



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Análisis genómico-funcional de la regulación de la expresión génica por la luz en el hongo *Mucor circinelloides*.

D. Sergio López García

2015

**Análisis genómico-funcional de la regulación de la
expresión génica por la luz en el hongo *Mucor
circinelloides*.**

Trabajo realizado en el Departamento de Genética y Microbiología (Área de Genética) de la Universidad de Murcia, para optar al grado de Doctor en Biología, por el Licenciado **Sergio López García**

Murcia, 6 de Noviembre de 2015



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Victoriano Garre Mula, Profesor Titular de Universidad del Área de Genética y D. Santiago Torres Martínez, Catedrático de Universidad del Área de Genética ambos en el Departamento de Genética y Microbiología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Análisis genómico-funcional de la regulación de la expresión génica por la luz en el hongo *Mucor circinelloides*", realizada por D. Sergio López García, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 5 de Noviembre de 2015

AGRADECIMIENTOS

Lo primero agradecer a mis tutores Víctor y Santiago la oportunidad que me dieron de trabajar con ellos, la paciencia que han tenido conmigo, su esfuerzo y dedicación formándome. Sin ellos esto no sería posible, muchas gracias.

Gracias a mis compañeros y amigos por su apoyo, por toda la ayuda que he recibido de ellos y por todos los cafés juntos, hemos sufrido juntos pero también ha sido divertido. Agradecer muy especialmente a Sebi por su ayuda durante todos estos años.

A mi familia muchas gracias por estar ahí siempre, por apoyarme y sostenerme cuando las cosas han ido mal, pero también por compartir las alegrías y los buenos momentos. Gracias María José por todo lo que me das y me has dado durante estos años.

A todos ellos les dedico este trabajo.

Contenidos

1. Introducción	1
1.1. <i>Mucor circinelloides</i>	1
1.1.1. Características generales.	1
1.1.2. Ciclo de vida.	1
1.1.3. <i>Mucor</i> como modelo de estudio.	3
1.2. La luz como fuente de información ambiental	5
1.3. Fotocarotenogénesis en hongos	7
1.3.1. Carotenos: características principales	7
1.3.2. Biosíntesis	8
1.3.3. Regulación de la síntesis de carotenos	10
1.4. Fototropismo en hongos.....	12
1.5. Fotorreceptores	13
1.6. Los genes <i>white-collar</i>	18
1.6.1. Los genes <i>white-collar</i> de <i>Neurospora crassa</i>	18
1.6.2. Otros genes de <i>N. crassa</i> implicados en la regulación por luz.....	20
1.6.3. Genes regulados por la luz y el complejo WC en <i>N. crassa</i>	20
1.6.4. Genes <i>wc-1</i> en cigomicetos	22
1.6.4. Genes <i>wc-1</i> en <i>Mucor</i>	24
1.7. El gen <i>crgA</i>	27
1.7.1. Características generales	27
1.7.2. Dominio RING-finger	28
1.7.3. Otros dominios presentes en <i>CrgA</i>	29
1.7.4. Funciones de <i>CrgA</i>	31
1.7.5. Genes similares a <i>crgA</i>	32
1.8. Ubiquitilación no degradativa.....	33

1.9. Proteínas con dominio Velvet.....	34
1.9.1. VelB como regulador.....	36
1.9.2. Dominio Velvet.....	37
1.10. Objetivos. De la Tesis.....	37
2. Materiales y Métodos	39
2.1. Estirpes utilizadas	39
2.2. Medios y condiciones de crecimiento	40
2.2.1. Echerichia coli	40
2.2.2. Sacharomyces cerevisiae	40
2.2.3. Mucor circinelloides.	41
2.2.4. Inducción por luz de micelios de <i>Mucor circinelloides</i>	41
2.3. Tampones y reactivos	41
2.4. Transformación de <i>E. coli</i>	47
2.5. Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	47
2.6. Transformación de <i>Mucor</i>	48
2.8. Manipulación del DNA.	48
2.8.1. Aislamiento de DNA de <i>Mucor</i>	48
2.8.3. Tratamiento de DNA con enzimas.....	49
2.8.4. Técnicas electroforéticas.....	50
2.8.5. Amplificación de DNA por PCR.	50
2.8.6. Marcado de fragmentos de DNA.	52
2.8.7. Hibridación de DNA fijado a un soporte.	52
2.8.8. Secuenciación del DNA.	52
2.9. Análisis de secuencias de DNA.....	53
2.10. Plásmidos.....	53
2.10.1. Generación de diferentes alelos de <i>mcwc-1b</i>	56
2.10.2. Generación de los vectores que expresan las diferentes versiones de <i>mcwc-1b</i>	63

2.10. Manipulación del RNA.....	66
2.10.1. Aislamiento de RNA total de <i>Mucor</i>	66
2.10.2. Aislamiento de RNA total para experimentos de Microarrays.....	67
2.10.3. Hibridación de RNA total en micromatrices Agilent y análisis de expresión.....	68
2.10.4. Hibridación de RNA total fijado a un soporte.....	68
2.11. Manipulación de proteínas.....	68
2.11.1. Preparación de extractos de proteínas de <i>Mucor</i>	68
2.11.2. Anticuerpo primario anti-Mcwc-1b.....	69
2.11.3. Inmunoprecipitación de proteínas.....	69
2.12. Inmunodetección de proteínas.....	70
2.12.1. Transferencia de proteínas a membranas.....	70
2.12.2. Revelado de las membranas por inmunodetección.....	70
2.13. Tinción de plata para proteínas.....	71
2.14. Digestión con tripsina.....	71
2.15. HPLC-MS / Análisis MS para proteínas digeridas con tripsina.....	72
3. Resultados.....	75
3.1. Identificación de la lisina ubiquitilada en Mcwc-1b.....	75
3.1.1. Detección de ubiquitina por espectrometría de masa.....	75
3.1.2. Purificación de Mcwc-1b.....	76
3.1.3. Análisis mediante espectrometría de masas de las proteínas purificadas. ...	77
3.2. Mutagénesis dirigida de mcwc-1b.....	79
3.2.1. Transformación de la estirpe nula para <i>mcwc-1b</i> con los alelos mutante y silvestre de <i>mcwc-1b</i>	81
3.2.2 Transformación de la estirpe nula para <i>mcwc-1b</i> con los alelos mutantes de <i>mcwc-1b</i> con un solo cambio.....	85
3.2. Análisis de la interacción entre CrgA y las diferentes E2 de <i>Mucor</i>	87
3.2.1. Doble híbrido de levaduras.....	88
3.3. Identificación de genes regulados por <i>crgA</i> y/o <i>mcwc-1b</i>	90

3.3.1. Diseño experimental	91
3.3.2. Agrupación de los genes dependiendo de su regulación.	91
3.3.3. Validaciones.....	93
3.3.4. Análisis funcional	95
3.4. Análisis del gen <i>velB7</i> con dominio velvet en <i>Mucor</i>	97
3.4.1. Características estructurales del gen <i>velB7</i>	97
3.4.2. Generación de mutantes dobles <i>crgAΔ velB7Δ</i>	102
3.5.3. Fenotipo del doble mutante <i>crgAΔ velB7Δ</i>	103
3.5. Análisis transcriptómico de las respuestas a la luz y de las funciones de los tres genes <i>mcwc-1</i> de <i>Mucor</i>	104
3.5.1. Diseño experimental	105
3.5.2. Análisis de los resultados y agrupación de los genes en función de su expresión.	106
3.5.3. Agrupación de los genes en función de su regulación por la luz y los genes <i>mcwc-1</i>	108
3.5.4. Agrupación de los genes independiente de luz	109
3.5.4. Análisis de las funciones biológicas de los genes regulados por luz.....	110
3.5.5. Validación de los resultados de expresión	111
4. Discusión	115
4.1. Ubiquitilación no degradativa de Mcwc-1b	115
4.2. Genes regulados por la ruta CrgA/Mcwc-1b.....	118
4.3. Funciones de la ruta CrgA/Mcwc-1b.....	119
4.4. Genes <i>velB</i> de <i>Mucor</i>	125
4.5 Análisis de las rutas reguladas por luz y los diferentes genes <i>wc-1</i> de <i>Mucor</i>	126
5. Conclusiones	127
6. Bibliografía	129
7. Anexos	157

Figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Mucor circinelloides</i>	2
Figura 2. Ruta de síntesis de carotenoides en <i>M. circinelloides</i>	9
Figura 3. Principales fotorreceptores y cromóforos.	16
Figura 4. Resumen de genes regulados por luz en <i>N. crassa</i>	22
Figura 5. Proteínas Wc-1 en Zygomycotina.	23
Figura 6. Arquitectura de las proteínas Wc-1 de hongos.	26
Figura 7. Arquitectura de las proteínas de la familia Velvet y LaeA de <i>A. nidulans</i>	36
Figura 8. Comparación de las secuencias silvestre y mutante (sintetizada) de <i>mcwc-1b</i> . ..	59
Figura 9. Construcción del plásmido pMAT1609.	60
Figura 10. Esquema de la construcción de los plásmidos pMAT1613, pMAT1614, pMAT1615 y pMAT1616.	62
Figura 11. Construcción de los plásmidos de expresión con los alelos silvestre y mutante de <i>mcwc-1b</i>	64
Figura 12. Construcción de los vectores de expresión pMAT1620, pMAT1621, pMAT1622 y pMAT1623.	65
Figura 13. Construcción de los vectores de expresión pMAT1624, pMAT1625, pMAT1626 y pMAT1627.	66
Figura 14. Proteínas inmunoprecipitadas utilizando el anticuerpo contra Mcwc-1b. ...	77
Figura 15. Localización de los péptidos identificados por espectrometría de masas en las secuencias de la proteína Mcwc-1b y de la ubiquitina.	79
Figura 16. Alineamiento de las secuencias peptídica de Mcwc-1b de <i>Mucor</i> y de proteínas similares de otros hongos relacionados filogenéticamente.	81
Figura 17. Fenotipos de transformantes que expresan la versión silvestre y mutante de <i>mcwc-1b</i>	83
Figura 18. Contenido de carotenos en las estirpes silvestre (MU241), Mutantes <i>crgAΔ</i> , <i>mcwc-1bΔ</i> y mutantes <i>mcwc-1bΔ</i> complementados con la versión de <i>mcwc-1b</i> silvestre, mutante en 21 lisinas.	84
Figura 19. Fenotipos de transformantes con diferentes alelos de <i>mcwc-1b</i>	85

Figura 20. Fenotipos de transformantes con diferentes alelos de <i>mcwc-1b</i>	86
Figura 21. Contenido de carotenos en las estirpes silvestre (MU241), Mutantes <i>crgA</i> Δ , <i>mcwc-1b</i> Δ y mutantes <i>mcwc-1b</i> Δ complementados con la versión de <i>mcwc-1b</i> silvestre, mutante en 21 lisinas y mutante en la lisina ubiquitilada.....	87
Figura 22. Experimento doble híbrido de levaduras.	90
Figura 23. Diseño experimental del análisis transcritoómico.	91
Figura 24. Relación de genes en cada grupo. Cada gen tan solo está presente en un grupo concreto.	93
Figura 25. Validación de los resultados transcriptómicos de <i>crgA</i> mediante la técnica de Northern-blot.....	95
Figura 26. Porcentajes de funciones con diferencias estadísticamente significativas entre los genes regulados por <i>crgA</i> y genes presentes en el genoma.	97
Figura 27. Secuencias genómica y aminoacídica de la región codificante del gen <i>velB7</i> y de la proteína VelB7.....	98
Figura 28. Filogenia de las proteínas con dominio Velvet en hongos.	100
Figura 29. Alineamiento de los dominios velvet de VelB de hongos.	101
Figura 30. Interrupción del gen <i>velB7</i>	103
Figura 31. Análisis de la producción de esporas del mutante <i>crgA</i> Δ <i>velB7</i> Δ	104
Figura 32. Diseño experimental del análisis transcritoómico.	106
Figura 33. Heatmap de los genes regulados por luz, tanto inducidos como reprimidos.	107
Figura 34. Representación densitométrica de los datos obtenidos mediante <i>northern</i> una vez normalizados respecto al rRNA 28S.....	114
Figura 35. Esquema de la proteína Mcwc-1b.....	117
Figura 36. Ruta resumen de la síntesis de algunos aminoácidos.	121
Figura 37. Diámetro de las colonias de las estirpes silvestre (MU241), Mutante <i>crgA</i> Δ , mutante <i>mcwc-1b</i> Δ y doble mutante <i>crgA</i> Δ <i>mcwc-1b</i> Δ	123

Tablas

Tabla 1. Estirpes de <i>Mucor</i> utilizadas en este trabajo.	39
Tabla 2. Estirpes de <i>E. coli</i> y <i>S. cerevisiae</i> utilizadas en este trabajo	40
Tabla 3. Cebadores específicos utilizados en las reacciones de PCR y en secuenciación	50
Tabla 4. Plásmidos utilizados en este trabajo.	53
Tabla 5. Péptidos identificados por espectrometría de masas	78
Tabla 6. Genes analizados en los estudios de doble híbrido de levadura	89
Tabla 7. Grupos de genes pro <i>crgA</i> y/o <i>mcwc-1b</i>	93
Tabla 8. Análisis funcional de los genes regulados por <i>crgA</i>	96
Tabla 9. Resumen de los genes regulados por la luz y/o los genes <i>mcwc-1</i>	110
Tabla 10. Análisis funcional de los genes regulados por luz.....	111
Tabla 11. Resumen del análisis funcional de los genes regulados por <i>crgA</i>	120
Tabla 12. Genes activados en presencia de CrgA que cifran probables enzimas implicadas en el metabolismo de aminoácidos.....	122
Tabla 13. Genes regulados por <i>crgA</i> que cifran probables Citocromos P45.....	124
Tabla 14. Genes homologos a <i>velB</i> presentes en el genoma de <i>Mucor</i>	126
Tabla S1.	157
Tabla S2.	170

1. Introducción

1.1. *Mucor circinelloides*.

1.1.1. Características generales.

Mucor circinelloides (en adelante *Mucor*) es un hongo filamentosos que presenta una amplia distribución, encontrándose en el suelo y sobre estiércol u otros sustratos orgánicos en descomposición. Pertenece a la clase *Zygomycetes*, caracterizada por tener una reproducción sexual por fusión de gametangios, presentar un micelio generalmente cenocítico (en algunas especies pueden aparecer algunos septos, y producir esporas aflageladas e inmóviles. Se incluye en el orden *Mucorales* porque las esporas vegetativas que produce se desarrollan de forma endógena en unas estructuras conocidas como esporangios, y en la familia *Mucoraceae* porque el esporangio aparece separado del resto del esporangiífero por un septo llamado columela. El género *Mucor*, que da nombre a la familia y al orden, presenta esporangiíferos ramificados en forma de racimos o cimas y esporangios globosos.

1.1.2. Ciclo de vida.

Las especies del género *Mucor* son heterotálicas, con dos tipos sexuales (+ y -), idénticos morfológicamente. Presenta dos ciclos de vida (**Figura 1**):

- 1) Un **ciclo asexual o vegetativo**, que permite una rápida dispersión del organismo. Se caracteriza por la formación de esporas vegetativas o esporangiosporas, que pueden ser uninucleadas, como en *M. hiemalis* (Robinow, 1957), o multinucleadas. Estas esporas maduran en el esporangio, situado en el extremo del esporangiífero. Al germinar, las esporas se hinchan y producen uno o varios tubos germinativos, dando lugar a las hifas que crecen por el ápice y se ramifican para formar el micelio, generalmente cenocítico. En un momento dado estas hifas pueden hacerse aéreas, originando los esporangiíferos (Gooday, 1973).

- 2) Un **ciclo de vida sexual**, que garantiza la recombinación del material genético de las estirpes que participan en él, asegurando así la variabilidad genética de la especie. Tiene lugar cuando se encuentran dos micelios de diferente tipo sexual, lo que provoca la inhibición de la formación de esporangióforos, la inducción de β -caroteno y la diferenciación de hifas sexuales, los zigóforos.

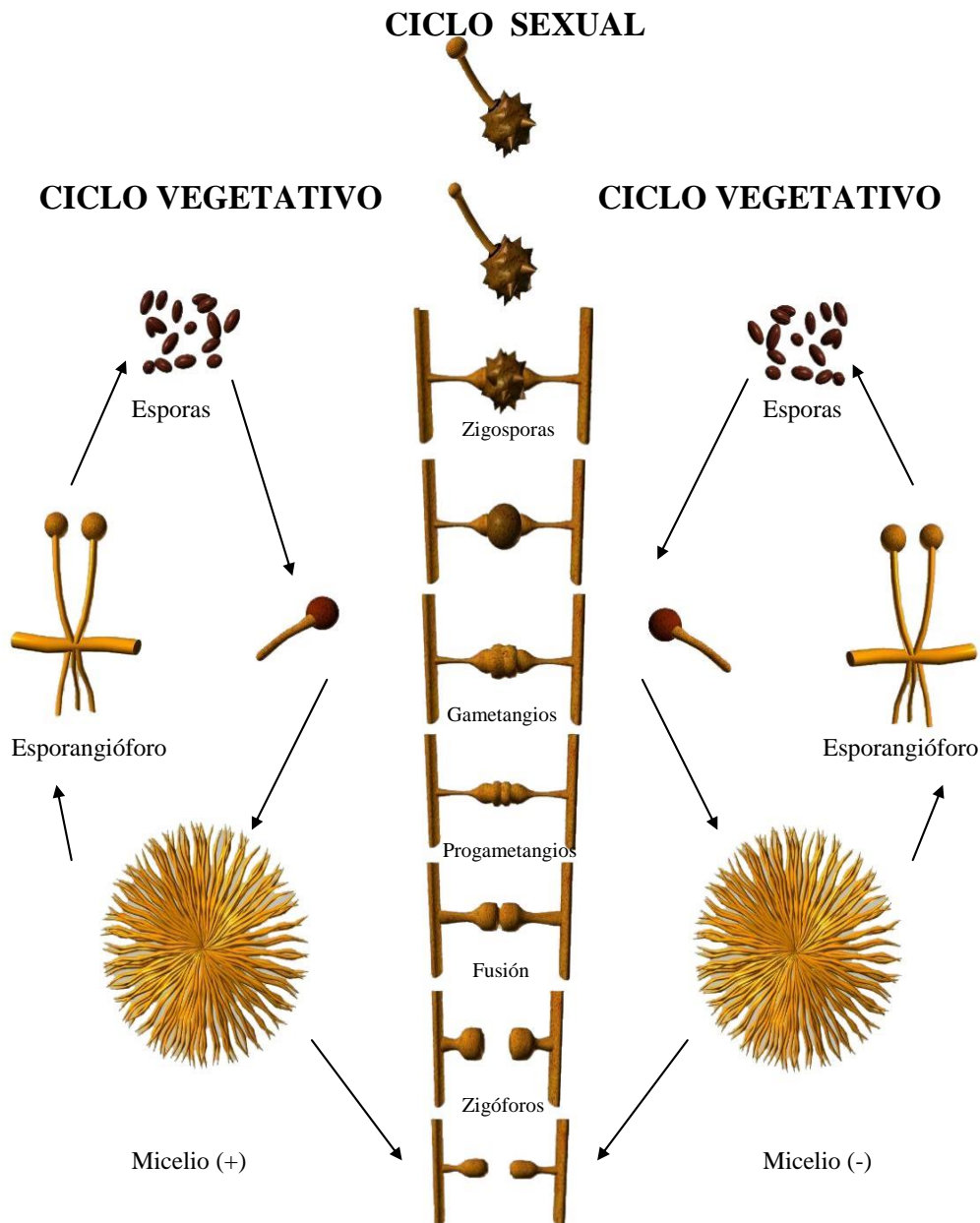


Figura 1. Ciclo de vida de *Mucor circinelloides*.

Estos se fusionan, generalmente por el ápice, y dan lugar a los progametangios, que presentan un septo que los separa del resto de la hifa sexual. La pared localizada en la zona

de fusión degenera, mezclándose los citoplasmas (plasmogamia), mientras el resto de la pared se engrosa y se depositan compuestos como la esporolenina, polímero de carotenoides oxidados (Gooday *et al.*, 1973), y melanina, que protegen a la zigospora. En ella se produce la fusión de núcleos de distinto tipo sexual (cariogamia), aunque la mayor parte de los núcleos englobados degenera. De los cuatro productos meióticos posibles, sólo uno sobrevive. Tras un período de latencia, variable según la especie, la zigospora germina dando lugar a un germosporangio que contiene los productos de la meiosis, las germosporas. En el caso de *Mucor*, nunca se ha observado la germinación de la zigospora en laboratorio.

1.1.3. *Mucor* como modelo de estudio.

Mucor es un organismo ideal para el estudio de la síntesis de metabolitos secundarios, respuestas a la luz, silenciamiento génico, síntesis de lípidos, dimorfismo y mucormicosis. Contiene un genoma pequeño de 36,6 megabases (*Mucor* CBS277.49; <http://genome.jgi-ps.org/Mucci2/Mucci2home.html>), que incluye 11719 genes, y ofrece fácil manejo y rápido crecimiento en el laboratorio. Sin embargo, su principal ventaja es la existencia de un sistema eficaz de transformación genética, que permite la introducción de DNA exógeno (van Heeswijk, 1984; van Heeswijk y Roncero, 1984; Gutiérrez *et al.*, 2011; Torres-Martínez *et al.*, 2012). Se han desarrollado vectores autorreplicativos con este fin, capaces de complementar mutaciones auxotróficas presentes en distintas estirpes de *Mucor* (Roncero *et al.*, 1989; Anaya y Roncero, 1991; Benito *et al.*, 1995; Torres-Martínez *et al.*, 2012), y que requieren presión selectiva para su mantenimiento en el hongo. Se han desarrollado también procedimientos para la integración, por recombinación homóloga, de fragmentos lineales de DNA en los cromosomas de *Mucor*, permitiendo tanto la generación de mutantes nulos por reemplazamiento génico (Navarro *et al.*, 2001), como la integración en un locus concreto (*carRP*) de construcciones génicas para sobreexpresar genes de forma estable (Rodríguez-Frómata *et al.*, 2012). Así mismo, se ha desarrollado una estrategia basada en la transferencia de DNA mediada por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (Nyilasi *et al.*, 2005), aunque su uso ha sido muy esporádico. Finalmente, el descubrimiento del fenómeno de silenciamiento génico en *Mucor* (Nicolás *et al.*, 2003) ha supuesto la incorporación de una nueva herramienta molecular que permite el estudio de la función génica sin necesidad de generar mutantes nulos (Nicolás *et al.*, 2008).

Introducción

El conjunto de herramientas moleculares descritas ha convertido a *Mucor* en la especie, dentro de los cigomicetos, con el mayor repertorio de recursos moleculares para analizar la función génica, a pesar de no haberse establecido las condiciones de laboratorio adecuadas para llevar a cabo cruzamientos. Esta característica y, sobre todo, su posible utilización para la producción de biocarburantes (Vicente *et al.*, 2009; Vicente *et al.*, 2010), influyó decisivamente para que el Joint Genome Institute, dependiente del Departamento de Energía de Estados Unidos, aprobase en 2007 un proyecto liderado por nuestro grupo de investigación para secuenciar el genoma de *Mucor*. La disponibilidad de la secuencia del genoma ha acelerado las investigaciones en *Mucor* al simplificar procedimientos experimentales y ha abierto la posibilidad de nuevas aproximaciones experimentales basadas en técnicas de genómica, transcriptómica y proteómica.

Un proceso de gran interés estudiado en *Mucor* es el silenciamiento génico. El silenciamiento génico mediado por RNA es un complejo mecanismo de regulación génica conservado en el mundo eucariota. Este mecanismo promueve la supresión de la expresión génica mediada por pequeñas moléculas de RNA que inducen la destrucción del mRNA, impiden su traducción o inhiben su transcripción. Nuestro grupo de investigación ha identificado los genes implicados en la ruta de silenciamiento y ha generado mutantes afectados en cada uno de ellos, permitiendo caracterizar la función de cada uno de los genes en este mecanismo. Así, se han identificado dos genes *dicer*, uno de los cuales, *dicer2*, juega un papel principal en la inducción del silenciamiento en respuesta a transgenes y en la producción de los dos tipos de siRNAs asociados al mismo (de Haro *et al.*, 2009), mientras que el otro, *dicer1*, en cambio, no parece tener una función relevante en este procesos (Nicolás *et al.*, 2007).

También se han identificado tres genes, *ago-1*, *ago-2* y *ago-3*, que cifran proteínas Argonauta. Estas proteínas son el componente principal del complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*), ya que unen las moléculas de siRNAs que le sirven como guía para bloquear la traducción o degradar los mRNAs diana. Sólo los mutantes en el gen *ago-1* están afectados en el silenciamiento inducido por transgenes, mientras que los mutantes nulos en los otros dos genes, *ago-2* y *ago-3*, presentan fenotipos silvestres para esta respuesta. Por otro lado, se han identificado tres genes de polimerasas de RNA dependientes de RNA (*rdrp*). Los mutantes nulos para *rdrp1* indican que este gen cumple un papel fundamental en la inducción del silenciamiento por transgenes “con sentido”, sugiriendo que la actividad

RdRP1 convierte moléculas de RNA de cadena sencilla derivadas del transgen en RNA de doble cadena (dsRNA). Por el contrario, este gen no parece jugar un papel esencial en la amplificación del silenciamiento a partir de las moléculas de mRNA de los genes diana. La obtención de mutantes nulos para este gen y su análisis fenotípico indica que *rdrp2* desempeña también un papel fundamental en el mecanismo de silenciamiento, tanto si éste se induce por transgenes “con sentido” como por dsRNA, lo que sugiere una función relacionada con el proceso de amplificación.

1.2. La luz como fuente de información ambiental

La luz es una de las principales señales ambientales para los seres vivos. La reproducción sexual y asexual, el desarrollo vegetativo, el reloj circadiano y la producción de pigmentos son procesos esenciales y dependientes de la luz en hongos (Bahn *et al.*, 2007). De entre todas las longitudes de onda, la luz azul controla la mayoría de procesos identificados en hongos (Cerdá-Olmedo, 2001; Liu *et al.*, 2003).

La señal luminosa proporciona información vital sobre el ambiente que rodea al organismo. La capacidad de percibir la luz apareció tempranamente en la historia evolutiva, probablemente como parte de un mecanismo de protección frente a la radiación UV. Sin embargo, la gran variedad de proteínas fotorreceptoras existente en procariotas y arqueas apunta hacia una diversificación de funciones ya en esos reinos (Krauss *et al.*, 2009).

La luz permite a *Mucor* ‘detectar’ si se encuentra en el interior de un animal (Idnurm and Heitman, 2005), o si está creciendo en una superficie óptima para la dispersión de las esporas, pudiendo dirigirlas hacia zonas con mayores probabilidades de supervivencia (Corrochano and Garre, 2010, Purschwitz *et al.*, 2006). Además, las principales transiciones en los ciclos de vida de los hongos están, en mayor o menor medida, reguladas por la luz, como es el caso de la germinación y la dispersión de esporas, la extensión y ramificación de las hifas o la formación de las estructuras reproductoras (Corrochano, 2007). La capacidad de percibir cambios en la iluminación se habría seleccionado por las mejoras en la supervivencia, en la capacidad de dispersión y/o en el éxito reproductivo. En definitiva la luz es un estímulo importante para la supervivencia y eficacia de los hongos.

Introducción

La luz también viene asociada a ciertos efectos negativos como los provocados por el rango de los ultravioleta. Tanto las radiaciones UVB (280-315 nm) como las UVA (315-400 nm) pueden ocasionar daños en las proteínas, en los lípidos y en el DNA.

La defensa contra la luz UV es especialmente importante para organismos sésiles, ya que no pueden desplazarse hacia zonas con menor exposición solar. Los mecanismos de prevención y reparación aparecen pronto en el repertorio evolutivo, y los hongos no son una excepción a la regla (Borkovich *et al.*, 2004, Herrera-Estrella and Horwitz, 2007). En el ascomiceto *Trichoderma harzianum* se ha estudiado el gen de la fotoliasa Phr1, una enzima que utiliza la energía de la luz para reparar dímeros de pirimidina tipo ciclobutano (CPD) en el DNA. El gen *phr1* pertenece al grupo de inducción temprana por luz, expresándose a los pocos minutos de la iluminación. En el modelo propuesto, la luz azul actuaría como señal de aviso frente a daño inminente por UV, sintetizándose Phr1 que quedaría disponible para la célula en caso de lesiones (Berrocal-Tito *et al.*, 1999; Berrocal-Tito *et al.*, 2000).

Por otro lado, existe una gran cantidad de metabolitos secundarios capaces de absorber en el espectro UV. Algunos de ellos se postulan como agentes protectores contra el UV, aunque esta función no se haya comprobado en muchos de los casos. Ejemplos de compuestos de defensa contra el UV son las melaninas (típicas de animales y también de hongos), los fenilpropanoides y flavonoides (plantas), las escitoneminas (cianobacterias) y las micosporinas (hongos y organismos marinos) (Gao and Garcia-Pichel, 2011; Garcia-Pichel, 1994; Shick and Dunlap, 2002). En microorganismos, considerando el tamaño de la célula, suele ser necesaria una gran cantidad de pigmento para conceder protección, lo que supone un alto coste energético (Garcia-Pichel, 1994). No es de extrañar, por tanto, que su producción esté regulada por luz, sintetizándose solo cuando son necesarios.

Otros compuestos secundarios no absorben mayoritariamente en el ultravioleta, pero confieren resistencia a la luz UV igualmente. Entre estos compuestos se encuentran los carotenos, que son producidos por muchos hongos, como *Mucor* que acumula β -caroteno en respuesta a la luz. Se cree que los carotenos actúan de forma indirecta, ya que son muy eficientes neutralizando compuestos fotosensibilizados (Foote and Denny, 1968; Krinsky, 1979; Moore *et al.*, 1989). En *Neurospora crassa* y en las levaduras *Sporobolomyces ruberrimus*, *Cystofilobasidium capitatum* y *Rhodotorula mucilaginosa*, las estirpes sin carotenos son más sensibles a la radiación UVB, por lo que estos compuestos sí parecen

tener función protectora en hongos (Moline *et al.*, 2009; Moore *et al.*, 1989; Morris and Subden, 1974).

