reacción reversible de gliceraldehído-3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato (Figura 16), tanto en la glucólisis como en la gluconeogénesis. Además, se ha observado que en la levadura *S. cerevisiae* la GAPDH se encuentra tanto en citoplasma como en pared celular [44].

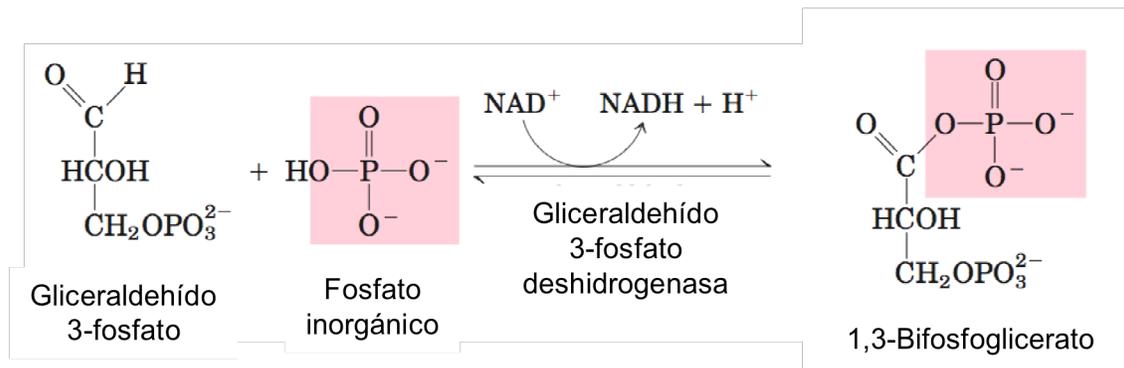


Figura 16. Interconversión de Gliceraldehído-3-fosfato a 1,3-Bifosfoglicerato. Modificado de [20].

La GAPDH esta ampliamente distribuida entre animales, plantas y algunos microorganismos como: las levaduras, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* y *Candida albicans* por mencionar algunos. Para determinar cuántos genes que codifican para la GAPDH poseen las especies de levadura con las que cuenta nuestro grupo (*S. cerevisiae*, *C. glabrata*, *K. lactis*, *S. kluyveri* y *D. hansenii*) (Tabla 2), se utilizó la base de datos de Génolevures [45]. Y como puede observarse en la Tabla 5, *S. cerevisiae* posee 3 genes que codifican para isoenzimas de la GAPDH mientras que *C. glabrata*, *K. lactis*, *S. kluyveri* y *D. hansenii* poseen 2, 3, 4, 1, respectivamente.

Dado que en la levadura *S. cerevisiae* estos genes codifican para enzimas involucradas en el metabolismo de carbono además, tenemos datos sobre su expresión en glutamina y prolina como fuentes de nitrógeno. Por otro lado, sabemos que la GAPDH se encuentra ampliamente distribuida entre las especies de levadura antes mencionadas y considerando que las levaduras difieren entre otras cosas, en el uso de

las fuentes de carbono disponibles en el medio. Caracterizamos el crecimiento de estas levaduras en diferentes fuentes de carbono. Para posteriormente analizar la expresión de los genes que codifican a la GAPDH en las especies de levadura antes mencionadas cuando crecen en diferentes fuentes de carbono y nitrógeno.

Tabla 5. Número de genes que codifican para proteínas GAPDH en distintas especies de levaduras.

Especie	Gen*	Número total de genes por especie
<i>S. cerevisiae</i>	SACE0G10230p	3
	SACE0J03740p	
	SACE0J05170p	
<i>C. glabrata</i>	CAGL0G09383p	2
	CAGL0J00451p	
<i>K. lactis</i>	KLLA0A11858p	3
	KLLA0F09141p	
	KLLA0F20988p	
<i>S. kluyveri</i>	SAKL0C10186p	4
	SAKL0G14102p	
	SAKL0G17204p	
	SAKL0H24926p	
<i>D. hansenii</i>	DEHA2F04796p	1

Se muestra el número de genes por especie que codifican proteínas GAPDH. Información obtenida de la base de datos Génolevures [45] (<http://www.genolevures.org/index.html>),

*Indica la nomenclatura sistemática para los elementos cromosomales ver sitio web (<http://www.genolevures.org/nomenclature.html>).

Se determinó el crecimiento de las levaduras *S. cerevisiae*, *C. glabrata*, *K. lactis*, *S. kluyveri* y *D. hansenii*, en medios sólidos y líquidos. La metodología experimental y la preparación de los medios están descritas en Materiales y Métodos. Los datos en crudo de los experimentos en medios sólidos se encuentran disponibles en la sección de Anexos 1-3.

En la Figura 17 panel A, se encuentran los resultados obtenidos de los experimentos de goteos cuando las células fueron crecidas en medios sólidos nutritivos con diferentes fuentes de carbono. A las 48 h la levadura *S. cerevisiae* cuando se encuentra en medios que contienen glucosa, galactosa, glicerol o sacarosa como fuentes de carbono llega hasta la cuarta dilución. Sin embargo, en etanol solo crece

hasta la tercera dilución. Por otro lado, la levadura *C. glabrata* CGM1 en presencia de glucosa crece hasta la quinta dilución. Mientras que cuando crece en medios que contienen etanol, galactosa, glicerol o sacarosa llega hasta la cuarta dilución. Además, las levaduras *K. lactis* y *S. kluyveri* a las 48 h de haber sido goteadas en medios nutritivos que poseen las fuentes de carbono antes mencionadas crecen hasta la cuarta dilución. Sin embargo, la levadura *D. hansenii* a las 48 horas de haber sido goteada en medio que contiene sacarosa como fuente de carbono crece hasta la cuarta dilución. Mientras que cuando glucosa, etanol, galactosa o glicerol están disponibles en el medio llega hasta la tercera dilución. Sabemos que el medio nutritivo es un medio en el cual las levaduras cuentan con los nutrientes necesarios para un óptimo desarrollo. Es por eso que las levaduras *S. cerevisiae*, *C. glabrata*, *K. lactis* y *S. kluyveri* muestran buen crecimiento a las 48 h de haber sido goteadas sin importar la fuente de carbono provista. Por otro lado, se sabe que la levadura *D. hansenii* es una especie halotolerante, que prefiere crecer a un pH cercano a 7 y hasta 0.5 M de NaCl [46]. Creemos que la dificultad de esta levadura para crecer en nuestros medios es debido a que contienen cantidades traza de NaCl sin embargo, es necesario evaluar el crecimiento de esta levadura pero con la concentración de NaCl antes mencionada.

Una vez que conocimos el crecimiento de estas levaduras en medios sólidos nutritivos se continuó con el análisis en medios sólidos mínimos con diferentes fuentes de carbono (Figura 17 paneles B y C). Se encontró que la levadura *S. cerevisiae* a las 72 h de haber sido goteada en medios que contienen glucosa o sacarosa como fuentes de carbono crece hasta la quinta dilución. Mientras que cuando el medio contiene glicerol llega hasta la cuarta dilución. Además, en medios que contienen etanol o galactosa crece hasta la segunda dilución (Figura 17 panel C). Se sabe que *S. cerevisiae* posee 17 genes que codifican para transportadores de la glucosa (de *HXT1* a *HXT17*) [47,48]. Además, de 8 genes que codifican para la enzima invertasa (de *SUC1* a *SUC8*) [49] encargada de la hidrólisis del disacárido sacarosa en sus monómeros fructosa y glucosa. Es por eso que esta levadura crece con facilidad en medios que contienen glucosa o el disacárido sacarosa como fuentes de carbono. Por

otro lado, se sabe que la importación de glicerol está dada por difusión pasiva [18] y recientemente se describió la proteína de membrana Stl1 de tipo symporter glicerol:H⁺ [50]. Además, la expresión del gen *STL1* es inactivada por la glucosa [50]. Por lo tanto aunque esta levadura posea solo un transportador de glicerol la ausencia de su represor permite el crecimiento que observamos. Sabemos que la levadura *S. cerevisiae* es capaz de crecer cuando el etanol es la única fuente de carbono. Además, existen 5 genes que codifican para alcohol deshidrogenasas (de *ADH1* a *ADH5*) todos involucrados en el metabolismo del etanol. Cuatro de estos producen etanol a partir de acetaldehído (*ADH1*, *ADH3*, *ADH4* y *ADH5*). Mientras que *ADH2* cataliza la reacción inversa es decir produce acetaldehído a partir de etanol y es reprimido por la glucosa [18]. Sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos de internalización del etanol extracelular en la levadura *S. cerevisiae*. Por otro lado, la sensibilidad que encontramos hacia esta fuente de carbono puede deberse a que nuestra cepa tiene una mutación en el gen *HAP1*, por lo que se encuentra modificada la expresión de múltiples genes de la vía respiratoria. También se sabe que cuando la glucosa está presente en el medio se activa la proteína Mig1, que es la encargada de reprimir la transcripción del gen *GAL2*, el cual es el transportador de galactosa. Sin embargo, cuando la galactosa está presente en la célula esta se une a Gal3 y secuestra a Gal80, lo que en una célula normal resulta en la transcripción de los genes *GAL1*, *GAL10* y *GAL7*. Desafortunadamente nuestra cepa de *S. cerevisiae* es mutante en el gen *GAL2* por lo tanto es incapaz de crecer de forma anaeróbica en medios que contienen galactosa como fuente de carbono. Es por eso que observamos poco crecimiento en este medio. Es decir, esta levadura está incorporando y metabolizando por respiración esta fuente de carbono.

Las cepas de la levadura *C. glabrata* *CGM1* y *CGM2* a las 48 horas de haber sido goteadas crecen hasta la quinta dilución en los medios mínimos que contienen glucosa y sacarosa como fuente de carbono. Mientras que en los medios que contienen etanol, galactosa o glicerol no hay crecimiento ni a las 72 h de haber sido goteadas (Figura 17 paneles B y C). Se sabe que la levadura *C. glabrata* posee 11

transportadores de hexosas por lo cual es capaz de crecer en medios que contienen glucosa como fuente de carbono [48]. Sin embargo, no posee un gen ortólogo a *SUC2* de *S. cerevisiae* [51]. Además, se sabe que en la levadura patógena *C. albicans*, la sacarosa es transportada e hidrolizada en el interior de la célula por una proteína de tipo symporter sucrose:H⁺, esta proteína está codificada por el gen *CaMAL2* [23], dicho gen tampoco se encuentra presente en el genoma de *C. glabrata*. Debido a esto, esta levadura es incapaz de crecer cuando la sacarosa es la única fuente de carbono disponible en el medio. En contraste, nuestros datos sugieren que las cepas de *C. glabrata* *CGM1* y *CGM2* tienen una proteína aún no caracterizada que le permite a esta levadura crecer cuando la sacarosa es la única fuente de carbono disponible en el medio. Además, *C. glabrata* no posee genes ortólogos a *ADH2* y *STL1* de *S. cerevisiae* [48,51]. Esto es consistente con el hecho de que estas levaduras no crezcan cuando el etanol o el glicerol son usados como fuentes de carbono en medios mínimos. Por otro lado, esta levadura carece de gen ortólogo al transportador de galactosa de *S. cerevisiae* *Gal2* además, de todas las enzimas involucradas en el metabolismo de la galactosa (*Gal3*, *Gal4*, *Gal80*, *Gal1*, *Gal7* y *Gal10*) [51,52]. Por lo tanto nuestros datos son consistentes con los revisados en la literatura. Ya que observamos que esta levadura es incapaz de crecer en galactosa como fuente de carbono.

También observamos que la levadura *K. lactis* a las 48 h de haber sido goteada en medio que contiene glucosa como fuente de carbono crece hasta la quinta dilución mientras que en los medios que poseen etanol, galactosa, glicerol o sacarosa llega hasta cuarta dilución (Figura 17 panel B). Se sabe que en esta levadura la importación de glucosa hacia el interior de la célula está dada por difusión facilitada. Además, se han descrito dos transportadores de glucosa codificados por los genes *RAG1* y *HGT1* [18,48]. De acuerdo con lo revisado en la literatura, la difusión facilitada en sinergia con estos transportadores son capaces de proveer a la célula de la glucosa necesaria para su desarrollo. Por otro lado, sabemos que esta levadura posee cuatro genes que codifican para alcohol deshidrogenasas (de *KIADH1* a *KIADH4*). De entre estos genes solo *KIADH4* es inducido por el etanol [53]. Creemos que la proteína *KIadh4*, es

suficiente para la interconversión del etanol al acetaldehído necesario para el crecimiento de las células cuando el etanol es usado como fuente de carbono. En esta levadura la galactosa es transportada por la misma proteína que transporta la lactosa ya que una mutación en el gen que codifica para el transportador de lactosa, *LAC12*, elimina el crecimiento de esta levadura tanto en lactosa como en galactosa [54]. Además, esta levadura posee todas las proteínas encargadas del metabolismo de la galactosa (*Gal3*, *Gal4*, *Gal80*, *Gal1*, *Gal7* y *Gal10*) [51,52]. Con base en esto confirmamos que esta levadura es capaz de transportar y metabolizar la galactosa. Por otro lado, sabemos que el glicerol puede ser utilizado como fuente de carbono por esta levadura. Además, en el año 2007 el grupo de Palma et al., [48], detectó por estudios filogenéticos la existencia en *K. lactis* de un gen ortólogo a *STL1* de *S. cerevisiae*. Nuestros datos muestran que la levadura *K. lactis* es capaz de crecer en medio que contiene glicerol como fuente de carbono e inferimos que está proteína está mediando el paso de el glicerol hacia el interior de la célula. Se sabe que en *K. lactis* existe una invertasa (*KIINV1*) que es ortóloga a *SUC2* de *S. cerevisiae* [18,51]. Por lo tanto esta levadura es capaz de hidrolizar la sacarosa en sus monómeros, glucosa y fructosa, y así crecer cuando este disacárido es la fuente de carbono disponible en el medio.

La levadura *S. kluyveri* a las 48 h de haber sido goteada en los medios mínimos que contienen galactosa o sacarosa como fuentes de carbono crece hasta la cuarta dilución. Mientras que en los medios que contienen glucosa, etanol o glicerol llega hasta la tercera dilución. En la actualidad muchos de los aspectos fisiológicos de esta levadura aún son desconocidos. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede en *S. cerevisiae*, esta levadura no está bajo represión por la glucosa; es decir, cuando el medio contiene altas concentraciones de glucosa esta levadura metaboliza por respiración principalmente y produce poco etanol [55]. Sin embargo, con ayuda de la base de datos de Byrne et al., [51] determinamos los genes ortólogos a *S. cerevisiae* involucrados en el metabolismo de las fuentes de carbono. Encontramos que esta levadura posee 3 genes ortólogos a transportadores de hexosas *HXT* y 1 gen ortólogo a *SUC2*. además, no posee un gen ortólogo a *GAL2* pero si todos los genes involucrados

en la conversión de este monosacárido a glucosa (*GAL1*, *GAL3*, *GAL4*, *GAL7*, *GAL10* y *GAL80*). En cuanto al gen involucrado en la interconversión de etanol a gliceraldehído esta levadura no posee gen ortólogo a *ADH2* pero sí los genes involucrados en la reacción reversa es decir, los genes *ADH1*, *ADH3*, *ADH4* y *ADH5*. Como puede observarse esta levadura posee genes ortólogos para casi todos los involucrados en el metabolismo de las fuentes de carbono usadas en este estudio por lo tanto es de esperarse que puede crecer en ellas. Por otro lado, las diferencias que observamos en nuestros experimentos en medios sólidos mínimos con respecto de los observados en medios nutritivos pueden deberse a que esta levadura necesite un tiempo más largo de incubación cuando crece en algunas fuentes de carbono.

La levadura *D. hansenii* a las 48 h de haber sido goteada en medio que contiene glucosa como fuente de carbono crece hasta la cuarta dilución mientras que en los medios que poseen galactosa, glicerol o sacarosa llega hasta la segunda dilución; sin embargo, no se observa crecimiento en los medios que contienen etanol (Figura 17 panel B). Sabemos, por estudios previos que esta levadura posee 4 transportadores de hexosas, 3 transportadores de alta afinidad para glucosa y 8 transportadores de tipo symporter glycerol:H⁺ [48]. Además, es capaz de metabolizar la galactosa mediante un sistema que involucra un gen ortólogo a *GAL4* de *S. cerevisiae* [52]. Dado que en esta levadura es poco lo que se sabe acerca del metabolismo de sacarosa y etanol, buscamos en la base de datos de Genolevures genes ortólogos a *SUC2* y *ADH2*. Encontramos que posee un gen ortólogo a *SUC2* y dos genes *ADH2*. Sin embargo, nuestros datos muestran que esta levadura crece poco o nada en las fuentes de carbono que probamos con excepción de cuando es usada la glucosa como fuente de carbono. Esto nos sugiere que la dificultad de esta levadura par crecer en nuestros medios sólidos se debe a que no contienen NaCl sin embargo, como se mencionó anteriormente es necesario hacer los experimentos en medios sólidos adicionados con NaCl. Otra alternativa es que tal vez necesite otro nutriente ya que el medio que utilizamos esta optimizado para *S. cerevisiae*.