1.3. Fotocarotenogénesis en hongos

1.3.1. Carotenos: características principales

Los carotenoides constituyen uno de los grupos de pigmentos más extendidos en la naturaleza. Se encuentran en la mayoría de los organismos fotosintéticos, así como en algunos organismos no fotosintéticos (bacterias y hongos) a los que dan su color característico. Los animales no los pueden sintetizar, pero sí pueden transformar los que incorporan en su dieta. Los carotenos son ampliamente usados como colorantes en alimentación, en la industria farmacéutica o como suplementos en alimentos animales y recientemente se les ha asignado un papel en la prevención del cáncer (Goodwin, 1980; Nishino, 1995).

En organismos fotosintéticos se encuentran asociados, junto con clorofilas y bacterioclorofilas, a proteínas de membrana (Britton, 1993; Kühlbrandt *et al.*, 1994), formando parte de los complejos antena, donde actúan como pigmentos accesorios de la fotosíntesis. Absorben luz entre 400 y 500 nm y transfieren la energía luminosa a las moléculas de clorofila que, a su vez, la canalizan hacia los centros de reacción. En organismos no fotosintéticos, están unidos a la membrana celular, a proteínas del citoplasma o a estructuras citoplasmáticas como cristales y fibrillas (Goodwin, 1980; Britton, 1983; Deruère *et al.*, 1994). Tanto en estos organismos como en los fotosintéticos actúan como agentes protectores contra los efectos nocivos de la radiación luminosa. En estudios recientes atribuyen funciones de señalización a derivados de carotenoides, regulando procesos tan importantes como el propio crecimiento y desarrollo de la planta (Van Norman *et al.*, 2004; Van Norman and Sieburth, 2007; Tian, 2015).

En mamíferos, los productos de la transformación de determinados carotenos tienen funciones esenciales en nutrición (vitamina A), visión (retinol) y desarrollo (ácido retinoico). También contribuyen a la pigmentación de aves, peces y crustáceos (Britton, 1983). En plantas son también utilizados para la síntesis de otras moléculas, como es el caso del ácido abscísico (Rock y Zeevart, 1991).

Los carotenoides son terpenoides de 40 átomos de carbono formados por ocho unidades de isopreno. La estructura básica sufre un número variable de deshidrogenaciones, ciclaciones en uno o en ambos extremos y adición de varios grupos funcionales. Todas estas modificaciones dan lugar a las aproximadamente 600 variedades de carotenos encontrados en la naturaleza.

Hay dos tipos principales de carotenoides: los carotenos, que son hidrocarburos, por lo que no contienen oxígeno, y las xantofilas, que contienen diversos radicales oxigenados. El número de dobles enlaces conjugados y el estado de isomerización de la estructura básica (cadena de polieno) determina las propiedades de absorción de cada carotenoide. Los que tienen siete o más dobles enlaces conjugados absorben luz visible.

1.3.2. Biosíntesis

Los primeros pasos de la ruta de síntesis de carotenoides son comunes a los de otros isoprenoides (**Figura 2**). El precursor común es el ácido mevalónico, que se sintetiza vía acetil-CoA, aunque se ha descrito una ruta alternativa a partir de valina y leucina en algunos organismos (Goodwin, 1980). Éste es convertido en isopentenilpirofosfato (IPP), una molécula de 5 carbonos, mediante dos fosforilaciones y una descarboxilación. El isopentenilpirofosfato y un isómero suyo, el dimetilpirofosfato (DMPP), se condensan para dar lugar al geranilpirofosfato (GPP), molécula de 10 átomos de carbono. La transferencia secuencial de dos moléculas de isopentenilpirofosfato produce en primer lugar farnesilpirofosfato (FPP) y finalmente geranilgeranilpirofosfato (GGPP), con 20 carbonos. La condensación de dos de estas moléculas es la primera reacción específica de la ruta de síntesis de carotenos y origina un intermediario inestable, el prefitoeno pirofosfato (PPPP), de 40 átomos de carbono. La pérdida de un protón de esta molécula conduce a la aparición del primer caroteno de la ruta, el fitoeno, que absorbe a longitudes de onda dentro de la región del ultravioleta del espectro luminoso. Según el protón que se pierda, se producen dos isómeros, el 15-cis fitoeno o el todo-trans fitoeno (Goodwin, 1980).

En la mayoría de las eubacterias y en hongos, las cuatro deshidrogenaciones necesarias para convertir el fitoeno en licopeno son llevadas a cabo por una única enzima deshidrogenasa de fitoeno. El aumento en el número de dobles enlaces conjugados, resultado de estas deshidrogenaciones, desplaza el espectro de absorción hacia mayores longitudes de onda, dando lugar a una coloración amarilla o naranja. Las reacciones posteriores

(deshidrogenaciones, ciclaciones, metilaciones, glicosilaciones) dan lugar a la amplia variedad de carotenoides que se encuentran en la naturaleza.

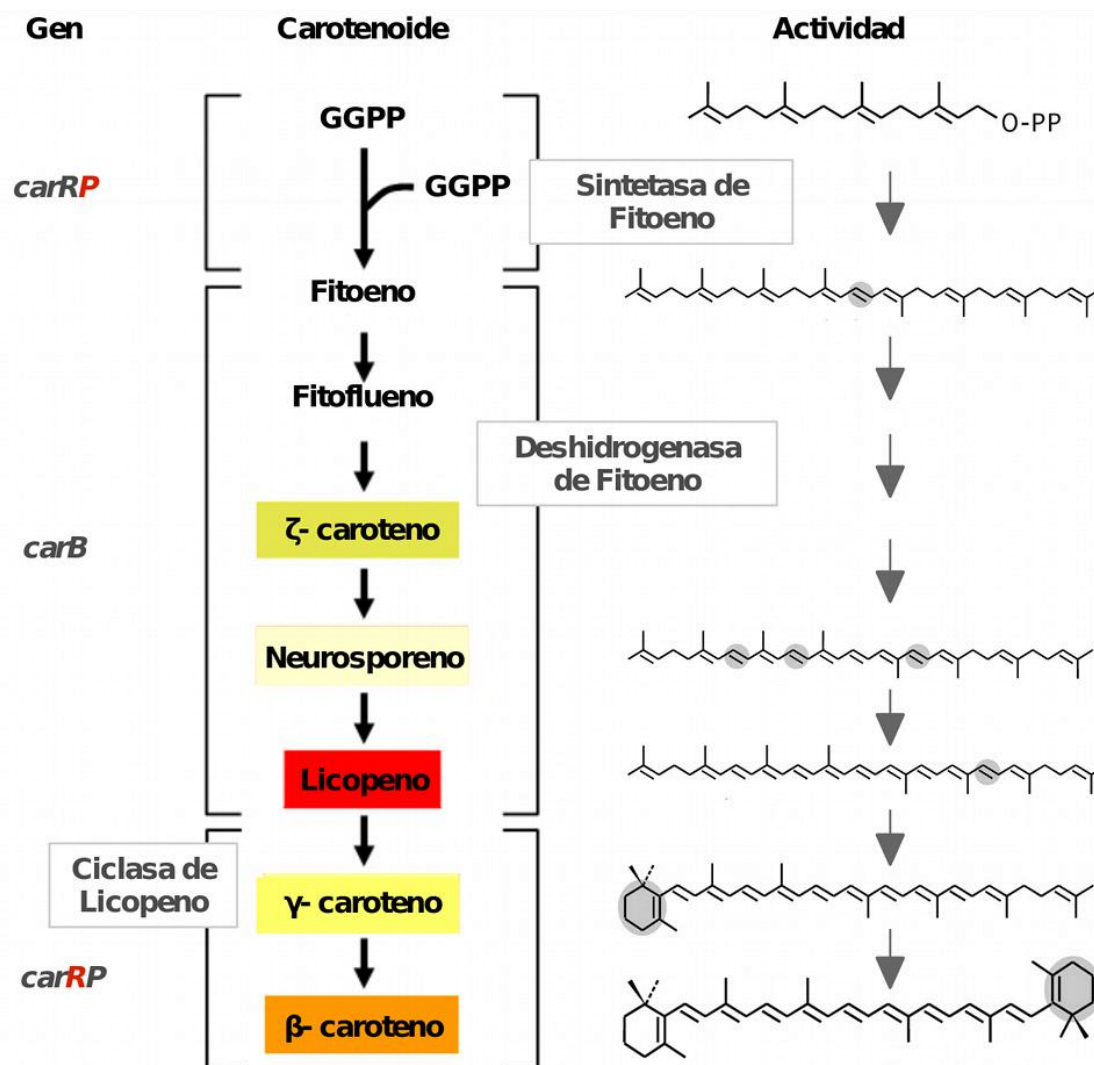


Figura 2. Ruta de síntesis de carotenoides en *M. circinelloides*.

La primera reacción específica de la ruta de síntesis de carotenos, consistente en la unión de dos moléculas de GGPP, es catalizada por la actividad sintasa de la enzima bifuncional CarRP y origina un intermediario inestable, el prefitoeno pirofosfato (PPPP, C40), que se transforma en fitoeno (Goodwin *et al.*, 1980). Las reacciones posteriores deshidrogenaciones son llevadas a cabo por la enzima CarB y las reacciones finales de ciclación por la actividad ciclasa de CarRP. Los cambios en cada paso se señalan en gris sobre la estructura del compuesto. Las estructuras mostradas están basadas en Estrada y Avalos, 2009 y el esquema de la ruta está tomado de la tesis doctoral de Fátima Silva (Silva, 2013).

1.3.3. Regulación de la síntesis de carotenos

La síntesis de carotenoides en hongos está regulada tanto por factores exógenos como endógenos, tales como la interacción sexual entre estirpes de sexo opuesto, la acumulación de producto final o diversos agentes químicos (revisado por Cerdá-Olmedo, 1987; Avalos *et al.*, 1992). Sin embargo, es la luz el estímulo externo que regula la síntesis de carotenoides en una mayor variedad de organismos. En muchos hongos y bacterias no fotosintéticas, la carotenogénesis es activada por luz azul. En algunos organismos, la luz es absolutamente necesaria para que se active la ruta de síntesis de carotenoides, mientras que en otros produce un incremento del nivel de carotenoides presentes en la oscuridad (Bramley y Mackenzie, 1988; Sandmann, 1994). Algunos de los ejemplos más significativos en hongos son la acumulación de neurosporaxantina en *Fusarium aquaeductum*, *N. crassa* y *Gibberella fujikuroi*, de tolureno en *Rhodotorula minuta* y de β -caroteno en *P. blakesleeanus* y *Mucor* (revisado por Cerdá-Olmedo y Corrochano, 1996). La inducción de la biosíntesis de carotenos por la luz ha sido estudiada con detalle en *N. crassa*, *P. blakesleeanus* y *Mucor*.

En *N. crassa*, los genes estructurales carotenogénicos *al-1*, *al-2* y *al-3* se encuentran entre el 5,6 % de los genes que están regulados por luz (Chen *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2003; Nelson *et al.*, 1989). Mutantes en estos loci presentan micelios de color blanco (albinos), en contraste con el color anaranjado de los silvestres. El gen *al-1* cifra la deshidrogenasa de fitoeno (Schmidhauser *et al.*, 1990), el gen *al-2* la enzima bifuncional sintetasa de fitoeno y ciclase de 3-4 dihidrolicopeno (Arrach, 2001; Schmidhauser *et al.*, 1994), y *al-3* corresponde a la geranilgeranil pirofosfato sintetasa (Carattoli, 1991; Nelson *et al.*, 1989, Sandmann *et al.*, 1993). Los tres están regulados por la luz y pertenecen al grupo de genes de respuesta temprana: su expresión es muy baja en oscuridad y aumenta rápidamente tras la iluminación (luz azul), alcanzándose el pico de inducción en 20-30 minutos (Linden *et al.*, 1997a, Nelson *et al.*, 1989). La activación de la transcripción de los genes *al-1*, *al-2* y *al-3* por la luz depende de *wc-1* y *wc-2* (Linden *et al.*, 1997b, Nelson *et al.*, 1989, Talora *et al.*, 1999) (Ver apartado 1.6)

En *P. blakesleeanus* se han identificado y clonado los genes estructurales *carB*, que cifra la enzima deshidrogenasa de fitoeno, y *carRA*, que cifra la enzima bifuncional responsable de las actividades ciclase de licopeno y sintetasa de fitoeno. Los dos genes, *carB* y *carRA*, están estrechamente ligados y se transcriben de forma divergente a partir de una

zona reguladora común. En esta región, de 1381 pb, es probable que se encuentren secuencias implicadas en la regulación por la luz, similares a las que existen en *N. crassa* (Arrach, 2001; Carattoli, 1995; Ruiz-Hidalgo *et al.*, 1997; Sanz *et al.*, 2010; Sanz *et al.*, 2011). Además de estos genes, el aislamiento de mutantes en la carotenogénesis, afectados en la respuesta a la luz y en otras rutas, han permitido localizar varios genes reguladores (Bramley and Mackenzie, 1992; Cerdá-Olmedo, 1985; Avalos, 1992). El modelo general propuesto se resume la (Almeida and Cerdá-Olmedo, 2008). Entre éstos se encuentran, los genes *carS* y *carD* que participan en la regulación por producto final (Bejarano *et al.*, 1988; Salgado *et al.*, 1989), ya que sus mutantes acumulan mayor cantidad de carotenos, tanto en luz como oscuridad, aunque siguen respondiendo a la inducción por luz (Cerdá-Olmedo and Lipson, 1987; Murillo and Cerda-Olmedo, 1976; Eslava *et al.*, 1974). Por otro lado, los mutantes en el gen *carF* presentan el mismo fenotipo superamarillo, pero no responden a la iluminación con luz azul. El gen *carF* no parece estar implicado en la regulación por producto final, y sus mutaciones ejercen un efecto sinérgico junto con las de *carS* (Mehta *et al.*, 1997). Adicionalmente, la pérdida de función de los genes *carC*, *carI*, *picA*, *picB* y *pim-3* inhibe la síntesis de carotenos por la luz en mayor o menor grado (Cerdá-Olmedo, 2001). De todos estos genes, solo se ha caracterizado molecularmente *carS*, que cifra una oxigenasa que corta el β -caroteno produciendo apocarotenoides, algunos de los cuales deben ser capaces de inhibir la síntesis de carotenos (Tagua *et al.*, 2012).

A la lista anterior hay que añadir los mutantes en los genes *madA* y *madB*, los homólogos de *wc-1* y *wc-2*, que son deficientes en la inducción de la fotocarotenogénesis. *P. blakesleeanus* posee tres copias de genes *wc-1* (*madA*, *wcoA* y *wcoB*), pero todas las respuestas a la luz estudiadas por el momento dependen solo de *madA* (Idnurm *et al.*, 2006, Sanz *et al.*, 2009).

En la zona reguladora común de los genes *carB* y *carRA*, se ha observado la unión de un complejo en la oscuridad, denominado HMC, cuya formación depende, directa o indirectamente, de las proteínas CarB, CarRA y CarS. Se trataría de un complejo represor de la carotenogénesis dependiente de producto final, desvinculado de la luz, ya que las proteínas MadA y MadB, no son necesarias para su constitución (Sanz *et al.*, 2010).

En *Mucor* también se han clonado los genes estructurales *carB*, y *carRP*, que son los ortólogos a los genes *carB* y *carRA*, respectivamente, de *P. blakesleeanus*. Además, la

disposición de los genes en el genoma es similar en ambos hongos, aunque la región promotora común es de solo 446 pb en *Mucor* (Velayos *et al.*, 2000a, Velayos *et al.*, 2000b). Esta disposición también se encuentra en el cigomiceto *Blakeslea tripora* (Rodríguez-Saiz *et al.*, 2004), por lo que parece exclusiva de cigomicetos, ya que en otros hongos, como *N. crassa* o *Fusarium fujikuroi*, los genes homólogos se disponen en un mismo cromosoma pero, o están en la misma orientación o separados por otros genes (Linnemannstöns *et al.*, 2002).

La regulación de la síntesis de carotenos en *Mucor* también está regulada por genes *wc-1*, pero en este hongo presenta tres genes, *mcwc-1a*, *mcwc-1b* y *mcwc-1c*, de los que *mcwc-1b* y *mcwc-1c* están implicados en la regulación, aunque a distintos niveles y con diferentes mecanismos (Silva *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2008). Los mecanismos de regulación de estos genes se analizan con detalle en el apartado 1.6.7. En la regulación de la biosíntesis de carotenos participa un tercer gen, denominado *crgA* (*carotenogenic regulatory gene*), que actúa como represor de la carotenogenesis (Navarro *et al.*, 2001; Navarro *et al.*, 2000) al bloquear la función de la proteína *Mcwc-1b* (Silva *et al.*, 2008). El papel de la proteína *CrgA* se trata con más detalle en el apartado 1.7. En este organismo también se han aislado mutantes afectados en la regulación de la síntesis de carotenos (Navarro *et al.*, 1995), que no presentan mutaciones en los genes reguladores conocidos y que, por tanto, definen elementos reguladores de la carotenogenesis adicionales (Eusebio Navarro, comunicación personal),

1.4. Fototropismo en hongos

Aunque la mayoría de estudios moleculares sobre el fototropismo se ha realizado en plantas, los estudios en hongos también han contribuido al conocimiento de las bases fisiológicas y moleculares de esta respuesta a la luz. En este sentido, los esporangióforos del cigomiceto *P. blakesleeanus*, que consisten en una sola célula cilíndrica que puede llegar a alcanzar hasta 10 cm de longitud, se han utilizado como modelo de fototropismo desde los años 30 debido a su gran tamaño (Bergman *et al.*, 1969). Además de responder a la luz, los esporangióforos también reaccionan a otras señales, como la gravedad, el contacto y la presencia de objetos cercanos (Cerdá-Olmedo, 2001). En este hongo, la respuesta fototrópica se aprecia en tan solo 5 minutos, abarcando intensidades de luz desde 10^{-9} a 10 W/m² (Galland, 1990). La luz azul y el UV cercano producen fototropismo positivo (curvatura hacia la luz), mientras que el UV lejano provoca fototropismo negativo. Por otro lado, la

luz roja por encima de 600 nm no genera ningún fototropismo, pero puede modular la respuesta a la luz azul (Galland, 1998).

Cuando los esporangióforos crecen en la oscuridad se aprecian dos fases, una temprana y otra tardía, con distintos periodos de latencia y cinéticas, que dependen de la intensidad de luz utilizada (alta o baja) (Galland and Lipson, 1987). Ambas respuestas se diferencian también en las longitudes de onda a las que son sensibles y en sus cinéticas de adaptación. Debido a estas y otras observaciones, se postuló la necesidad de, al menos, dos fotosistemas, uno sensible a bajas intensidades (por debajo de 10^{-6} W/m²) y otro a altas (por encima de los 10^{-6} W/m²) (Galland and Lipson, 1987).

El fototropismo en plantas, estudiado principalmente en tallos de plántulas y en raíces primarias de *Avena sativa* y *Arabidopsis thaliana*, está regulado por complejas interacciones entre varios fotosistemas distintos, con las fototropinas en los roles principales (Pedmale *et al.*, 2010). Sin embargo, a pesar de utilizar el mismo dominio sensor que los fotorreceptores del hongo (dominio LOV), las fototropinas poseen un dominio efector de tipo Ser/Thr quinasa, mientras que las proteínas de hongos presentan dominios zinc-finger. Debido a ello, es probable que los pasos aguas abajo en la cascada de transducción sean diferentes. Sin embargo, la complejidad de las respuestas observadas en el esporangióforo de *P. blakesleeanus* apoya la existencia de una regulación basada en interacciones entre varios fotorreceptores distintos, de manera similar a lo que se observa en plantas (Cerdá-Olmedo, 2001; Galland and Lipson, 1987). Los esporangióforos de *Mucor* presentan fototropismo positivo a la luz azul y verde. El fototropismo en *Mucor* está controlado por el fotorreceptor Mcwc-1a

1.5. Fotorreceptores

Los fotorreceptores están constituidos por una apoproteína y un cromóforo unido que es el que detecta la luz (Herrera-Estrella and Horwitz, 2007). El retinal, los tetrapirroles y las flavinas forman los tres grupos principales de cromóforos conocidos hasta ahora. Estos compuestos se asocian a apoproteínas para formar los fotorreceptores (Herrera-Estrella and Horwitz, 2007) (**Figura 3**)

Las proteínas fotorreceptoras estudiadas hasta el momento pueden dividirse en seis familias: rodopsinas, fitocromos, proteínas PYP (xantopsinas), criptocromos, proteínas con

dominio LOV (tipo LOV) y proteínas BLUF (**Figura 3**). La tipo LOV, regula la mayoría de respuestas a la luz en hongos (Purschwitz *et al.*, 2006), el cromóforo al que se unen es de tipo flavina (van der Horst and Hellingwerf, 2004). Recientemente se ha descrito una nueva familia de proteínas fotorreceptoras que regulan la expresión génica explotando la capacidad de la vitamina B12 para responder a la luz, revelando así una nueva faceta funcional de esta vitamina como cromóforo (Ortiz-Guerrero *et al.*, 2011).

El modo de acción de los fotorreceptores se basa principalmente en cambios en la estructura del cromóforo al recibir el estímulo luminoso. Las modificaciones afectarían a los residuos en la zona de unión a la apoproteína, provocando cambios conformacionales y modulando las interacciones con componentes aguas abajo de la cascada de transducción, o liberando inhibiciones en los dominios de señalización (Zoltowski and Gardner, 2011). El estímulo luminoso genera una serie de cambios estructurales, pasando de un estado inactivo a activo y volviendo al estado inactivo después de un tiempo, dependiendo del fotorreceptor.

Dependiendo del rango de luz que detectan, los fotorreceptores pueden dividirse en tres grupos: sensores de luz azul, de luz roja y de luz verde. En esta revisión bibliográfica solo se van a describir los receptores de luz azul, ya que son los estudiados en esta tesis.

En eucariotas los sensores de luz azul contienen flavinas como cromóforos, ya sean FMN (flavin mononucleótido) o FAD (flavin dinucleótido). Existen dos tipos principales de fotorreceptores, los criptocromos y las proteínas con dominios LOV (Cheng *et al.*, 2003).

El dominio LOV pertenece a la familia PAS (PER-ARNT-SIM), de funciones muy diversas, principalmente asociadas con la transducción de señales (Taylor and Zhulin, 1999). Concretamente, los dominios PAS/LOV están especializados en la recepción de luz. Fueron inicialmente identificados en fototropinas de plantas, denominándose LOV por su parecido a dominios sensores de luz, oxígeno y voltaje presentes en otros eucariotas y procariotas (Christie *et al.*, 1999). El uso del término 'LOV' se reserva para los dominios PAS fotosensibles que unen flavina como cromóforo (FAD o FMN) (Crosson *et al.*, 2003). Se encuentran en proteínas fotosensoras de bacterias, plantas, microalgas y hongos (Krauss *et al.*, 2009), asociados a múltiples dominios efectores, como quinasas, fosfodiesterasas, dominios F-box, STAS (Sulphate Transporter and Anti-Sigma factor antagonist) y dedos de zinc (Crosson *et al.*, 2003).

La estructura característica de los dominios LOV consiste en una hoja- β , formada por 5 láminas- β en orden 2-1-5-4-3, con hélices- α intercaladas y caps en los extremos N- y/o C-terminales. (Crosson and Moffat, 2001; Losi and Gärtner, 2011). Esta estructura, así como los 11 residuos clave para la interacción con el cromóforo, se encuentran conservados en los dominios LOV de plantas y hongos (Cheng *et al.*, 2003).

Los dominios LOV se acoplan a diferentes dominios efectores. Por ejemplo, en fototropinas aparece un dominio Ser/Thr quinasa aguas abajo de dos dominios LOV, mientras que las proteínas Wc-1 poseen dominios PAS (interacción con proteínas) y Zn-Finger (unión a DNA).

En eucariotas, actualmente se distinguen cuatro grupos de fotorreceptores basados en dominios LOV: fototropinas de plantas, tipo ZTL/ADO de plantas, Wc-1/Vvd de hongos y los aureocromos de Stramenopiles fotosintéticos (Krauss *et al.*, 2009).

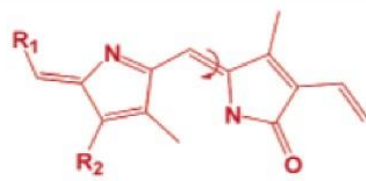
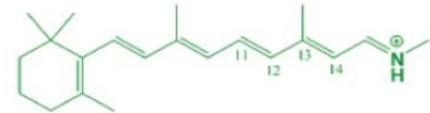
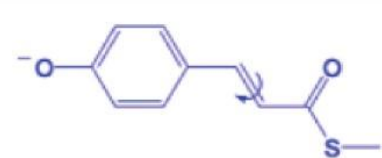
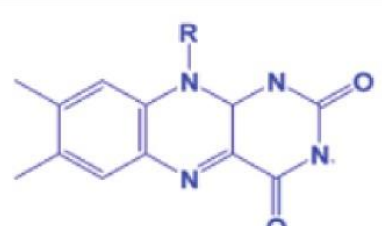
Cromóforo	Elemento fotosensible	Tipo de fotorreceptor
Tetrapirroles		Fitocromo
Retinal		Rhodopsina
Ácido 4-hidroxicinámico		PYP
Flavina		Criptocromo LOV BLUF

Figura 3. Principales fotorreceptores y cromóforos.

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

El dominio LOV de Las familias ZTL/ADO y Wc-1/Vvd. contiene 9-11 residuos encargados de la unión con FAD (Crosson *et al.*, 2003; Zoltowski *et al.*, 2007) (véase el Apartado 1.4.5).

Las proteínas Wc-1 son los fotorreceptores más importante de hongos se encargan de controlar el reloj biológico y regular muchas de las respuestas a la luz descritas en estos organismos. Estos fotorreceptores forman complejos, denominados WCC (*White-Collar Complex*), con los factores los transcripcionales Wc-2. Ascomicetos, basidiomicetos, cigomicetos y quitridios utilizan estos complejos para la recepción de la luz, lo que sugiere su presencia en un antecesor común a estos cuatro grupos de hongos (Corrochano, 2007).

En *N. crassa*, estos complejos, junto a la proteína FRQ, forman parte del oscilador central del reloj circadiano (Cheng *et al.*, 2002), mientras que Vvd, la otra proteína de hongos con dominio LOV, es responsable de la fotoadaptación.

Sin embargo, a pesar de compartir el complejo WC, cada clase de hongos contiene diferentes conjuntos de fotorreceptores en sus genomas. Por un lado, ascomicetos y basidiomicetos presentan una única copia del gen *wc-1*, acompañada de un completo repertorio de posibles fotorreceptores, mientras que los cigomicetos presentan tres genes *wc-1*, varias copias de *wc-2* y solo una copia de un gen *cry-DASH* (Corrochano and Garre, 2010; Idnurm *et al.*, 2010).

Los criptocromos son proteínas similares en secuencia a las fotoliasas pero sin capacidad de reparación del DNA. Pueden percibir luz azul y UVA. Según su origen filogenético, suelen dividirse en 3 grupos: los de animales, los de plantas y las proteínas CRY-DASH (Lin and Todo, 2010; Zoltowski and Gardner, 2011).

Los criptocromos presentes en hongos son de tipo CRY-DASH. En *N. crassa*, la proteína CRY une FAD y MTHF (5,10-Metilenetetrahidrofolato) como cromóforos, conservando también los residuos necesarios para la interacción con dímeros de pirimidina tipo ciclobutano (CPDs) (Froehlich *et al.*, 2010). Existen proteínas de este tipo en ascomicetos, basidiomicetos y cigomicetos, aunque todavía no se les ha asignado ninguna función fotosensora clara en estos organismos (Idnurm *et al.*, 2010). En *N. crassa* el gen *cry* está regulado por la luz de forma dependiente de *wc-1*, siguiendo igualmente oscilaciones circadianas en oscuridad. Sin embargo, el único fenotipo observado en el mutante nulo es un ligero desfase en el ritmo circadiano (Froehlich *et al.*, 2010). De hecho, comparando el transcriptoma del mutante *cryΔ* respecto al silvestre no se detectan diferencias tras la inducción por luz (Froehlich *et al.*, 2010). Sin embargo, el análisis de los patrones de expresión del gen *con-10*, implicado en conidiación, sugiere un papel de CRY como modulador del complejo WC (Olmedo *et al.*, 2010). En *Sclerotinia sclerotiorum*, otro ascomiceto, el gen *cry1* se induce solo tras iluminación con luz UVA y los mutantes *cry1Δ* exhiben ligeras variaciones en morfología únicamente tras tratamientos con luz UVA, desarrollándose de forma normal en otras condiciones de laboratorio (Veluchamy and Rollins, 2008).

Aunque formalmente los criptocromos de tipo CRY-DASH se caracterizan por la ausencia de la actividad fotoliasa, recientemente se ha demostrado que las proteínas CRY-DASH de *Vibrio cholerae* poseen capacidad fotoliasa sobre DNA de cadena sencilla, sin embargo su función biológica se desconoce (Selby and Sancar, 2006). Esta capacidad de reparación del DNA no se ha descrito en los criptocromos de hongos.

Además de en eucariotas, en bacterias se han descrito otros receptores de luz azul, como los de tipo PYP (xantopsinas) y varias familias de proteínas con dominios LOV (LOV-HK, LOV-STAS, etc.) (Crosson *et al.*, 2003; Galperin *et al.*, 2001, Krauss *et al.*, 2009; Zoltowski and Gardner, 2011).

1.6. Los genes *white-collar*

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

En *N. crassa*, *wc-1* y *wc-2* son elementos centrales de la ruta de transducción de la luz, siendo los mutantes *wc-1Δ* y *wc-2Δ* ciegos para la carotenogénesis, la regulación del ritmo circadiano, la conidiación, el desarrollo de las estructuras sexuales y el foto-tropismo (Degli-Innocenti and Russo, 1984; Harding and Turner, 1981; Linden *et al.*, 1997). Las proteínas Wc-1 y Wc-2 son factores transcripcionales que se asocian formando el complejo WC. Tras la iluminación, se unen al DNA en los elementos de respuesta a la luz (LREs) y regulan positivamente la mayoría de comportamientos dependientes de la luz azul (Chen *et al.*, 2010; Froehlich *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003). El complejo WC también es necesario en la oscuridad, tanto para el funcionamiento del reloj circadiano como para su sincronización por la luz (Cheng *et al.*, 2003).

Las proteínas Wc-1 y Wc-2 contienen dominios de tipo PAS, tres en Wc-1 (LOV, PAS-B y PAS-C), y uno en Wc-2. Este último y el dominio PAS-C de Wc-1 están relacionados con la formación del WCC (Ballario *et al.*, 1998; Ballario *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2003; Froehlich *et al.*, 2002; He *et al.*, 2002; Linden and Macino, 1997), mientras que el dominio PAS-B de Wc-1 es esencial para su función, tanto en la luz como en la oscuridad, aunque no se conoce su papel concreto (Cheng *et al.*, 2003). Por últimos, el dominio PAS cercano al extremo N-terminal de Wc-1 es un dominio LOV que une FAD como cromóforo y actúa como receptor de la luz azul (Froehlich *et al.*, 2002; He *et al.*, 2002).