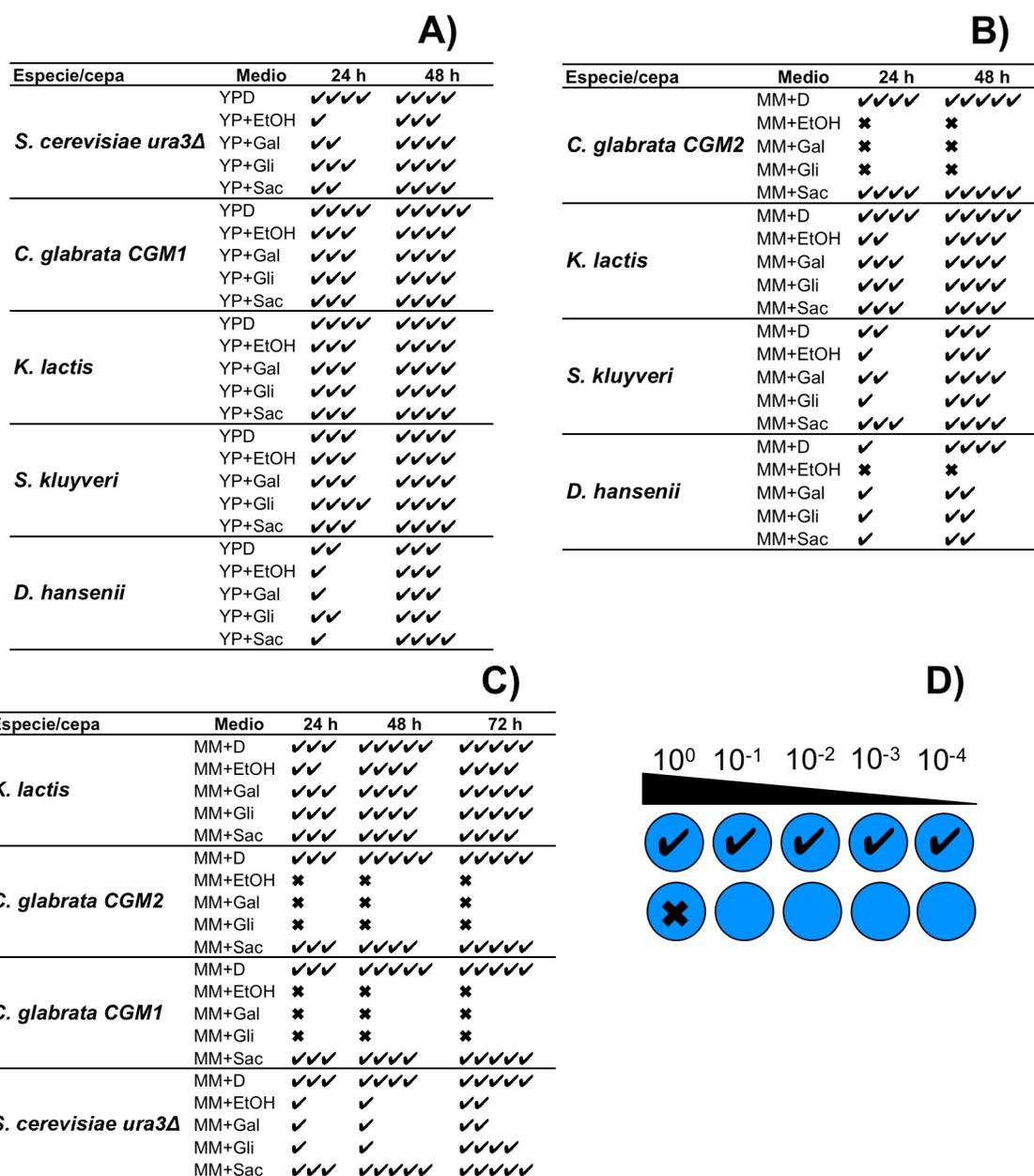


Figura 17. Caracterización del crecimiento de las distintas especies y/o cepas de levaduras en medios sólidos con diferentes fuentes de carbono. Los medios fueron preparados de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. A) Crecimiento en medios nutritivos. B) Crecimiento en medios mínimos sin uracilo. C) Crecimiento en medio mínimos con uracilo para complementar las auxotrofías de las cepas que lo necesitan (ver listado de cepas), se utilizó como control de crecimiento especies de levadura silvestres. D) Diluciones logarítmicas de cultivos celulares fueron goteadas en cajas con medios sólidos. Se usaron medios nutritivos o mínimos que contaban con diferentes fuentes de carbono, se dejaron a 28 °C y se fotografiaron a 24, 48 y 72 h después de haber sido goteadas según el caso (Materiales y Métodos). El símbolo ✓ significa que es una dilución que puede observarse en el medio al momento de ser tomada la fotografía mientras que el símbolo ✗ significa que solo hay vestigio de la gota depositada pero no se observa crecimiento. Las fotografías directas de los medios se encuentran en la sección de Anexos 1-3.

Para caracterizar el crecimiento de las levaduras en medios líquidos nutritivos y mínimos con las diferentes fuentes de carbono antes mencionadas se llevaron a cabo curvas de crecimiento y fue calculado el tiempo de duplicación. La metodología experimental y la preparación de los medios están descritas en Materiales y Métodos. Cabe señalar que se adicionó NaCl a los medios en los que se caracterizó el crecimiento de la levadura *D. hansenii*. Los datos en crudo de las curvas de crecimiento realizadas se encuentran disponibles en la sección de Anexos 4-15.

En la Figura 18 paneles A y B, están graficados los tiempos de duplicación de las levaduras cuando son crecidas en medios líquidos nutritivos y mínimos con diferentes fuentes de carbono. Puede observarse en el panel A que la levadura *S. cerevisiae* cuando es crecida en medios nutritivos que contienen glucosa o sacarosa como fuentes de carbono tiene tiempos de duplicación similares de 1.4 y de 1.7 h, respectivamente. Mientras que en galactosa es de 5.4 h aproximadamente. Además, en etanol el tiempo de duplicación es aproximadamente 6 veces mayor que el calculado para glucosa o sacarosa. Sin embargo, esta levadura no crece cuando el medio posee glicerol como fuente de carbono. Por otro lado, en el panel B se muestran los tiempos de duplicación calculados cuando las levaduras son crecidas en medios líquidos mínimos con diferentes fuentes de carbono. Puede observarse que cuando esta levadura es crecida en medios mínimos que contienen glucosa o sacarosa como fuentes de carbono tiene un tiempo de duplicación de aproximadamente 1.6 y 2.2 h respectivamente. Sin embargo, en el medio que contiene etanol como fuente de carbono el tiempo de duplicación es aproximadamente 5 veces mayor que el calculado para glucosa. Además, no fue posible determinar el tiempo de duplicación en los medios mínimos que contienen galactosa o glicerol como fuentes de carbono. Debido a que como se explicó anteriormente esta cepa es mutante en el gen *GAL2*. Sin embargo, desconocemos la causa de la incapacidad de esta levadura para crecer en medio mínimo que contiene glicerol como fuente de carbono. Cuando se comparan los tiempos de duplicación obtenidos de los medios nutritivos y mínimos puede observarse

que estos aumentan cuando la fuente de carbono es glucosa o sacarosa. Sin embargo, disminuye cuando se usa el etanol como fuente de carbono. Además, observamos que a diferencia de lo que sucede en el medio nutritivo esta levadura no crece cuando es usada la galactosa en medio mínimo. Mientras que la ausencia de crecimiento observada en medio nutritivo con glicerol se mantiene cuando es crecida en medio mínimo con esta fuente de carbono. Lo observado en glucosa y sacarosa es lo que esperamos pues cuando estas células se encuentran en medio mínimo no tienen los nutrientes que existen en el medio nutritivo por lo tanto deben sintetizarlos y esto hace que su ciclo celular sea más lento. Por otro lado, creemos que la disminución observada en etanol se debe a que estas células se encuentran en un medio en el cual no existe represión por glucosa o por alguna fuente de carbono que esté presente en el medio nutritivo por lo tanto, comienzan a respirar el etanol con mayor rapidez. Además, con la premisa de que esta cepa de *S. cerevisiae* es mutante en el gen *GAL2* no es de sorprender su incapacidad para crecer en medio mínimo que contiene galactosa como fuente de carbono este resultado confirma que en el medio nutritivo se encuentra alguna fuente de carbono que le permitió a esta levadura crecer. Sin embargo, como se mencionó anteriormente no sabemos la causa de que esta levadura no pueda crecer en medios líquidos cuando el glicerol es empleado como fuente de carbono.

La levadura *C. glabrata CGM1* cuando es crecida en medios nutritivos con glucosa o glicerol como fuentes de carbono tiene un tiempo de duplicación de 1 h aproximadamente. Mientras que cuando el medio contiene galactosa o sacarosa tiene un tiempo de duplicación de aproximadamente 2 h. Por otro lado, en etanol el tiempo de duplicación es aproximadamente 6 veces mayor que el calculado para glucosa. De igual manera, cuando la levadura *C. glabrata CGM2* es crecida en medio nutritivo con glucosa como fuente de carbono tiene un tiempo de duplicación cercano a 1 h. Mientras que en galactosa y sacarosa es de 2 h. Además, en glicerol es de 2.5 h. Sin embargo, en etanol es tres veces mayor que el calculado para glucosa (Figura 18 panel A). Por otro lado, cuando las cepas de la levadura de *C. glabrata CGM1* y *CGM2* se encuentran en medios mínimos que contienen glucosa tienen tiempos de duplicación similares de

1.6 y 1.4 h respectivamente. Además, en sacarosa tienen tiempos de duplicación de 1.6 y 1.7 respectivamente. Sin embargo, no fue posible determinar su tiempo de duplicación en medios mínimos que poseen etanol, galactosa o glicerol como fuentes de carbono (Figura 18 panel B). Estos resultados son consistentes con los observados en medios sólidos sin embargo, solo tenemos conocimiento de que esta levadura es incapaz de desarrollarse en medio que contiene galactosa como fuente de carbono. Además, nuestros resultados muestran que ambas cepas de *C. glabrata* aumentan su tiempo de duplicación en medio mínimo cuando es usada la glucosa como fuente de carbono con respecto del observado medio nutritivo. Por otro lado, llama la atención que el tiempo de duplicación en sacarosa de ambas cepas disminuye en el medio mínimo con respecto del nutritivo. Sin embargo, ambas cepas son incapaces de crecer en medios mínimos que contienen etanol, galactosa o glicerol como fuente de carbono. Lo observado en glucosa como fuente de carbono al igual que en *S. cerevisiae* es lo que se esperaba pues en el medio mínimo esta levadura debe sintetizar todos los nutrientes necesarios para asegurar su ciclo celular y esto hace más lento su ciclo celular. Sin embargo, es de llamar la atención el hecho de observar crecimiento de esta levadura en los medios que contienen sacarosa ya que como se discutió anteriormente esta levadura debería ser incapaz de crecer en medios que contienen este disacárido. Aunque por otro lado, esto es consistente con nuestros experimentos en medios sólidos donde observamos crecimiento cuando este disacárido es usado como fuente de carbono. Por otro lado, observamos que no hay crecimiento de esta levadura en medios mínimos con glicerol o etanol. Además, como se discutió previamente esta levadura es incapaz de metabolizar la galactosa. Estos datos son consistentes con los observados en los experimentos en medios sólidos y sostienen el planteamiento antes propuesto de que en los medios nutritivos existe una fuente de carbono que le permite a estas células crecer.

Cuando la levadura *K. lactis* es crecida en medios nutritivos que contienen glucosa, galactosa o sacarosa como fuentes de carbono tiene un tiempo de duplicación de 1.5 h aproximadamente. Mientras que en glicerol es de aproximadamente 2.2 h. Por otro lado, en etanol el tiempo de duplicación es el doble del calculado para glucosa (Figura 18 panel A). De forma consistente, cuando esta levadura es crecida en medios mínimos que contienen glucosa o sacarosa tiene un tiempo de duplicación de 1.5 h aproximadamente. Mientras que en galactosa el tiempo de duplicación es de 1.9 h. Por otro lado, cuando el medio mínimo contiene etanol el tiempo de duplicación es de 4.3 h. Sin embargo, cuando el medio mínimo contiene glicerol el tiempo de duplicación es aproximadamente 7 veces mayor que el observado para glucosa (Figura 18 panel B). Nuestros datos indican que esta levadura mantiene su tiempo de duplicación cuando crece en medios mínimos o nutritivos; con glucosa o sacarosa. Además, como se esperaba el tiempo de duplicación fue mayor en los medios mínimos que en los nutritivos, cuando etanol, galactosa o glicerol fueron usados como fuentes de carbono. Sin embargo, puede observarse que los medios mínimos con etanol o glicerol el tiempo de duplicación es significativamente mayor que en los medios nutritivos.

La levadura *S. kluyveri* cuando es crecida en medios nutritivos que contienen glucosa, galactosa o sacarosa como fuentes de carbono tiene un tiempo de duplicación de 1 h aproximadamente. Mientras que en etanol o glicerol es de 1.8 h (Figura 18 panel A). Por otro lado, cuando es crecida en medios mínimos que contienen glucosa o sacarosa tiene un tiempo de duplicación de 1.5 h. Además, cuando es usada la galactosa es de aproximadamente 2 h. Sin embargo, cuando el medio mínimo contiene etanol el tiempo de duplicación es 7 veces mayor que el calculado para glucosa. Por otro lado, debido a que no se observó crecimiento de esta levadura en el medio mínimo con glicerol como fuente de carbono; no fue posible determinar su tiempo de duplicación en dicho medio (Figura 18 panel B). Nuestros resultados muestran que cuando esta levadura se encuentra en medios mínimos con las diferentes fuentes de carbono probadas su tiempo de duplicación aumenta. Además, no crece en medio mínimo cuando la fuente de carbono es glicerol. Esto es contradictorio con lo observado

en medio sólido y desafortunadamente la información disponible sobre esta levadura es limitada.

Cuando la levadura *D. hansenii* es crecida en medio nutritivo con glucosa como fuente de carbono tiene un tiempo de duplicación de 2 h. Mientras que en sacarosa es de duplicación de 2.8 h. Por otro lado, en glicerol tiene un tiempo de duplicación de 3.9 h. Además, cuando es crecida en galactosa como fuente de carbono tiene un tiempo de duplicación de 5.3 h. Sin embargo, en etanol es 4 veces mayor que el calculado para glucosa (Figura 18 panel A). Por otro lado, cuando es crecida en medio mínimo con sacarosa como fuente de carbono tiene un tiempo de duplicación de 5.6. Mientras que cuando el medio mínimo contiene etanol el tiempo de duplicación es de 7 h. Por otro lado, en glicerol tiene tiempo de duplicación de aproximadamente 10 h. Además, cuando los medios contienen glucosa o galactosa como fuentes de carbono esta levadura tiene tiempos de duplicación similares de 11 h (Figura 18 panel B). Estos resultados son consistentes con los que se esperaba cuando esta levadura crece en medios mínimos es decir los tiempos de duplicación aumentan en todas las fuentes de carbono probadas. Además, a diferencia de lo que sucede en los medios sólidos encontramos que esta levadura es capaz de crecer en etanol. Sin embargo, creemos que se debe a que los medios sólidos no contienen NaCl.

En conjunto nuestros datos muestran que existe clara diferencia entre lo que se observa en medios sólidos y medios líquidos. Podemos resumir que todas las levaduras probadas son capaces de metabolizar la glucosa y la sacarosa.

Existe heterogeneidad en el uso de la galactosa además, de entre las levaduras estudiadas solo *C. glabrata* está reportada como incapaz de utilizar esta fuente de carbono.

Los medios que se utilizaron están optimizados para *S. cerevisiae* por lo tanto, es necesario optimizar las condiciones de crecimiento de cada especie de levadura.

Dado que nos encontramos en un laboratorio donde pretendemos hacer genómica comparativa estos resultados nos permitieron comenzar a estandarizar condiciones para el manejo de otras especies de levaduras en nuestro grupo de trabajo.

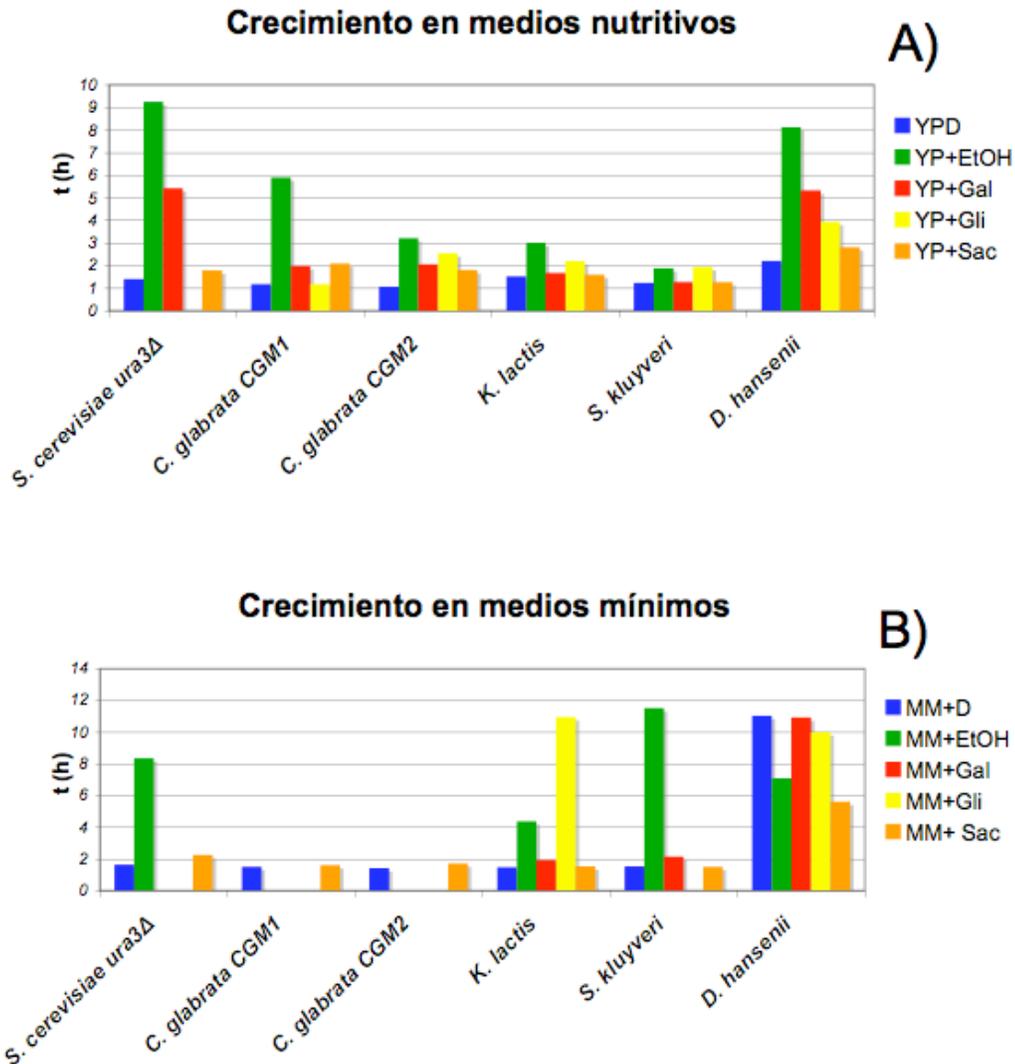


Figura 18. Caracterización del crecimiento de las especies y/o cepas de levaduras en medios líquidos. Caracterización del crecimiento en medios líquidos con diferentes fuentes de carbono los medios fueron preparados de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Los medios mínimos fueron suplementados con uracilo cuando fue necesario complementar las auxotrofías de las levaduras que lo requerían (Tabla 2). Los medios en los que se caracterizó el crecimiento de *D. hanseni* fueron suplementados con NaCl 0.5 M de acuerdo a lo revisado en [46]. Las especies y/o cepas en las que no se muestra el tiempo de duplicación es debido a que no fue posible determinarlo. Las curvas de crecimiento y los datos en crudo están contenidos en la sección de Anexos 4-15 (n= 2). A) Crecimiento en medios líquidos nutritivos. B) Crecimiento en medios líquidos mínimos.

VI. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se realizó el escrutinio de una lista de genes provenientes de experimentos de microarreglos descritos previamente se decidió iniciar con el estudio de genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3*. Estos genes están relacionados con la glucólisis y gluconeogénesis. Encontramos que todos poseen al menos una caja de tipo GATA (5'-GATWA-3') en la cual creemos se puede estar uniendo Gln3 y así estar involucrado en la regulación de estos genes.

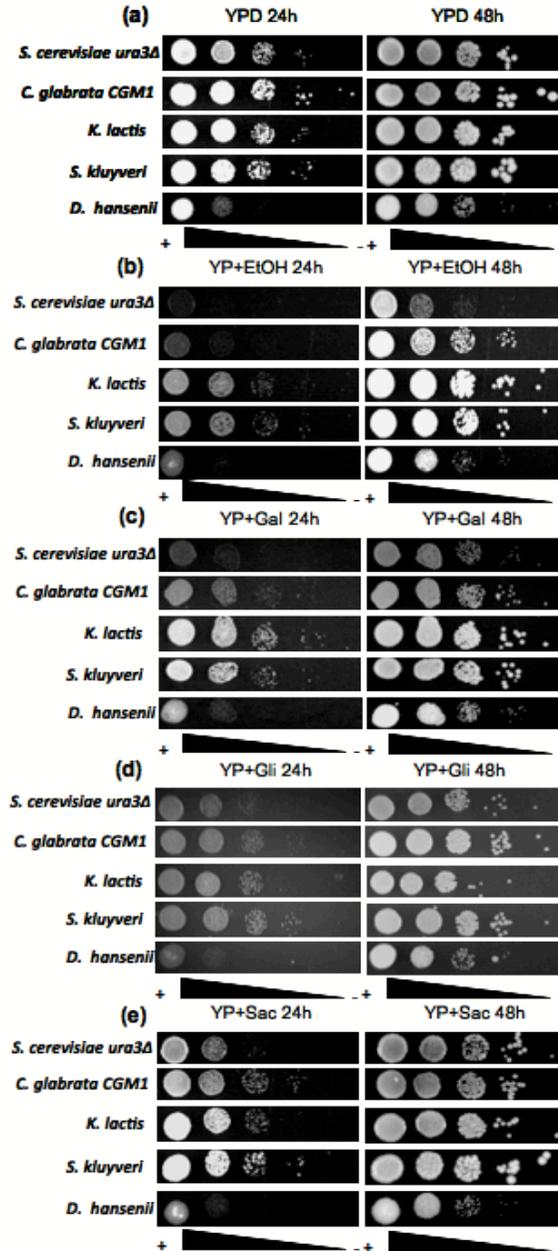
Se confirmó por RT-PCR, que el factor transcripcional Gln3 se encuentra involucrado en la regulación de los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3*. Además, nuestros datos sugieren la existencia de un regulador negativo que en presencia de glutamina puede haber un regulador negativo de los genes *TDH1* y *TDH3* que puede ser retenido en el citoplasma por Ure2. Por otro lado, cuando la prolina es usada como fuente de nitrógeno, nuestros datos sugieren la existencia de un regulador negativo que bajo estas condiciones interviene en la regulación de los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3*.

VII. PERSPECTIVAS

- Realizar por PCR en tiempo real la evaluación de la transcripción de los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3* en la cepa parental y en las mutantes *gln3Δ*, *ure2Δ*, *gln3Δ ure2Δ*.
- Generar la cepa mutante *gat1Δ*, con la finalidad de estudiar la contribución de Gat1p en la regulación de los genes *TDH1-3*.
- Investigar la presencia de Gln3 en las cajas GATA (5'-GATWA-3') encontradas en los promotores de los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3*. Mediante experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) utilizando anticuerpos dirigidos contra el epítipo Myc¹³ fusionado a la proteína Gln3.

• VIII. ANEXOS

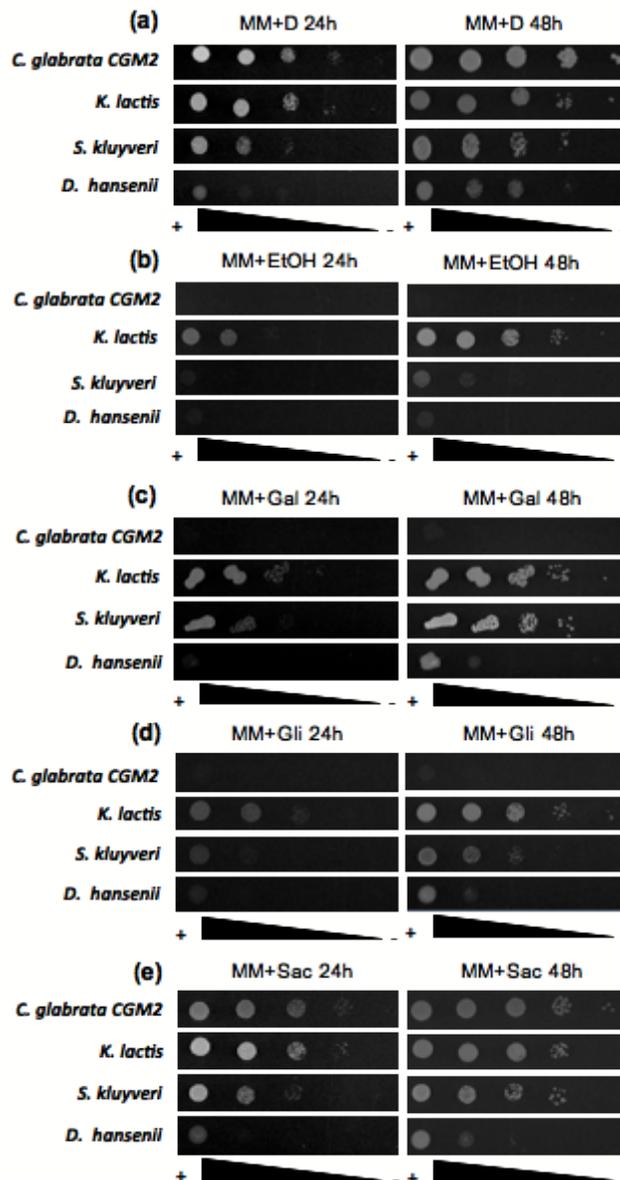
Anexo 1



Anexo 1. Crecimiento de las distintas especies de levadura analizadas en medios nutritivos con diferentes fuentes de carbono. Se muestra el desarrollo a 24 h y 48 h, de las distintas especies de levaduras analizadas. Se observa que en YPD a las 48 h de haber sido goteadas todas las especies con excepción de *D. hansenii* crecen hasta la cuarta dilución. En YP+EtOH a las 24 h solo las especies *K. lactis* y *S. kluyveri* tienen crecimiento hasta la tercera dilución, pero a las 48 h, *C. glabrata CGM1*, *K. lactis*, y *S. kluyveri* tienen crecimiento hasta la cuarta dilución, mientras que *S. cerevisiae ura3Δ* y *D. hansenii* no logran crecer más allá de la tercera dilución. En YP+Gal el crecimiento es similar a las 24 h y a las 48 h al observado para YP+EtOH. En YP+Gli el crecimiento a las 24 h de las especies: *S. cerevisiae*

ura3Δ, *C. glabrata* CGM1, *K. lactis* y *S. kluyveri* es similar llegando hasta la tercera dilución pero la especie *D. hansenii* no logra crecer mas allá de la primera dilución. En YP+Sac el crecimiento a las 24 h y a las 48 h es similar a el observado en YPD. Los medios utilizados contenían extracto de levadura (Y) 1% (m/v), peptona de caseína (P) 2% (m/v) y se varió la fuente de carbono quedando como sigue: (a) dextrosa (D) 2% (m/v); (b) etanol (EtOH) al 2% (v/v); (c) galactosa (Gal) 2% (m/v); (d) glicerol (Gli) 2% (v/v); y (e) sacarosa (Sac) 2% (m/v).

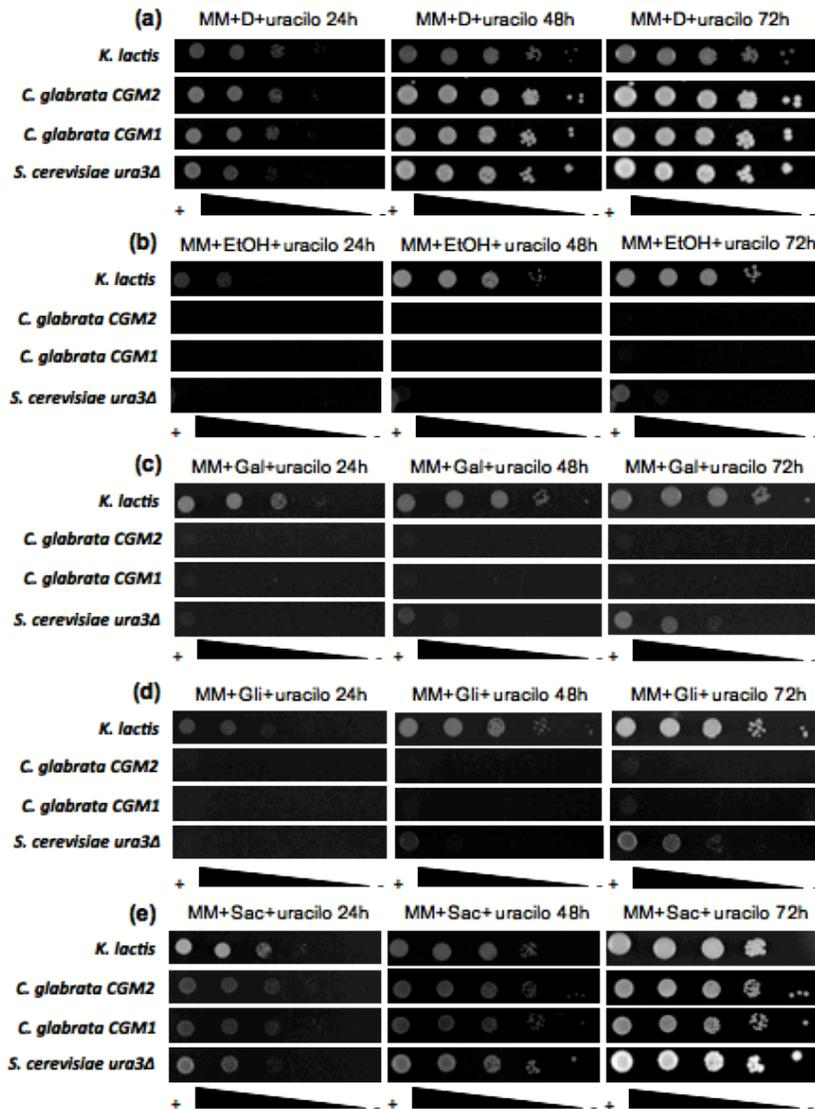
Anexo 2



Anexo 2. Crecimiento de las distintas especies de levadura analizadas en medio mínimo con diferentes fuentes de carbono. Se muestra el desarrollo a 24 h y 48 h, de las especies de levaduras que no poseen auxotrofías. En MM+D a las 24 h de haber sido goteadas *C. glabrata* CGM2 y *K. lactis* tienen crecimiento hasta la tercera dilución mientras que *S. kluyveri* y *D. hansenii* solo crecen hasta la segunda y primera dilución, respectivamente, por otro lado a las 48 h *C. glabrata* CGM2 crece hasta la quinta dilución y *K. lactis* hasta la cuarta dilución. *S. kluyveri* y *D. hansenii*, no logran crecer mas allá de la tercera dilución. En MM+EtOH a las 24 h solo la especie *K. lactis* tiene crecimiento llegando hasta la segunda dilución y a las 48 h ninguna de las especies probadas muestra crecimiento solo *K. lactis* que crece hasta la tercera dilución. En MM+Gal solo las especies *k. lactis* y *S. kluyveri* tienen crecimiento tanto a 24 h como a 48 h llegando hasta la cuarta dilución a las 48 h de haber sido goteadas. En MM+Gli a las 24 h de haber sido goteadas solo se observa crecimiento en la especie *K. lactis* y a las 48 h se observa crecimiento en las especies *K. lactis* y *S. kluyveri* llegando hasta la cuarta y segunda dilución

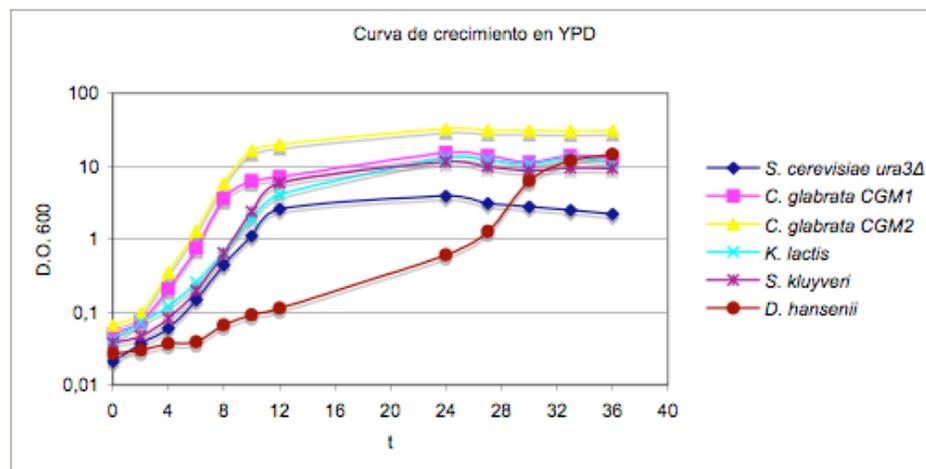
respectivamente. El crecimiento en MM+Sac es similar al observado en MM+D para todas las especies probadas. Los medios utilizados contenían sales, elementos traza y vitaminas según la fórmula de Difco. Como fuente de nitrógeno se adicionó sulfato de amonio 0.2% (m/v) y se varió la fuente de carbono quedando como sigue: (a) dextrosa (D) 2% (m/v); (b) etanol (EtOH) al 2% (v/v); (c) galactosa (Gal) 2% (m/v); (d) glicerol (Gli) 2% (v/v); y (e) sacarosa (Sac) 2% (m/v).

Anexo 3



Anexo 3. Crecimiento de las distintas especies de levadura en medio mínimo con diferentes fuentes de carbono. Se muestra el desarrollo a 24 h, 48 h y 72 h, de las especies de levadura que poseen auxotrofías, se incluyen las especies *K. lactis* y *C. glabrata CGM2* como control. En MM+D a las 24 h de haber sido goteadas todas las especies goteadas crecen hasta la tercera dilución, a las 48 h y 72 h todas especies probadas crecen hasta la quinta dilución. En MM+EtOH solo *K. lactis* tiene crecimiento a las 24 h, 48 h, y 72 h. En MM+ Gal *K. lactis* tiene crecimiento a las 24 h, 48 h, y 72 h, mientras que de las otras especies probadas solo *S. cerevisiae ura3Δ* logra llegar a la tercera dilución pero hasta las 72 h de haber sido goteada. En MM+Gli las especies muestran crecimiento similar al observado en MM+Gli. En MM+Sac el crecimiento es similar al observado en MM+D. Los medios utilizados contenían sales, elementos traza y vitaminas según la formula de Difco. Como fuente de nitrógeno se adicionó sulfato de amonio 0.2% (m/v) y se varió la fuente de carbono quedando como sigue: (a) dextrosa (D) 2% (m/v); (b) etanol (EtOH) al 2% (v/v); (c) galactosa (Gal) 2% (m/v); (d) glicerol (Gli) 2% (v/v); y (e) sacarosa (Sac) 2% (m/v).