Además de los dominios PAS, la proteína Wc-1 posee dos regiones ricas en glutaminas en sus extremos C- y N-terminal. Estas regiones forman parte del dominio de activación de algunos factores transcripcionales, siendo necesarias para una respuesta completa de los mismos. Normalmente no tienen una estructura 3D definida, pero pueden interaccionar con regiones ricas en glutamina de otras proteínas, lo que suele aumentar el nivel de activación del factor transcripcional (Atanesyan *et al.*, 2012; Courey *et al.*, 1989; Escher *et al.*, 2000; Triezenberg, 1995). La proteína Wc-2 contiene una región rica en prolina y otra ácida, descritas también en otros factores transcripcionales (Triezenberg, 1995). Asimismo, se han identificado señales de localización nuclear en ambas proteínas, aguas abajo del último dominio PAS (Ballario *et al.*, 1996; Linden and Macino, 1997).

Además, ambas proteínas poseen un dominio dedo de zinc tipo GATA, de unión a DNA, en el extremo C-terminal (Ballario *et al.*, 1996; Linden and Macino, 1997). Tanto el dominio dedo de zinc tipo GATA como la señal de localización nuclear de Wc-1 son necesarias para el funcionamiento del reloj circadiano en la oscuridad. Sin embargo, estas regiones no intervienen en la regulación transcripcional por la luz (Cheng *et al.*, 2003). Por su parte, el dominio dedo de zinc tipo GATA de Wc-2 sí es necesario para la inducción de los genes regulados por luz y también para la regulación en oscuridad de *frq* (*frequency*, regulador principal del reloj circadiano), pero no para su inducción por luz (Cheng *et al.*, 2002, Collett *et al.*, 2002, Linden and Macino, 1997).

La proteína Wc-2 es más abundante que Wc-1 y su expresión no oscila de forma circadiana, estando regulada por Wc-1 de forma independiente de la luz (Cheng *et al.*, 2003). Por otro lado, la expresión de *wc-1* está regulada por luz y por el gen *frq*. Además, la proteína Wc-1 necesita unirse con Wc-2 para mantener sus niveles en la célula (Cheng *et al.*, 2002; Denault *et al.*, 2001), habiéndose observado dos complejos con distinta composición, denominados L-WCC (Light-WCC) y D-WCC (Dark-WCC). El de menor tamaño, D-WCC, es un heterodímero de Wc-1 y Wc-2 que contiene la mayor parte de la proteína Wc-1 presente en la célula. Este complejo se asocia con la activación de *frq* y otros genes en la oscuridad (Cheng *et al.*, 2003; Denault *et al.*, 2001; He *et al.*, 2002). El complejo L-WC es de mayor tamaño y se cree que está constituido por una copia de Wc-2 y varias de Wc-1. Regula las respuestas a la luz y se asocia a los LREs de *frq* de forma dependiente de la luz (Cheng *et al.*, 2003; Froehlich *et al.*, 2002; He and Liu, 2005).

1.6.2. Otros genes de *N. crassa* implicados en la regulación por luz

Otros reguladores importantes en la regulación de las respuestas a la luz en *N. crassa* son Vivid o Vvd, que cumple varias funciones en las respuestas a la luz, y el factor transcripcional Sub-1, inducido por luz y esencial para la expresión de muchos de los genes de respuesta tardía (Chen *et al.*, 2009).

Vvd es una proteína de pequeño tamaño, constituida por un dominio LOV y una extensión N-terminal de 70 aminoácidos (Ncap) que está implicada en la dimerización de Vvd (Zoltowski and Crane, 2008; Zoltowski *et al.*, 2007), ya que Vvd puede dimerizar de forma inestable y dependiente de la luz, consigo misma y con el complejo WC (Chen *et al.*, 2010; Hunt *et al.*, 2010; Zoltowski and Crane, 2008).

Esta proteína es necesaria para la fotoadaptación y para la sincronización del reloj circadiano, especialmente en las transiciones del amanecer y del atardecer (Elvin *et al.*, 2005; Heintzen *et al.*, 2001; Hunt *et al.*, 2010; Schwerdtfeger and Linden, 2003). La proteína Vvd parece actuar como represor del complejo WC, compitiendo en la formación de heterodímeros WCC-Vvd y también regulando su fosforilación de forma dependiente de Frh (una helicasa asociada a Frq) (Hunt *et al.*, 2010; Malzahn *et al.*, 2010; Schafmeier *et al.*, 2005). Además de su papel en los ritmos circadianos, Vvd regula respuestas tardías a la luz (Chen *et al.*, 2009) y reduce la sensibilidad del reloj circadiano a los cambios de temperatura (Hunt *et al.*, 2007).

En *N. crassa* deben existir mecanismos de respuesta basados en otros fotorreceptores, ya que se aprecia una respuesta residual a la luz en mutantes *wc-1* (Chen *et al.*, 2009), pero aún no han sido caracterizados.

1.6.3. Genes regulados por la luz y el complejo WC en *N. crassa*

La recepción de la luz por el cromóforo de Wc-1 provoca cambios conformacionales en la proteína e induce la formación del complejo L-WC. Éste se une de forma transitoria a secuencias ELRE (elementos de regulación temprana por luz), controlando la expresión de los genes de respuesta temprana a la luz (Briggs, 2007; Chen *et al.*, 2009, Froehlich *et al.*, 2002; He *et al.*, 2002). El fotociclo del complejo WC, el tiempo que tarda la proteína Wc-1 en volver a la conformación no excitada tras la activación por la luz, es de tipo lento y su vida media se estima en varias horas (He and Liu, 2005).

Análisis globales de expresión, utilizando microarrays, han demostrado que al menos el 5,6 % de los genes de *N. crassa* están regulados directa o indirectamente por la luz (314 de los 5.588 genes analizados mediante *clustering*; 152 genes considerando un incremento en la expresión del 2.2 veces y un FDR (*false discovery rate*) del 10 %), principalmente a través del complejo WC. Se distinguen dos grupos de genes, los de respuesta temprana (ELRGs, 45 % de los genes regulados), con un pico de inducción entre 15 y 45 minutos tras la iluminación, y los de respuesta tardía (LLRGs), con, máxima expresión entre 45 y 90 minutos. En cada grupo se observan elementos reguladores característicos: los ya mencionados ELRE, en los genes de respuesta temprana, y los LLRE, en los genes de respuesta tardía (Chen *et al.*, 2009).

El análisis de la funciones biológicas reguladas por la luz reveló (Figura 4) que en los ELRGs se detecta un enriquecimiento en genes de síntesis de pigmentos fotoprotectores (7,1 % de los ELRGs), procesamiento y reparación del DNA (6,3 %), señalización celular (5,5 %) y síntesis de vitaminas, cofactores y grupos prostéticos (4,7 %). En cambio, entre los LLRGs hay enriquecimiento en genes implicados en metabolismo de carbohidratos (20 %), detoxificación de ROS (*reactive oxygen species*) y otros radicales (2,5 %) y oxidación de ácidos grasos (1,9 %) (Chen *et al.*, 2009).

Según datos recientes de Chip-Seq, tras la iluminación, el complejo WC se une a más de 400 sitios diana en el genoma, de ellos, más de 200 están cerca de uno o varios genes y aproximadamente el 15 % se localiza entre genes que se transcriben de forma divergente (Smith *et al.*, 2010). En la **Figura 4** se resumen las funciones biológicas más representadas en los genes identificados (Smith *et al.*, 2010).

Entre los ELRGs se encuentran bastantes factores transcripcionales. El complejo WC controla directamente la expresión de 26 factores transcripcionales, lo que supone dirigir un entramado transcripcional que regula aproximadamente el 20 % de todos los genes de *N. crassa*. Entre ellos, 9 factores transcripcionales están implicados en fases del desarrollo dependientes de la luz y 6 son reguladores del metabolismo o de respuestas a estrés. Los otros 11 hipotéticos factores transcripcionales no tienen funciones conocidas, aunque contienen dominios de unión a DNA (Smith *et al.*, 2010).

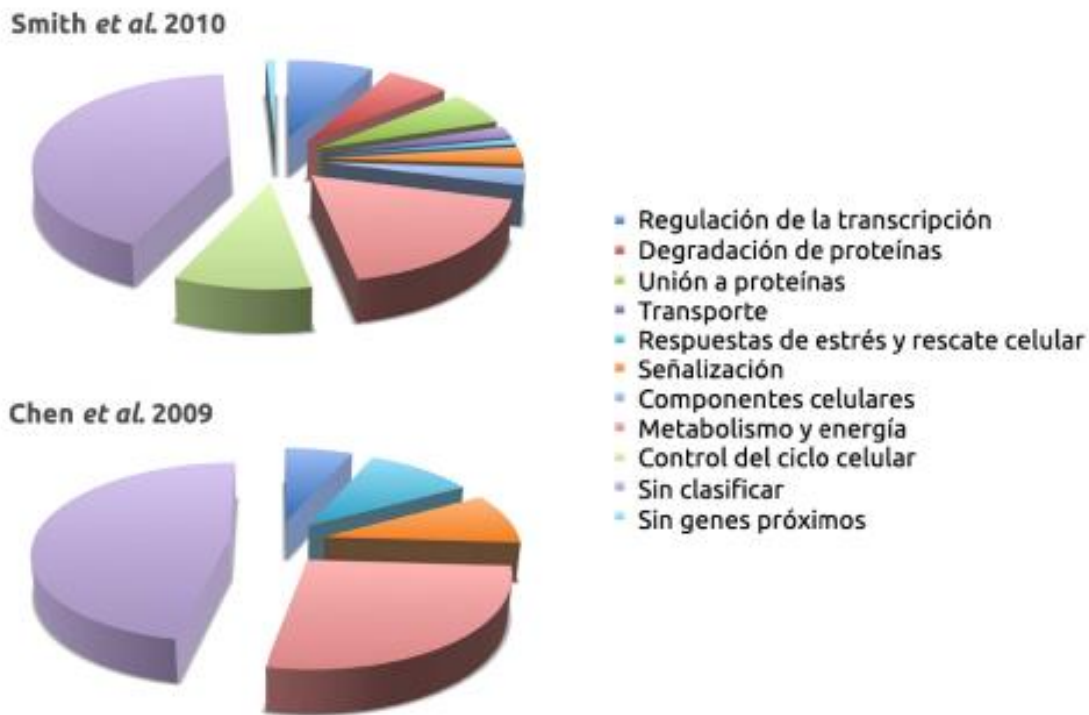


Figura 4. Resumen de genes regulados por luz en *N. crassa*.

Tomado de Schafmeier y Diernfellner, 2011

1.6.4. Genes *wc-1* en cigomicetos

En todos los cigomicetos secuenciados hasta el momento se encuentran tres genes *wc-1* y un número variable de copias de *wc-2*. En *P. blakesleeanus* hay tres genes *wc-1* (*madA*, *wcoA* y *wcoB*) y cuatro homólogos de *wc-2* (*wctA* o *madB* y *wctB-D*), siendo *madA* y *madB* necesarios para el fototropismo, la carotenogénesis y otras respuestas a la luz (Cerdá-Olmedo, 2001; Idnurm *et al.*, 2006; Sanz *et al.*, 2009). Respecto a su regulación, los genes *wcoA* y *wcoB* se inducen por la luz y requieren la presencia de MadA y MadB, mientras que la expresión de *madA* y *madB* presenta una ligera represión (Idnurm and Heitman, 2005; Sanz *et al.*, 2009). Adicionalmente, mediante estudios de doble híbrido de levadura se ha detectado interacción entre MadA y MadB, aunque no entre ninguna de las otras proteínas Wc-1 o Wc-2 (*WcoA*, *WcoB*, *WctB*, *WctC* y *WctD*) (Sanz *et al.*, 2009), sugiriendo la existencia de complejos WC (REFERENCIA).

Otros cigomicetos con *wc-1* en sus genomas son *Pilobolus crystallinus* (*pcmada1*, *pcmada2* y *pcmada3*) (Kubo, 2009) y *Rhizopus oryzae* (RO3G_16338 ,RO3G_09997 y

RO3G_14273, que en adelante se denominarán *rowc-1a*, *rowc-1b* y *rowc-1c*). Los tres genes homólogos en *Mucor* son *mcwc-1a*, *mcwc-1b* y *mcwc-1c* (Silva et al., 2008, Silva et al., 2006).

En este grupo de hongos, las proteínas Wc-1 son de menor tamaño que la de *N. crassa* pero conservan una arquitectura de dominios similar, pudiéndose separar en 3 grupos comparando sus secuencias (**Figura 5**). Todas ellas poseen un dominio LOV y dos dominios PAS adicionales (PAS-B y PAS-C). Sin embargo, el dominio dedo de zinc de unión a DNA está presente en los grupos 1 y 3, pero en el grupo 2 aparece un dominio dedo de zinc atípico (*wcoB*, *pcmada2*, *mcwc-1b* y *rowc-1b*) (Corrochano and Garre, 2010). Las proteínas de cada grupo son más parecidas a sus ortólogos en las otras especies que a sus parálogos intraespecíficos, lo que apunta a que la duplicaciones genómicas o segmentales tuvieron lugar antes de la divergencia del último ancestro común a los zigomicetos (Sanz et al., 2009). Los grupos 1 y 3 están más próximos filogenéticamente y en *Phycomyces* comparten un gen MAPK aguas arriba, sugiriendo dos eventos de duplicación, el primero que originó el gen *wcoB* y el segundo que desdobló la otra copia en los grupos 1 y 3 (Sanz et al., 2009).

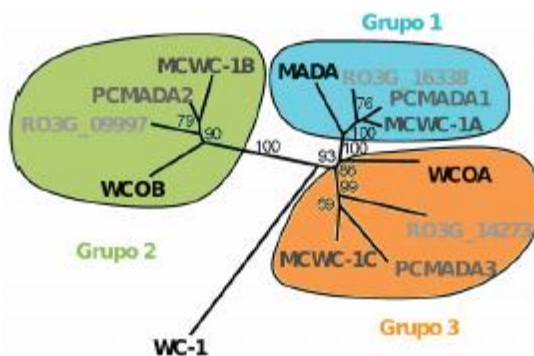


Figura 5. Proteínas Wc-1 en Zygomycotina.

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

1.6.4. Genes *wc-1* en *Mucor*

Como ya se ha mencionado en el genoma de *Mucor* hay tres genes *wc-1*: *mcwc-1a*, *mcwc-1b* y *mcwc-1c*. El único cuya expresión está controlada por luz es *mcwc-1c*, los otros dos se expresan de forma constitutiva tanto en luz como en oscuridad. Las secuencias aminoacídicas, deducidas a partir de la secuencia de nucleótidos, y las arquitecturas de las tres proteínas Mcwc-1, son similares pero no idénticas. Todas presentan los dominios característicos de las proteínas Wc-1, como el dominio LOV, los dominios PAS, el dominio de localización nuclear y el dominio dedo de zinc tipo GATA (**Figura 6**), a excepción de la proteína Mcwc-1b que presenta un dominio dedo de zinc atípico, denominado *4gat_A*, que está presente en las proteínas similares a Mcwc-1b de mucorales (Silva, 2013).. Los dominios LOV de las tres proteínas Mcwc-1 conservan los 11 aminoácidos esenciales para la interacción con el cromóforo (Crosson and Moffat, 2002), por lo que es probable que puedan unirlo y actuar como fotorreceptores, de forma similar a Wc-1 y Vivid en *N. crassa*. Además, como es típico de las proteínas Wc-1 de hongos, las tres poseen el lazo extendido de 11 aminoácidos respecto a los dominios LOV de plantas, entre las hélices A y C, sugiriendo el uso de FAD como cromóforo, en vez de FMN como en las fototropinas de plantas (Casas-Flores *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2003, Crosson *et al.*, 2003).

Las secuencias de aminoácidos deducidas de Mcwc-1a y Mcwc-1c presentan un dominio dedo de zinc tipo GATA canónico, que suele asociarse a factores transcripcionales ya que puede unirse a DNA. Estos dominios aparecen tanto en los Wc-1 como en los Wc-2 de *N. crassa* (Cheng *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2003; Collett *et al.*, 2002; Linden and Macino, 1997). Las proteínas Wc-1 de basidiomicetos carecen de este dominio, por lo que es probable que en estos organismos la unión al DNA se produzca a través del dominio presente en Wc-2 (Idnurm and Heitman, 2005).

Los esporangióforos de *Mucor* presentan fototropismo positivo a la luz azul y verde (Silva *et al.*, 2006). El comportamiento de los esporangióforos frente a la luz verde se había observado previamente en *P. blakesleanus* (Galland and Lipson, 1987). En *Mucor* esta respuesta está controlada por el gen *mcwc-1a* al igual que en *P. blakesleanus* lo está por *madA* (Idnurm *et al.*, 2006), en plantas también se observan respuestas a la luz verde mediadas por criptocromos que utilizan flavinas como cromóforos (Lin *et al.*, 1995).

El gen *mcwc-1c* es el elemento clave en la inducción de la carotenogénesis por luz en *Mucor*, ya que mutantes nulos *mcwc-1cΔ* presentan una baja inducción de la acumulación de carotenos en condiciones de luz. En concordancia con esta reducida respuesta a la luz, en relación con la acumulación de carotenos, la inducción de la acumulación de mRNAs de los genes carotenogénicos *carB* y *carRP* por la luz también está afectada, ya que los mutantes *mcwc-1cΔ* presentan solo una activación residual en presencia de luz. Sorprendentemente, *mcwc-1a* regula la expresión de los genes carotenogénicos, activándola en presencia de luz, pero su ausencia se traduce solo en una pequeña bajada de los niveles de carotenos (Silva et al., 2006). Estas diferencias entre los niveles de ARNm de los genes carotenogénicos y la acumulación de β-carotenos también se ha observado en otros hongos, como *N. crassa*, pero el mecanismo subyacente se desconoce (Merrow et al., 2001; Schwerdtfeger and Linden, 2001)

En el caso de *mcwc-1b*, forma parte de un mecanismo que regula la síntesis de carotenos independientemente de la luz y en el que el gen *crgA* juega un papel clave. (ver apartado 1.7). En este mecanismo, la proteína CrgA reprime la síntesis de carotenos mediante la ubiquitilación de Mcwc-1b, a la que adiciona dos moléculas de ubiquitina y que se traduce en el bloqueo de la función de Mcwc-1b, ya que la forma no ubiquitilada de esta proteína es capaz de activar la expresión de los genes carotenogénicos en oscuridad. Mcwc-1b es capaz de interaccionar consigo misma (Silva et al., 2008), siendo probable que forme complejos WC constituidos por Mcwc-1b y alguna o varias de las proteínas Mcwc-2, al igual que ocurre en *N. crassa* (Cheng et al., 2003).

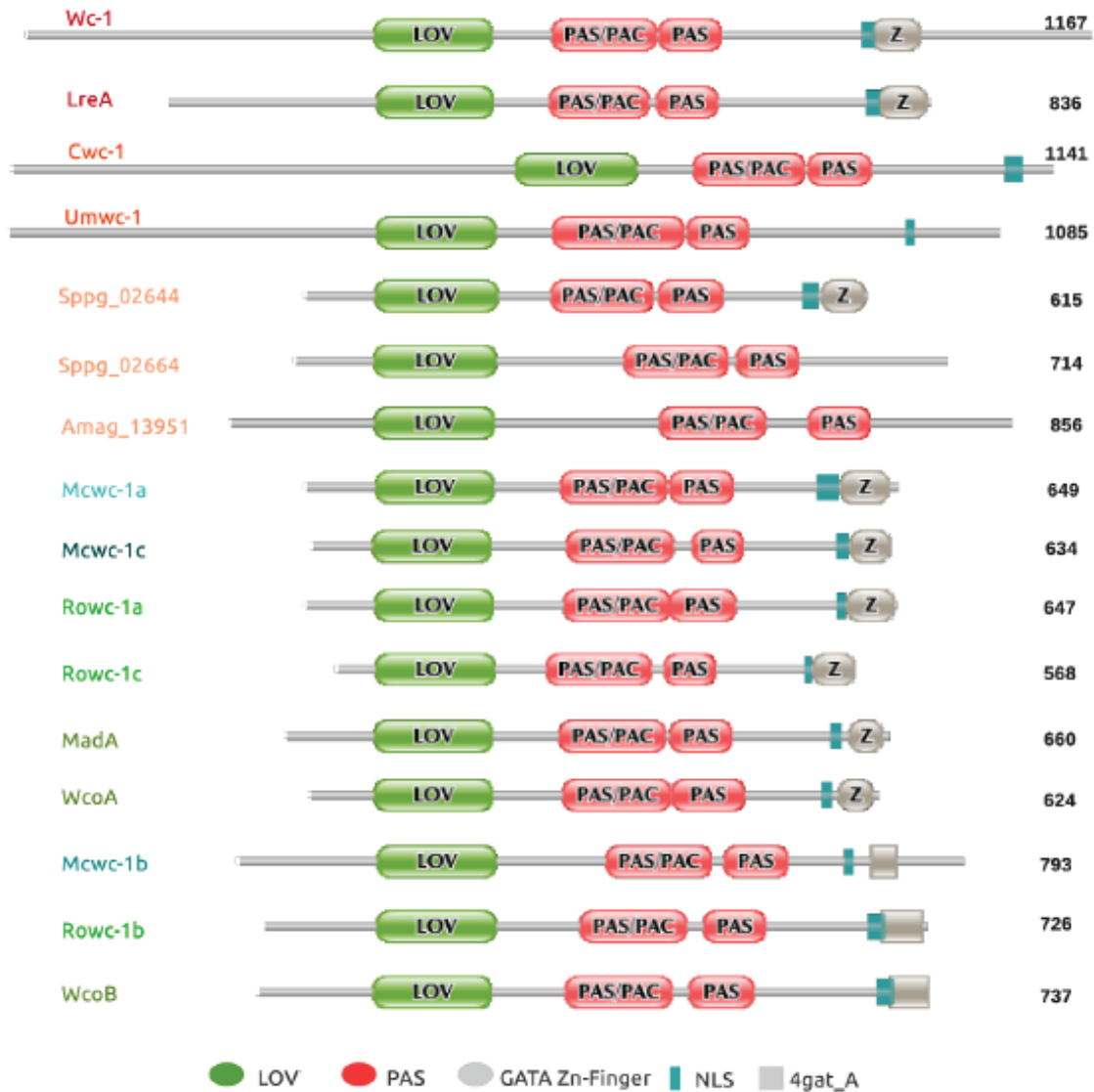


Figura 6. Arquitectura de las proteínas Wc-1 de hongos.

Los tamaños de las proteínas y la posición de los distintos dominios se representan a escala. Los dominios se identificaron utilizando principalmente Pfam y SMART (Letunic *et al.*, 2012; Punta *et al.*, 2012). El dominio *4gat_A*, presente en las proteínas de tipo Mcwc-1b de mucorales, corresponde con un dominio dedo de Zn tipo GATA definido en PDB (base de datos de estructuras terciarias (Berman *et al.*, 2000)) y reconocido por el programa HHPred (Soding *et al.*, 2005). Imagen tomada de la tesis doctoral de Fátima Silva (Silva, 2013).

1.6.5. Genes *wc-1* en otros hongos

Aparte de en *N. crassa*, se han identificado genes homólogos a *wc-1* y *wc-2* en otros hongos, donde también tienen funciones centrales en la regulación de las respuestas a la luz (Corrochano, 2007; Corrochano and Garre, 2010; Lombardi and Brody, 2005).

Los ascomicetos poseen una o ninguna copia de *wc-1* (Idnurm and Heitman, 2005). En *Trichoderma atroviride*, los genes *wc* regulan el crecimiento y son esenciales para la inducción por la luz de la conidiación y del gen *phr1* (fotoliasa) (Casas-Flores *et al.*, 2004). Mutantes en estos genes presentan fenotipos que los implican también en procesos no regulados por luz, como la inducción de la conidiación por falta de glucosa (Casas-Flores *et al.*, 2006). En *Fusarium oxysporum*, *wc-1* participa en el desarrollo de hifas aéreas, la patogenicidad en mamíferos, la carotenogénesis inducida por luz y la fotorreactivación dependiente de la luz UV (Ruiz-Roldan *et al.*, 2008); mientras que en *Fusarium fujikuroi*, *wcoA* (homólogo de *wc-1*) está implicada en la regulación del metabolismo secundario y de la conidiación (Estrada and Avalos, 2008).

En basidiomicetos, se han estudiado en *Cryptococcus neoformans*, donde son necesarios para la represión del apareamiento dependiente de la luz, influyen en la virulencia y participan en la resistencia a la luz UV (Idnurm and Heitman, 2005; Lu *et al.*, 2005); y también en *Coprinus cinereus*, donde los genes *wc* están implicados en el desarrollo de los cuerpos fructíferos inducido por luz (Terashima *et al.*, 2005).

Los basidiomicetos, al igual que los ascomicetos, tienen una copia de los genes *wc-1* y *wc-2*. La proteína Wc-1 de basidiomicetos es similar a la de *N. crassa* pero no presenta el dominio dedo de zinc C-terminal, por lo que la unión a los promotores de los genes regulados por luz podría depender exclusivamente del dominio dedo de zinc de Wc-2. De hecho, el dominio dedo de zinc de Wc-1 de *N. crassa* no es necesario para la regulación de las respuestas a la luz (Cheng *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2003; Collett *et al.*, 2002; Linden and Macino, 1997). Además, en *Cryptococcus neoformans* el gen *wc-1* no está regulado por la luz, mientras que el gen *wc-2* sí lo está (Idnurm and Heitman, 2005; Lu *et al.*, 2005).

1.7. El gen *crgA*

1.7.1. Características generales

El gen *crgA* actúa como regulador negativo de la fotocarotenogénesis en *Mucor*, ya que los mutantes nulos para *crgA* presentaban un fenotipo super-amarillo en la oscuridad y en la luz (Navarro *et al.*, 2000). Este gen cifra una proteína soluble con dos dominos RING-finger en el extremo N-terminal, el segundo de los cuales es de tipo canónico, con un perfil (CX2CX11CXHX2CX2CX9CX2C) (Navarro *et al.*, 2000). El primer RING-finger no se

ajusta a este motivo pero se identifica igualmente mediante HMMs (Hidden Markov Models, por ejemplo en SMART (Letunic *et al.*, 2012)). Aguas abajo de estos dominios se detectan dos regiones acídicas y un dominio LON interrumpido por tres regiones ricas en prolina y glutaminas, típicas en reguladores transcripcionales (Navarro *et al.*, 2000). A continuación posee una señal de localización nuclear bipartita (RRR...RRKR) (Navarro *et al.*, 2000) y en el extremo C-terminal contiene una secuencia CCIS, que podría ser diana de isoprenilación (Navarro *et al.*, 2000) (véase más adelante para una explicación de los dominios).

La expresión del gen *crgA* está controlada por la luz, con un patrón de acumulación de mRNA similar al de otros genes regulados por la luz en *Mucor*, como *carB*, *carRP* o *carG*, presentando una inducción rápida tras la iluminación pero que se mantiene durante poco tiempo (pico en 20-30 minutos) (Navarro *et al.*, 2001; Navarro *et al.*, 2000; Velayos *et al.*, 2000; Velayos *et al.*, 2000b).

Los niveles de la proteína CrgA son muy bajos, por lo que se cree que es extremadamente inestable (Lorca-Pascual *et al.*, 2004). No obstante, los niveles de CrgA han podido estudiarse en cultivos líquidos, donde bajo iluminación se detectan cantidades constantes y cuatro veces superiores a las detectadas en la oscuridad (Lorca-Pascual *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2001). El gen *crgA* tiene un codón de inicio de la traducción no convencional (GUG). En eucariotas superiores, el inicio de la traducción en codones no-AUG está asociado con la regulación de la expresión de protooncogenes y de factores transcripcionales (Falvey *et al.*, 1995; Nanbru *et al.*, 1997). La traducción de genes con codones no-AUG normalmente es menos eficiente, ocasionando niveles muy bajos de estas proteínas (Kozak, 1989), probablemente como parte de su regulación. Sin embargo la sustitución del triplete GUG por AUG no se traduce en un aumento en los niveles de la proteína CrgA en *Mucor* (Murcia-Flores *et al.*, 2007), sugiriendo la existencia de otros mecanismos que mantienen la proteína a niveles bajos.

1.7.2. Dominio RING-finger

Los dominios RING-finger (RF) combinan cisteínas e histidinas en una conformación capaz de unir dos átomos de zinc. Aunque el motivo canónico se definió como Cys-X2-Cys-X(9-39)-Cys-X(1-3)-His-X(2-3)-Cys-X2-Cys-X(4-48)-Cys-X2-Cys (Borden and Freemont, 1996), los modelos actuales también tienen en cuenta aminoácidos en

posiciones menos conservadas. Son típicos de eucariotas y están implicados en interacciones proteína-proteína y en la formación de complejos multiprotéicos, estando asociados a la regulación de múltiples procesos y enfermedades (Lipkowitz and Weissman, 2011; Quevillon et al., 2005).

Los dominios RF son capaces de unir proteínas E2 (conjugadora de ubiquitina) y catalizar la transferencia de la ubiquitina a los sustratos específicos, por lo que se sospecha que muchas de las proteínas que los contienen son ligasas de ubiquitina (Deshaies and Joazeiro, 2009). De hecho, estos dominios definen una familia de ligasas E3, una de las más amplias en humanos, formada por más de 600 miembros. Las ligasas E3 son las responsables de la especificidad en la ubiquitilación, mediando la transferencia de ubiquitina desde la enzima E2 al sustrato. En las proteínas estudiadas no todos los dominios RF poseen actividad E3, pero en esos casos el dominio RING suele interaccionar con otra proteína RF que sí tiene actividad E3 (Deshaies and Joazeiro, 2009). Las ligasas E3 normalmente actúan marcando proteínas para su degradación por el proteosoma, por lo que en un principio se propuso que CrgA podría ejercer su papel como represor marcando activadores transcripcionales para su degradación (Murcia-Flores *et al.*, 2007). Sin embargo, al menos en el caso de la carotenogenesis, CrgA bloquea la actividad del activador transcripcional Mcwc-1b mediante ubiquitilación, pero sin que esto determine su degradación, sugiriendo que esta inactivación podría ser revertida por enzimas que eliminan ubiquitinas de las proteínas (Silva *et al.*, 2008).