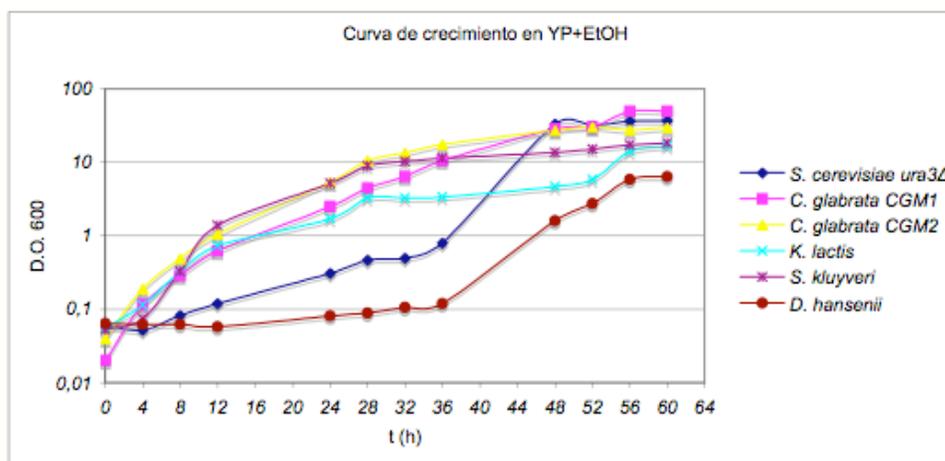
Anexo 4



Medio	Fungi	D.O.	Horas de cultivo		t de duplicación (h)	t (h:min)	m	b	Tiempo de duplicación medio t1/2	
			t	t1/2 (h:min)						
YPD	<i>S. cerevisiae ura3Δ</i>	0,06	4	1,455348792	01 h 27 min	0,2143	-2,0899	1,403017618	01 h 24 min	
		0,147	6	1,271336112	01 h 16 min	0,2143	-2,0899			
		0,444	8	1,511493074	01 h 30 min	0,2143	-2,0899			
		1,113	10	1,373892487	01 h 22 min	0,2143	-2,0899			
		0,074	2	1,99535045	01 h 11 min	0,2544	-1,6437			
	<i>C. glabrata CGM1</i>	0,208	4	0,96810262	00 h 50 min	0,2544	-1,6437	1,183562232	01 h 11 min	
		0,756	6	1,166870248	01 h 10 min	0,2544	-1,6437			
		3,56	8	1,812028277	01 h 48 min	0,2544	-1,6437			
		6,26	10	0,77556733	00 h 46 min	0,2544	-1,6437			
		0,097	2	1,044819089	01 h 02 min	0,2834	-1,5751			
	<i>C. glabrata CGM2</i>	0,354	4	1,028698863	01 h 01 min	0,2834	-1,5751	1,061297133	01 h 03 min	
		1,3	6	1,02213602	01 h 01 min	0,2834	-1,5751			
		5,77	8	1,305948514	01 h 18 min	0,2834	-1,5751			
		16,38	10	0,90488318	00 h 54 min	0,2834	-1,5751			
		0,12	4	1,586360734	01 h 41 min	0,1986	-1,7491			
	<i>K. lactis</i>	0,254	6	1,32610127	01 h 19 min	0,1986	-1,7491	1,514541	01 h 30 min	
		0,649	8	1,377516075	01 h 22 min	0,1986	-1,7491			
		1,85	10	1,568185922	01 h 40 min	0,1986	-1,7491			
		0,082	4	1,43954205	01 h 26 min	0,2449	-2,1173			
		0,196	6	0,9848349	00 h 59 min	0,2449	-2,1173			
	<i>S. kluyveri</i>	0,643	8	1,091633191	01 h 05 min	0,2449	-2,1173	1,230246249	01 h 13 min	
		2,37	10	1,404974854	01 h 24 min	0,2449	-2,1173			
		0,067	8	5,116201012	05 06 min	0,0577	-1,6297			
	<i>D. hansenii</i>	0,091	10	5,420647972	05 h 25 min	0,0577	-1,6297	5,217856923	05 h 13 min	
0,114		12	5,116721785	05 h 07 min	0,0577	-1,6297				

Anexo 4. Curvas de crecimiento para la especies probadas en YPD. Se muestran las curvas de crecimiento para la especies probadas (superior), la gráfica que compara los tiempos de duplicación (medio) y se muestran los datos a partir de los cuales se calculó la ecuación de la recta (D.O.₆₀₀, horas de cultivo, tiempo de duplicación, pendiente m, ordenada al origen b y tiempo de duplicación medio) (inferior) (n= 2).

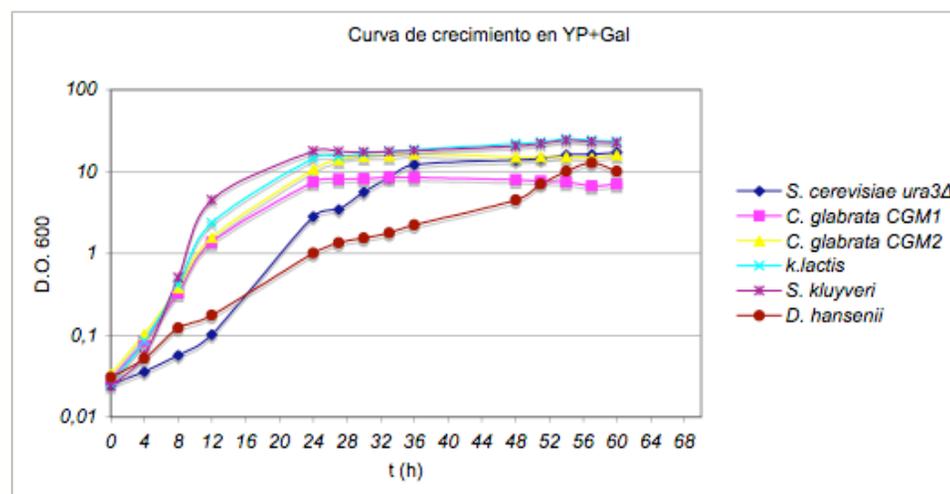
Anexo 5



Medio	Fungi	D.O.	Horas de cultivo	t de duplicación (h)		Tiempo de duplicación medio				
				t (h;min)	m	t ^{1/2}	t ^{1/2} (h;min)			
YP+EtOH	<i>S. cerevisiae ura3Δ</i>	0,307	24	9,036626055	09 h 02 min	0,0319	-1,2657	9,249390744	09 h 14 min	
		0,47	28	10,83472895	10 h 50 min	0,0319	-1,2657			
		0,5	32	7,677115987	07 h 40 min	0,0319	-1,2657			
		0,8	36	10,07586153	10 h 04 min	0,0319	-1,2657			
	<i>C. glabrata CGM1</i>	2,5	24	5,559332109	05 h 33 min	0,0509	-0,8056	5,899598941	05 h 53 min	
		4,5	28	6,574509026	06 h 34 min	0,0509	-0,8056			
		6,4	32	5,579763647	05 h 34 min	0,0509	-0,8056			
		10,6	36	5,884790981	05 h 53 min	0,0509	-0,8056			
	<i>C. glabrata CGM2</i>	0,189	4	3,080040597	03 h 04 min	0,0936	-1,0852	3,217117221	03 h 13 min	
		0,489	8	3,490799731	03 h 29 min	0,0936	-1,0852			
		1,06	12	3,080511335	03 h 04 min	0,0936	-1,0852			
		0,115	4	2,840756092	02 h 50 min	0,1003	-1,3244			
<i>K. lactis</i>	0,324	8	3,32577274	03 h 19 min	0,1003	-1,3244	3,003176131	03 h 00 min		
	0,73	12	2,842999559	02 h 50 min	0,1003	-1,3244				
	0,074	4	1,870990675	01 h 52 min	0,1592	-1,7644			1,891981471	01 h 53 min
	0,328	8	1,932813061	01 h 55 min	0,1592	-1,7644				
1,39	12	1,872140678	01 h 52 min	0,1592	-1,7644					
1,6	48	4,506355626	04 h 30 min	0,0708	-3,2123					
<i>D. hansenii</i>	2,75	52	3,828569061	03 h 49 min	0,0708	-3,2123	4,167462343	04 h 10 min		
	5,9	56	4,511045301	04 h 30 min	0,0708	-3,2123				

Anexo 5. Curvas de crecimiento para la especies probadas en YP+EtOH. Se muestran las curvas de crecimiento para la especies probadas (superior), la gráfica que compara los tiempos de duplicación (medio) y se muestran los datos a partir de los cuales se calculó la ecuación de la recta (D.O.₆₀₀, horas de cultivo, tiempo de duplicación, pendiente m, ordenada al origen b y tiempo de duplicación medio) (inferior) (n= 2).

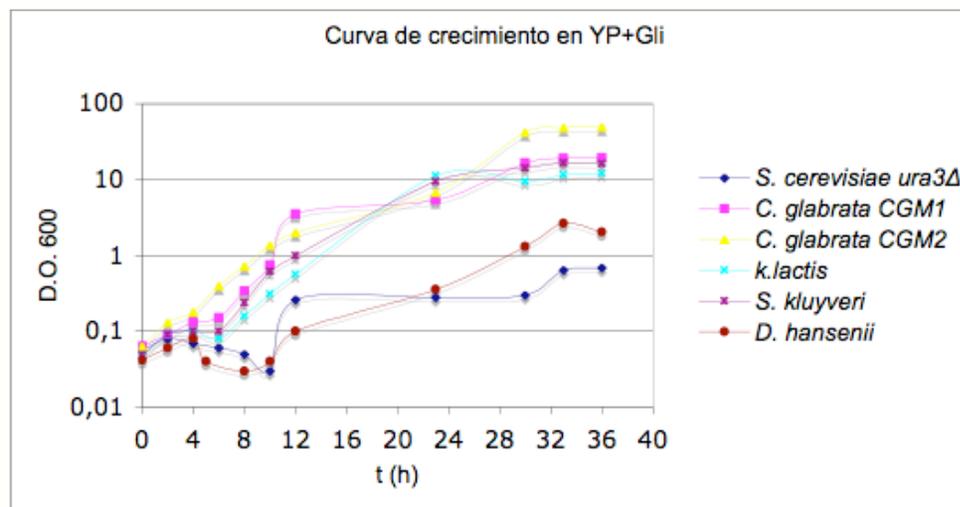
Anexo 6



Medio	Fungi	D.O.	Horas de cultivo	t de duplicación		tiempo de duplicación			
				(h)	t (h:min)	medio $t^{1/2}$	$t^{1/2}$ (h:min)		
YP+Gal	<i>S. cerevisiae ura3Δ</i>	2,84	24	6,044273702	06 h 02 min	0,0553	-0,9071	5,423230871	5 h 22 min
		3,46	27	4,595046916	04 h 35 min	0,0553	-0,9071		
		5,63	30	5,418415742	05 h 25 min	0,0553	-0,9071		
		8,48	33	5,635187123	05 h 38 min	0,0553	-0,9071		
	<i>C. glabrata CGM1</i>	0,085	4	2,028082759	02 h 01 min	0,1513	-1,6816	1,989830132	01 h 59 min
		0,329	8	1,912927255	01 h 54 min	0,1513	-1,6816		
		1,38	12	2,028480384	02 h 01 min	0,1513	-1,6816		
	<i>C. glabrata CGM2</i>	0,104	4	2,107913843	01 h 06 min	0,147	-1,5798	2,048270147	02 h 02 min
		0,379	8	1,928361943	01 h 55 min	0,147	-1,5798		
		1,56	12	2,108534653	02 h 06 min	0,147	-1,5798		
	<i>K. lactis</i>	0,085	4	1,726989586	01 h 43 min	0,1804	-1,8027	1,670467425	01 h 40 min
		0,417	8	1,555798507	01 h 33 min	0,1804	-1,8027		
		2,36	12	1,728614183	01 h 43 min	0,1804	-1,8027		
	<i>S. kluyveri</i>	0,058	4	1,275319464	01 h 16 min	0,2363	-2,1821	1,275519005	01 h 16 min
		0,511	8	1,274443063	01 h 16 min	0,2363	-2,1821		
		4,51	12	1,276794488	01 h 16 min	0,2363	-2,1821		
	<i>D. hansenii</i>	1,01	24	10,36451903	10 h 21 min	0,0273	-0,6328	11,17243834	11 h 10 min
		1,35	27	11,98035766	11 h 58 min	0,0273	-0,6328		
1,54		30	11,07511782	11 h 04 min	0,0273	-0,6328			

Anexo 6. Curvas de crecimiento para la especies probadas en YP+Gal. Se muestran las curvas de crecimiento para la especies probadas (superior), la gráfica que compara los tiempos de duplicación (medio) y se muestran los datos a partir de los cuales se calculó la ecuación de la recta (D.O.₆₀₀, horas de cultivo, tiempo de duplicación, pendiente m, ordenada al origen b y tiempo de duplicación medio) (inferior) (n= 2).

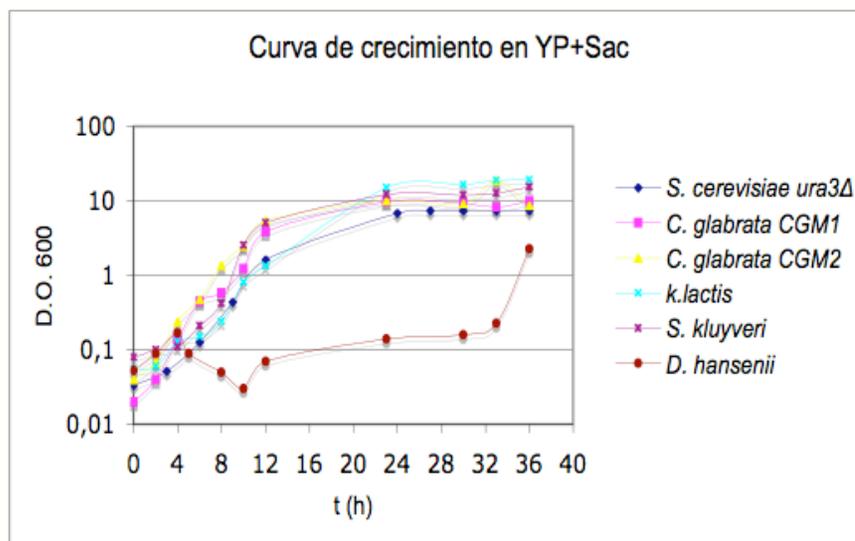
Anexo 7



Medio	Fungi	D.O.	Horas de cultivo	t de duplicación		m	b	tiempo de duplicación medio	
				t (h)	t (h:min)			t ^{1/2}	t ^{1/2} (h:min)
	<i>S. cerevisiae ura3Δ</i>	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
YP+Gli	<i>C. glabrata CGM1</i>	0,34	8	1,39854304	01 h 23 min	0,2547	-2,5613	1,181466458	01 h 06 min
		0,75	10	0,74751181	00 h 44 min	0,2547	-2,5613		
		3,55	12	1,39834452	01 h 23 min	0,2547	-2,5613		
	<i>C. glabrata CGM2</i>	0,4	6	2,56328234	01 h 33 min	0,131	-1,2187	2,557038787	02 h 33 min
		0,72	8	2,51192742	02 h 30 min	0,131	-1,2187		
		1,35	10	2,5959066	02 h 35 min	0,131	-1,2187		
	<i>K. lactis</i>	0,16	8	2,17683808	02 h 10 min	0,136	-1,8789	2,214361986	02 h 12 min
		0,31	10	2,28890948	02 h 17 min	0,136	-1,8789		
		0,56	12	2,1773384	02 h 10 min	0,136	-1,8789		
	<i>S. kluyveri</i>	0,24	8	1,72589566	01 h 43 min	0,1549	-1,8253	1,946616996	01 h 56 min
		0,62	10	2,38684109	02 h 23 min	0,1549	-1,8253		
		1	12	1,72711424	01 h 43 min	0,1549	-1,8253		
	<i>D. hansenii</i>	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D

Anexo 7. Curvas de crecimiento para la especies probadas en YP+Gli. Se muestran las curvas de crecimiento para la especies probadas (superior), la gráfica que compara los tiempos de duplicación (medio) y se muestran los datos a partir de los cuales se calculó la ecuación de la recta (D.O.₆₀₀, horas de cultivo, tiempo de duplicación, pendiente m, ordenada al origen b y tiempo de duplicación medio) (inferior) (n= 2).

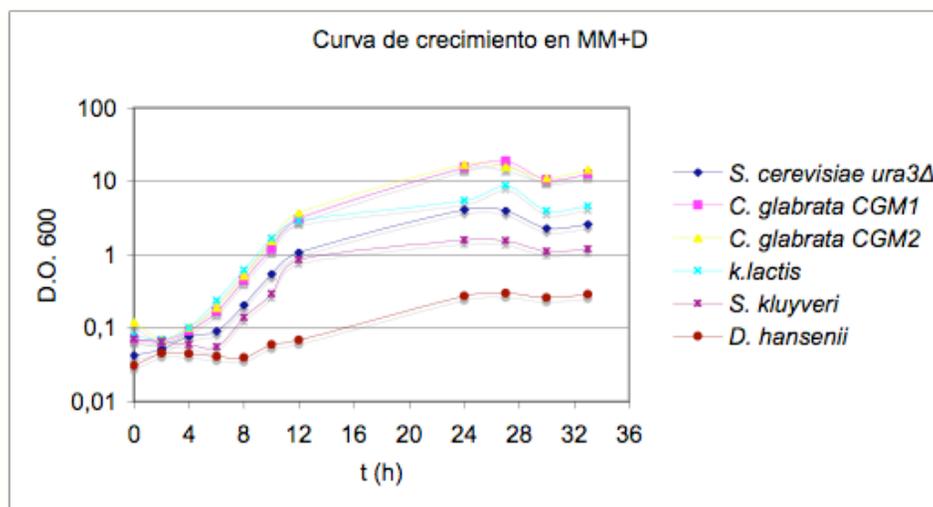
Anexo 8



Medio	Fungi	D.O.	Horas de cultivo	t de duplicación		m	b	Tiempo de duplicación medio	
				(h)	t (h:min)			t1/2	(h:min)
YP+Sac	<i>S. cerevisiae ura3Δ</i>	0,05	3	2,094358399	02 h 05 min	0,1678	-1,8378	1,79205873	01 h 47 min
		0,13	6	1,425744728	01 h 25 min	0,1678	-1,8378		
		0,44	9	1,621470037	01 h 37 min	0,1678	-1,8378		
		1,64	12	2,026661762	02 h 01 min	0,1678	-1,8378		
	<i>C. glabrata CGM1</i>	0,14	4	1,53350192	01 h 32 min	0,1465	-1,3635	2,09182828	02 h 05 min
		0,45	6	2,994829416	02 h 59 min	0,1465	-1,3635		
	<i>C. glabrata CGM2</i>	0,58	8	1,74715351	1 h 44 min	0,1465	-1,3635	1,81345297	02 h 33 min
		0,24	4	1,75184395	01 h 45 min	0,1715	-1,3052		
	<i>K. lactis</i>	0,48	6	1,507120892	01 h 30 min	0,1715	-1,3052	1,80020179	01 h 36 min
		1,38	8	2,181394065	01 h 45 min	0,1715	-1,3052		
	<i>S. kluyveri</i>	0,24	8	1,32204587	01 h 19 min	0,1883	-2,0741	1,28296515	01 h 16 min
		0,82	10	2,155835624	02 h 09 min	0,1883	-2,0741		
	<i>D. hansenii</i>	0,21	6	1,414942448	01 h 24 min	0,2469	-2,2075	N/D	N/D
		0,42	8	0,634180989	00 h 38 min	0,2469	-2,2075		
		2,54	10	1,799772022	01 h 47 min	0,2469	-2,2075		

Anexo 8. Curvas de crecimiento para la especies probadas en YP+Sac. Se muestran las curvas de crecimiento para la especies probadas (superior), la gráfica que compara los tiempos de duplicación (medio) y se muestran los datos a partir de los cuales se calculó la ecuación de la recta (D.O.₆₀₀, horas de cultivo, tiempo de duplicación, pendiente m, ordenada al origen b y tiempo de duplicación medio) (inferior) (n= 2).

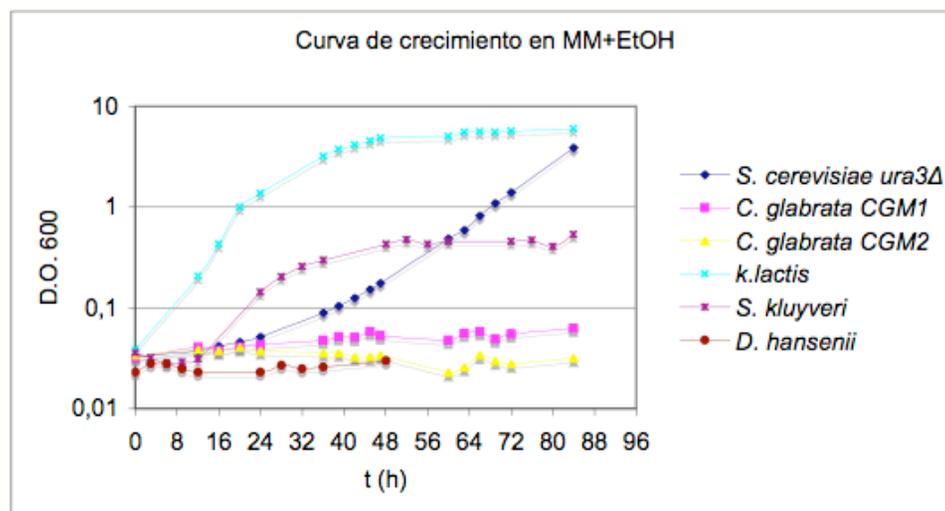
Anexo 9



Medio	Fungi	D.O.	Horas de cultivo	t de duplicación		m	b	Tiempo de duplicación medio	
				(h)	t (h:min)			t1/2	t1/2 (h:min)
MM+D	<i>S. cerevisiae ura3Δ</i>	0,091	6	1,612569325	01 h 36 min	0,1823	-2,1277	1,649768452	01 h 38 min
		0,208	8	1,581971095	01 h 34 min	0,1823	-2,1277		
		0,55	10	1,8984788	01 h 53 min	0,1823	-2,1277		
		1,08	12	1,506054587	01 h 30 min	0,1823	-2,1277		
	<i>C. glabrata CGM1</i>	0,169	6	1,25893661	01 h 15 min	0,1893	-1,8452	1,506903419	01 h 30 min
		0,45	8	1,505771312	01 h 30 min	0,1893	-1,8452		
		1,2	10	1,756002333	01 h 45 min	0,1893	-1,8452		
	<i>C. glabrata CGM2</i>	0,192	6	1,359461367	01 h 21 min	0,2168	-2,0112	1,419320814	01 h 25 min
		0,52	8	1,355319831	01 h 21 min	0,2168	-2,0112		
		1,55	10	1,543181245	01 h 32 min	0,2168	-2,0112		
	<i>K. lactis</i>	0,102	4	1,564162963	01 h 33 min	0,2023	-1,816	1,467940501	01 h 28 min
		0,24	6	1,40109361	01 h 24 min	0,2023	-1,816		
0,62		8	1,438564929	01 h 26 min	0,2023	-1,816			
0,14		8	1,656578301	01 h 39 min	0,1958	-2,4436			
<i>S. kluyveri</i>	0,294	10	1,302233535	01 h 18 min	0,1958	-2,4436	1,538618112	01 h 32 min	
	0,85	12	1,657042499	01 h 39 min	0,1958	-2,4436			
	<i>D. hansenii</i>	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D

Anexo 9. Curvas de crecimiento para la especies probadas en MM+D. Se muestran las curvas de crecimiento para la especies probadas (superior), la gráfica que compara los tiempos de duplicación (medio) y se muestran los datos a partir de los cuales se calculó la ecuación de la recta (D.O.₆₀₀, horas de cultivo, tiempo de duplicación, pendiente m, ordenada al origen b y tiempo de duplicación medio) (inferior) (n= 2).

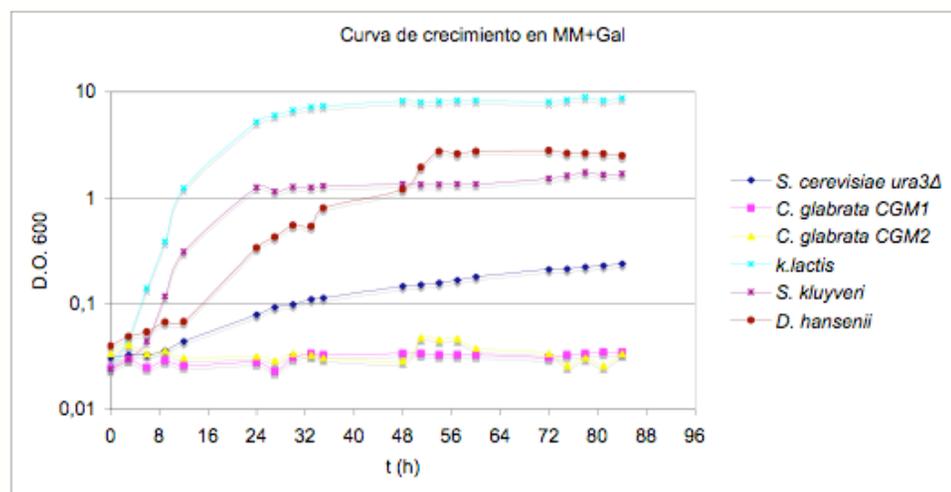
Anexo 10



Medio	Fungi	D.O.	Horas de cultivo	t de duplicación		m	b	Tiempo de duplicación medio	
				(h)	t (h:min)			t/2	t/2 (h:min)
MM+EtOH	<i>S. cerevisiae ura3Δ</i>	0,126	42	8,924434325	08 h 55 min	0,0344	-2,3504	8,365657329	08 h 21 min
		0,153	45	8,375622863	08 h 22 min	0,0344	-2,3504		
		0,176	47	8,143682078	08 h 80 min	0,0344	-2,3504		
		0,488	60	8,018890048	08 h 01 min	0,0344	-2,3504		
	<i>C. glabrata CGM1</i>	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	<i>C. glabrata CGM2</i>	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	<i>K. lactis</i>	0,428	16	4,248576156	04 h 14 min	0,0711	-1,5072	4,380376072	04 h 22 min
		1,01	20	5,492986912	05 h 29 min	0,0711	-1,5072		
		1,38	24	3,399565149	03 h 23 min	0,0711	-1,5072		
	<i>S. kluyveri</i>	0,203	28	12,07616668	12 h 04 min	0,0266	-1,4575	11,52765719	11 h 31 min
		0,259	32	12,05375037	12 h 03 min	0,0266	-1,4575		
		0,3	36	10,45305453	10 h 27 min	0,0266	-1,4575		
<i>D. hansenii</i>	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	

Anexo 10. Curvas de crecimiento para la especies probadas en MM+EtOH. Se muestran las curvas de crecimiento para la especies probadas (superior), la gráfica que compara los tiempos de duplicación (medio) y se muestran los datos a partir de los cuales se calculó la ecuación de la recta (D.O.₆₀₀, horas de cultivo, tiempo de duplicación, pendiente m, ordenada al origen b y tiempo de duplicación medio) (inferior) (n= 2).

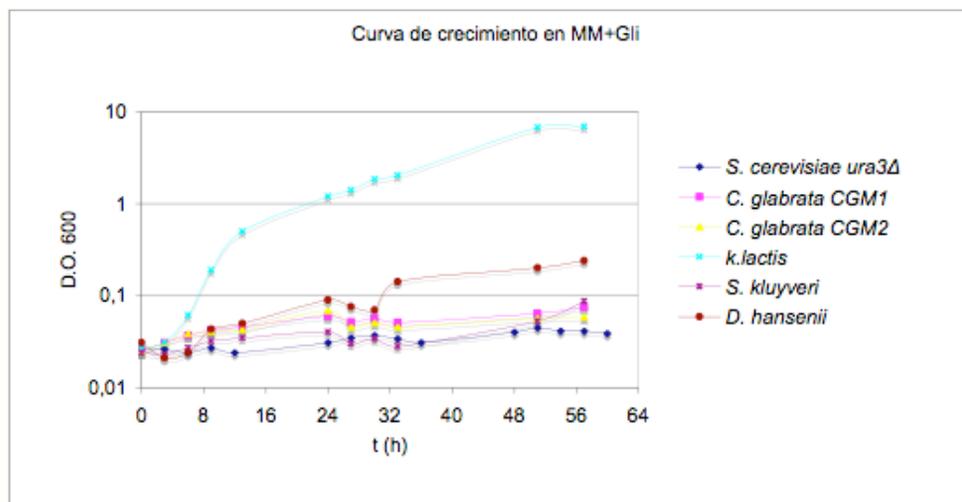
Anexo 11



Medio	Fungi	D.O.	Horas de cultivo	T de duplicación			Tiempo de duplicación		
				(h)	t (h:min)	m	b	medio t1/2	t1/2 (h:min)
MM+Gal	<i>S. cerevisiae ura3Δ</i>	0,11	33	37,68947962	37 h 41 min	0,0083	-1,2443	37,61033314	37 h 36 min
		0,114	35	37,5584153	37 h 33 min	0,0083	-1,2443		
		0,146	48	37,50395801	37 h 30 min	0,0083	-1,2443		
		0,11	33	37,68947962	37 h 41 min	0,0083	-1,2443		
	<i>C. glabrata CGM1</i>	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	<i>C. glabrata CGM2</i>	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	<i>K. lactis</i>	0,14	6	1,959858722	01 h 57 min	0,1555	-1,7906	1,922303019	01 h 55 min
		0,384	9	1,777885659	01 h 46 min	0,1555	-1,7906		
		1,23	12	2,029164676	02 h 01 min	0,1555	-1,7906		
	<i>S. kluyveri</i>	0,044	6	2,134820115	02 h 08 min	0,1408	-2,2009	2,141049341	02 h 08 min
		0,117	9	2,151391033	02 h 09 min	0,1408	-2,2009		
		0,308	12	2,136936876	02 h 08 min	0,1408	-2,2009		
	<i>D. hansenii</i>	0,55	30	11,0433787	11 h 02 min	0,0298	-1,1817	10,10778997	10 h 06 min
		0,54	33	7,775964949	07 h 46 min	0,0298	-1,1817		
		0,8	35	11,50402626	11 h 30 min	0,0298	-1,1817		

Anexo 11. Curvas de crecimiento para la especies probadas en MM+Gal. Se muestran las curvas de crecimiento para la especies probadas (superior), la gráfica que compara los tiempos de duplicación (medio) y se muestran los datos a partir de los cuales se calculó la ecuación de la recta (D.O.₆₀₀, horas de cultivo, tiempo de duplicación, pendiente m, ordenada al origen b y tiempo de duplicación medio) (inferior) (n= 2).

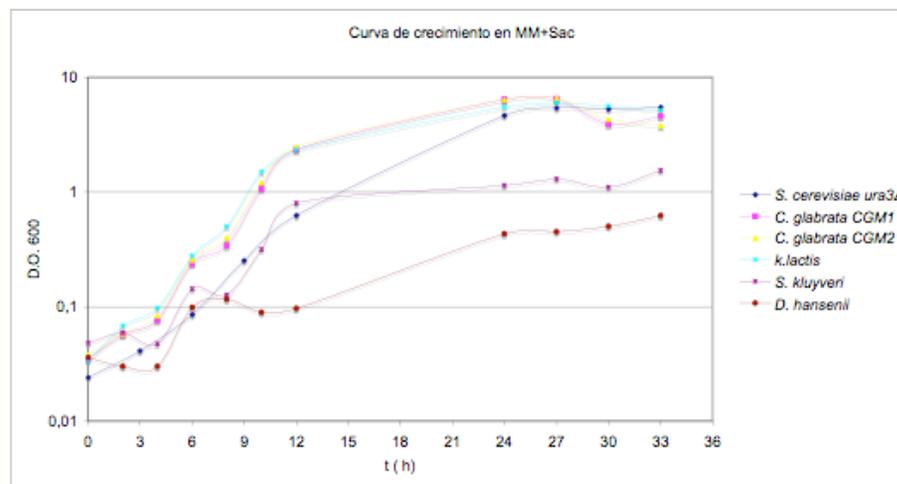
Anexo 12



Medio	Fungi	D.O.	Horas de cultivo	t de duplicación (h)	t (h:min)	m	b	Tiempo de duplicación	
								medio t1/2	t1/2 (h:min)
MM+Gli	<i>S. cerevisiae ura3Δ</i>	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	<i>C. glabrata CGM1</i>	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	<i>C. glabrata CGM2</i>	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
	<i>K. lactis</i>	1,4	27	10,52036611	10 h 31 min	0,0274	-0,5809	10,95335782	10 h 57 min
		1,84	30	11,85211017	11 h 51 min	0,0274	-0,5809		
		2,04	33	10,48759719	10 h 29 min	0,0274	-0,5809		
	<i>S. kluyveri</i>	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
<i>D. hansenii</i>	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	

Anexo 12. Curvas de crecimiento para la especies probadas en MM+Gli. Se muestran las curvas de crecimiento para la especies probadas (superior), la gráfica que compara los tiempos de duplicación (medio) y se muestran los datos a partir de los cuales se calculó la ecuación de la recta (D.O.₆₀₀, horas de cultivo, tiempo de duplicación, pendiente m, ordenada al origen b y tiempo de duplicación medio) (inferior) (n= 2).

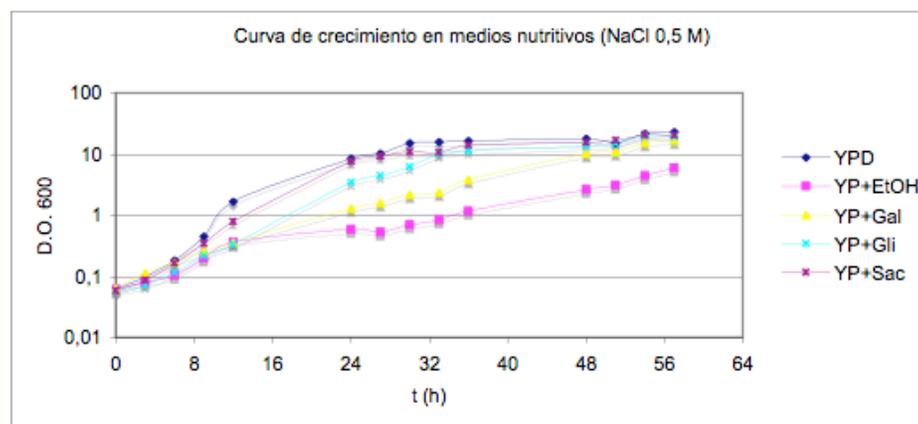
Anexo 13



Medio	Fungi	D.O.	Horas de cultivo	t de duplicación (h)			Tiempo de duplicación medio t1/2		
				t (h;min)	m	b	t1/2 (h;min)		
MM+Sac	<i>S. cerevisiae ura3Δ</i>	0,04	3	2,479207854	02 h 28 min	0,134	-1,8204	2,248513663	02 h 14 min
		0,09	6	1,84215613	01 h 50 min	0,134	-1,8204		
		0,25	9	2,364406988	02 h 21 min	0,134	-1,8204		
		0,63	12	2,308283679	02 h 18 min	0,134	-1,8204		
	<i>C. glabrata CGM1</i>	0,08	4	1,488859456	01 h 29 min	0,1801	-1,8067	1,607312312	01 h 36 min
		0,24	6	2,231417777	02 h 13 min	0,1801	-1,8067		
		0,34	8	1,101659704	01 h 06 min	0,1801	-1,8067		
	<i>C. glabrata CGM2</i>	0,25	6	2,04321779	02 h 02 min	0,1727	-1,6832	1,732424368	01 h 43 min
		0,4	8	1,185234435	01 h 11 min	0,1727	-1,6832		
		1,21	10	1,96882088	01 h 58 min	0,1727	-1,6832		
	<i>K. lactis</i>	0,1	4	1,493209885	01 h 29 min	0,1912	-1,7625	1,529308742	01 h 31 min
		0,28	6	1,876620108	01 h 52 min	0,1912	-1,7625		
		0,5	8	1,218096234	01 h 13 min	0,1912	-1,7625		
	<i>S. kluyveri</i>	0,13	8	1,502244847	01 h 30 min	0,2007	-2,5057	1,498650725	01 h 29 min
		0,32	10	1,491863868	01 h 29 min	0,2007	-2,5057		
		<i>D. hansenii</i>	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D

Anexo 13. Curvas de crecimiento para la especies probadas en MM+Sac. Se muestran las curvas de crecimiento para la especies probadas (superior), la gráfica que compara los tiempos de duplicación (medio) y se muestran los datos a partir de los cuales se calculó la ecuación de la recta (D.O.₆₀₀, horas de cultivo, tiempo de duplicación, pendiente m, ordenada al origen b y tiempo de duplicación medio) (inferior) (n= 2).