Los dominios RF de CrgA son necesarios para su función (Lorca-Pascual *et al.*, 2004; Murcia-Flores *et al.*, 2007), ya que mutaciones puntuales en residuos esenciales para la unión a zinc, en cualquiera de los dos dominios RF, provocan la pérdida de su función en la carotenogénesis.

1.7.3. Otros dominios presentes en CrgA

Como se ha indicado anteriormente, además de los dominios RF, la proteína CrgA posee regiones ricas en glutamina, una señal de localización nuclear, un dominio LON y un dominio terminal de isoprenilación. Las regiones ricas en glutamina, o ‘poliQs’, se encuentran en muchos factores transcripcionales, donde participan en las interacciones con la maquinaria de transcripción (Triezenberg, 1995). En CrgA, la delección de la región de poliglutaminas más alejada del extremo C-terminal provoca la pérdida de su función en la

carotenogénesis, mientras que la delección de las otras dos regiones también afecta su función, aunque el efecto es menor (Lorca-Pascual *et al.*, 2004).

Algunas proteínas, como los factores de apareamiento de hongos o las proteínas Ras, requieren estar preniladas para activarse. La prenilación es una modificación lipídica que consiste en la unión covalente de farnesil (15C) o geranylgeranil (20C) a residuos de cisteína C-terminales. Se cree que esta modificación aumenta o posibilita la unión de la proteína a membrana, quizás mediando en las interacciones lípido-proteína. El motivo más habitual suele ser CAAC (A, cualquier aminoácido alifático), pero en algunas proteínas similares a las Ras se han descrito secuencias CC, CCXX o CXC (con X normalmente metionina o serina) (Navarro *et al.*, 2000). Mutaciones en el hipotético motivo de isoprenilación de CrgA afectaron solo ligeramente a su función (Lorca-Pascual *et al.*, 2004) y, por tanto, no parece ser esencial para el control de la carotenogénesis. De igual forma, la capacidad de reprimir la carotenogénesis no se vio afectada por mutaciones que destruyen la posible señal de localización nuclear, (Lorca-Pascual *et al.*, 2004), no descartándose la posibilidad que pueda estar localizada en el núcleo a través de otros sistemas de transporte.

El dominio LON se encuentra en el extremo N-terminal de las proteasas dependientes de ATP de la familia LON (Rawlings and Barrett, 1994). En estas proteínas es esencial para la actividad proteolítica, pero no es el dominio catalítico. Se cree que es importante en la interacción con las proteínas diana, aunque su función no está clara (Rotanova *et al.*, 2004). Se ha visto que es capaz de interactuar con DNA de doble cadena en bacterias y con DNA de una cadena y RNA en eucariotas (Liu *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2007). En estos organismos las proteasas LON participan en respuestas al estrés y de defensa frente a daño en el DNA. En eucariotas las proteínas LON se encuentran en la mitocondria y se ha propuesto que se unen a las zonas de control de la transcripción y la replicación del DNA mitocondrial, acercándose de este modo la proteasa a las proteínas a degradar, que estarían unidas en las proximidades, como factores transcripcionales y sus complejos (Liu *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2007).

El dominio LON de CrgA es esencial para su función en la carotenogénesis (Lorca-Pascual *et al.*, 2004; Murcia-Flores *et al.*, 2007), aunque CrgA no es una proteasa LON, al carecer de los dominios ATPasa y proteolítico de estas proteasas. El dominio LON de CrgA podría actuar de forma similar a como funciona en las proteasas LON de eucariotas, es decir,

permitiendo la unión de CrgA a regiones próximas a los promotores, donde se encontrarían las proteínas a marcar con ubiquitina, pudiendo actuar además como superficie de interacción con estas proteínas.

1.7.4. Funciones de CrgA

El fenotipo de los mutantes *crgA* Δ se denominó ‘constitutivo’, ya que los micelios parecen estar respondiendo a la luz de forma continua, debido a la falta de represión de los genes carotenogénicos en estos mutantes. En *P. blakesleeanus* se han aislado mutantes con un fenotipo similar de sobreacumulación de carotenos en la oscuridad. Sin embargo, los genes responsables, *carD* y *carS*, están implicados en el control por producto final (Bejarano *et al.*, 1988; Salgado *et al.*, 1989), en *Mucor* no existe esa regulación (Velayos *et al.*, 1997).

Los mutantes *crgA* Δ son, además, deficientes en la formación de hifas aéreas y en la esporulación. Este fenotipo no es consecuencia de la sobreacumulación de carotenos, ya que mutantes *crgA* Δ albinos, por silenciamiento del gen *carB*, muestran el mismo fenotipo (Nicolas *et al.*, 2003).

Además de los genes carotenogénicos, *crgA* también reprime la expresión de *cigA*, un gen que se encuentra aguas arriba de un gen homólogo a *crgA* (*crgB*) y que está implicado en el crecimiento vegetativo (Quiles-Rosillo *et al.*, 2003). El gen *cigA* se induce tras la iluminación, como los genes *crgA*, *carB* y *carRP*, aunque su máximo nivel de expresión se produce antes que en estos genes, a unos 5-15 minutos, dándose un segundo máximo a los 40 minutos (Quiles-Rosillo *et al.*, 2003). La existencia de dos máximos en la inducción de *cigA* apuntan a la existencia de dos respuestas, una rápida y otra posterior más lenta. En ciertas condiciones también se ha observado dos máximos de expresión en respuesta a la luz en los genes *carB* y *carRP* (Velayos *et al.*, 2000, Velayos *et al.*, 2000b)). Estudios previos han identificado varios genes de función desconocida que están regulados por CrgA, pero no inducidos por la luz (Quiles-Rosillo *et al.*, 2001).

La regulación de CrgA, al menos en la carotenogénesis y producción de esporas asexuales, se produce a través de la ubiquitilación no degradativa de Mcwc-1b (Silva *et al.*, 2008), en la que se adicionan dos unidades de ubiquitina a Mcwc-1b. Los estudios proteómicos utilizando las estirpes mutantes nulo en *crgA* y doble mutante *crgA* Δ , *mcwc-1b* Δ han revelado que CrgA también regula genes implicados en el metabolismo, en el

crecimiento vegetativo y en otro tipo de funciones (Navarro *et al.*, 2013). Estos estudios también revelaron que *CrgA*, además de ser un represor, es también un activador aunque en menor medida, y puede actuar de forma independiente a *Mcwc-1b*, sugiriendo la existencia de otras dianas.

1.7.5. Genes similares a *crgA*

En *Mucor* existen otros tres genes parálogos a *crgA*, denominados *crgB*, *crgC* y *crgD*. El gen *crgB* se induce fuertemente por luz y probablemente es esencial para la supervivencia, ya que no se ha conseguido generar mutantes nulos (Gómez –Mateo, 2005). En otros mucorales, también se han encontrado varias copias del gen. Así, en *P. blakesleeanus* también posee cuatro genes *crg*, todos ellos fotoinducibles de forma dependiente del complejo Mad. Los genes *crgA*, *crgC* y *crgD* son de inducción temprana, con un máximo a los 15 minutos tras la iluminación, mientras que *crgB* tarda unos 30 minutos en alcanzar su expresión máxima (He *et al.*, 2005).

En el ascomiceto *Fusarium oxysporum* se ha clonado un gen similar a *crgA*, identificado como el responsable del fenotipo de los mutantes sobreproductores de carotenos en oscuridad. Este gen, denominado *carS*, posee un dominio RING-Finger en el extremo N-terminal y un dominio LON no interrumpido. Los mutantes *carS* sobreexpresan los genes *carB* y *carRA* en la oscuridad y son capaces de responder a la luz incrementando su transcripción, pero al contrario que los mutantes *crgA* de *Mucor* no se produce el correspondiente incremento en carotenos tras la iluminación (Rodríguez-Ortiz *etal.*, 2009; Rodríguez-Ortiz *etal.*, 2011).

Fuera del reino de los hongos, aparecen genes de tipo *crgA* en prácticamente todos los eucariotas, aunque la función de los mismos no se ha caracterizado en ninguna especie. En humanos existen 3 genes con arquitectura similar, dos RING-fingers en el extremo N-terminal y un dominio LON en el extremo C-terminal, denominados *lonrf1-3*. Aunque su función se desconoce, uno de estos genes está sobreexpresado en neuroblastoma (Choi, 2005). Otro eucariota en el que se ha observado sobreexpresión de genes tipo *crgA* es el pez cebra (*Danio rerio*). Recientemente se ha estudiado el transcriptoma dependiente de la luz en este organismo, identificándose dos genes *lonrf1* que se sobreexpresan tras la iluminación. De hecho, uno de los genes *lonrf1* es el gen que más se induce tras la iluminación en algunos de los tejidos. (Weger *et al.*, 2011).

1.8. Ubiquitilación no degradativa

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

Mediante ubiquitilación no solo se regula la estabilidad de una proteína (o su vida media), sino también su localización celular, la posibilidad de interacción con otras proteínas, etc (Conaway *et al.*, 2002). El efecto de la ubiquitilación depende tanto de la longitud de las cadenas como del tipo de enlaces que las forman. Normalmente para marcaje degradativo se requiere una cadena de, al menos, cuatro ubiquitinas unidas por la lisina 48. Sin embargo, cadenas unidas mediante otros enlaces, o la adición de mono-, bi- o tri-ubiquitinas, están implicadas en mecanismos de regulación independientes de proteólisis, como la defensa al daño del DNA, la transducción de señales, la regulación de la transcripción, la activación de quinasas, la endocitosis y la compartimentalización (Conaway *et al.*, 2002; Haglund and Dikic, 2005; Welchman *et al.*, 2005). Las consecuencias de las modificaciones que no marcan a la proteína para degradación son muy variadas. Así, por ejemplo, la adición de ubiquitinas puede modular la actividad de un factor transcripcional, como ocurre con Smad3, cuya mono-ubiquitinación en múltiples residuos afecta a su capacidad de unión al DNA (Inui *et al.*, 2011). En otras ocasiones, la adición de ubiquitinas puede actuar impidiendo la formación de multímeros en proteínas que forman parte de complejos o inhibir otras modificaciones post-traduccionales, o a la inversa y solo producirse tras la modificación en ciertos residuos (Topisirovic *et al.*, 2009).

Recientemente se ha observado la ubiquitilación de la fototropina 1 (Phot1) en *Arabidopsis*. Esta proteína, que se encuentra en la membrana plasmática y es un

fotorreceptor de luz azul implicado en el fototropismo en plantas, sufre mono-, oligo- y poliubiquitinación. Aunque la poliubiquitinación lleva a la degradación de la fototropina, la mono- y oligo-ubiquitinación son importantes en la regulación de su función, probablemente siendo necesarias para su internalización desde la membrana (Roberts *et al.*, 2011). Además, el estado de ubiquitinación de Phot1 varía según la intensidad de la luz, tanto en tipo como en las proteínas de las que depende (Roberts *et al.*, 2011).

1.9. Proteínas con dominio Velvet.

Las proteínas de la familia Velvet son proteínas reguladoras específicas de hongos, muy conservadas en basidiomicetos y ascomicetos (Ni & Yu, 2007), pero también presentes en otros hongos como los cigomicetos. La primera proteína descrita con dominio velvet fue VeA de *A. nidulans*, descrita hace 40 años. En este hongo VeA inhibe la reproducción asexual y activa la reproducción sexual. Mutaciones en el gen *veA* provocan un aumento de la conidiación e inhiben la formación de cuerpos fructíferos (Kaefer, 1965, Kim *et al.*, 2002). VeA también está implicada en el metabolismo secundario (Kato *et al.*, 2003), no solo en *A. nidulans*, sino también en *Aspergillus parasiticus* o *Aspergillus flavus*, en los que las mutaciones de falta de función en el gen *veA* provocan una disminución en la producción de toxinas (Calvo *et al.*, 2004; Duran *et al.*, 2007; Amaike & Keller, 2009). VeA es capaz de interactuar en el núcleo con el fitocromo FphA sensible a luz roja, este a su vez interactúa con los receptores de luz azul LreA y LreB, provocando la pérdida de función de VeA en luz (Purschwitz *et al.*, 2008; Bayram *et al.*, 2010). Los homólogos de VeA en ascomicetos están implicados en las mismas funciones. La delección de FvVE1 (Homólogo de *veA*) en *Fusarium verticilloides* incrementa la formación de macroconidios en detrimento de la de microconidios y provoca la síntesis truca de toxinas (Li *et al.*, 2006; Myung *et al.*, 2009). Tal puede ser su importancia a nivel biotecnológico que juega un papel muy importante en la producción de penicilina del hongo *Penicillium chrysogenum* (Hoff *et al.*, 2010).

La proteína VeA de *A. nidulans* contiene un dominio velvet encargado de la unión a DNA, una señal de localización nuclear (NLS) en el extremo amino y una señal de exportación al núcleo cercana (NES). En el extremo carboxilo contiene una zona rica en prolinas o dominio PEST, típico de proteínas inestables (**Figura 7**). En este hongo se han identificado otras proteínas con dominio velvet:

- VelB, es un regulador del desarrollo y de la producción de metabolitos secundarios dependiente de la luz y que interacciona con VeA (Bayram *et al.*, 2008b).
- VosA, interacciona con VelB, y es considerado un represor de la reproducción asexual (Ni & Yu, 2007; Sarikaya Bayram *et al.*, 2010). Contiene un dominio velvet en el extremo amino, un dominio de localización nuclear (NLS) y un dominio de activación de la transcripción (TAD) en el extremo carboxilo (Ni & Yu, 2007).
- VelC, parece ser más bien una proteína auxiliar. Mutaciones en el gen *velC* provocan un aumento en la formación de cuerpos fructíferos (Sarikaya Bayram *et al.*, 2010).

La función de las proteínas velvet está relacionada con la proteína LaeA. El gen *laeA* (loss of aflR expression A) fue descubierto en 2004 asociado a la producción de la toxina de *A. nidulans* aflatoxina. Los homólogos de esta proteína en otros hongos están asociados a la producción de metabolitos secundarios y toxinas muy importantes a nivel biotecnológico y fitopatogeno (Bok & Keller, 2004; Hoff *et al.*, 2010; Wiemann *et al.*, 2010). La proteína LaeA no contiene ningún dominio velvet, pero sí uno de localización nuclear (NLS) en la región N terminal y un dominio dependiente de SAM (s-adenosil metionina) y otro metiltransferasa (MTD) en la región central. LaeA presenta actividad reguladora a nivel epigenético (Bok *et al.*, 2006; Reyes-Dominguez *et al.*, 2010). En *A. nidulans* tiene un importante papel en el control de la reproducción asexual dependiente de luz, de hecho el fenotipo de los mutantes nulos provoca un aumento de la formación de cuerpos fructíferos y una bajada en la conidiación, el fenotipo contrario a los mutantes en el gen *veA*. La dependencia de la luz en las funciones de LaeA no está en ella misma sino en la región N terminal de VeA (Sarikaya Bayram *et al.*, 2010).

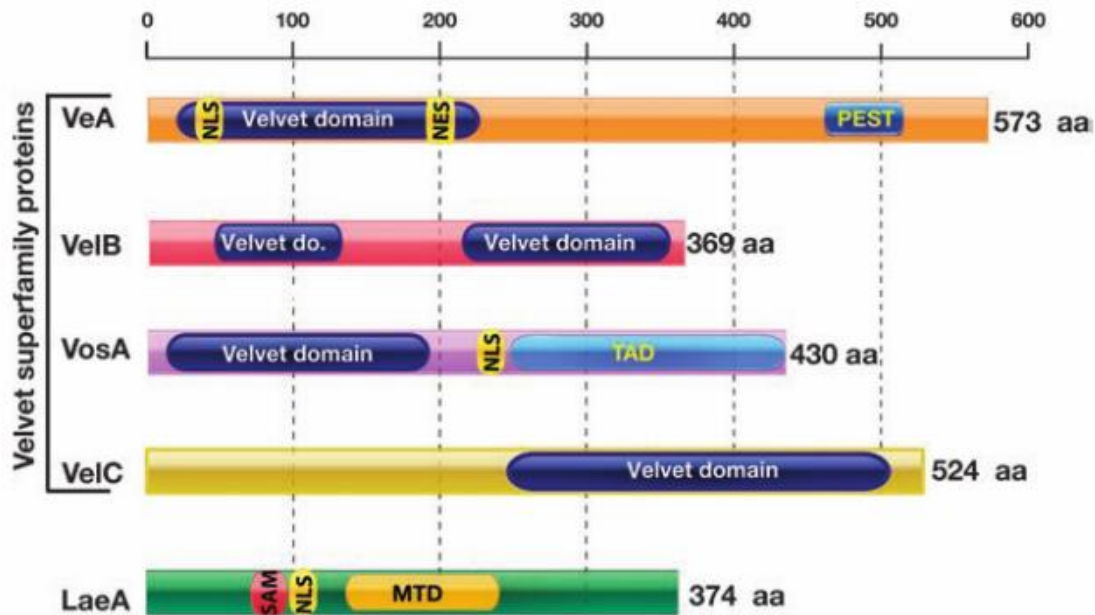


Figura 7. Arquitectura de las proteínas de la familia Velvet y LaeA de *A. nidulans*.

Los tamaños de las proteínas y la posición de los distintos dominios se representan a escala. Los dominios que aparecen en la figura son: dominio velvet, dominio de localización nuclear (NLS), señal de exportación al núcleo (NES), zona rica en prolina o dominio PEST, dominio de activación de la transcripción (TAD), dominio dependiente de SAM y dominio metiltransferasa (MTD). Imagen obtenida de Bayram and Braus, 2011.

1.9.1. VelB como regulador

VelB es el miembro más corto de la familia de proteínas velvet de *A. nidulans*, estando constituida únicamente por dos dominios velvet, uno en cada extremo (Bayram *et al.*, 2008b). Esta proteína está presente en varios *complejos* uno de ellos son los complejos triméricos VelB-VeA-LaeA coordinando la producción de metabolitos secundarios y el desarrollo en la oscuridad (Bayram *et al.*, 2008b). En la oscuridad también están presentes los complejos diméricos VelB-VeA encargados de la formación de cuerpos fructíferos. VelB no posee ningún dominio de señalización nuclear, por lo que necesita unirse a VeA en el citoplasma para llegar juntos al núcleo. Esta característica es utilizada por la célula para regular la función de VelB. En presencia de luz baja la cantidad de VeA detectable, ya sea porque se desestabiliza o porque no se sintetiza, como resultado el complejo trimérico y dimérico se reduce reprimiéndose la formación de cuerpos fructíferos.

VelB también forma dímeros con VosA, presentes en las hifas vegetativas y durante el inicio de la reproducción sexual, parece estar relacionado con la viabilidad de las esporas sexuales, además está relacionado con la inhibición de la reproducción asexual en oscuridad en cultivo líquido (Sarıkaya Bayram *et al.*, 2010). En condiciones de luz LaeA reduce los niveles de VelB y VosA facilitando así la reproducción asexual (Sarıkaya Bayram *et al.*, 2010). La formación de dímeros VelB-VelB parece estar relacionada con la formación de conidios, la caracterización de mutantes nulos para *velB* en *A. nidulans* revela una disminución de la conidiación en estos mutantes respecto a la estirpe silvestre (Park *et al.*, 2012). La complejidad de los mecanismos de acción de VelB queda patente al observar la cantidad de complejo de los que puede formar parte.

1.9.2. Dominio Velvet

Este dominio comprende alrededor de 150 aminoácidos y apenas hay motivos relacionados. En mitad del dominio hay una región muy conservada rica en prolina, típica de los dominios relacionados con la interacción proteína-proteína, lo que sumado a la gran variedad de complejos que forman estas proteínas se pensó que el dominio velvet estaba implicado en este tipo de interacciones (Sarıkaya Bayram *et al.*, 2010). Experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), *tiling microarray* (ChIP-chip) y retraso en gel han revelado que la proteína VosA es capaz de unirse al DNA, a través de la primera mitad de la proteína, donde se encuentra el dominio velvet (Ahmed *et al.*, 2013). La proteína con la que presenta mayor homología estructural VosA es el factor de transcripción de mamíferos NF-kD-p50 (Muller *et al.*, 1995; Ghosh *et al.*, 1995; Ahmed *et al.*, 2013). Utilizando la similitud estructural con NF-kD-p50 se identificaron residuos importantes para la unión a DNA: K37, K39, R41, K42 y R160 (Ahmed *et al.*, 2013). En el caso del dominio velvet presente en la proteína VelB de *A. nidulans* el residuo correspondiente al K37 no existe y el K42 es sustituido por un residuo arginina (Ahmed *et al.*, 2013). En el caso de VelB no se ha podido demostrar la unión a DNA por sí mismo, pero si del complejo dimérico VelB-VosA.

1.10. Objetivos de la tesis

Este proyecto tiene como objetivo general caracterizar las bases moleculares de la inactivación de Mewc-1b por oligoubiquitilación, sin que medie degradación, profundizando a su vez en la función de *crgA* y además caracterizar las respuestas a la luz y la implicación

Introducción

de los tres genes *wc-1* de *Mucor*. Este objetivo general se ha estructurado en los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterización de la oligoubiquitilación de *Mcwc-1b*.
2. Identificación y caracterización de genes regulados por *crgA* de forma dependiente e independiente de *mcwc-1b* y genes exclusivamente regulados por *mcwc-1b*.
3. Caracterizar genes regulados por *crgA* que controlen la esporulación.
4. Identificación y caracterización de genes regulados por luz de forma dependiente e independiente de *mcwc-1a*, *mcwc-1b* y *mcwc-1c*.

2. Materiales y Métodos

2.1. Estirpes utilizadas

Las estirpes de *Mucor* utilizadas en este trabajo se muestran en la **Tabla 1**. Todas las estirpes con el prefijo MU se han obtenido en la Universidad de Murcia y derivan de la estirpe R7B, silvestre para la carotenogénesis y autótrofa para la leucina, que se obtuvo mediante mutagénesis química a partir de la estirpe silvestre CBS 277.49 (*Mucor racemosus* ATCC 1216b; Schipper, 1976).

Tabla 1. Estirpes de *Mucor* utilizadas en este trabajo.

Estirpes	Genotipo	Origen o referencia
R7B	<i>leuA</i> ⁻	Roncero, 1984
MU221	<i>crgA::leuA</i>	Navarro et al., 2001
MU223	<i>crgA::leuA, pyrG</i> ⁻	Lorca-Pascual et al., 2001
MU241		
MU242	<i>leuA</i> ⁻ , <i>mcwc-1a::pyrG</i>	Silva et al., 2006
MU244	<i>leuA</i> ⁻ , <i>mcwc-1b::pyrG</i>	Silva et al., 2006
MU247	<i>leuA</i> ⁻ , <i>mcwc-1c::pyrG</i>	Silva et al., 2006
MU252	<i>crgA::leuA, mcwc-1b::pyrG</i>	Silva et al., 2008

La estirpe MU221 se generó por sustitución del *crgA* de la estirpe R7B por una copia silvestre del gen *leuA* de *Mucor*, mientras que la estirpe MU223 se generó por mutagénesis química a partir de la estirpe MU221. Por otro lado, la estirpe MU241 se generó restaurando el gen mutado *leuA* de R7B con una copia silvestre del mismo mediante recombinación homóloga. Las estirpes MU242, MU244 y MU247 se generaron por sustitución de los genes *mcwc-1a*, *mcwc-1b* y *mcwc-1c* respectivamente de la estirpe MU402 (*leuA*⁻, *pyrG*⁻) por una copia silvestre del gen *pyrG* de *Mucor*. La estirpe MU252 se generó por sustitución del *mcwc-1b* de la estirpe MU223 por una copia silvestre del gen *pyrG* de *Mucor*.

En la **Tabla 2** se muestran las estirpes de *Escherichia coli* y *Sacharomyces cerevisiae* utilizadas, su genotipo y el origen o referencia.

Tabla 2. Estirpes de *E. coli* y *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo

Estirpes	Genotipo	Origen o referencia
DH5 α	F-, recA1, endA1, gyrA96, hsdR17(rk-,mk-), supE44, thi-1, relA1, lacZ, l-	Hanahan, 1983
PJ69-4	MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-901 his3-200 gal4 Δ gal80 Δ GAL-ADE2 lys2::GAL1-HIS3 met2::GAL7-LacZ	P. James et al., 1996

La estirpe DH5 α de *E. coli* se utilizó en los experimentos de clonación de plásmidos bacterianos. Sus características más significativas son:

1. No permite la recombinación debido a la mutación recA⁻, lo que favorece la estabilidad de los plásmidos.
2. Porta una mutación lacZ que puede ser complementada por una gran variedad de plásmidos utilizados habitualmente.
3. Puede mantenerse congelada competente durante largos periodos de tiempo.

La estirpe PJ69-4 de *S. cerevisiae* se utilizó en la búsqueda de proteínas que interaccionaran con CrgA mediante ensayo de Doble Híbrido de Levaduras.

2.2. Medios y condiciones de crecimiento

2.2.1. Echerichia coli

E. coli se cultivó a 37°C con agitación en medio nutritivo Luria (LB) (Miller, 1972). Antes de esterilizar el medio en el autoclave, el pH fue ajustado a 7,2-7,4. Para medios sólidos se añadió 15 g/l de agar. Cuando fue necesario, tras autoclavar, se añadió el antibiótico ampicilina a una concentración final de 100 μ g/ml, cloranfenicol a 40-50 μ g/ml o tetraciclina a 13 μ g/ml para medio sólido y 10 μ g/ml para medio líquido.

2.2.2. Sacharomyces cerevisiae

S. cerevisiae se cultivó a 30°C con agitación en medio nutritivo YPAD o en medio mínimo SD (Synthetic Defined). Para los experimentos de transformación se preparó el medio SD en el que se eliminaron varios de los componentes específicos: triptófano (-W), leucina (-L), histidina (-H) y adenina (-A). Se añadió 2.5 mM de aminotriazol

(antimetabolito de la histidina) siempre que se eliminó este último aminoácido del medio, ya que el gen *his3* tiene una débil expresión basal en la estirpe PJ69-4, lo que puede permitir un ligero crecimiento de la levadura que se ve reducido por la presencia del 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT). La mezcla de aminoácidos se esterilizó por filtración y se añadió al medio autoclavado. Para medios sólidos se añadió 20 g/l de agar.

2.2.3. *Mucor circinelloides*.

Mucor se cultivó a 26°C en medio mínimo YNB (Lasker y Borgia, 1980) o MMC (Nicolás *et al.*, 2007) o en medio nutritivo YPG (Bartnicki-García y Nickerson, 1962). Cuando fue necesario, después de autoclavar, el medio mínimo YNB se suplementó con leucina (20 µg/ml) y los medios YNB, MMC e YPG con uridina (0,2 mg/ml). En experimentos de transformación se añadió sorbitol a una concentración de 0,5 M para evitar que la diferencia de presión osmótica hiciese estallar los protoplastos. En todos los casos, al preparar medios sólidos el agar se autoclavó por separado para evitar que el pH ácido de los medios impidiese la correcta polimerización del mismo. El pH se ajustó a 4,5 cuando se requirió un crecimiento micelial normal y a 2,8-3,2 para obtener un crecimiento colonial, que permitiera analizar un gran número de colonias por caja.

Para la obtención de esporas se obtuvieron micelios en cajas de Petri con el medio de cultivo adecuado a partir de suspensiones de esporas o de fragmentos de micelio trasplantados con pinzas estériles. Los micelios se incubaron durante 2-3 días bajo luz continua antes de recoger las esporas extendiendo unos 5 ml de agua destilada estéril con ayuda de un asa de siembra también estéril. Las esporas de las distintas estirpes se conservaron en agua destilada estéril a 4°C cuando su uso fue continuado y a -20°C de forma permanente.

2.2.4. Inducción por luz de micelios de *Mucor circinelloides*.

Rutinariamente los cultivos para la obtención de esporas se realizan en condiciones de iluminación con luz blanca (13,7 Wm⁻²). Cuando fue necesario los cultivos en caja de petri se sometieron a un pulso de luz blanca (13,7 Wm⁻²) durante 20 minutos.

2.3. Tampones y reactivos

- a) Manipulación de DNA:

TE

Materiales y Métodos

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

TAE 50x

- Tris 2 M
- Ácido acético 5,71 %
- EDTA 0,05 M

Tampón de carga 10x electroforesis

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

Solución de extracción de DNA de *Mucor*

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

b) Manipulación de **RNA**:

Tampón MOPS

- MOPS pH 7,0 20 mM
- Acetato sódico 5 mM
- EDTA 1 mM

Tampón de ribonucleasas

- Tris-HCl pH 7,5 20 mM
- NaCl 60 mM
- EDTA pH 8,0 5 mM

Solución de extracción de RNA

- Isotiocianato de guanidina 4 M
- Tris-HCl pH 7,5 50 mM
- EDTA pH 8 10 mM
- Sarcosil 2 %

Solución de CsCl

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

Los tampones utilizados en los experimentos con RNA se trataron con dietilpircarbonato (DEPC) al 0,1 % durante al menos 1 hora a temperatura ambiente para eliminar las ribonucleasas. El DEPC se eliminó posteriormente mediante autoclavado durante 20 minutos. Las soluciones que contenían Tris se prepararon con agua previamente tratada con DEPC.

c) Manipulación de **proteínas**:

Tampón de extracción de proteínas (TSA)

- Tris-ClH (pH 8,0) 10 mM
- NaCl 0,15 M
- Tritón X-100 1 %
- Benzamidina 1 mM
- Coctel de inhibidores de proteasas (Sigma P-8215) 1:50

Geles de poliacrilamida

-Gel separador (10%)

- Tris-HCl pH 8,85 0,75 M
- SDS 0,1 %

Materiales y Métodos

- Acrilamida/bisacrilamida (37,5:1) 10 %
- APS 0,2 %
- TEMED 0,1 %

-Gel concentrador (6%)

- Tris-HCl pH 6,8 0,125 M
- SDS 0,1 %
- Acrilamida/bisacrilamida (37,5:1) 6 %
- APS 0,2 %
- TEMED 0,2 %

Tampón de carga 5x

- Tris-HCl (pH 6,8) 0,3 M
- Glicerol 50 %
- SDS 10 %
- Azul de bromofenol 0,01 %
- β -mercaptoetanol 25 %

Tampón de electroforesis

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

Tampón PBS

- NaCl 140 mM

- KCl 3,3 mM
- Na₂HPO₄ 10 mM
- KH₂PO₄ 1,8 mM

Tampón PBST

- Se obtiene adicionando 0,05 % de Tween-20 al tampón PBS.

Tampón de lisis/ Tampón de lavado I (Inmunoprecipitación)

- Tris-HCl (pH 8,0) 0,05 M
- NaCl 0,15 M
- Nonidet (SIGMA) 1 %
- Deoxicolato sódico 0,5 %

Tampón de lavado 2 (Inmunoprecipitación)

- Tris-HCl (pH 8,0) 0,05 M
- NaCl 0,5 M
- Nonidet (SIGMA) 1 %
- Deoxicolato sódico 0,5 %

Tampón de lavado 2I (Inmunoprecipitación)

- Tris-HCl (pH 8,0) 0,05 M
- Nonidet (SIGMA) 1 %
- Deoxicolato sódico 0,5 %

d) Transformación de *Mucor*:

Tampón fosfato-sorbitol

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

Tampón MOPS-sorbitol

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

Solución de PEG 4000

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

e) Transferencia de ácidos nucleicos a membranas:

SSC 20x pH 7,0

- NaCl 3 M
- Citrato sódico 300 mM

f) Hibridaciones:

Solución de prehibridación NaCl

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

desnaturalizado.

Solución de hibridación NaCl

Se obtiene adicionando 0,1 g/ml de sulfato de dextrano a la solución de prehibridación.

g) Electroforesis en geles de poliacrilamida:

Tampón de carga-formamida 2x

- Formamida desionizada 95 %
- Azul de bromofenol 0,025 %

- Cianol de xileno 0,025 %
- SDS 0,025 %
- EDTA pH 8 18 mM

TBE 10x

- Tris base 0,9 M
- Ácido bórico 0,9 M
- EDTA 20 mM

2.4. Transformación de *E. coli*.

La introducción de plásmidos en *E. coli* se realizó siguiendo tanto el procedimiento químico como la electroporación en función del número de transformantes que se querían obtener, ya que el segundo procedimiento es más eficiente. La obtención de células competentes y su transformación se efectuaron según Sambrook y Russell, 2001, para ambos procedimientos. Los parámetros de electroporación utilizados fueron: 1,7 kV, 25 μ F y 200 Ω , siendo empleadas cubetas de electroporación de 0,1 cm en un electroporador Gen Pulser Xcell™ Electroporation System (Bio-Rad)

2.5. Transformación de *S. cerevisiae*

La transformación de levaduras para los experimentos de doble híbrido se realizó siguiendo el protocolo de acetato de litio-PEG3350 descrito previamente por Gietz *et al.* (1995). Una colonia de levaduras crecida en cajas de medio YPAD se inoculó en 2 ml de medio líquido YPAD, incubándose a 30°C y en agitación continua a 250 r.p.m. Después de 24 horas de crecimiento, se añadieron otros 8 ml de YPAD y se prolongó la incubación durante 5 horas más. Las células se precipitaron mediante centrifugación a 2.300 r.p.m y se resuspendieron en 5 ml de acetato de litio 100 mM. A partir de la mezcla de células se hicieron alícuotas en tubos eppendorf de 1,5 ml, se centrifugaron a 2.300 r.p.m y el pellet se resuspendió el pellet en 230 μ l de PEG 3350 50 %, 35 μ l de acetato de litio 1 M, 46 μ l de H₂O destilada y 9 μ l de DNA de salmón. La transformación se realizó en tubos eppendorf de 0,5 ml. A cada tubo se añadió 32 μ l de la mezcla de células y 1 μ l de plásmido purificado

a una concentración de 150-300 ng/μl. La mezcla se sometió a una serie de tratamientos térmicos en un termociclador: 30 min a 30°C, 25 min a 42°C y 1 min a 30°C. Los transformantes se seleccionaron en medio SD-W (si el marcador es *trp1*) o SD-L (si el marcador es *leu2*). Las estirpes diploides con los dos plásmidos híbridos se generaron en cajas de medio YPAD y se seleccionaron en medio SD-LW. El análisis de la interacción entre las proteínas se realizó mediante réplica, usando terciopelo, en cajas de medio SD-LWH, para seleccionar las interacciones débiles, y SD-LWA, para seleccionar las interacciones fuertes.

2.6. Transformación de *Mucor*.

La transformación se realizó siguiendo dos protocolos: el primero descrito por van Heeswijck y Roncero (1984) y basado en la generación de protoplastos que son incubados con DNA en presencia de polietilenglicol e iones de calcio (Torres-Martínez et al., 2012); y el segundo basado en la electroporación de protoplastos (Gutiérrez *et al.*, 2011). En este segundo caso los parámetros de electroporación utilizados fueron: 800V, 25μF y 400Ω siendo empleadas cubetas de electroporación de 0,2 cm.

La transformación integrativa para interrumpir el gen *velB7* se realizó por el procedimiento de electroporación, pero empleando DNA lineal en lugar de DNA circular. Los protoplastos se sembraron en cajas de medio MMC pH 3,2 con 0,5 M de sorbitol para seleccionar los transformantes. La identificación de los transformantes que habían integrado el DNA exógeno se realizó determinando el porcentaje de esporas que mantenían el marcador *pyrG*, utilizado como marcador de selección, durante cuatro ciclos de crecimiento en medio selectivo. Este porcentaje se calculó comparando el número de colonias en la siembra en medio selectivo (YNB pH 3,2) y no selectivo (YNB pH 3,2 con uridina). Los transformantes con un mayor porcentaje de esporas Ura⁺ se seleccionaron como presuntos portadores del DNA integrado.

2.8. Manipulación del DNA.

2.8.1. Aislamiento de DNA de *Mucor*.

El DNA de *Mucor* se aisló siguiendo básicamente el protocolo descrito por (Ruiz-Pérez et al., 1995), con ligeras modificaciones. La extracción de DNA se realizó a partir de micelios crecidos en medio sólido a pH 4,5. Para ello, los trasplantes se realizaron sobre una

lámina estéril de papel celofán colocada sobre la superficie del medio sólido para facilitar posteriormente la recogida del micelio.

Los micelios se incubaron durante 2-4 días a 26°C antes de ser recogidos y triturados en un mortero rugoso con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino. Al micelio triturado se le añadió 750-800 µl de tampón de extracción de DNA (200 mM TrisClH pH 8,0, 100 mM EDTA pH 8,0, 1 % SDS) y la mezcla se incubó con 30 µl de proteinasa K (2 mg/ml en TE) y 30 µl de RNasa (10 mg/ml) durante 3 horas a 37°C en un tubo eppendorf.

Tras este período de incubación, se extrajo la fase acuosa mediante un tratamiento con fenol y varios con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), hasta que no quedaron restos de proteínas en la interfase. Finalmente, se lavó con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). La fase acuosa resultante se precipitó con un volumen de isopropanol y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M a pH 5,2. El precipitado se lavó con etanol al 70 % y, tras ser secado a 37°C, se resuspendió en 40-50 µl de TE o agua bidestilada.

2.8.2. Aislamiento de DNA plasmídico.

El DNA plasmídico de *E. coli* se aisló por el procedimiento rápido de hervido (Holmes y Quigley, 1981) cuando no se necesitaba gran pureza (digestiones con enzimas de restricción, transformación de *Mucor*, etc,..) o mediante columnas comerciales de purificación de plásmido (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche Applied Science o GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Fermentas) cuando se requería una gran pureza (secuenciación, PCR).

2.8.3. Tratamiento de DNA con enzimas.

Los tratamientos enzimáticos más usuales fueron:

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

Desfosforilación del extremo 5' con la enzima fosfatasa alcalina de camarón (Roche) para evitar autoligación de vectores. Todos los tratamientos se realizaron de acuerdo con las especificaciones del suministrador.

Ligación de fragmentos de DNA. Se realizó en volúmenes pequeños (20 µl) con tampón de ligación (Roche o Fermentas) y una unidad de la enzima ligasa de T4 (Roche o Fermentas). Las mezclas de ligación se incubaron a 16°C durante un mínimo de 2 horas. En

general, la relación molar de vector:inserto usada fue de 1:3 ó 1:10. Siempre que fue necesario, las enzimas se inactivaron por medio de calor, siguiendo las especificaciones del suministrador.

2.8.4. Técnicas electroforéticas.

Para caracterizar plásmidos, separar fragmentos de distinto tamaño generados en las digestiones con restrictasas o verificar los productos obtenidos mediante PCR, el DNA se sometió a electroforesis en geles horizontales de agarosa (Pronadisa). La purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se llevó a cabo con columnas High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Applied Science) o GeneJET Gel Extraction Kit (Fermentas).

2.8.5. Amplificación de DNA por PCR.

El proceso de amplificación de DNA se llevó a cabo utilizando 20 pmoles de cada oligonucleótido (60 pmoles en el caso de cebadores degenerados) y las enzimas ECOTAQ DNA Polymerase (Ecogen), ECOTAQ PLUS DNA Polymerase (Ecogen) o PfuUltra™ Hotstart DNA Polymerase (Stratagene), BIOTAQ™ DNA Polymerase (Bioline), BIO-X-ACT™ Long Mix (Bioline) KAPA HiFi PCR (kapa Biosystems) siguiendo en cada caso las indicaciones del suministrador. Las muestras se sometieron a un ciclo de 3 minutos a 94°C y 30 ciclos de desnaturalización (45 segundos a 94°C), alineamiento (1 minuto a la T_m de los cebadores) y polimerización (1 minuto por kb de producto a amplificar a 72°C) .Los cebadores utilizados en los experimentos de PCR se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Cebadores específicos utilizados en las reacciones de PCR y en secuenciación

Los nucleótidos marcados en rojo indican sitios de restricción añadidos en el extremo 5' de algunos oligonucleótidos. En negrita, nucleótidos añadidos en el extremo 5' de los sitios de restricción para facilitar la digestión.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia*	Uso
mcwc-1b-p38	TACCTGTCGACT TATGGATCCGTTTC AATC	Cebador usado para la clonación de mcwc-1b en el vector de expresión.
34278F1	AAGTCGACGTGAGGGACGCCTTG	Cebador para la síntesis de la sonda que detecta el mRNA del gen con ID 34278
34278P1	TACCTCGCCGAGGACGTCCCATC	Cebador para la síntesis de la sonda que detecta el mRNA del gen con ID 34278
94089F1	CTAGCAATAGGCCGTTTCG	Cebador para la síntesis de la sonda que detecta el mRNA del gen con ID 94089
94089P1	ATGCATTCCAGCAATGTCC	Cebador para la síntesis de la sonda que detecta el mRNA del gen con ID 94089

94903F1	TTATTTTCGCTAGTGGGTCG	Cebador para la síntesis de la sonda que detecta el mRNA del gen con ID 94903
94903P1	GGCACAGCTATTATCTGCGC	Cebador para la síntesis de la sonda que detecta el mRNA del gen con ID 94903
TauF1	AGCGCCTTGACCGACACTC	Cebador para la síntesis de la sonda que detecta el mRNA del gen con ID 39289
TauR1	AGACTCGCGCTTGCTGAGG	Cebador para la síntesis de la sonda que detecta el mRNA del gen con ID 39289
RiboF1	TGGACAGCCGAGGAAGTCG	Cebador para la síntesis de la sonda que detecta el mRNA del gen con ID 88856
RiboR1	TGCTGGACATGACACCAGC	Cebador para la síntesis de la sonda que detecta el mRNA del gen con ID 88856
VonF1	TGGCTGCTGCTGCTCTTAGC	Cebador para la síntesis de la sonda que detecta el mRNA del gen con ID 94333
VonR1	GCCTTGCATTTCGGCACCACC	Cebador para la síntesis de la sonda que detecta el mRNA del gen con ID 94333
VeryF1	TGCTGCTTCCGCTGCCTACC	Cebador para la síntesis de la sonda que detecta el mRNA del gen con ID 79596
VeryR1	CTGGCTTGAGCGGGCTTGG	Cebador para la síntesis de la sonda que detecta el mRNA del gen con ID 79596
PeptiF1	CGCGTTGCCTTTGCCTCTGC	Cebador para la síntesis de la sonda que detecta el mRNA del gen con ID 85591
PeptiR1	TTCGCTCTCGCGCCAGGATG	Cebador para la síntesis de la sonda que detecta el mRNA del gen con ID 85591
HydroF1	CGCCGCTGTTGGCATGGC	Cebador para la síntesis de la sonda que detecta el mRNA del gen con ID 86952
HydroR1	CCCAGAGCACCAGCGGCATAG	Cebador para la síntesis de la sonda que detecta el mRNA del gen con ID 86952
PeptiAF1	CAGCTTATGGTGTTCAAACCCGTG	Cebador para la síntesis de la sonda que detecta el mRNA del gen con ID 32338
PeptiAR1	TGAAGCATCATGTCTTGTACCTC	Cebador para la síntesis de la sonda que detecta el mRNA del gen con ID 32338
VelvetP1	CACCTGCAGTACCAAGCAGCCTCC AGATG	Cebador para la amplificación y clonación del gen <i>velB7t</i>
VelvetP2	ATCAAGAATTCGAGGTAGCCTGT GCTGTGC	Cebador para la amplificación y clonación del gen <i>velB7</i>
VelvetP3	GAACAAAGATCTGCTATCGCTTGA CATTGACG	Cebador para la generación del plásmido de interrupción del gen <i>velB7</i>
VelvetP4	GCTTCTGAAAGATCTGAACAATGA TAGAGCG	Cebador para la generación del plásmido de interrupción del gen <i>velB7</i>
VelvetP5	ACGAGCATGGAGCAACACTG	Cebador para la síntesis de la sonda que detecta la interrupción

2.8.6. Marcado de fragmentos de DNA.

El DNA que se utilizó como sonda en los experimentos de hibridación tipo Southern se marcó mediante la introducción del nucleótido dCTP marcado con fósforo-32 (³²P) en la posición α (Easytides® Deoxycytidine 5'-Triphosphate, [α-³²P], Perkin Elmer) (Feinberg y Vogelstein, 1983; Feinberg y Vogelstein, 1984). El marcado se realizó con el kit Ready-To-Go™ DNA Labelling Beads (-dCTP) (Amersham), siguiendo las instrucciones del suministrador. Para detener la reacción de marcado, se añadieron 50 µl de agua bidestilada a la reacción. A continuación, se pasó toda la solución por una columna de Sephadex™ G-50 Fine DNA Grade (Amersham Pharmacia), centrifugando durante 3 minutos a 2.000 r.p.m. para eliminar los nucleótidos no incorporados, que quedan retenidos en la columna, mientras que en la sonda queda en eluido.

2.8.7. Hibridación de DNA fijado a un soporte.

El DNA genómico (1 µg) se digirió con las restrictasas adecuadas y se sometió a electroforesis en gel de agarosa. A continuación, el gel se incubó durante 20-25 minutos en una solución de ácido clorhídrico 0,4 N, se lavó con agua bidestilada y se incubó durante 20-25 minutos en una solución de NaOH 0,4 N para desnaturalizar el DNA. Finalmente, el DNA se transfirió a una membrana de nailon (Hybond™-N+, Amersham Biosciences) mediante transferencia capilar con una solución de NaOH 0,4 N durante un mínimo de 2 horas (Sambrook y Russell, 2001). Una vez transferido, se secó el filtro a temperatura ambiente para fijar el DNA. La hibridación se realizó en todos los casos con sondas de DNA marcadas, utilizando una temperatura de hibridación de 65°C y condiciones restrictivas de lavado (20 minutos a 65°C con 2x SSC, 0,1 % SDS, 20 minutos a 65°C con 1x SSC, 0,1 % SDS, 20 minutos a 65°C con 0,5x SSC, 0,1 % SDS y 20 minutos a 65°C con 0,1x SSC, 0,1 % SDS). Seguidamente, las membranas se pusieron en contacto con películas Kodak X-OMAT™ LS (baja sensibilidad) o con películas Kodak BIOMAX MS-1 (alta sensibilidad) dependiendo de la intensidad de la señal, que fue estimada utilizando un contador Geiger, siendo mantenidas a -70°C hasta el revelado de la película.

2.8.8. Secuenciación del DNA.

Los plásmidos portadores de los distintos fragmentos de DNA a secuenciar se purificaron con columnas High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Applied Science) o

GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas). La secuenciación fue llevada a cabo por el Servicio de Biología Molecular del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia.

2.9. Análisis de secuencias de DNA.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas en este trabajo se analizaron en el servidor BCM Search Launcher, utilizando la aplicación “Sequence Utilities” para buscar la presencia de ORFs, secuencias repetidas, puntos de corte con enzimas, etc. El programa Serial Cloner para se utilizó para la construcción teórica de los vectores, digestiones teóricas, comprobar tamaños de fragmentos digeridos con enzimas de restricción, tamaños de amplificaciones por PCR, etc. Para el análisis de las secuencias de aminoácidos se utilizaron los servidores EBI, NCBI y ExPasy. La búsqueda de proteínas homólogas se llevó a cabo mediante el programa “Blastp” del NCBI (Altschul *et al.*, 1997). Las predicciones de dominios conservados se realizaron con los programas “InterProScan” (EMBL-EBI), “Conserve Domain Database” (NCBI) y “Pfam” (Sanger Institute). Los análisis de comparación de múltiples secuencias se realizaron mediante el programa ClustalW2 del EMBL-EBI (Larkin *et al.*, 2007). El peso molecular y el punto isoeléctrico de proteínas se determinó con el programa “Compute pI/Mw” (ExPasy) (Gasteiger *et al.*, 2005). Los análisis filogenéticos entre las distintas secuencias se llevaron a cabo con el programa Phylogeny.fr del servidor MABL (<http://www.phylogeny.fr/>).

2.10. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo, así como sus características más destacables, se recogen en la **Tabla 4**. Un número importante de estos plásmidos han sido generados para este trabajo, describiéndose en los párrafos siguientes los detalles concretos de su construcción.

Tabla 4. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmidos	Características	Origen o referencia
pGEM-T Easy	Amp ^R (Clonación de productos PCR)	Promega

Plásmidos	Características	Origen o referencia
pBluescript 2 SK +/-	Amp ^R	Stratagene
pUC18	Amp ^R	Yanisch-Perron et al., 1985
pAD-GAL4-2.1	Amp ^R , <i>leu2</i> (Sistema de Doble Híbrido de levaduras)	Stratagene
pBD-GAL4 Cam	Cam ^R , <i>trp1</i> (Sistema de Doble Híbrido de levaduras)	Stratagene
pLEU4	Amp ^R , <i>leuA</i>	Roncero et al., 1989
pEPM1	Amp ^R , <i>pyrG</i>	Benito et al., 1992
pEPM9	Amp ^R , <i>pyrG</i>	
pUC57	Amp ^R	
pMAT470	Amp ^R , <i>trp1</i> , <i>crgA</i> (<i>pBDGal4</i> + los dos RING-finger de <i>CrgA</i> en fase)	Este laboratorio
pMAT1055	Amp ^R , <i>leu2</i> , <i>crgA</i> (<i>pADGal4</i> + <i>crgA</i> en fase)	Este laboratorio
pMAT1056	Amp ^R , <i>trp1</i> , <i>crgA</i> (<i>pBDGal4</i> + <i>crgA</i> en fase)	Este laboratorio
pMAT1404	Amp ^R , <i>leu2</i> , E2(2) (<i>pADGal4</i> + E2 (2) <i>NheI</i> y <i>XhoI</i> en fase)	Este laboratorio
pMAT1405	Amp ^R , <i>leu2</i> , E2(8) (<i>pADGal4</i> + E2 (8) <i>EcoRI</i> y <i>SalI</i> en fase)	Este laboratorio
pMAT1406	Amp ^R , <i>leu2</i> , E2(9) (<i>pADGal4</i> + E2 (9) <i>BamHI</i> y <i>SalI</i> en fase)	Este laboratorio
pMAT1407	Amp ^R , <i>leu2</i> , E2(4) (<i>pADGal4</i> + E2 (4) <i>EcoRV</i> y <i>SalI</i> en fase)	Este laboratorio
pMAT1408	Amp ^R , <i>leu2</i> , E2(5) (<i>pADGal4</i> + E2 (5) <i>EcoRI</i> y <i>XhoI</i> en fase)	Este laboratorio
pMAT1409	Amp ^R , <i>leu2</i> , E2(16) (<i>pADGal4</i> + E2 (16) <i>EcoRI</i> y <i>XhoI</i> en fase)	Este laboratorio
pMAT1410	Amp ^R , <i>leu2</i> , E2(11) (<i>pADGal4</i> + E2 (11) <i>EcoRI</i> y <i>XhoI</i> en fase)	Este laboratorio

Plásmidos	Características	Origen o referencia
pMAT1411	Amp ^R , <i>leu2</i> , E2(6) (pADGal4 + E2 (6) <i>EcoRI</i> y <i>XhoI</i> en fase)	Este laboratorio
pMAT1412	Amp ^R , <i>leu2</i> , E2(7) (pADGal4 + E2 (7) <i>EcoRI</i> y <i>XhoI</i> en fase)	Este laboratorio
pMAT1413	Amp ^R , <i>leu2</i> , E2(12) (pADGal4 + E2 (12) <i>EcoRI</i> y <i>SalI</i> en fase)	Este laboratorio
pMAT1414	Amp ^R , <i>leu2</i> , E2(3) (pADGal4 + E2 (3) <i>XhoI</i> en fase)	Este laboratorio
pMAT1415	Amp ^R , <i>leu2</i> , E2(13) (pADGal4 + E2 (13) <i>EcoRI</i> y <i>XhoI</i> en fase)	Este laboratorio
pMAT1416	Amp ^R , <i>trp1</i> , <i>mms2</i> (pBDGal4 + <i>mms2 EcoRI</i> y <i>XhoI</i> en fase)	Este laboratorio
pMAT1118	Amp ^R , <i>mcwc-1b</i> (fragmento <i>Hind2I</i> de 3300pb que incluye el gen completo <i>mcwc-1b</i>)	Este trabajo
pMAT1608	Amp ^R , <i>mcwc-1b</i> (fragmento <i>Hind2I-SacI</i> de 2100pb que incluye el gen <i>mcwc-1b</i> con 21 mutaciones sintetizado)	Este trabajo
pMAT1609	Amp ^R , <i>mcwc-1b</i> (fragmento <i>Hind2I-SacI</i> de 3300pb que incluye el gen completo <i>mcwc-1b</i> con 21 mutaciones)	Este trabajo
pMAT1611	Amp ^R , <i>leuA</i> , <i>mcwc-1b</i> (fragmento de 2700pb que incluye el gen <i>mcwc-1b</i> amplificado por cebadores y bajo el control de un promotor constitutivo)	Este trabajo
pMAT1612	Amp ^R , <i>leuA</i> , <i>mcwc-1b</i> (fragmento de 2700pb que incluye el gen completo <i>mcwc-1b</i> con 21 mutaciones amplificado por cebadores y bajo el control de un promotor constitutivo)	Este trabajo
pMAT1613	Amp ^R , <i>mcwc-1b</i> (fragmento <i>Hind2I-SacI</i> de 3300pb que incluye el gen completo <i>mcwc-1b</i> con 12 mutaciones en la región 3' del gen)	Este trabajo
pMAT1614	Amp ^R , <i>mcwc-1b</i> (fragmento <i>Hind2I-SacI</i> de 3300pb que incluye el gen completo <i>mcwc-1b</i> con 9 mutaciones en la región 5' del gen)	Este trabajo
pMAT1615	Amp ^R , <i>mcwc-1b</i> (fragmento <i>Hind2I-SacI</i> de 3300pb que incluye el gen completo <i>mcwc-1b</i> con 5 mutaciones en la región 5' del gen)	Este trabajo
pMAT1616	Amp ^R , <i>mcwc-1b</i> (fragmento <i>Hind2I-SacI</i> de 3300pb que incluye el gen completo <i>mcwc-1b</i> con 4 mutaciones en la región 5' del gen)	Este trabajo
pMAT1620	Amp ^R , <i>leuA</i> , <i>mcwc-1b</i> (fragmento de 2700pb que incluye el gen completo <i>mcwc-1b</i> con 12 mutaciones amplificado por cebadores y bajo el control de un promotor constitutivo)	Este trabajo
pMAT1621	Amp ^R , <i>leuA</i> , <i>mcwc-1b</i> (fragmento de 2700pb que incluye el gen completo <i>mcwc-1b</i> con 9 mutaciones amplificado por cebadores y bajo el control de un promotor constitutivo)	Este trabajo
pMAT1622	Amp ^R , <i>leuA</i> , <i>mcwc-1b</i> (fragmento de 2700pb que incluye el gen completo <i>mcwc-1b</i> con 5 mutaciones amplificado por cebadores y bajo el control de un promotor constitutivo)	Este trabajo

Plásmidos	Características	Origen o referencia
pMAT1623	Amp ^R , <i>leuA</i> , <i>mcwc-1b</i> (fragmento de 2700pb que incluye el gen completo <i>mcwc-1b</i> con 4 mutaciones amplificado por cebadores y bajo el control de un promotor constitutivo)	Este trabajo
pMAT1624	Amp ^R , <i>leuA</i> , <i>mcwc-1b</i> (fragmento de 2700pb que incluye el gen completo <i>mcwc-1b</i> con el cambio K216R y bajo el control de un promotor constitutivo)	Este trabajo
pMAT1625	Amp ^R , <i>leuA</i> , <i>mcwc-1b</i> (fragmento de 2700pb que incluye el gen completo <i>mcwc-1b</i> con el cambio K227R y bajo el control de un promotor constitutivo)	Este trabajo
pMAT1626	Amp ^R , <i>leuA</i> , <i>mcwc-1b</i> (fragmento de 2700pb que incluye el gen completo <i>mcwc-1b</i> con el cambio K234R y bajo el control de un promotor constitutivo)	Este trabajo
pMAT1627	Amp ^R , <i>leuA</i> , <i>mcwc-1b</i> (fragmento de 2700pb que incluye el gen completo <i>mcwc-1b</i> con el cambio K244R y bajo el control de un promotor constitutivo)	Este trabajo
pMAT1630	Amp ^R , <i>leuA</i> , <i>mcwc-1b</i> (fragmento de 3400pb que incluye el gen <i>mcwc-1b</i> amplificado fusionado por el extremo carboxilo a <i>cherry</i> bajo el control de un promotor constitutivo)	Este trabajo
pMAT1631	Amp ^R , <i>LeuA</i> , <i>mcwc-1b</i> (fragmento de 2700pb que incluye el gen completo <i>mcwc-1b</i> con el cambio K234R fusionado por el extremo carboxilo a <i>cherry</i> y bajo el control de un promotor constitutivo)	Este trabajo
pMAT1632	Amp ^R , <i>mcwc-1b</i> , <i>cherry</i> (fragmento <i>NotI-BbvCI</i> de 750pb del gen <i>mcwc-1b</i> que contiene el cambio K216R)	Este trabajo
pMAT1633	Amp ^R , <i>mcwc-1b</i> (fragmento <i>NotI-BbvCI</i> de 750pb del gen <i>mcwc-1b</i> que contiene el cambio K227R)	Este trabajo
pMAT1634	Amp ^R , <i>mcwc-1b</i> , <i>cherry</i> (fragmento <i>NotI-BbvCI</i> de 750pb del gen <i>mcwc-1b</i> que contiene el cambio K234R)	Este trabajo
pMAT1635	Amp ^R , <i>mcwc-1b</i> (fragmento <i>NotI-BbvCI</i> de 750pb del gen <i>mcwc-1b</i> que contiene el cambio K244R)	Este trabajo
pMAT1642	Amp ^R , <i>velB7</i> (fragmento <i>PstI-EcoRI</i> de 2500pb del gen <i>velB7</i> clonado en pUC18)	Este trabajo
pMAT1643	Amp ^R , <i>velB7</i> , <i>pyrG</i> (vector utilizado para la interrupción del gen <i>velB</i> , contiene 3200pb del gen <i>pyrG</i> flanqueado por secuencias aguas arriba y aguas debajo de <i>velB7</i>)	Este trabajo

2.10.1. Generación de diferentes alelos de *mcwc-1b*

En los experimentos para identificar la lisina que es ubiutilada en *Mcwc-1b* se generaron una serie de alelos mutantes del gen *mcwc-1b*, que dan lugar a proteínas con un número variable de lisinas sustituidas por argininas. Para generar los distintos alelos mutantes se sintetizó inicialmente (Genscript, EE.UU.) una parte del gen (desde el sitio *Apal* hasta el final del gen, que corresponde a la región del genoma: Scaffold7 1829644- 1827455)

donde 21 codones correspondientes a lisinas se cambiaron por codones de arginina (**Figura 8**).