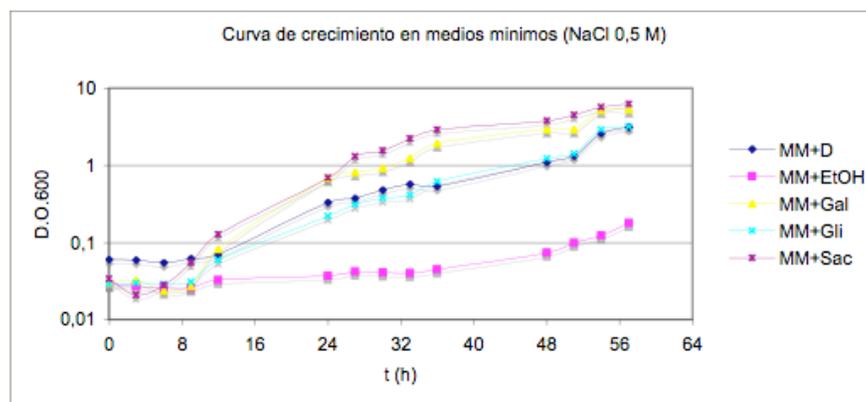
Anexo 14



Medio	D.O.	Horas de cultivo	t de duplicacion (h)	t (h;min)	m	b	Tiempo de duplicacion medio t1/2
YPD	0,098	3	2,731152394	02 h 43 min	0,1363	-1,4889	2,208674747 02 h 12 min
	0,183	6	1,721064456	01 h 43 min	0,1363	-1,4889	
	0,454	9	1,616183775	01 h 36 min	0,1363	-1,4889	
	1,67	12	2,766298363	02 h 45 min	0,1363	-1,4889	
YP+EtOH	0,54	27	8,237837075	08 h 14 min	0,0371	-1,2739	8,137315833 08 h 08 min
	0,7	30	8,275688293	08 h 16 min	0,0371	-1,2739	
	0,85	33	7,548488447	07 h 32 min	0,0371	-1,2739	
	1,19	36	8,487249516	08 h 29 min	0,0371	-1,2739	
YP+Gal	0,114	3	5,197076938	05 h 11 min	0,0565	-1,1052	5,325928551 05 h 19 min
	0,174	6	5,447420247	05 h 26 min	0,0565	-1,1052	
	0,258	9	5,475215958	05 h 28 min	0,0565	-1,1052	
	0,367	12	5,18400106	05 h 11 min	0,0565	-1,1052	
YP+Gli	0,072	3	3,987744995	03 h 59 min	0,0765	-1,3762	3,940019212 03 h 56 min
	0,116	6	3,695267776	03 h 41 min	0,0765	-1,3762	
	0,218	9	4,276947572	04 h 16 min	0,0765	-1,3762	
	0,34	12	3,800116506	03 h 48 min	0,0765	-1,3762	
YP+Sac	0,087	3	2,999526128	02 h 59 min	0,1071	-1,402	2,812004522 02 h 48 min
	0,166	6	2,619403209	02 h 37 min	0,1071	-1,402	
	0,349	9	2,632636999	02 h 37 min	0,1071	-1,402	
	0,8	12	2,996451752	02 h 59 min	0,1071	-1,402	

Anexo 14. Curvas de crecimiento para la especie *D. hansenii* en medios nutritivos. Los medios fueron adicionados con 0.5 M de NaCl según lo revisado de [46] Se muestran las curvas de crecimiento para la especies probadas (superior), la gráfica que compara los tiempos de duplicación (medio) y se muestran los datos a partir de los cuales se calculó la ecuación de la recta (D.O.₆₀₀, horas de cultivo, tiempo de duplicación, pendiente m, ordenada al origen b y tiempo de duplicación medio) (inferior).

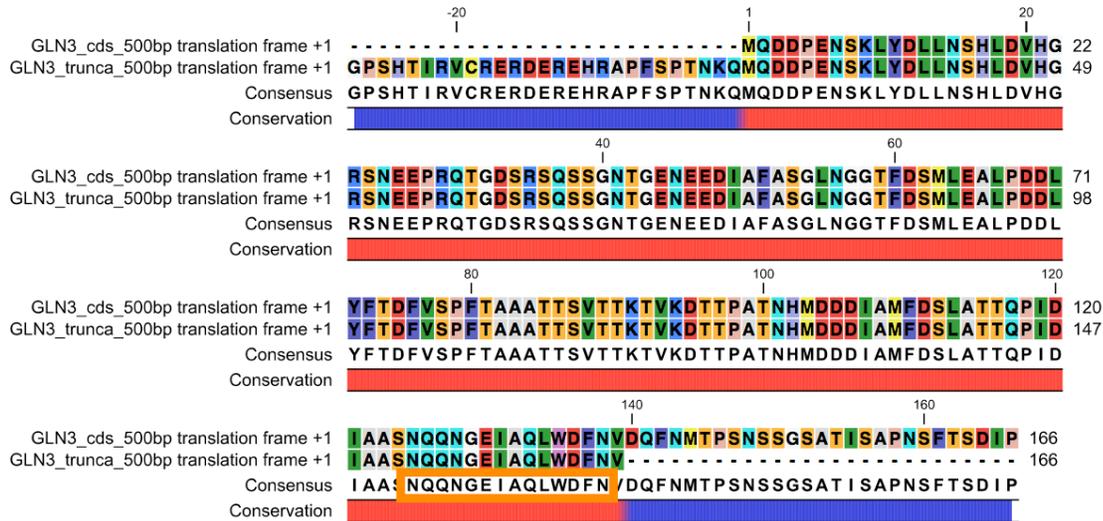
Anexo 15



Medio	D.O.	Horas de cultivo	t de duplicación (h)	t (h:min)	m	b	Tiempo de duplicación medio t1/2	t1/2 (h:min)
MM+D	0,33	24	11,39355075	11 h 23 min	0,0273	-1,1467	11,04684884	11 h 02 min
	0,374	27	10,38467391	10 h 23 min	0,0273	-1,1467		
	0,479	30	11,32108092	11 h 19 min	0,0273	-1,1467		
	0,57	33	11,08808979	11 h 05 min	0,0273	-1,1467		
MM+EtOH	0,074	48	7,168136081	07 h 10 min	0,042	-3,1468	7,093166443	07 h 05 min
	0,1	51	7,281666563	07 h 16 min	0,042	-3,1468		
	0,124	54	6,505992401	06 h 30 min	0,042	-3,1468		
	0,181	57	7,416870727	07 h 08 min	0,042	-3,1468		
MM+Gal	0,69	24	11,24561907	11 h 14 min	0,0276	-0,8329	10,93637579	10 h 56 min
	0,82	27	10,96173362	10 h 57 min	0,0276	-0,8329		
	0,93	30	9,942497979	09 h 56 min	0,0276	-0,8329		
	1,25	33	11,59565249	11 h 35 min	0,0276	-0,8329		
MM+Gli	0,22	24	9,038168096	09 h 02 min	0,0302	-1,3543	9,993183956	09 h 59 min
	0,312	27	11,06240363	11 h 03 min	0,0302	-1,3543		
	0,375	30	10,7073266	10 h 42 min	0,0302	-1,3543		
	0,415	33	9,164837496	09 h 09 min	0,0302	-1,3543		
MM+Sac	0,69	24	4,760356755	04 h 45 min	0,0535	-1,3988	5,608984678	05 h 36 min
	1,32	27	7,026241624	07 h 01 min	0,0535	-1,3988		
	1,55	30	5,330125118	05 h 19 min	0,0535	-1,3988		
	2,24	33	5,319215215	05 h 19 min	0,0535	-1,3988		

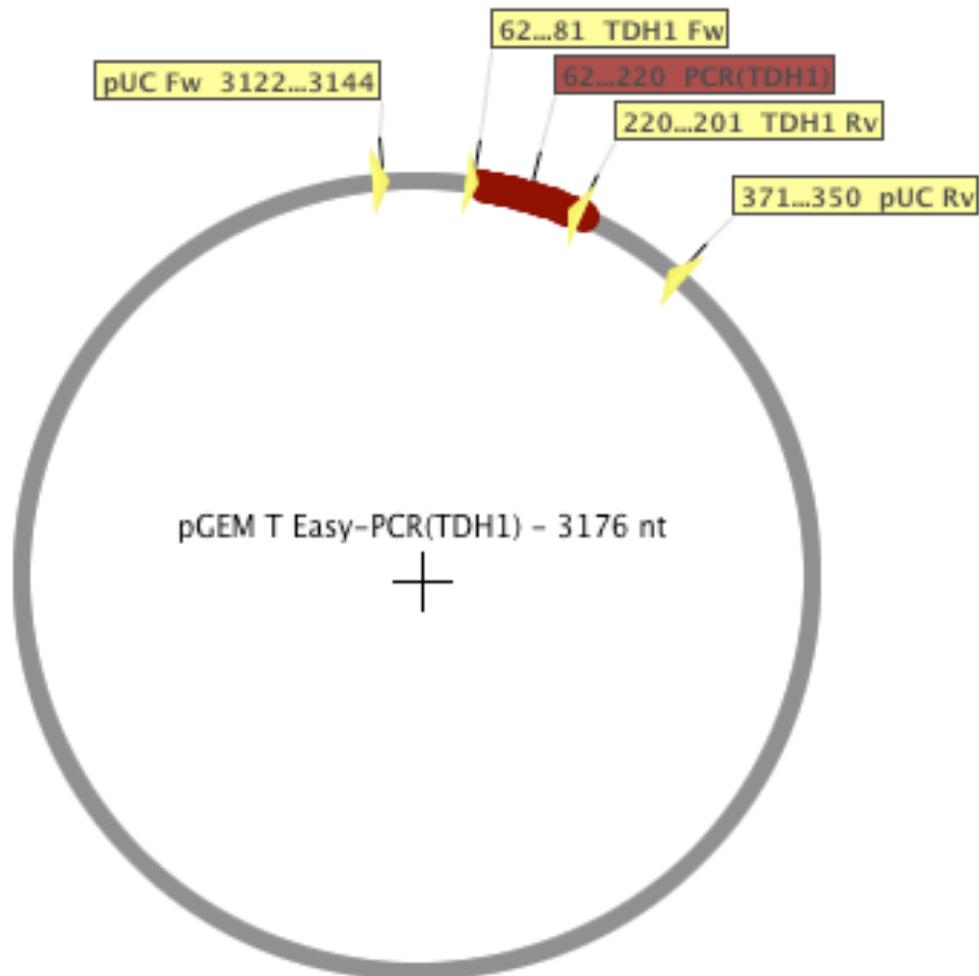
Anexo 15. Curvas de crecimiento para la especie *D. hansenii* en medios mínimos. Los medios fueron adicionados con 0.5 M de NaCl según lo revisado de [46] Se muestran las curvas de crecimiento para la especie probadas (superior), la gráfica que compara los tiempos de duplicación (medio) y se muestran los datos a partir de los cuales se calculó la ecuación de la recta (D.O.₆₀₀, horas de cultivo, tiempo de duplicación, pendiente m, ordenada al origen b y tiempo de duplicación medio) (inferior).

Anexo 16



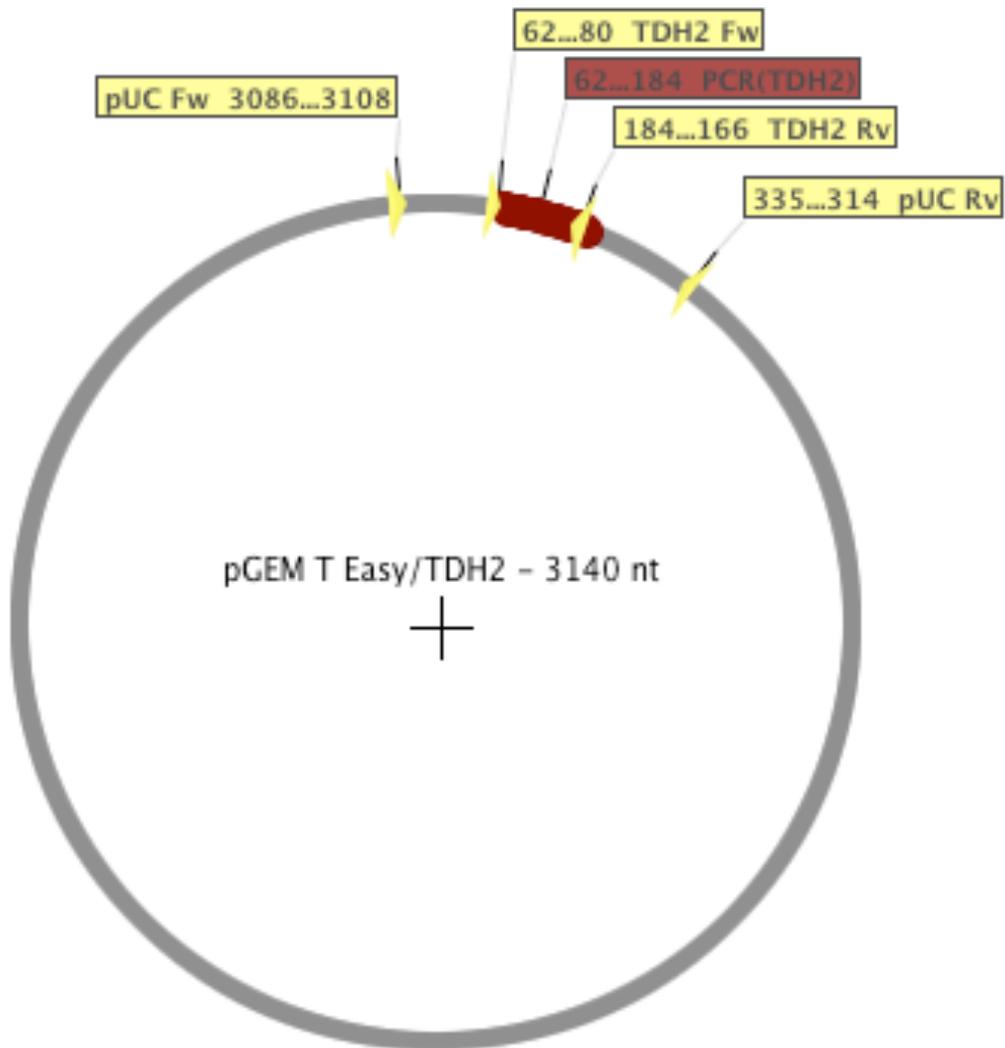
Anexo 16. Alineamiento de 166 aminoácidos hacia el extremo N-terminal de la proteína Gln3. En esta figura se muestra el alineamiento de 166 aminoácidos localizados hacia el extremo N-terminal de la proteína Gln3. Se alinearon las secuencias en aminoácidos de la proteína Gln3 de la cepa parental (secuencia superior) contra las secuencias en aminoácidos (secuencia inferior) de la cepa mutante trunca *gln3*, se muestra sobre la secuencia consenso en el rectángulo naranja que la mutante trunca *gln3* conserva el dominio de activación previamente descrito por Svetlov et al., en 1997 [12].

Anexo 17



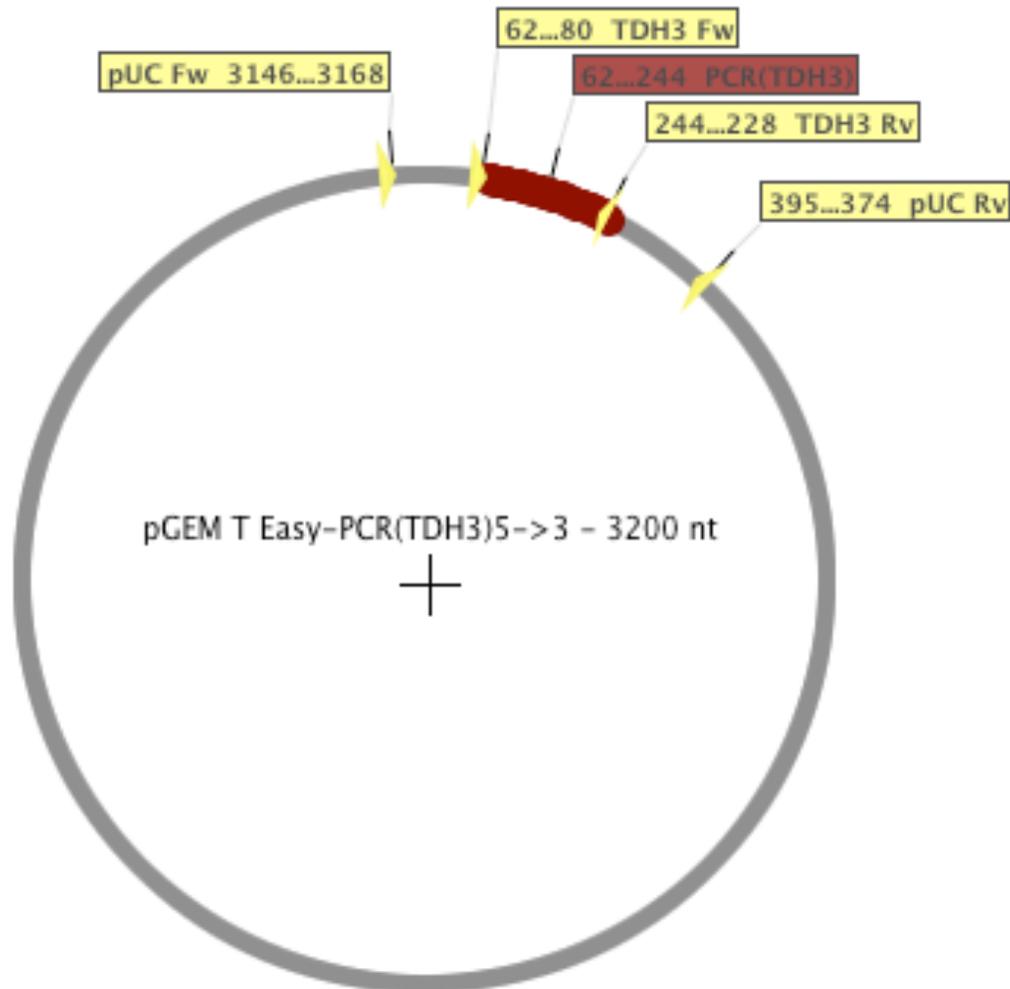
Anexo 17. Ligación del producto de PCR en pGEM-T Easy. El producto fue obtenido con los oligonucleótidos TDH1 Fw/TDH1 Rv. Construcción con la cual se realizará la estandarización de condiciones para PCR en tiempo real. Los pares de oligonucleótidos utilizados para comprobar los fragmentos clonados y los tamaños de banda esperados son; pUC Fw/pUC Rv 426 bp, TDH1 Fw/TDH1 Rv 159 bp, pUC Fw/ TDH1 Rv 275 bp, TDH1 Fw/pUC Rv 310 bp.