Silvestre	1321	ACCAAACCTCAAATCAACCTGGGGCCCGTTGATTGTGTCGTGCTCTTTTGTGTTGTTGA	1380
Mutante	7	-----GGGCCCGTTGATTGTGTCGTGCTCTTTTGTGTTGTTGA	44
Silvestre	1381	TGCAAAACAATACGATTTTCCGCTTGTTTACGCCTCGCCCATGTTTGAGAGATTGACGGG	1440
Mutante	45	TGCAAAACAATACGATTTTCCGCTTGTTTACGCCTCGCCCATGTTTGAGAGATTGACGGG	104
Silvestre	1441	ATACGCCCCAAGCGAAGTGATAGGCAGAACTGCCGGTTCCTCCAGGCGCCGGACGGCAG	1500
Mutante	105	ATACGCCCCAAGCGAAGTGATAGGCAGAACTGCCGGTTCCTCCAGGCGCCGGACGGCAG	164
Silvestre	1501	AGTCGCTATTGGATCCAGACGAAAGTACACGGACAACACCACAGTGTACCACATCAAAAC	1560
Mutante	165	AGTCGCTATTGGATCCAGACGAAAGTACACGGACAACACCACAGTGTACCACATCAAAAC	224
Silvestre	1561	ACACATGGTGCAGGGCAAGAGTCGCAATCCAGCATCATCAACTACCGAAAGACGGGACA	1620
Mutante	225	ACACATGGTGCAGGGCAAGAGTCGCAATCCAGCATCATCAACTACCGAAAGACGGGACA	284
Silvestre	1621	GCCCTTTGTCAATCTGTTGACGGTGATACCCATTGCCTGGGAGTCGTCAGAGGACATTGA	1680
Mutante	285	GCCCTTTGTCAATCTGTTGACGGTGATACCCATTGCCTGGGAGTCGTCAGAGGACATTGA	344
Silvestre	1681	CTACTTTATTGGACTGCAGGTGGATCTGGTAGAGCAGCCAAATTCATCTTTCAAAGCAT	1740
Mutante	345	CTACTTTATTGGACTGCAGGTGGATCTGGTAGAGCAGCCAAATTCATCTTTCAAAGCAT	404
Silvestre	1741	GAAGGGTACGTGATAGTAGTAGCATAGCAGAGACACGGCACTTATTCTCTGTTTAAAGAC	1800
Mutante	405	GAAGGGTACGTGATAGTAGTAGCATAGCAGAGACACGGCACTTATTCTCTGTTTAAAGAC	464
Silvestre	1801	GGCACCTATTCTGTGAGCTATCGCAATTCACCATCCCTCCCTCCATTCAAGGTAGGCGC	1860
Mutante	465	GGCACCTATTCTGTGAGCTATCGCAATTCACCATCCCTCCCTCCATTCAAGGTAGGCGC	524
Silvestre	1861	TTGTTGCATGCGAGTGTGTTGATCCATTAACCAGTAGTTTTGTAGCGGGCCTCAGCATC	1920
Mutante	525	TTGTTGCATGCGAGTGTGTTGATCCATTAACCAGTAGTTTTGTAGCGGGCCTCAGCATC	584
Silvestre	1921	AATGCTGATCCAGGCGCTGCCATGGCAGAACCATTACGGAGTGGACGAGGCCCGTGTC	1980
Mutante	585	AATGCTGATCCAGGCGCTGCCATGGCAGAACCATTACGGAGTGGACGAGGCCCGTGTC	644
Silvestre	1981	CCCAAGCCAACGTACAACGCCAACAGTTCGCAGCAGCCCCATCATACAGCAGTAACCTG	2040
Mutante	645	CCCAAGCCAACGTACAACGCCAACAGTTCGCAGCAGCCCCATCATACAGCAGTAACCTG	704
Silvestre	2041	CCGAGCAAAAATGCCTCCATCACAGAAAGCGCCATCGTGCCATCGCAGCAGCAACACGCA	2100

Materiales y Métodos

Mutante	705	CCGAGCAAAAATGCCTCCATCACAGAAAGCGCCATCGTGCCATCGCAGCAGCAACACGCA	764
Silvestre	2101	GCGACACAGCCATCTGAAGCAGAGCCGCCATGGATGTAGAGACATTGATCAAGAAGCC	2160
Mutante	765	GCGACACAGCCATCTGAAGCAGAGCCGCCATGGATGTAGAGACATTGATCAGAGAAGCC	824
Silvestre	2161	AGCACCGACGAAGGCAAATTCCGACGCTGTTGGCACGAATTACTGCTGGACCAGAGTCCA	2220
Mutante	825	AGCACCGACGAAGGCAGATTCCGACGCTGTTGGCACGAATTACTGCTGGACCAGAGTCCA	884
Silvestre	2221	GATTTTCATCCATGTGCTGACCATCAAGGGCATCTTTTGTACTGCTCTGACTCGACTGCG	2280
Mutante	885	GATTTTCATCCATGTGCTGACCATCAGAGGCATCTTTTGTACTGCTCTGACTCGACTGCG	944
Silvestre	2281	CAACTACTAGAATACGAGCCGTCTGAACTGGTGGGCAATCATTAAAGCCATCTGCCAC	2340
Mutante	945	CAACTACTAGAATACGAGCCGTCTGAACTGGTGGGCAATCATTAAAGCCATCTGCCAC	1004
Silvestre	2341	CCATCCGATATCACCACCGTCATGCGGGAATTAAGCAATCCTCCAACCATTCCACCGAG	2400
Mutante	1005	CCATCCGATATCACCACCGTCATGCGGGAATTAAGCAATCCTCCAACCATTCCACCGAG	1064
Silvestre	2401	CCTGTCAATCTCATATAACCGTGTGCGTCGCAAGAACTCGGGCTACATGTGGATCGAATGT	2460
Mutante	1065	CCTGTCAATCTCATATAACCGTGTGCGTCGCAAGAACTCGGGCTACATGTGGATCGAATGT	1124
Silvestre	2461	AGCGGTAAAGCTGCGAAACGAAGATGGCCGTGGACGCAAGTACGTGGTCTATCCGGCCGG	2520
Mutante	1125	AGCGGTAGACTGCGAAACGAAGATGGCCGTGGACGCAAGTACGTGGTCTATCCGGCCGG	1184
Silvestre	2521	GAGCGACCCGTTTATCAGTTGCCACGCAACGCACTGACCGTCGGCAACAAGGCACACAGC	2580
Mutante	1185	GAGCGACCCGTTTATCAGTTGCCACGCAACGCACTGACCGTCGGCAACAAGGCACACAGC	1244
Silvestre	2581	ACACGCACCTCCAACCCTATACCCGGTATGGAGGATCACGAATTCTGGGGAATAAAGC	2640
Mutante	1245	ACACGCACCTCCAACCCTATACCCGGTATGGAGGATCACGAATTCTGGGGAAGATAAAGC	1304
Silvestre	2641	GCGGACGGACTTCTGCTGTATGTGACGCTGGGCAATGTGCTGGGATCGCCACCT	2700
Mutante	1305	GCGGACGGACTTCTGCTGTATGTGACGCTGGGCAATGTGCTGGGATCGCCACCT	1364
Silvestre	2701	TCTGAAATCATCGGCACTTCATTGTATCAGCTGCTGAGAAGCAACCGCACCACCGATTTA	2760
Mutante	1365	TCTGAAATCATCGGCACTTCATTGTATCAGCTGCTGAGAAGCAACCGCACCACCGATTTA	1424
Silvestre	2761	ACACGTGCGCTGGCAGAGGTCAAAGAGGGCAAAATTGTGTACCTGAGACACGCCTTGTG	2820
Mutante	1425	ACACGTGCGCTGGCAGAGGTCAGAGAGGGCAAAATTGTGTACCTGAGACACGCCTTGTG	1484
Silvestre	2821	GACAATACAGGCGTCGAGGTCATGGTCGCCACCACATTCATCCAGATGGAAAAGCGTCT	2880
Mutante	1485	GACAATACAGGCGTCGAGGTCATGGTCGCCACCACATTCATCCAGATGGAAAAGCGTCT	1544
Silvestre	2881	TTGCAAGAACAGCCGTCCTTGTGTTGATGCAGACAAAGGTGATTGGCGAGGAAACCACC	2940

Mutante	1545	 TTGCAAGAACAGCCGTCCTTTGTGTTGATGCAGACAAAGGTGATTGGCGAGGAAACCACC	1604
Silvestre	2941	CAGGCAGACGAGGAGCCTGTGTTTGTGTCGATAGATCCAGACGTC AAAAGA AGGGAAG	2999
Mutante	1605	 CAGGCAGACGAGGAGCCTGTGTTTGTGTCGATAGATCCAGACGTC GAAGA AGGGAAG	1663
Silvestre	3000	 AGCAGACATGTCGTTGCCCAATGTCGATAGCCATGGCGTCGTGACACCCACACCCCAAAA	3059
Mutante	1664	 AGCAGACATGTCGTTGCCCAATGTCGATAGCCATGGCGTCGTGACACCCACACCCCAAAA	1723
Silvestre	3060	 TATCAGTACGGTGGAGCGGATGGTGGATGAATTGGACATTAGCAGAGACACCAACTGGCA	3119
Mutante	1724	 TATCAGTACGGTGGAGCGGATGGTGGATGAATTGGACATTAGCAGAGACACCAACTGGCA	1783
Silvestre	3120	 GTACGAGCTGCATCAATTGCGAATCAGCAAC AAA AAGATGAGAGATGATTTAAATACCTT	3179
Mutante	1784	 GTACGAGCTGCATCAATTGCGAATCAGCAAC CA AAGATGAGAGATGATTTAAATACCTT	1843
Silvestre	3180	 GATCCAACGCGCC AA AGAGGTAAGTTTGCCGCTAGAGGCTCCATTTATGCACCTACTGAC	3239
Mutante	1844	 GATCCAACGCGCC CA AGAGGTAAGTTTGCCGCTAGAGGCTCCATTTATGCACCTACTGAC	1903
Silvestre	3240	 TAGGCACCAGGCTGGTAACAAGGAGGACACCGTCGTGTCAGCACATGTTTCCGAAGATT	3299
Mutante	1904	 TAGGCACCAGGCTGGTAACAAGGAGGACACCGTCGTGTCAGCACATGTTTCCGAAGATT	1963
Silvestre	3300	 TGATGGCTCCATGATTGACACACAAGAATATTCACCAGACGAACCCCTATTATGTAATTC	3359
Mutante	1964	 TGATGGCTCCATGATTGACACACAAGAATATTCACCAGACGAACCCCTATTATGTAATTC	2023
Silvestre	3360	 ATGTTCACTTCGCGAAATGCAGCAATCGGGCCATACCACGTCCCACAATGCACAATAAAC	3419
Mutante	2024	 ATGTTCACTTCGCGAAATGCAGCAATCGGGCCATACCACGTCCCACAATGCACAATAAAC	2083
Silvestre	3420	 TGTAATCCTAATTTGATAATACTACACCTCTCATTGGCATTGATGCTGCGTTGTAGGTAT	3479
Mutante	2084	 TGTAATCCTAATTTGATAATACTACACCTCTCATTGGCATTGATGCTGCGTTGTAGGTAT	2143
Silvestre	3480	 ATAGCAGGGAAAATGTATATAGGTAGAGCTC-----	3510
Mutante	2144	 ATAGCAGGGAAAATGTATATAGGTAGAGCTCATGCATAGATCT	2186

Figura 8. Comparación de las secuencias silvestre y mutante (sintetizada) de *mcwc-1b*.

En la secuencia silvestre se indica los pares de bases aguas abajo del codón de inicio ATG y en la secuencia mutante se indica los pares de bases sintetizados. Fondo amarillo: cambios de bases en la secuencia mutante respecto a la silvestre. Rojo: Codones

La secuencia mutante se recibió clonada en el vector pUC57, el plásmido se denominó pMAT1608. A partir de pMAT1118, que porta el alelo silvestre de *mcwc-1b*, incluyendo la

región promotora, se aisló el fragmento *Hind*2I-*Apa*I de 1,2 kb que se clonó en pMAT1608, generando un gen *mcwc-1b* completo (Figura 9). El plásmido generado se denominó pMAT1609 (Figura 9).

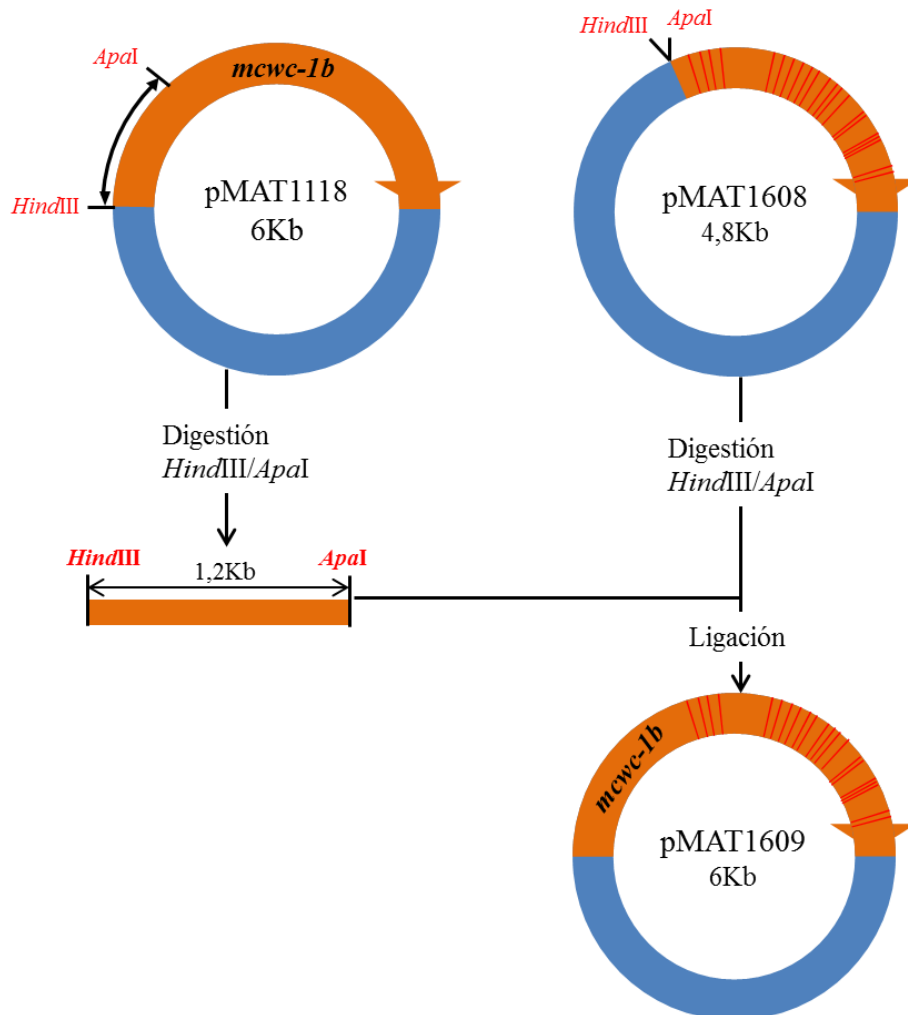
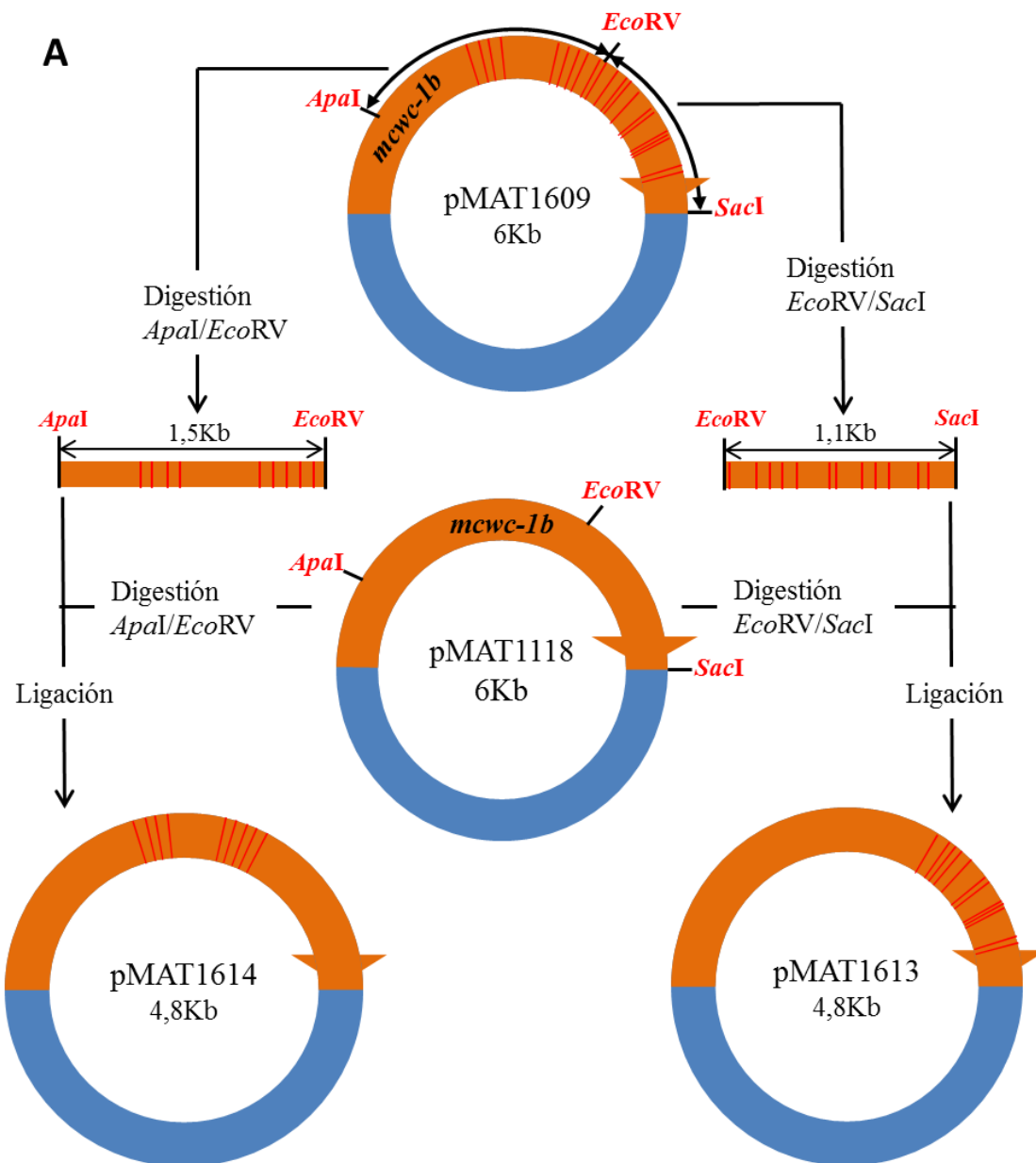


Figura 9. Construcción del plásmido pMAT1609.

Las mutaciones se representan con líneas rojas dentro del gen *mcwc-1b* manteniendo una posición relativa en la secuencia.

A partir de los alelos silvestre y mutante de *mcwc-1b* clonados en pMAT1118 y pMAT1609, respectivamente, se generaron, mediante la sustitución de fragmentos de un plásmido en otro, cuatro alelos mutantes con 12, 9, 5 y 4 codones de lisina mutados. El primer alelo portador de 12 codones mutados en la región 3' de la secuencia de *mcwc-1b* clonado en el plásmido pMAT1613 y el siguiente portador de 9 codones mutados en la región 5' clonado en el plásmido pMAT1614 (Figura 10). Los otros dos alelos se generaron

usando esta misma estrategia, el alelo con las sustituciones de las lisinas K216R, K227R, K234R y K244R (4 codones mutados) clonado en pMAT1616 y el alelo con las sustituciones de las lisinas K390R, K398R, K421R, K445R y K448R (5 codones mutados) clonado en el vector pMAT1615 (**Figura 10**).



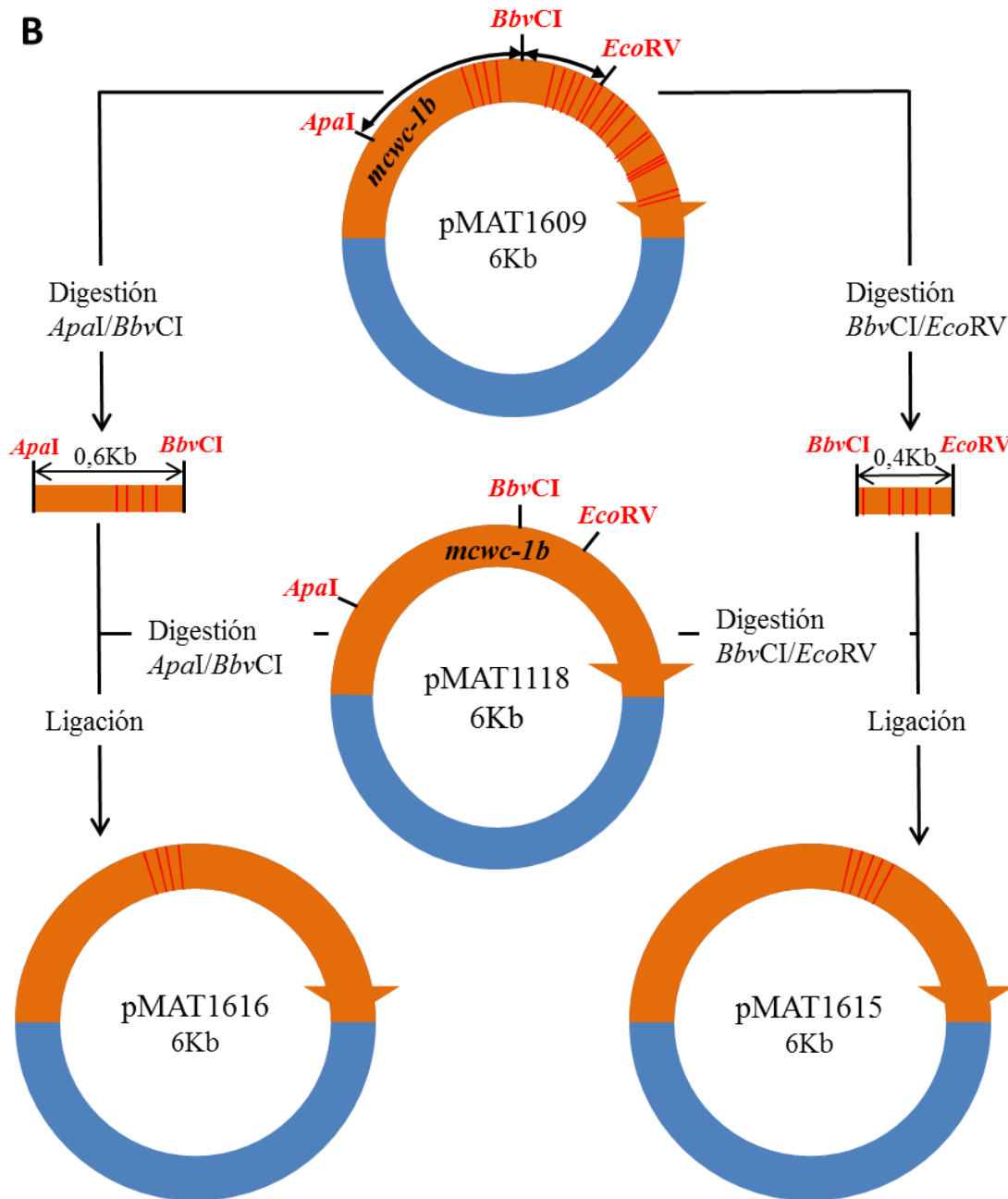


Figura 10. Esquema de la construcción de los plásmidos pMAT1613, pMAT1614, pMAT1615 y pMAT1616.

(A) A partir del alelo portador de 21 codones mutados se obtuvo un fragmento de 1,1 kb portador de 12 codones mutados mediante digestión con las enzimas de restricción *EcoRV* y *SacI*, del mismo alelo se obtuvo un fragmento de 1,5 kb portador de 9 codones mutados mediante digestión con *ApaI* y *SacI*. Ambos fragmentos se subclonaron en pMAT1118 obteniéndose dos nuevos vectores pMAT1613 y pMAT1614. (B) Se utilizó la misma estrategia para construir pMAT1615 cortando esta vez la secuencia mutada con *ApaI* y *BbvCI* y subclonando el fragmento de 0,6 kb portador de 5 codones mutados. Para construir pMAT1616 se subclonó un fragmento de 0,4 kb portador de 4 codones mutados obtenido de digerir la secuencia mutante con *BbvCI* y *EcoRV*.

2. 10.2. Generación de los vectores que expresan las diferentes versiones de *mcwc-1b*

Para generar vectores de expresión, los alelos silvestre y mutante del gen *mcwc-1b* se amplificaron por PCR a partir de pMAT1118 y pMAT1609, respectivamente (**Figura 10**). Para ello, se diseñó un oligonucleótido *mcwc-1b-38p*, que correspondía al extremo 5' del gen, incluyendo el codón ATG de inicio de la traducción y un punto de corte *SalI*, para facilitar su posterior clonación. Los alelos silvestre y mutante se amplificaron usando este cebador y como segundo cebador, el M13-rev y M13-fwd, respectivamente. En ambos casos se obtuvo un fragmento de 2700 pb correspondiente al gen *mcwc-1b*, que comprende desde el codón ATG inicial hasta 100 pb aguas abajo del codón fin de mensaje TAA. Estos fragmentos se clonaron en el vector de expresión pEUKA4-gox1 bajo el control del promotor P_{gpd1} (promotor del gen Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa 1) con una expresión dependiente de glucosa. La existencia de los puntos de corte *XhoI* y *SacI* nos permitió introducir cada una de las versiones del gen *mcwc-1b* amplificadas y cortadas con las enzimas de restricción *SalI* y *SacI* (**Figura 11**). Los dos plásmidos resultantes, que contienen los alelos mutante y silvestre, respectivamente, se denominaron pMAT1611 y pMAT1612 (**Figura 11**). Mediante secuenciación se comprobó que los fragmentos clonados en ambos plásmidos no tenían ninguna mutación adicional, aparte de las sustituciones introducidas en el alelo mutante para cambiar las 21 lisinas por argininas.

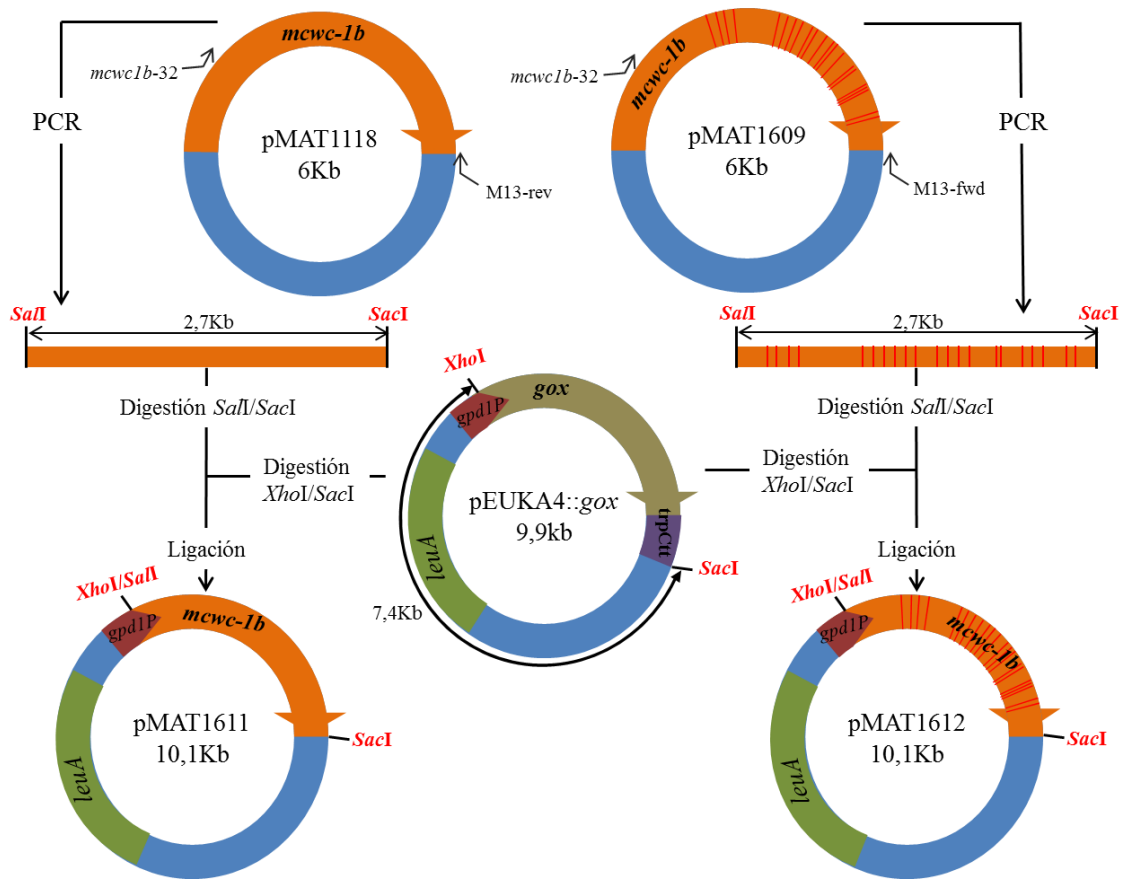


Figura 11. Construcción de los plásmidos de expresión con los alelos silvestre y mutante de *mcwc-1b*.

Los oligonucleótidos *mcwc1b-32* y M13-rev se usaron para amplificar la versión silvestre, *mcwc1b-32* y M13-fwd para amplificar la versión mutante, ambas se clonaron en pEUKA4 mediante los puntos de corte *XhoI/SalI* y *SacI*. Los vectores de expresión se denominaron pMAT1611 para el que expresa la versión silvestre y pMAT1612 para el que expresa la versión mutante.

Para construir los vectores de expresión que contienen las versiones de *mcwc-1b* con 12, 9, 5 y 4 codones mutados se realizó una subclonación. Los sitios de corte *NotI* y *SacI* presentes en *mcwc-1b* permitieron sustituir los fragmentos de los alelos con las diferentes mutaciones en el alelo silvestre clonado en el vector de expresión. Los nuevos vectores de expresión se denominaron pMAT1620, para el vector que contiene la versión con 12 cambios; pMAT1621 para el vector que contiene la versión con 9 cambios; pMAT1622 para el vector que contiene la versión con 5 cambios y pMAT1623 para el vector que contiene la versión con 4 cambios (**Figura 10**).

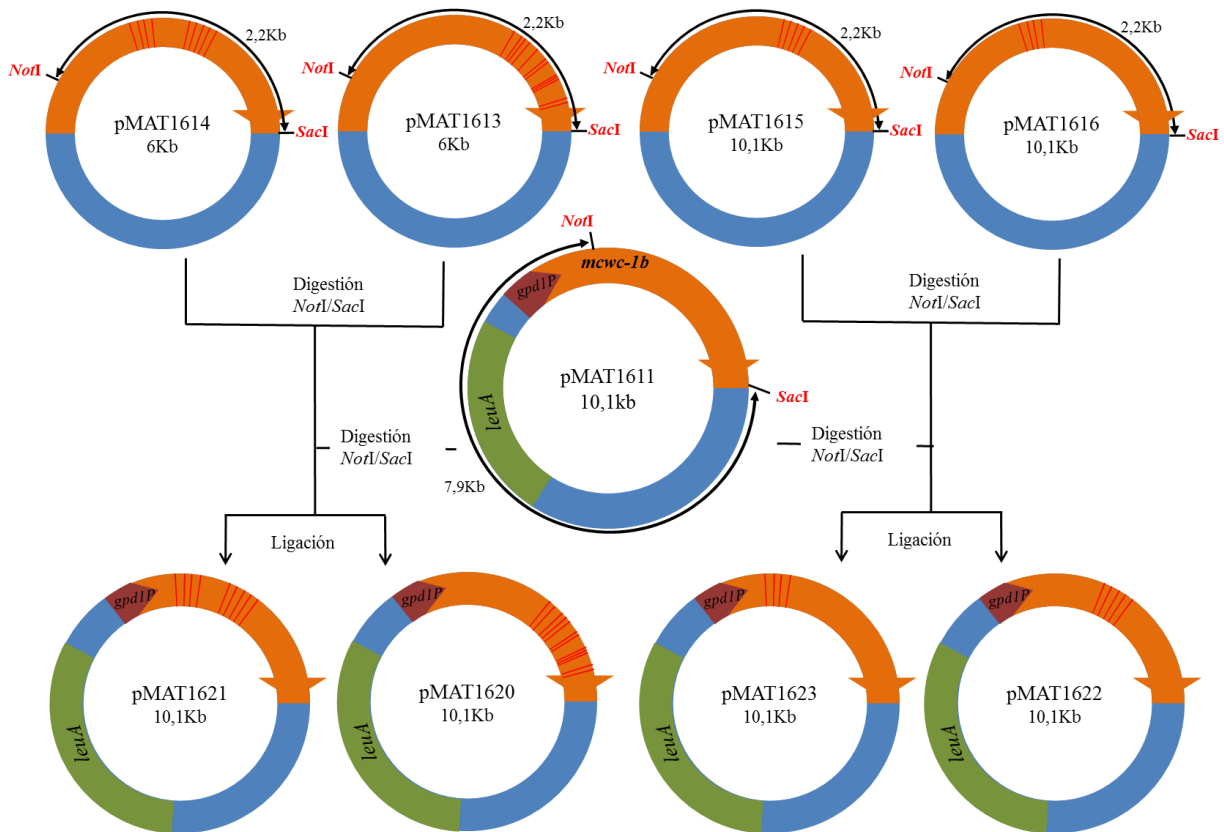


Figura 12. Construcción de los vectores de expresión pMAT1620, pMAT1621, pMAT1622 y pMAT1623.

Se realizó una digestión de las diferentes versiones de *mcwc-1b* con las enzimas de restricción *NotI* y *SacI*, los fragmentos obtenidos se subclonaron en el vector de expresión pMAT1611 que contiene la versión silvestre de *mcwc-1b*.

Para la generación de los alelos que daban lugar a una proteína con solo una lisina mutada, se obtuvieron por síntesis 4 fragmentos, correspondientes a la región del gen *mcwc-1b* comprendida entre los sitios de corte *NotI* y *BbvC1*, cada uno portador de mutación concreta. Estos puntos de corte permitieron, mediante subclonación sustituir los fragmentos con las mutaciones en el vector de expresión que contenía la versión silvestre (**Figura 13**). Los nuevos vectores de expresión se denominaron pMAT1624, para la sustitución de la lisina 216 (K216R); pMAT1625, para la sustitución de la lisina 227(K227R) ; pMAT1626, para la sustitución de la lisina 234 (K234R) y pMAT1627, para la sustitución de la lisina 244 (K244R).

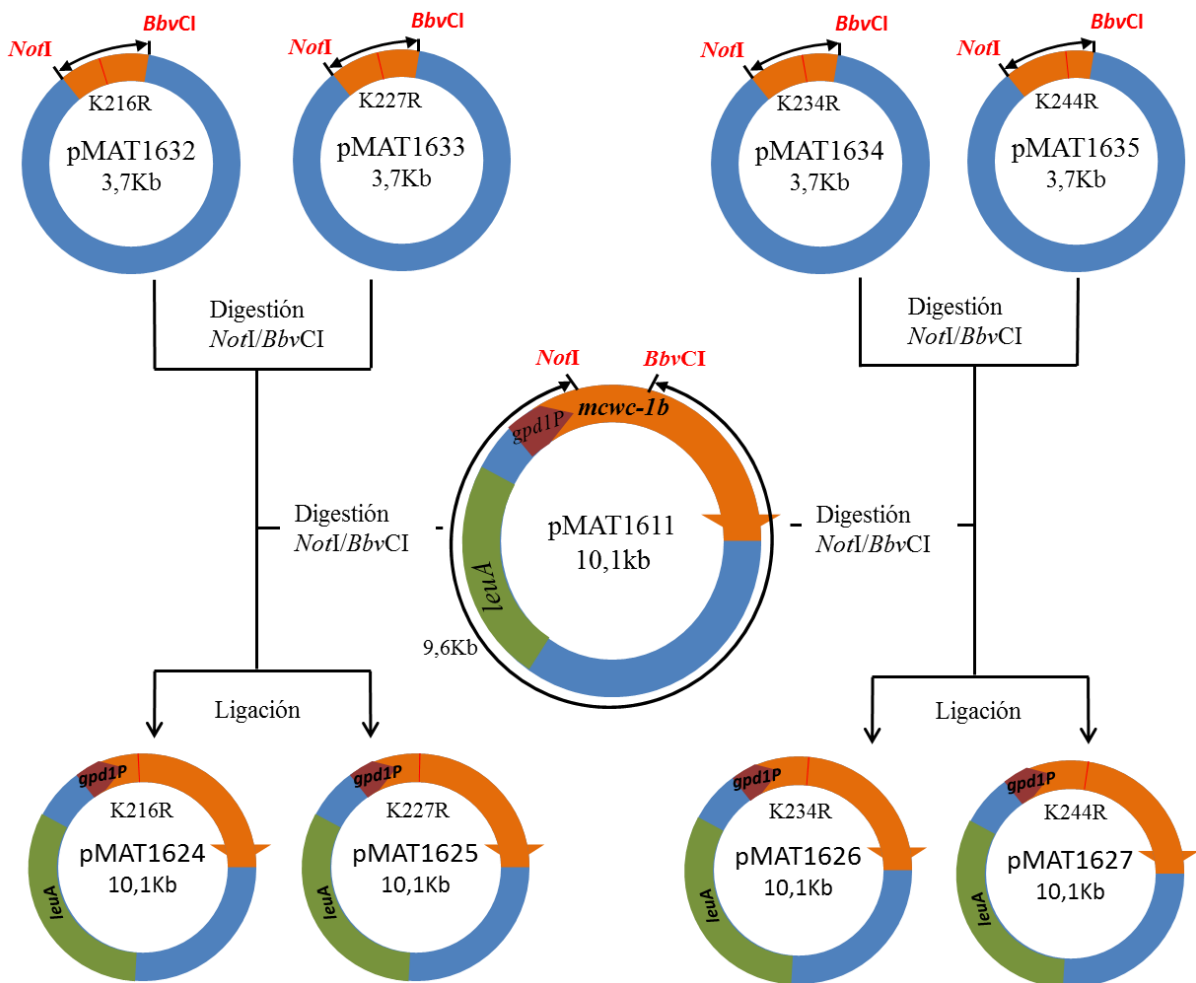


Figura 13. Construcción de los vectores de expresión pMAT1624, pMAT1625, pMAT1626 y pMAT1627.

Se realizó una digestión de los diferentes fragmentos de *mcwc-1b* portadores de un solo cambio con las enzimas de restricción *NotI* y *BbvCI*, los fragmentos obtenidos se subclonaron en el vector de expresión pMAT1611 que contiene la versión silvestre de *mcwc-1b*.

2.10. Manipulación del RNA.

2.10.1. Aislamiento de RNA total de *Mucor*.

El RNA total de *Mucor* se aisló por varios métodos. El método del cloruro de cesio (CsCl) descrito por Sambrook y Russell (2001). La extracción de DNA se realizó a partir de micelios crecidos en medio sólido. Para ello, los trasplantes se realizaron sobre una lámina

estéril de papel celofán colocada sobre la superficie del medio sólido para facilitar posteriormente la recogida del micelio. El micelio se trituró en un mortero rugoso con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino, rápidamente se pasó a un tubo eppendorf en hielo y se le añadió 700 µl de tampón de extracción (Isocianato de guanidina), se le añadió β-mercaptoethanol y se homogeneizó. La mezcla se pasó a un tubo eppendorf que contenía 900 µl de CICs/EDTA y se centrifugó a 50.000 r.p.m 18 horas. El pellet se resuspendió en agua bidestilada tratada con DEPC y se precipitó añadiendo acetato sódico y etanol, manteniendo la mezcla a -20°C 1 hora, se centrifugó a 14.000 r.p.m durante 20 minutos. Finalmente el precipitado se lavó con etanol al 80 %, tras secar a temperatura ambiente, se resuspendió en agua bidestilada tratada con DEPC.

Método rápido del Trizol (Gibco-BRL), siguiendo básicamente las instrucciones del suministrador. La extracción se realizó a partir de micelios de las estirpes de interés crecidos en medio sólido (pH 4,5) 100 mg de micelio se trituró en un mortero rugoso con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino, que rápidamente se pasó a un tubo eppendorf en hielo con 500 µl de Trizol. La mezcla se agitó vigorosamente en un vórtex, hasta resuspender totalmente el micelio y se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 r.p.m. a 4°C. A continuación se recuperó el sobrenadante, al que, tras un período de incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se le añadió 100 µl de cloroformo. Tras incubar de nuevo durante 3 minutos a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 10.000 r.p.m. y 4°C. El sobrenadante se precipitó añadiendo 250 µl de isopropanol, incubando durante 10 minutos en hielo y centrifugando durante 15 minutos a 10.000 r.p.m. y 4°C. El precipitado se lavó posteriormente con etanol al 70 % y, tras secar a 37°C, se resuspendió en agua bidestilada tratada con DEPC. Las muestras se conservaron congeladas a -70°C.

2.10.2. Aislamiento de RNA total para experimentos de Microarrays.

La extracción se realizó a partir de micelios de las estirpes de interés crecidos en medio sólido (pH 4.5) suplementado con leucina. Se creció durante 18 horas a 26°C en oscuridad y la mitad de los cultivos de cada estirpe se sometieron a un pulso de luz durante 20 minutos. 50-100 mg de micelio se trituró en un mortero rugoso con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino, que rápidamente se pasó a un tubo eppendorf. La extracción se realizó siguiendo las instrucciones del kit de extracción de RNA RNeasy Mini Kit, QUIAGEN, siguiendo las instrucciones del suministrador. La concentración de las muestras

de RNA oscilaba entre 2 µg/µl y 0,5µg/µl. Se seleccionaron las muestras con mayor grado de pureza e integridad para su utilización en los experimentos de Microarray.

2.10.3. Hibridación de RNA total en micromatrices Agilent y análisis de expresión.

Para los análisis globales de expresión con *microarrays* se optó por la plataforma de Agilent Technologies. Los microarrays contenían 10922 sondas.

2.10.4. Hibridación de RNA total fijado a un soporte.

Cada muestra de RNA se preparó en un volumen total de 25 µl conteniendo 30-50 µg de RNA, 2,5 µl de MOPS 10x, 4,4 µl de formaldehído y 12,5 µl de formamida. La mezcla se calentó a 65°C durante 10 minutos para eliminar estructuras secundarias del RNA y posteriormente se dejó 5 minutos en hielo. Tras adicionar 2,5 µl de tampón de carga, las muestras se cargaron en un gel de agarosa 1,2 % conteniendo 2,2 M de formaldehído y utilizando como tampón de electroforesis MOPS 1x con formaldehído 2,2 M. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se lavó durante 1,5 horas con agua y se transfirió por capilaridad durante toda la noche a una membrana de nailon cargada positivamente (Hybond™-N+, Amersham Biosciences) usando como tampón SSC 20x. El RNA se fijó a la membrana mediante radiación ultravioleta (0,120 J/cm²). La hibridación con la sonda marcada se realizó exactamente igual que en el caso de la hibridación de las membranas de DNA (**ver apartado 2.8.7**) excepto que los lavados de las membranas llegaron hasta el 0,5x SSC, 0,1 % SDS. La **Tabla 2.3** muestra la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos de DNA que se usaron como sonda en los experimentos de hibridación tipo Northern.

2.11. Manipulación de proteínas.

2.11.1. Preparación de extractos de proteínas de *Mucor*.

La obtención de los extractos de proteínas en *Mucor* se realizó siguiendo el protocolo de extracción con TSA (Murcia-Flores *et al.*, 2007). La extracción de proteínas se realizó a partir de micelios crecidos en medio sólido. Para ello, los cultivos se realizaron sobre una lámina estéril de papel celofán colocada sobre la superficie del medio sólido para facilitar posteriormente la recogida del micelio. El micelio recogido se trituró en un mortero con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino, que fue traspasado a un tubo eppendorf al que se añadió 500 µl de tampón TSA, 10 µl de coctel de inhibidores de proteasas (SIGMA)

y 5 µl de benzamicina a 100 mM (SIGMA). Las muestras se incubaron en hielo durante 30 minutos antes de centrifugar durante 30 minutos a 10.000 r.p.m. y 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la cantidad de proteína total por el método de Lowry *et al.*, 1951.

La separación, en función del tamaño, de las proteínas presentes en los extractos de *Mucor* se realizó mediante electroforesis en geles verticales de poliacrilamida (Pronadisa) utilizando el equipo Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad) para geles de 1,0 mm de grosor. Se realizaron geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) siguiendo el método de Laemmli (1970). La composición de los geles separador y concentrador se indica en el **apartado 2.3**, además se utilizaron geles comerciales NuPAGE® Novex® 4-12 % Bis-Tris Mini Gels (Invitogen). Las muestras se prepararon en un volumen total de 20 µl, a los que se añadió 5 µl de tampón de carga 5X. Tras 10 minutos de incubación a 100°C, las muestras se cargaron en el gel y se sometieron a electroforesis durante un tiempo entre 60 y 90 minutos a 200 V en el tampón de recorrido (0,05 M Tris, 0,192 M glicina, 0,1 % SDS, pH 8,3).

2.11.2. Anticuerpo primario anti-Mcwc-1b

El anticuerpo primario utilizado en la inmunodetección fue obtenido inmunizando conejo con un péptido de Mcwc-1b de un tamaño de 119 aminoácidos, desde I193 hasta C311 (Santa Cruz Biotechnology) (Fátima *et al.*, 2008).

2.11.3. Inmunoprecipitación de proteínas.

Mcwc-1b se purificó mediante inmunoprecipitación (Silva *et al.*, 2008) a partir de lisados celulares preparados como se ha descrito previamente (Murcia-Flores *et al.*, 2007) pero con algunas diferencias. La extracción se realizó a partir de micelios de las estirpes de interés crecidas en medio sólido (pH 4.5). El micelio se trituró en un mortero rugoso con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino, que rápidamente se pasó a un tubo eppendorf donde se añadió 1ml de Lysis Buffer, 20 µl de coctel de inhibidores (SIGMA) y 10 µl de benzamidina a 100 mM (SIGMA). La mezcla se mantuvo en hielo durante 30 minutos y se centrifugó otros 30 minutos a 4°C y 14.000 r.p.m. Se añadió el anticuerpo al sobrenadante y se mantuvo una noche en agitación continua a 4°C. Al día siguiente se añadió 50 µl de proteína A en agarosa (SIGMA) y se incubó en agitación continua a 4°C. Después de 3-4 horas se procedió a los lavados de los posibles complejos proteína-anticuerpo-

proteínaA formados durante el proceso. Los tampones de lavado utilizados fueron: Washing buffer 1, Washing buffer 2 y Washing buffer 3. Para romper las uniones entre la proteína de interés y el anticuerpo se utilizó 60 µl de Washing buffer 3 y 15 µl de Tampón de carga de proteínas con β-mercaptoethanol, calentándose la muestra a 100°C.

2.12. Inmunodetección de proteínas.

Las proteínas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida se transfirieron a un soporte sólido para ser detectadas por anticuerpos específicos mediante la técnica de "Western-blotting" (Towbin *et al.*, 1979; Burnette, 1981).

2.12.1. Transferencia de proteínas a membranas.

Las proteínas sometidas a electroforesis fueron electrotransferidas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN®, Whatman) mediante un sistema semi-seco utilizando el equipo Semi-Dry Electroblothing Unit (Sigma). La transferencia se realizó durante 45 minutos a 200 mA de intensidad, utilizando tampón de transferencia para proteínas (Glicina 39 mM, metanol 20 %, SDS 0,037 %, Tris 48 mM, pH 8,8).

2.12.2. Revelado de las membranas por inmunodetección.

Una vez realizada la transferencia, la membrana se sumergió durante una noche en tampón PBST con un 5 % de leche desnatada como agente bloqueante. Al día siguiente, se eliminó la solución mediante un lavado de 10 minutos en tampón PBST y se incubó la membrana durante una hora en presencia del anticuerpo primario anti-Mcwc1b (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:200 en 7,5 ml de PBST con 5 % de leche desnatada. Tras eliminar el exceso de anticuerpo con tres nuevos lavados de 10 minutos con PBST, se incubó la membrana durante 1 hora con una dilución 1:2500 de anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (Amersham Biosciences) en 7,5 ml de PBST con 5 % de leche desnatada. El exceso de anticuerpo secundario se eliminó mediante otros tres lavados con PBST. Los lavados y las incubaciones con los anticuerpos se llevaron a cabo a temperatura ambiente y con agitación suave y constante.

Para el revelado se utilizó el sistema Amersham™ ECL™ Western Blotting Analysis System (GE Healthcare). Tras añadir el reactivo que contiene el sustrato fluorescente para

la peroxidasa unida al anticuerpo secundario, la membrana se expuso a una película Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare) durante 2–5 minutos.

2.13. Tinción de plata para proteínas

Las proteínas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamina se tiñeron utilizando la tinción de plata ProteoSilver™ Silver Stain Kit (SIGMA), siguiendo básicamente las instrucciones facilitadas por el suministrador. Primero se fijaron las proteínas al gel durante mínimo 20 minutos usando la solución de fijación. Se decantó la solución de fijación y se lavó el gel primero con etanol al 30 % seguido de otro lavado con agua bidestilada. Se incubó el gel con solución de sensibilización 10 minutos y se lavó con agua bidestilada, seguidamente se aplicó la solución de plata durante 10 minutos y se lavó con agua bidestilada. Se aplicó la solución de revelado y se observó la progresiva aparición de las bandas de proteínas, cuando se consideró necesario se aplicó la solución de stop para parar el revelado. El gel se mantuvo en agua bidestilada hasta su utilización.

2.14. Digestión con tripsina

Las muestras se digirieron con el siguiente procedimiento estándar. Los geles SDS-PAGE se tiñeron con plata, las bandas de interés fueron recortas y desteñidas usando ProteoSilver Plus ® (Sigma-Aldrich). Las bandas se lavaron dos veces con agua MilliQ destilada y después dos veces con 25 mM de bicarbonato de amonio pH 8,5 en acetonitrilo al 50 % durante 30 min a 37°C. Después de retirar el sobrenadante, las bandas se secaron durante 15 min utilizando un Eppendorf 5301 vacumm evaporador, y se incubaron con 50 µl de 25 mM de bicarbonato de amonio, pH 8,5 con DTT 20 mM (Sigma-Aldrich) a 60°C durante 30 min. El sobrenadante se retiró y las muestras se alquilan mediante la adición de 25 mM de bicarbonato de amonio pH 8.5 con iodoacetamida 100 mM (Sigma-Aldrich) durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. El sobrenadante se separó de nuevo y las muestras se lavaron primero con 25 mM de bicarbonato de amonio pH 8,5 y luego con 25 mM de bicarbonato de amonio pH 8,5 en acetonitrilo al 50 % durante 15 min a 37°C cada vez. Después del lavado, las muestras se secaron de nuevo y después se incubaron con 25 mM de bicarbonato de amonio tampón de pH 8,5 que contiene 0,25 µg de Trypsin Gold

Proteomics Grade (Promega) durante 45 min a 4°C y finalmente sometido a digestión durante 16 horas a 37°C. Se recogió el sobrenadante en un tubo nuevo, y las muestras se lavaron con 50 µl de una solución que contiene acetonitrilo al 50 % y TFA al 0,5 % y después con 50 µl de acetonitrilo durante 30 min a 37°C cada vez. Estos lavados mejora la extracción de fragmentos digeridos de las bandas de gel y los dos sobrenadantes se recogieron después de lavado en el mismo tubo y se secó usando un Eppendorf 5301 vacumm evaporador.

2.15. HPLC-MS / Análisis MS para proteínas digeridas con tripsina.

La separación y el análisis de las muestras digeridas con tripsina se realizaron con un sistema de HPLC-MS que consta de una serie de HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.) equipado con un inyector automático µ-wellplate autosampler y una bomba capilar, conectado a una trampa de iones Agilent XCT Plus M culo S pectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.), utilizando una interfaz de electrospray (ESI). Los parámetros experimentales para HPLC se establecieron en el software ChemStation (Agilent Technologies, Rev. B. 01,03), mientras que los parámetros de trampa de iones se encuentran en LC / MSD Software de Control Trap (Bruker Daltonik, v5.3).

Las muestras secas de digestión en gel se resuspendieron en 10 µl de tampón A, que consiste en agua, acetonitrilo, ácido fórmico (94.9:5:0.1). La muestra se inyectó en una columna de HPLC Zorbax SB-C18 (5 µm, 150×0,5 mm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.), termostatzado a 40°C, a una velocidad de flujo de 10 µl/min. Después de la inyección de la columna se lavó con tampón A durante 30 min y los péptidos digeridos se eluyeron usando un gradiente lineal 0-80% de B (tampón B: agua, acetonitrilo, ácido fórmico, 10:89.9:0.1) durante 120 min. La columna se lavó con las condiciones iniciales (tampón A) durante 30 minutos antes de la siguiente inyección de muestra. La columna fue acoplada en línea a una trampa de iones Agilent XCT Plus espectrómetro de masas usando una interfaz de electropulverización.

El espectrómetro de masas se hizo funcionar en el modo positivo. La presión del gas nebulizador se fijó a 15 psi, mientras que el gas de secado se fijó a un flujo de 5l/min a una temperatura de 350°C. El voltaje de pulverización capilar era de 3500 V, mientras que la velocidad de exploración se establece en 8100 (m/z)/2 seg de 00 a 2200 m/z, con una masa objetivo de 1000 m/z, y 3 espectros promedio. La trampa de iones inteligente se establece

en 150,000, mientras que el tiempo máximo de acumulación fue de 50 ms. Los datos MS/MS fueron recogidos en un modo dependiente de los datos automatizados (modo AutoMSn). Los tres iones más intensos fueron fragmentados secuencialmente usando helium collision-induced dissociation (CID), con una anchura de aislamiento de 2 y una energía de colisión relativa de 35 %. El mismo ion fue rechazado después de dos exploraciones consecutivas. El procesamiento de los datos se realizó con el programa DataAnalysis para LC / MSD Trampa Version 3.3 (Bruker Daltonik, GmbH, Alemania) y Spectrum Mill MS Proteómica Workbench (Ap A.03.02.060B, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.).

En resumen, los datos promedio se extrajeron en condiciones predeterminadas de la siguiente manera: cisteínas no modificada o carbamidometiladas, longitud marcador de secuencia > 1; [MH] + 50-7000 m / z; carga máxima + 7; mínima relación señal-ruido (S/N) 25; la búsqueda de señales de C¹². La búsqueda de MS/MS contra las secuencias de hongos en la base de datos NCBIInr se realizó con los siguientes criterios: el modo de búsqueda de identidad, la digestión con tripsina con un máximo de 3 divisiones perdidas; cisteínas carbamidometiladas; carga péptidica +1, +2, +3; masa monoisotópica, tolerancia de masas de fragmentos 2,5 Da; tolerancia de masa de iones 0,7 amu; ESI instrumento de trampa de iones; mínima intensidad máxima emparejado 50 %.

3. Resultados

3.1. Identificación de la lisina ubiquitilada en Mcwc-1b

Trabajos previos de nuestro grupo de investigación demostraron que la proteína Mcwc-1b es ubiquitilada y que esta modificación bloquea la actividad de la proteína, aunque no provoca su degradación (Silva *et al.*, 2008). Así, en análisis tipo Western-blot, utilizando anticuerpos específicos contra esta proteína, se detectan tres formas de la misma. La forma con la mayor movilidad electroforética, que tiene un tamaño estimado de 106 kDa, corresponde a la forma no ubiquitilada, mientras que las dos formas de 115 kDa y 125 kDa corresponden a la proteína con una y dos moléculas de ubiquitina unidas, respectivamente. La presencia de moléculas de ubiquitina en las formas de mayor tamaño se demostró de forma indirecta mediante la utilización de anticuerpos policlonales contra la ubiquitina humana, pero esta aproximación experimental no permite conocer la lisina o lisinas que son ubiquitiladas. La caracterización del punto concreto de ubiquitilación es imprescindible para conocer la base molecular del bloqueo de la actividad de Mcwc-1b por ubiquitilación. Por tanto, se siguieron estrategias bioquímicas (análisis de péptidos mediante espectrometría de masas) y genéticas (mutagénesis dirigida) para la identificación de la lisina modificada por ubiquitilación.

3.1.1. Detección de ubiquitina por espectrometría de masa.

Los sitios de ubiquitilación pueden conocerse mediante la identificación de los péptidos de la proteína que presentan una masa molecular alterada como consecuencia de la unión de la molécula de ubiquitina. En este caso particular, la estrategia se basó en la purificación de las tres formas de la proteína Mcwc-1b, para su posterior digestión con Tripsina, separación de los péptidos producidos mediante cromatografía líquida de alta resolución y análisis de los mismos mediante espectrometría de masas (HPLC-MS). La comparación de las masas de los péptidos obtenidos a partir de las tres formas de la proteína Mcwc-1b debería identificar los péptidos provenientes de las formas ubiquitiladas que modifican su masa con respecto a los provenientes de la forma sin ubiquitilar. Estos péptidos deberían incluir la lisina o lisinas que son dianas de la ubiquitilación.

3.1.2. Purificación de Mcwc-1b.

La purificación de Mcwc-1b se realizó mediante inmunoprecipitación a partir de extractos totales de proteína. Concretamente, se obtuvieron extractos de proteínas de la estirpe silvestre (MU241), de un mutante nulo para *crgA* (MU221) (Navarro et al., 2001) y de un mutante nulo para *mcwc-1b* (MU244) (Silva et al., 2006). Las formas de Mcwc-1b presentes en los tres extractos se inmunoprecipitaron usando anticuerpos mono-específicos generados contra parte de la proteína (Silva et al., 2008). Para comprobar el éxito en la inmunoprecipitación, una alícuota de cada uno de los inmunoprecipitados se analizó mediante Western-blot, utilizando los mismos anticuerpos usados en la inmunoprecipitación. Tal como se había descrito previamente (Silva et al., 2008), en la estirpe silvestre se observó las tres formas de la proteína Mcwc-1b, mientras que en la estirpe nula para *crgA* se observó solo la forma sin ubiquitilar y en la estirpe nula para *mcwc-1b* no se observó ninguna forma. El resto de los inmunoprecipitados se sometió a electroforesis en un gel preparativo SDS-PAGE. La tinción del gel con una tinción de plata (véase Materiales y Métodos) que permitía el análisis posterior de las proteínas, reveló la existencia de tres bandas específicas correspondientes a las formas de la proteína Mcwc-1b presentes en la estirpe silvestre (**Figura 14**) una de las cuales, la de menor tamaño, coincidía con la única que aparecía en la estirpe mutante para *crgA*. Por tanto, las tres bandas específicas de la estirpe silvestre se recortaron del gel para su posterior análisis.

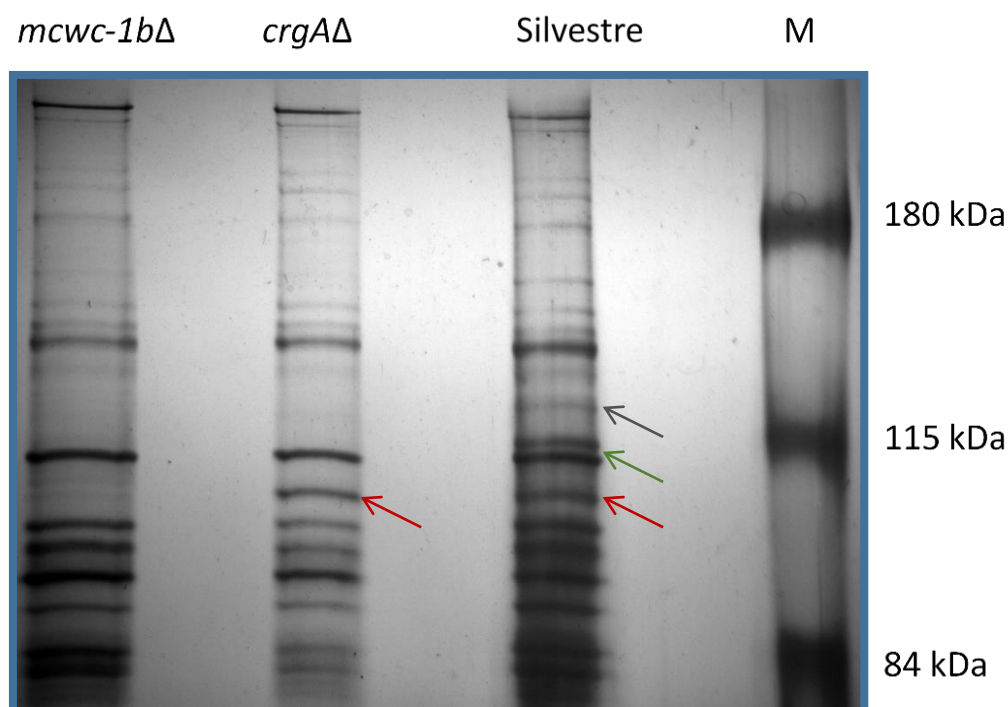


Figura 14. Proteínas inmunoprecipitadas utilizando el anticuerpo contra Mcwc-1b.

Las proteínas inmunoprecipitadas por el anticuerpo contra Mcwc-1b, a partir de extractos totales de las estirpes indicadas en cada calle, se sometieron a electroforesis en un gel SDS-PAGE del 7%. Tras la electroforesis las proteínas se tiñeron con plata mediante el kit ProteoSilver™ Silver Stain Kit (SIGMA). La flecha roja marca la banda correspondiente a la forma de 106 kDa no ubiquitilada, mientras que la naranja y verde marcan las formas ubiquitiladas de 115 kDa y 125 kDa, respectivamente. M: marcador de

3.1.3. Análisis mediante espectrometría de masas de las proteínas purificadas.

Las bandas aisladas se destiñeron y las proteínas contenidas se sometieron a una digestión con Tripsina. Las proteínas sometidas a la digestión no se extraen previamente de la acrilamida, sino que los péptidos resultantes de la digestión son los que se liberan y se recogen. Los péptidos obtenidos de cada muestra se analizaron mediante HPLC conectado a una trampa de iones. De esta forma, se identificó la masa molecular de los péptidos presentes en cada muestra. Los datos obtenidos de cada muestra se compararon con la base de proteínas de *Mucor* para identificar los péptidos presentes en cada muestra, así como de las proteínas de las que derivan.