Anexo 18



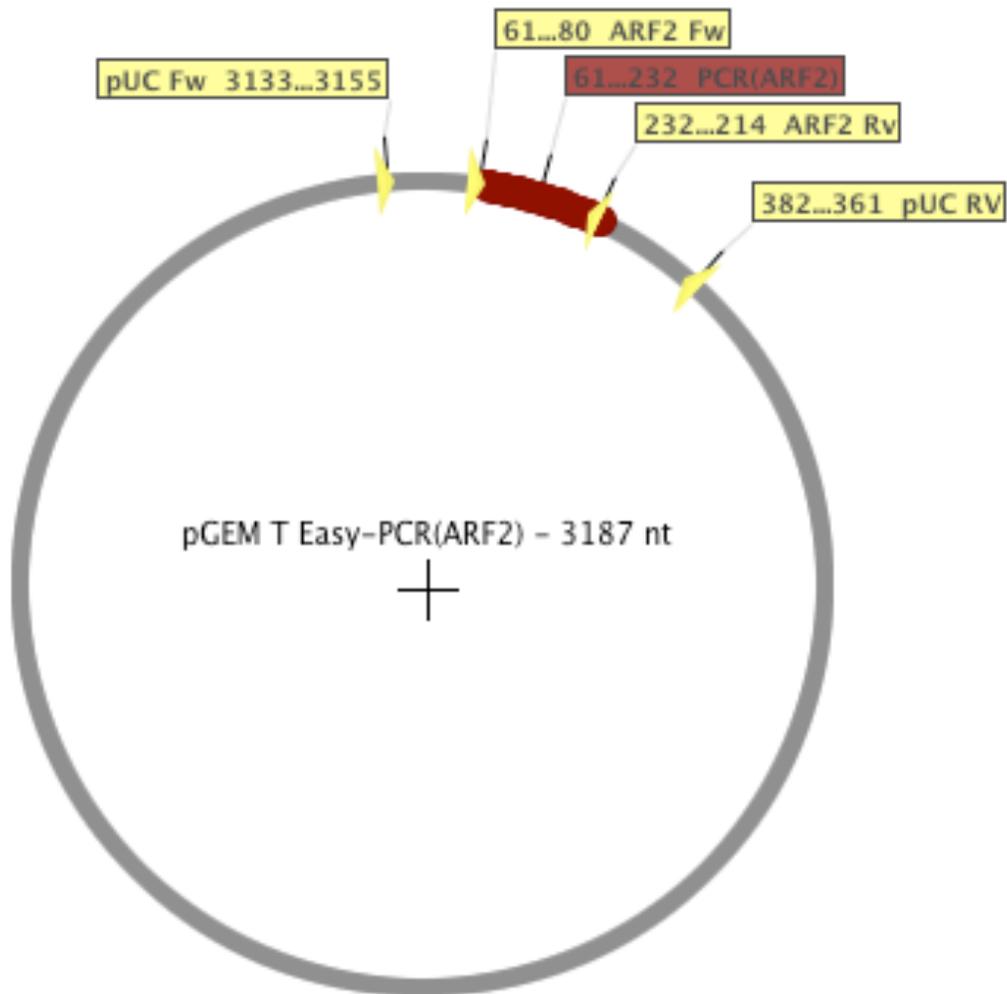
Anexo 18. Ligación del producto de PCR en pGEM-T Easy. El producto fue obtenido con los oligonucleótidos TDH2 Fw/TDH2 Rv. Construcción con la cual se realizará la estandarización de condiciones para PCR en tiempo real. Los pares de oligonucleótidos utilizados para comprobar los fragmentos clonados y los tamaños de banda esperados son; pUC Fw/pUC Rv 390 bp, TDH2 Fw/TDH2 Rv 123 bp, pUC Fw/TDH2 Rv 239 bp, TDH2 Fw/pUC Rv 274 bp.

Anexo 19



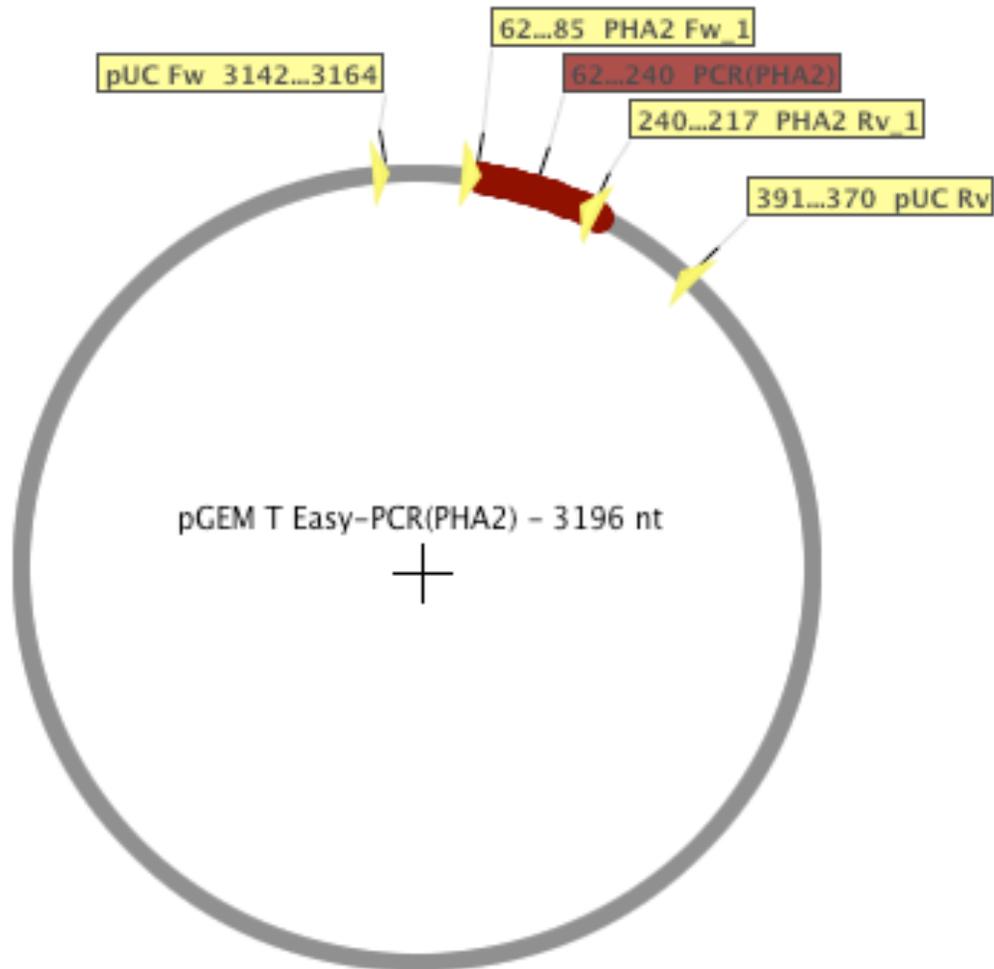
Anexo 19. Ligación del producto de PCR en pGEM-T Easy. El producto fue obtenido con los oligonucleótidos TDH3 Fw/TDH3 Rv. Construcción con la cual se realizará la estandarización de condiciones para PCR en tiempo real. Los pares de oligonucleótidos utilizados para comprobar los fragmentos clonados y los tamaños de banda esperados son; pUC Fw/pUC Rv 450 bp, TDH3 Fw/TDH3 Rv 183 bp, pUC Fw/TDH3 Rv 299 bp, TDH3 Fw/pUC Rv 334 bp.

Anexo 20



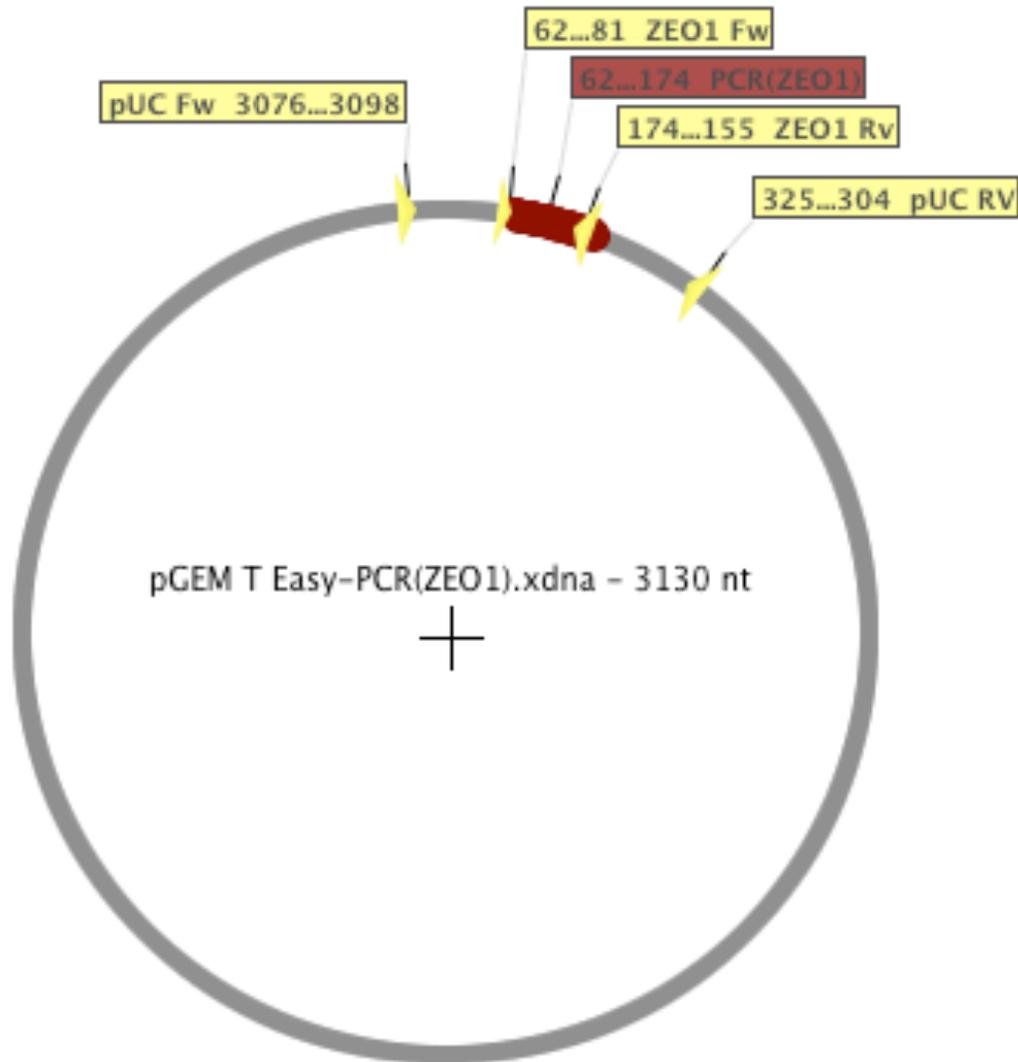
Anexo 20. Ligación del producto de PCR en pGEM-T Easy. El producto fue obtenido con los oligonucleótidos ARF2 Fw/ARF2 Rv. Construcción con la cual se realizará la estandarización de condiciones para PCR en tiempo real. Los pares de oligonucleótidos utilizados para comprobar los fragmentos clonados y los tamaños de banda esperados son; pUC Fw/pUC Rv 437 bp, ARF2 Fw/ARF2 Rv 172 bp, pUC Fw/ARF2 Rv 287 bp, ARF2 Fw/pUC Rv 322bp.

Anexo 21



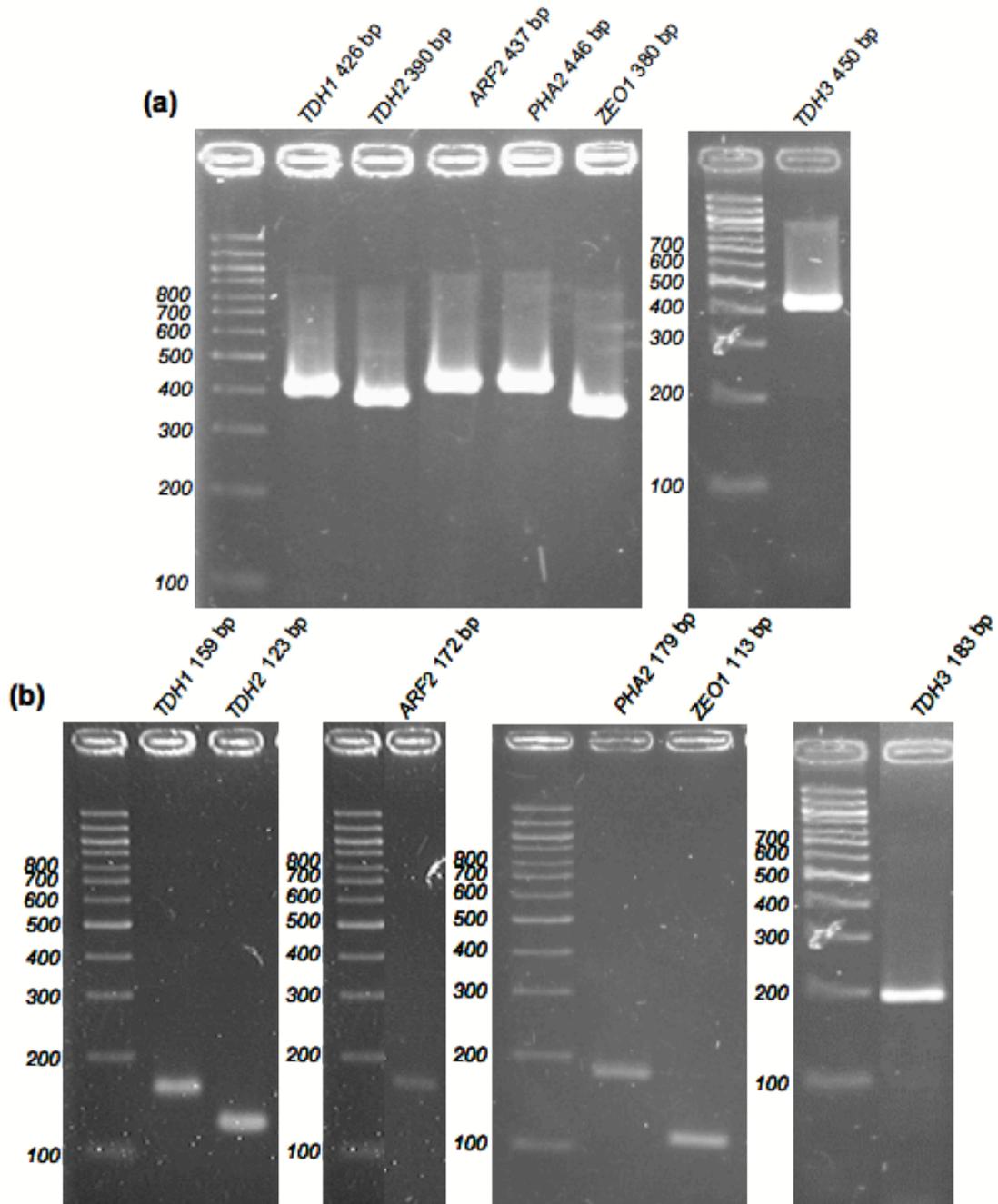
Anexo 21. Ligación del producto de PCR en pGEM-T Easy. El producto fue obtenido con los oligonucleótidos PHA2 Fw/PHA2 Rv. Construcción con la cual se realizará la estandarización de condiciones para PCR en tiempo real. Los pares de oligonucleótidos utilizados para comprobar los fragmentos clonados y los tamaños de banda esperados son; pUC Fw/pUC Rv 446 bp, PHA2 Fw/PHA2 Rv 179, pUC Fw/PHA2 Rv 295 bp, PHA2 Fw/pUC Rv 330 bp.

Anexo 22



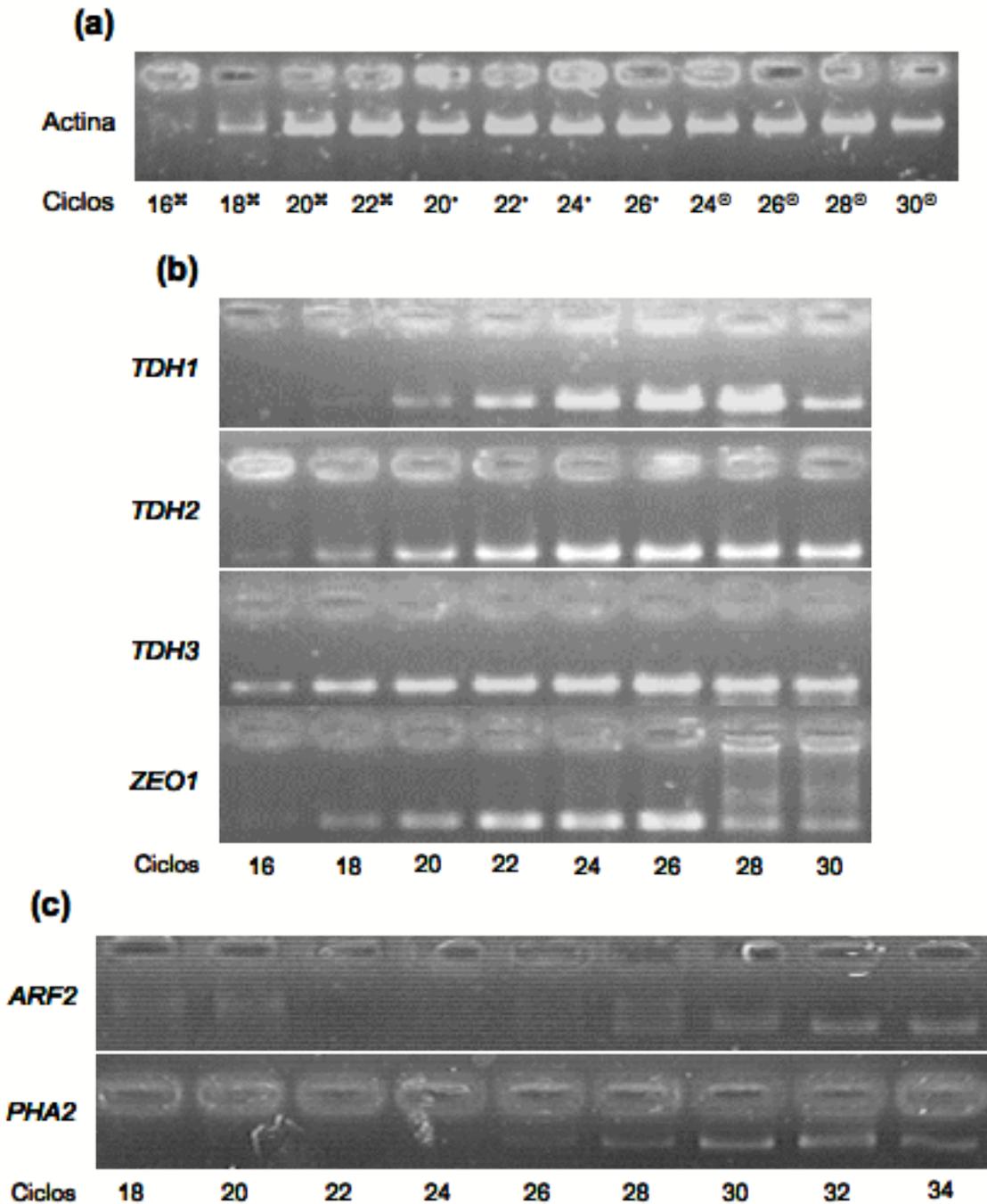
Anexo 22. . Ligación del producto de PCR en pGEM-T Easy. El producto fue obtenido con los oligonucleótidos ZEO1 Fw/ZEO1 Rv. Construcción con la cual se realizará la estandarización de condiciones para PCR en tiempo real. Los pares de oligonucleótidos utilizados para comprobar los fragmentos clonados y los tamaños de banda esperados son; pUC Fw/pUC Rv 380 bp, ZEO1 Fw/ZEO1 Rv 113 bp, pUC Fw/ZEO1 Rv 229 bp, ZEO1 Fw/pUC Rv 264 bp.

Anexo 23



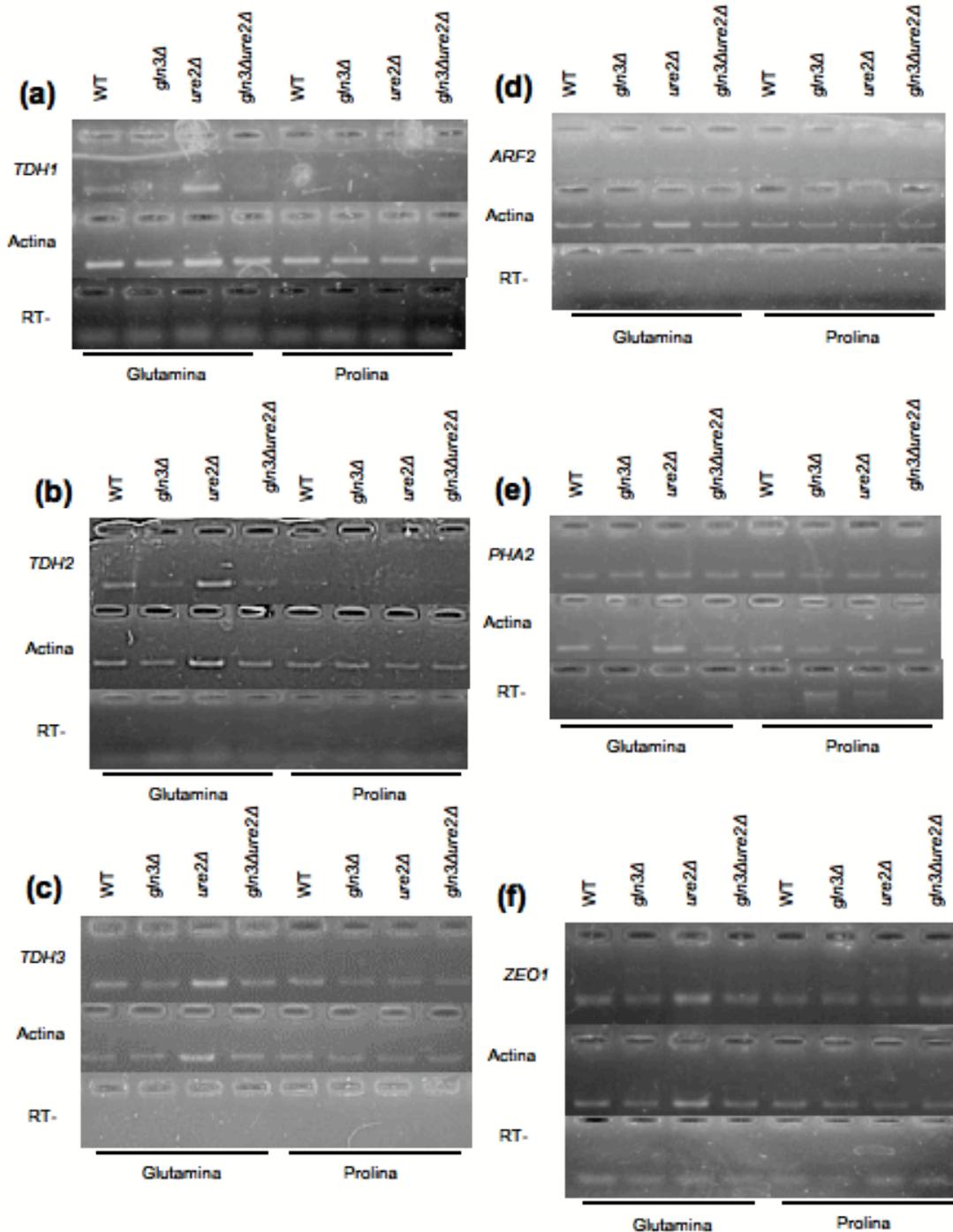
Anexo 23. Amplificaciones sobre las construcciones realizadas para estandarizar condiciones de PCR en tiempo real. (a): Comprobación con los pares de oligonucleótidos específicos a secuencias endógenas del plásmido pGEM-T Easy (pUC Fw/pUC Rv); (b): Con oligonucleótidos específicos a los productos de PCR ligados.

Anexo 24



Anexo 24. Estandarización de ciclos de amplificación lineal para realizar RT-PCR. (a): Se realizó gradiente de ciclos en 3 reacciones de PCR de forma independiente (*,·,°), fueron cargadas en el mismo gel de agarosa para determinar el número de ciclos necesario al cual fuera posible observar una banda clara que no fuera muy difusa ni tampoco estuviera saturada, se determinaron 20 ciclos para el gen actina; (b-c): Gradiente de ciclos para *TDH1*, *TDH2*, *TDH3*, *ARF2*, *PHA2*, *ZEO1*, quedando 20, 20, 18, 30, 30 y 20, respectivamente.

Anexo 25



Anexo 25. Geles representativos de los RT-PCRs. (a-f) gel representativo de las reacciones de RT-PCR para los genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3*; y resultados preliminares de los genes *ARF2*, *PHA2* y *ZEO1*. Los resultados en prolina como fuente de nitrógeno para los genes *ARF2*, *PHA2*, *ZEO1*, *TDH1*, *TDH2* y *TDH3* son de un solo experimento por tal motivo no se discuten en el presente trabajo.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Feldmann H (2006) Yeast Metabolism. Yeast Molecular Biology. Munich: University of Munich.
2. Fitzpatrick DA, Logue ME, Stajich JE, Butler G (2006) A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evol Biol* 6: 99-113.
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, et al. (2002) Molecular Biology of the Cell. New York: Garland Publishing, Inc. 1423 p.
4. Cooper T (2004) 9 Integrated regulation of the nitrogen-carbon interface. *Nutrient-Induced Responses in Eukaryotic Cells: Springer Berlin / Heidelberg*. pp. 1107.
5. Rodrigues F, Ludovico P, Leão C (2006) Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts: Springer Berlin Heidelberg*. pp. 101-121.
6. Godard P, Urrestarazu A, Vissers S, Kontos K, Bontempi G, et al. (2007) Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 27: 3065-3086.
7. Messenguy F, André B, Dubois E (2006) Diversity of Nitrogen Metabolism Among Yeast Species: Regulatory and Evolutionary Aspects. In: Péter G, Rosa C, editors. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts: Springer Berlin Heidelberg*. pp. 123-153.
8. Magasanik B (2005) The transduction of the nitrogen regulation signal in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 16537-16538.
9. Georis I, Feller A, Vierendeels F, Dubois E (2009) The Yeast GATA Factor Gat1 Occupies a Central Position in Nitrogen Catabolite Repression-Sensitive Gene Activation. *Mol Cell Biol* 29: 3803-3815.
10. Cooper T (2002) Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots. *FEMS Microbiol Rev* 26: 223-238.
11. Minehart PL, Magasanik B (1991) Sequence and expression of GLN3, a positive nitrogen regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. *Mol Cell Biol* 11: 6216-6228.
12. Svetlov V, Cooper T (1997) The minimal transactivation region of *Saccharomyces cerevisiae* Gln3p is localized to 13 amino acids. *J Bacteriol* 179: 7644-7652.
13. Svetlov VV, Cooper TG (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* GATA Factors Dal80p and Deh1p Can Form Homo- and Heterodimeric Complexes. *J Bacteriol* 180: 5682-5688.
14. Cunningham TS, Rai R, Cooper TG (2000) The Level of DAL80 Expression Down-Regulates GATA Factor-Mediated Transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 182: 6584-6591.
15. Soussi-Boudekou S, Vissers S, Urrestarazu A, Jauniaux JC, André B (1997) Gzf3p, a fourth GATA factor involved in nitrogen-regulated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 23: 1157-1168.

16. Tate J, Georis I, Feller A, Dubois E, Cooper TG (2009) Rapamycin-induced Gln3 dephosphorylation is insufficient for nuclear localization: Sit4 and PP2A phosphatases are regulated and function differently. *J Biol Chem* 284: 2522.
17. Tate JJ, Georis I, Dubois E, Cooper TG (2010) Distinct Phosphatase Requirements and GATA Factor Responses to Nitrogen Catabolite Repression and Rapamycin Treatment in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 285: 17880-17895.
18. Flores CL, Rodríguez C, Petit T, Gancedo C (2000) Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts¹. *FEMS Microbiol Rev* 24: 507-529.
19. Zaman S, Lippman SI, Zhao X, Broach JR (2008) How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu Rev Genet* 42: 27-81.
20. Nelson DL, Cox MM (2004) *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York: Worth Publishers. 1150 p.
21. Chávez FP, Pons T, Delgado JM, Rodríguez L (1998) Cloning and sequence analysis of the gene encoding invertase (INV1) from the yeast *Candida utilis*. *Yeast* 14: 1223-1232.
22. Tanaka N, Ohuchi N, Mukai Y, Osaka Y, Ohtani Y, et al. (1998) Isolation and Characterization of an Invertase and Its Repressor Genes from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Biophys Res Commun* 245: 246-253.
23. Williamson P, Huber M, Bennett J (1993) Role of maltase in the utilization of sucrose by *Candida albicans*. *Biochem J* 291: 765-711.
24. Avendaño A, Riego L, DeLuna A, Aranda C, Romero G, et al. (2005) Swi/SNF-GCN5-dependent chromatin remodelling determines induced expression of GDH3, one of the paralogous genes responsible for ammonium assimilation and glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 57: 291-305.
25. Ishida C, Aranda C, Valenzuela L, Riego L, DeLuna A, et al. (2006) The UGA3-GLT1 intergenic region constitutes a promoter whose bidirectional nature is determined by chromatin organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 59: 1790-1806.
26. Valenzuela L, Ballario P, Aranda C, Filetici P, Gonzalez A (1998) Regulation of Expression of GLT1, the Gene Encoding Glutamate Synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 180: 3533-3540.
27. Valenzuela L, Aranda C, Gonzalez A (2001) TOR Modulates GCN4-Dependent Expression of Genes Turned on by Nitrogen Limitation. *J Bacteriol* 183: 2331-2334.
28. McAlister L, Holland MJ (1985) Isolation and characterization of yeast strains carrying mutations in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *Journal of Biological Chemistry* 260: 15013-15018.
29. Holland MJ, Yokoi T, Holland JP, Myambo K, Innis MA (1987) The GCR1 gene encodes a positive transcriptional regulator of the enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene families in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7: 813-820.
30. Baker HV (1991) GCR1 of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a DNA binding protein whose binding is abolished by mutations in the CTTCC sequence motif.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88: 9443-9447.
31. Uemura H, Jigami Y (1992) Role of GCR2 in transcriptional activation of yeast glycolytic genes. *Mol Cell Biol* 12: 3834-3842.
 32. Avendaño A, Deluna A, Olivera H, Valenzuela L, Gonzalez A (1997) GDH3 encodes a glutamate dehydrogenase isozyme, a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 179: 5594-5597.
 33. Sosa E, Aranda C, Riego L, Valenzuela L, DeLuna A, et al. (2003) Gcn4 negatively regulates expression of genes subjected to nitrogen catabolite repression. *Biochem Biophys Res Commun* 310: 1175-1180.
 34. Schmitt ME, Brown TA, Trumppower BL (1990) A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 18: 3091-3092.
 35. Brody J, Kern S (2004) Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *BioTechniques* 36: 214-217.
 36. Thomas-Chollier M, Sand O, Turatsinze J-V, Janky Rs, Defrance M, et al. (2008) RSAT: regulatory sequence analysis tools. *Nucleic acids research* 36: W119-W127.
 37. Bysani N, Daugherty JR, Cooper TG (1991) Saturation mutagenesis of the UASNTR (GATAA) responsible for nitrogen catabolite repression-sensitive transcriptional activation of the allantoin pathway genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 173: 4977-4982.
 38. Rai R, Daugherty JR, Tate JJ, Buford TD, Cooper TG (2004) Synergistic operation of four cis-acting elements mediate high level DAL5 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 5: 29-41.
 39. Rai R, Genbauffe F, Lea HZ, Cooper TG (1987) Transcriptional regulation of the DAL5 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 169: 3521-3524.
 40. Cunningham T, Svetlov V, Rai R, Smart W, Cooper T (1996) G1n3p is capable of binding to UAS(NTR) elements and activating transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 178: 3470-3479.
 41. Coffman J, Rai R, Cooper T (1995) Genetic evidence for Gln3p-independent, nitrogen catabolite repression- sensitive gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* [published erratum appears in *J Bacteriol* 1996 Apr;178(7):2159]. *J Bacteriol* 177: 6910-6918.
 42. Coffman JA, el Berry HM, Cooper TG (1994) The URE2 protein regulates nitrogen catabolic gene expression through the GATAA-containing UASNTR element in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 176: 7476-7483.
 43. Scherens B, Feller A, Vierendeels F, Messenguy F, Dubois E (2006) Identification of direct and indirect targets of the Gln3 and Gat1 activators by transcriptional profiling in response to nitrogen availability in the short and long term. *FEMS Yeast Research* 6: 777-791.
 44. Delgado ML, O'Connor JE, Azorin I, Renau-Piqueras J, Gil ML, et al. (2001) The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* TDH1, TDH2 and TDH3 genes are also cell wall proteins. *Microbiology* 147: 411-417.

45. Sherman DJ, Martin T, Nikolski M, Cayla C, Souciet J-L, et al. (2009) Génolevures: protein families and synteny among complete hemiascomycetous yeast proteomes and genomes. *Nucleic Acids Res* 37: D550-554.
46. Prista C, Loureiro-Dias MC (2007) *Debaryomyces Hansenii*, a Salt Loving Spoilage Yeast. In: Pereira MS, editor. *A Portrait of State-of-the-Art Research at the Technical University of Lisbon*. Technical University of Lisbon: Springer Netherlands. pp. 457-464.
47. Barnett JA (2008) A history of research on yeasts 13. Active transport and the uptake of various metabolites. *Yeast* 25: 689-731.
48. Palma M, Goffeau A, Spencer-Martins I, Baret PV (2007) A Phylogenetic Analysis of the Sugar Porters in Hemiascomycetous Yeasts. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 12: 241-248.
49. Carlson M, Botstein D (1983) Organization of the SUC gene family in *Saccharomyces*. *Mol Cell Biol* 3: 351-359.
50. Ferreira C, van Voorst F, Martins A, Neves L, Oliveira R, et al. (2005) A Member of the Sugar Transporter Family, Stl1p Is the Glycerol/H⁺ Symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 16: 2068-2076.
51. Byrne KP, Wolfe KH (2005) The Yeast Gene Order Browser: Combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome Research* 15: 1456-1461.
52. Brown V, Sabina J, Johnston M (2009) Specialized Sugar Sensing in Diverse Fungi. *Current Biology* 19: 436-441.
53. Saliola M, Falcone C (1995) Two mitochondrial alcohol dehydrogenase activities of *Kluyveromyces lactis* are differently expressed during respiration and fermentation. *Molecular and General Genetics MGG* 249: 665-672.
54. Riley MI, Sreekrishna K, Bhairi S, Dickson RC (1987) Isolation and characterization of mutants of *Kluyveromyces lactis*; defective in lactose transport. *Molecular and General Genetics MGG* 208: 145-151.
55. Møller K, Christensen B, Förster J, Piškur J, Nielsen J, et al. (2002) Aerobic glucose metabolism of *Saccharomyces kluyveri*: Growth, metabolite production, and quantification of metabolic fluxes. *Biotechnology and Bioengineering* 77: 186-193.