Péptidos derivados de la proteína Mcwc-1b se observaron en las tres bandas analizadas, mientras que la ubiquitina solo aparece en las 2 bandas de mayor tamaño (**Tabla 5** y **Figura 15**). Estos resultados, por un lado, confirman que las proteínas purificadas correspondían a formas de Mcwc-1b y, por otro lado, sugieren que las formas de mayor

Resultados

tamaño están ubiquitiladas, tal como se había deducido de los experimentos de Western utilizando anticuerpos contra la ubiquitina humana (Silva et al., 2008). No obstante, la baja concentración de proteína de Mcwc-1b hizo imposible tener una información exhaustiva de los péptidos generados a partir de cada una de las formas de la proteína, que era necesaria para localizar la lisina ubiquitilada. Tras varios intentos, los resultados no mejoraron y se descartó esta estrategia para localizar la lisina o lisinas ubiquitiladas en la proteína Mcwc-1b. Por otro lado, esta aproximación experimental permitió identificar el gen de *Mucor*, de los 10 que existen en su genoma que podrían cifrar la molécula de ubiquitina, que cifra la ubiquitina que se une a Mcwc-1b, ya que los dos péptidos detectados solo aparecen en la proteína con ID 157563. No obstante, los datos disponibles no permiten determinar si esta molécula de ubiquitina concreta es la única que se une a Mcwc-1b.

Tabla 5. Péptidos identificados por espectrometría de masas

1B

Base de Datos	Proteína	Grupo	Péptidos	Score	Peso Molecular	cobertura %	Especie
WC1B	WC1B	1	3	21.29	88187.7	6	<i>Mucor circinelloides</i>
			z	Score	MH+	SPI (%)	Secuencia
			2	8.53	1900,321	90.5	(R)TSNPIPGMEDHEFWGK(L)
			2	7.66	1499,101	85.6	(K)AICHPSDITTVMR(E)
			3	5.10	2613,241	70.1	(R)KNSGYMWIECSGKLRNE DGRGR(K)

1B-monoubiquitinada

Base de Datos	Proteína	Grupo	Péptidos	Score	Peso Molecular	cobertura %	Especie
WC1B	WC1B	1	2	11.06	88187.7	4	<i>Mucor circinelloides</i>
			z	Score	MH+	SPI (%)	Secuencia
			2	7.21	1499,101	84.3	(K)AICHPSDITTVMR(E)
			3	3.85	2613,241	60.3	(R)KNSGYMWIECSGKLRNE DGRGR(K)

Base de Datos	Proteína	Grupo	Péptidos	Score	Peso Molecular	cobertura %	Especie
Ubiq	Ubiquitina	2	1	3.60	8583.8	17	<i>Mucor circinelloides</i>
			z	Score	MH+	SPI (%)	Secuencia
			2	3.60	1523,781	75.6	(K)IQDKEGIPPDQQR(L)

1B-diubiquitinada

Base de Datos	Proteína	Grupo	Péptidos	Score	Peso Molecular	cobertura %	Especie
WC1B	WC1B	2	1	3.20	88187.7	2	<i>Mucor circinelloides</i>
			z	Score	MH+	SPI (%)	Secuencia
			3	3.20	2613,241	50.4	(R)KNSGYMWIECSGKLRNE DGRGR(K)
Base de Datos	Proteína	Grupo	Péptidos	Score	Peso Molecular	cobertura %	Especie
Ubiq	Ubiquitina	1	2	8.52	8583.8	38	<i>Mucor circinelloides</i>
			z	Score	MH+	SPI (%)	Secuencia
			2	4.85	1763,985	78.4	(K)TITLEVSSDSIENVK(Q)
			2	3.67	1523,781	77.3	(K)IQDKEGIPPDOOR(L)

A

MDPFQSLGQFNPIYESSNVPPSSDKLFSFSGFQAGLMTNQTSSMQAPSANLQQQPPR
 HSIPSQQHFIIQQPQPFPQPAPSQPQLQHMMQPSGTASMNHFLPSAPPPVLPSSAS
 NQADSGRYSYMYANTGFDMLSILSRVANRPNPQINLGPVDLSCSFVVVDAKQYDFPL
 VYASPMFERLTGYAPSEVIGRNCRFLQAPDGRVAIGSRRKYTDNTTVYHIKTHMVQG
 KESQSSIINRYRKTGQPFVNLTVIPIAWESSEDIDYFIGLQVDLVEQPNSIFQSMKDGTY
 VSYRNSTIPPSIQAGLSINADPGAAMAEPITWTRPVSPKPTYNANSSQPHHTAVTLPS
 KNASITESAIVPSQQHAATQPSAEPPMDVETLIKEASTDEGKFRRCWHELLLDQSPD
 FIHVLTIKGIYLYCSDSTAQLLEYEPELVGKSLKAICHPSDITVMRELKQSSNHSTP
 NLIYRVRKNSGYMWIECSGKLRNEDGRGRKYVVLVSGRERPVIYQLPRNALTVG
 NKAHSTRTSNPIPGMEDHEFWGKLSADGLLLYVSWTVANVLGSPSEIHTSLYQLLRNRT
 TDLTRALAEVKEGKIVYLRHALLDNTGVEVMVATTFYDPDGKASLQEQPSFVLMQTKV
 IGEETTQADEEPVFSIDPDVKKKGRADMSLPNVDSHG VVTPTPQNISTVERMVDELDI

B

MQIFVKTLTGKTITLEVSSDSIENVKQKIQDKEGIPPDOORLIFAGKQLEDGRSLSDYNIQESTLHLV
LRLRGG**MQIFVKTLTGK**TITLEVSSDSIENVKQKIQDKEGIPPDOORLIFAGKQLEDGRSLSDYNIQKE
STLHLVLRRLRGG**MQIFVKTLTGK**TITLEVSSDSIENVKQKIQDKEGIPPDOORLIFAGKQLEDGRSLSD
YNIQESTLHLVLRRLRGG**MQIFVKTLTGK**TITLEVSSDSIENVKQKIQDKEGIPPDOORLIFAGKQLED
GRSLSDYNIQESTLHLVLRRLRGG**MQIFVKTLTGK**TITLEVSSDSIENVKQKIQDKEGIPPDOORLIFA
GKQLEDGRSLSDYNIQESTLHLVLRRLRGG*

Figura 15. Localización de los péptidos identificados por espectrometría de masas en las secuencias de la proteína Mcwc-1b y de la ubiquitina.

(A) Secuencia de aminoácidos de la proteína Mcwc-1b con los péptidos identificados subrayados. (B) Secuencia de aminoácidos de la proteína ubiquitina de *Mucor* con ID 157563. El gen de *Mucor*, al igual que ocurre con los genes que cifran ubiquitinas en otras especies, contiene varias repeticiones de la secuencia de aminoácidos. Cada una de estas secuencias está marcada con un color diferente y los péptidos identificados están subrayados.

3.2. Mutagénesis dirigida de mcwc-1b

La segunda estrategia seguida para identificar la lisina que es ubiquitilada en Mcwc-1b se basó en la transformación de la estirpe mutante en *mcwc-1b* (MU244; *mcwc-1b* Δ , *leuA*⁻), y que presenta fenotipo silvestre, con plásmidos que expresaban alelos del gen en los que

Resultados

que las colonias de los 8 transformantes que expresaban la versión silvestre del gen mostraron color blanco, las de los transformantes que expresaban la versión mutante presentaron color amarillento parecido al mutante nulo para *crgA* (**Figura 17A**). La aparición del fenotipo amarillo en oscuridad nos proporciona información muy importante: por un lado, nos indica que dentro de esas 21 lisinas sustituidas está la lisina o lisinas que se ubiquitilan y, por otro lado, que la proteína Mcwc-1b es funcional a pesar de las 21 mutaciones.

Aunque claramente la estirpes transformadas con la versión mutante de *mcwc-1b* presentaban color amarillo en la oscuridad, los niveles de β -caroteno en la oscuridad no son tan elevados como los mostrados por el mutante *crgA Δ (**Figura 17**), sugiriendo bien que la proteína Mcwc-1b no es tan activa como la forma silvestre sin ubiquitilar o bien que la complementación en plásmidos autoreplicativos no es totalmente eficiente. Así mismo, los niveles de β -caroteno en la luz de los transformantes con el alelo de *mcwc-1b* con las 21 mutaciones fueron similares a los de la estirpe silvestre o transformada con la versión silvestre de *mcwc-1b*.*

Para confirmar que la proteína Mcwc-1b mutante no estaba siendo ubiquitilada, se analizó la misma mediante Western-blot y así relacionar fenotipo con ausencia de ubiquitilación. En los micelios de los transformantes que expresaban el alelo silvestre se observaron las tres formas de la proteína Mcwc-1b que aparecen en las estirpes silvestres (**Figura 17**), mientras que en los micelios de los transformantes con el alelo mutante solo se observó la forma no ubiquitilada de la proteína, que aparece en el mutante nulo para CrgA. Estos resultados demuestran que la presencia de formas no ubiquitiladas de Mcwc-1b provocan la acumulación de carotenos en la oscuridad, independientemente de la presencia o no de la proteína CrgA.

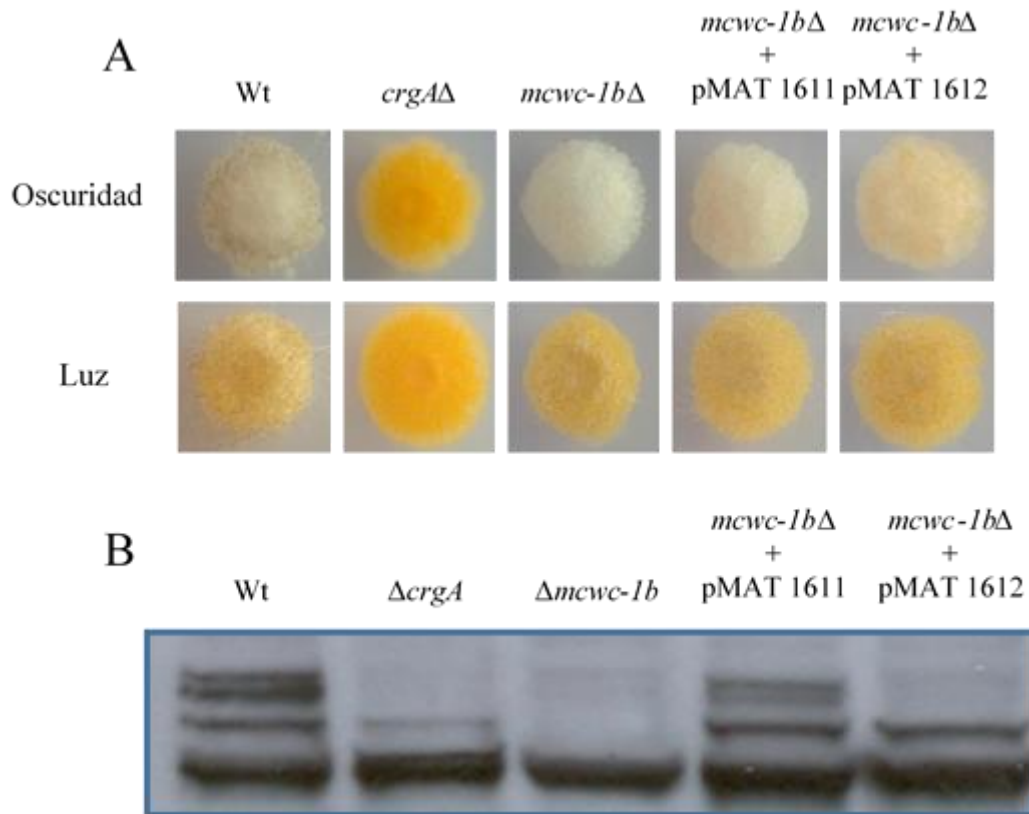


Figura 17. Fenotipos de transformantes que expresan la versión silvestre y mutante de *mcwc-1b*.

(A) Fenotipo de color de las estirpes silvestre, mutantes y transformantes con el gen *mcwc-1b* silvestre (pMAT1611) o con el alelo con 21 lisinas mutadas (pMAT1612) crecidas en condiciones de luz y oscuridad. (B) Análisis de Mcwc-1b, mediante Western-blot utilizando anticuerpos contra Mcwc-1b, en las mismas estirpes.

Resultados

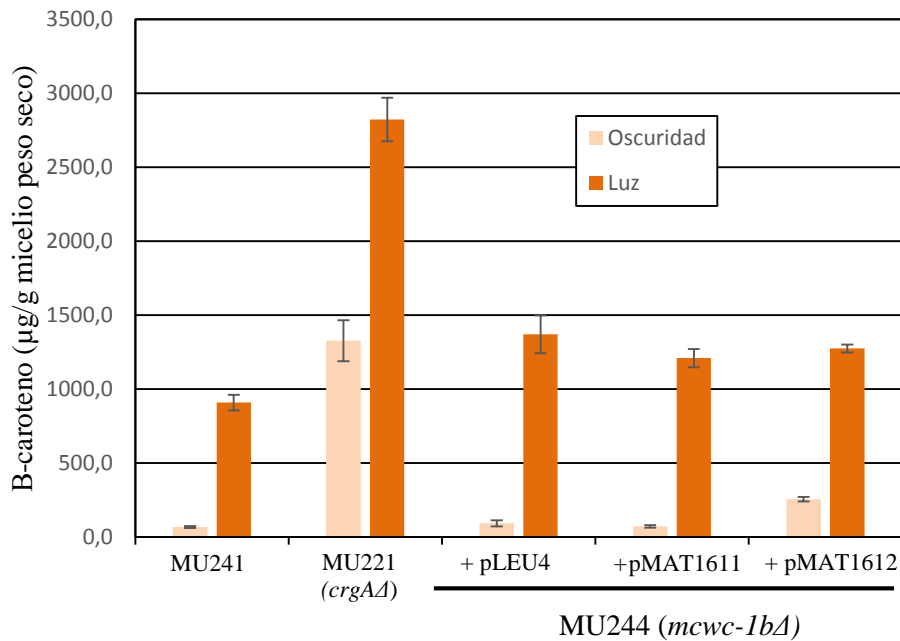


Figura 18. Contenido de carotenos en las estirpes silvestre (MU241), Mutantes *crgAΔ*, *mcwc-1bΔ* y mutantes *mcwc-1bΔ* complementados con la versión de *mcwc-1b* silvestre, mutante en 21 lisinas.

Crecidas en medio sólido (YNB 4,5), en condiciones de oscuridad (48 horas de oscuridad) o luz (48 horas de luz).

Los resultados obtenidos en el experimento inicial confirmaron que la estrategia diseñada podía permitir la identificación de la lisina ubiquitilada. Así, se realizaron nuevas transformaciones con plásmidos con un número menor de lisinas mutadas, obtenidos mediante la sustitución de fragmentos de restricción del alelo mutante por los equivalentes en el plásmido con el alelo silvestre (véase Materiales y Métodos para los detalles). Los siguientes plásmidos utilizados portaban un alelo con 12 mutaciones en la región 3' del gen (pMAT1620), o un alelo con 9 mutaciones en la región 5' (pMAT1621). Con ambos plásmidos se obtuvieron más de 100 transformantes, de los que se seleccionaron 8 de cada plásmido que fueron analizados de igual forma que los obtenidos con el plásmido inicial con las 21 mutaciones. En esta ocasión, el fenotipo amarillento en la oscuridad lo mostraron solo los transformantes que portaban el alelo con 9 mutaciones, mientras que los transformantes que portaban el alelo con 12 mutaciones eran blancos en oscuridad (**Figura 19**). De forma equivalente a lo observado con la proteína *Mcwc-1b* en la que se habían sustituido las 21 lisinas, la proteína con 9 lisinas sustituidas aparecía sin ubiquitilar, indicando que dentro de esas 9 lisinas tiene que encontrarse la lisina que es ubiquitilada (**Figura 19**).

El experimento se repitió de nuevo con plásmidos que portaban un alelo de *mcwc-1b* con 5 lisinas mutadas (pMAT1622) o con 4 lisinas mutadas (pMAT1623). El resultado fue que solo los transformantes obtenidos con el plásmido con el alelo con 4 lisinas mutadas presentan un fenotipo amarillento en la oscuridad y la correspondiente proteína no era ubiquitilada (**Figura 19**). Por tanto, la lisina ubiquitilada es una de estas 4, que ocupan las posiciones 216, 227, 234 y 244 de la proteína.

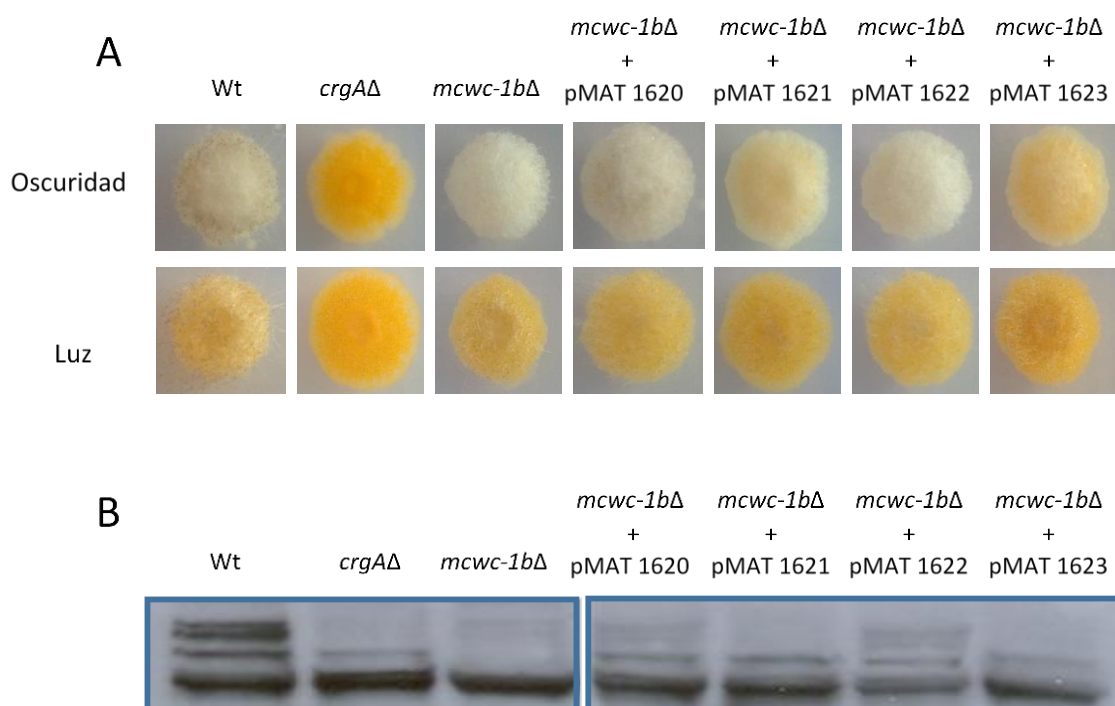


Figura 19. Fenotipos de transformantes con diferentes alelos de *mcwc-1b*.

(A) Fenotipos de las estirpes silvestre, mutantes y transformantes con los plásmidos pMAT1620 (9 lisinas mutadas), pMAT1621 (12 lisinas mutadas), pMAT1622 (5 lisinas mutadas) y pMAT1623 (4 lisinas mutadas) crecidas en condiciones de luz y oscuridad.. (B) Análisis de Mcwc-1b, mediante Western-blot utilizando anticuerpos contra Mcwc-1b, en las mismas estirpes

3.2.2 Transformación de la estirpe nula para *mcwc-1b* con los alelos mutantes de *mcwc-1b* con un solo cambio.

Para la identificación de la lisina concreta que es diana de la ubiquitilación se generaron plásmidos que contenían alelos con solo una de ellas mutada (véase Materiales y Métodos para detalles). Estos se utilizaron en los experimentos de transformación,

Resultados

analizándose 5 transformantes independientes de cada plásmido. Solo los transformantes obtenidos con el plásmido que portaba la mutación en la lisina 234 (pMAT1626) presentaron color amarillento en la oscuridad y la correspondiente proteína no estaba ubiquitilada, mientras que los transformantes obtenidos con los otros plásmidos producían colonias blancas y contenían formas ubiquitiladas de la proteína (**Figura 20**). Estos resultados demostraron que la lisina 234 es la diana de la ubiquitilación mediada por CrgA.

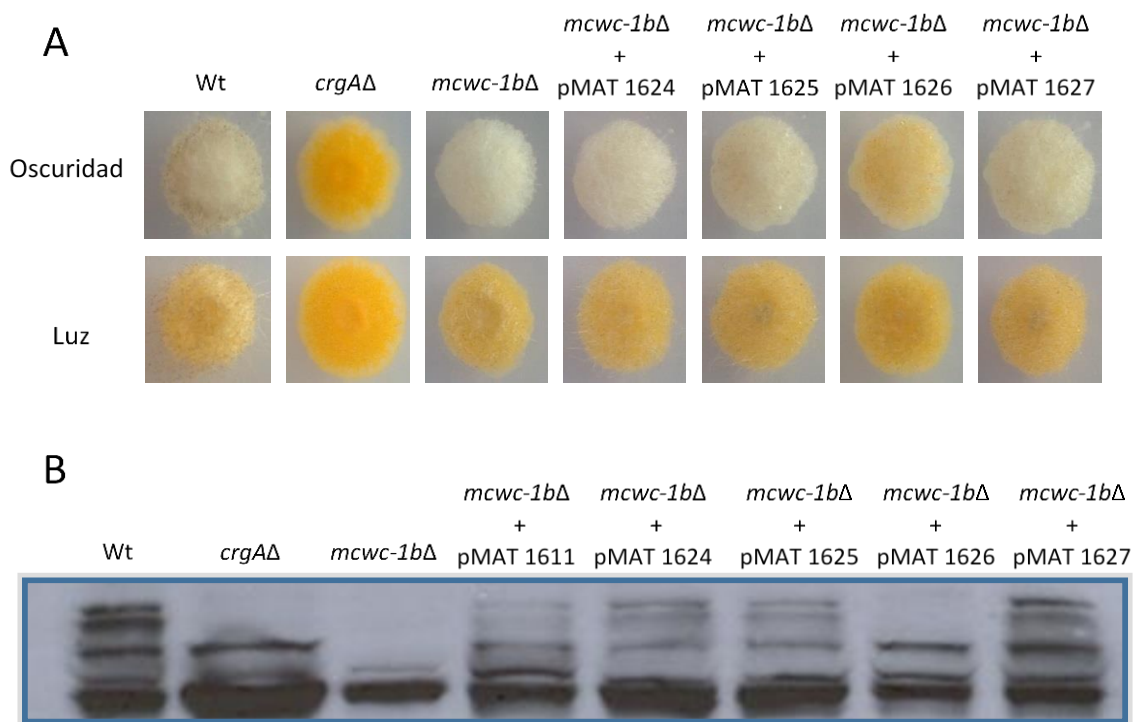


Figura 20. Fenotipos de transformantes con diferentes alelos de *mcwc-1b*.

(A) Fenotipos de las estirpes silvestre, mutantes y transformantes con los plásmidos pMAT1624 (K---R), pMAT1625 (K---R), pMAT1626 (K234R) y pMAT1627 (K---R) crecidos en condiciones de luz y oscuridad.. (B) análisis de Mcwc-1b, mediante Western-blot utilizando anticuerpos contra Mcwc-1b, en las mismas estirpes.

El color amarillento en la oscuridad de los transformantes con el alelo K234R de *mcwc-1b* se debió a uno niveles de β -caroteno mayores que en las estirpes silvestre y transformada con el alelo silvestre (**Figura 21**). Interesantemente, estos niveles fueron

superiores a los mostrados por los transformantes con las 21 lisinas mutadas, aunque sin llegar a los niveles del mutante nulo para CrgA, indicando que este alelo es más activo, aunque no puede descartarse que el plásmido que lo porta se replique mejor. Esta mayor actividad del alelo con la mutación K234R se aprecia también en la luz, ya que, a diferencia de los transformantes con el alelo con las 21 mutaciones, el alelo con la mutación K234R incrementa los niveles de carotenos, nuevamente, sin llegar a los niveles del mutante *crgAΔ* (Figura 21).

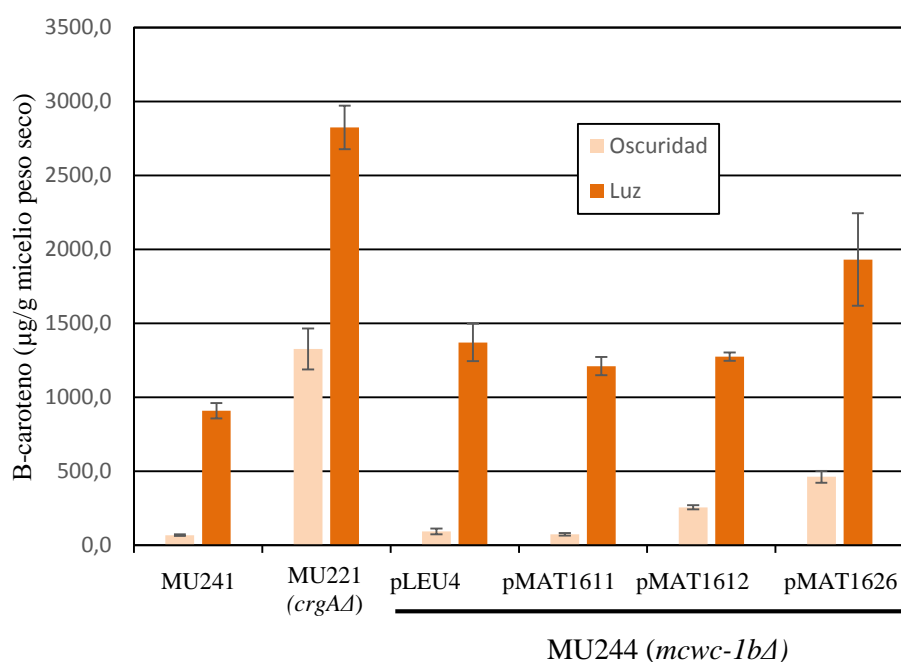


Figura 21. Contenido de carotenos en las estirpes silvestre (MU241), Mutantes *crgAΔ*, *mcwc-1bΔ* y mutantes *mcwc-1bΔ* complementados con la versión de *mcwc-1b* silvestre, mutante en 21 lisinas y mutante en la lisina ubiquitilada.

Crecidas sobre medio sólido (YNB 4,5), en condiciones de oscuridad (48 horas de oscuridad) o luz (48 horas de luz).

3.2. Análisis de la interacción entre CrgA y las diferentes E2 de *Mucor*

A pesar de la clara implicación de CrgA en la ubiquitilación de Mcwc-1b, no se conocen los detalles moleculares de este proceso ni el papel exacto de CrgA. La presencia de dos dominios RING-finger en la proteína CrgA sugiere una posible función como ligasa de ubiquitina, ya que estos dominios son característicos de un grupo de ligasas E3. Las

ligasas E3 interaccionan con proteínas conjugadoras de ubiquitina o E2 (Deshaies and Joazeiro, 2009), que transfieren la molécula de ubiquitina a la proteína diana. Por tanto, se planteó en esta tesis la identificación de la proteína E2 que participa que interacciona con CrgA y que, consecuentemente, participaría en la regulación de Mcwv-1b. Para la consecución de este objetivo, se realizó un experimento de doble híbrido de levaduras, que utiliza dos genes chivatos y que permite detectar interacciones débiles.

3.2.1. Doble híbrido de levaduras.

Los vectores de expresión utilizados contienen las secuencias de las diferentes E2 de *Mucor* fusionadas al dominio de activación de GAL4. La proteína Mms2 de *Mucor* se incluyó en el experimento, esta proteína es similar a una E2 ligasa pero carece de un residuo de cisteína activo necesario para su función, por lo que actúa en forma de heterodímero junto con otra E2 ligasa. En el caso de Mms2 se fusionó al dominio de unión al DNA. Se utilizaron 2 vectores de expresión que contenían la secuencia del gen *crgA*, uno fusionado al dominio de activación y otro al dominio de unión de GAL4. También se usó una versión de *crgA* que carecía de los dominios de isoprenilación, en este caso fusionado al dominio de unión al DNA para reducir la posibilidad de que CrgA se uniese a la membrana durante su expresión en levaduras (**Tabla 6**).

El análisis de interacción se estudió en estirpes diploides de *S. cerevisiae*, obtenidas por cruzamiento de estirpes haploides que expresaban cada una de las proteínas que se quería probar si interaccionaban. Los plásmidos que expresaban las proteínas fusionadas al dominio de activación se transformaron en la estirpe PJ69-4a, mientras que los que expresaban las proteínas fusionadas al dominio de unión al DNA se transformaron en la estirpe PJ69-4 α . Tras la selección de estirpes diploides que expresaban las proteínas de fusión a analizar se hicieron réplicas en medio SD-LWH (Medio mínimo sin leucina, triptófano ni histidina) donde se pueden detectar interacciones débiles entre las proteínas, que se manifiesta por el crecimiento en este medio.

Tabla 6. Genes analizados en los estudios de doble híbrido de levadura

Gen	Dominio fusionado (GAL4)	Nombre del vector
E2(2)	Dominio de activación	pMAT1404
E2(8)	Dominio de activación	pMAT1405
E2(9)	Dominio de activación	pMAT1406
E2(4)	Dominio de activación	pMAT1407
E2(5)	Dominio de activación	pMAT1408
E2(16)	Dominio de activación	pMAT1409
E2(11)	Dominio de activación	pMAT1410
E2(6)	Dominio de activación	pMAT1411
E2(7)	Dominio de activación	pMAT1412
E2(12)	Dominio de activación	pMAT1413
E2(3)	Dominio de activación	pMAT1414
E2(13)	Dominio de activación	pMAT1415
<i>crgA</i>	Dominio de activación	pMAT1055
<i>mms2</i>	Dominio de unión	pMAT1416
<i>crgA</i>	Dominio de unión	pMAT1056
<i>crgA</i> (sin dominios de isoprenilación)	Dominio de unión	pMAT470

Aunque en este experimento no se observó interacción directa de CrgA con ninguna de las proteínas tipo E2 conocidas de *Mucor* (**Figura 22**), lo que sí se pudo demostrar es la capacidad de CrgA de interactuar consigo misma en el sistema de dos híbridos, sugiriendo que esta interacción pudiese ocurrir también en *Mucor*. La interacción CrgA-CrgA parece depender en gran medida del dominio de isoprenilación, ya que la versión que carece de este dominio no interacciona de forma normal con la versión silvestre. La proteína Mms2 activa la transcripción cuando está fusionada al dominio de unión al DNA, impidiendo que se pueda estudiar la interacción con CrgA o con cualquiera de las E2 analizadas.

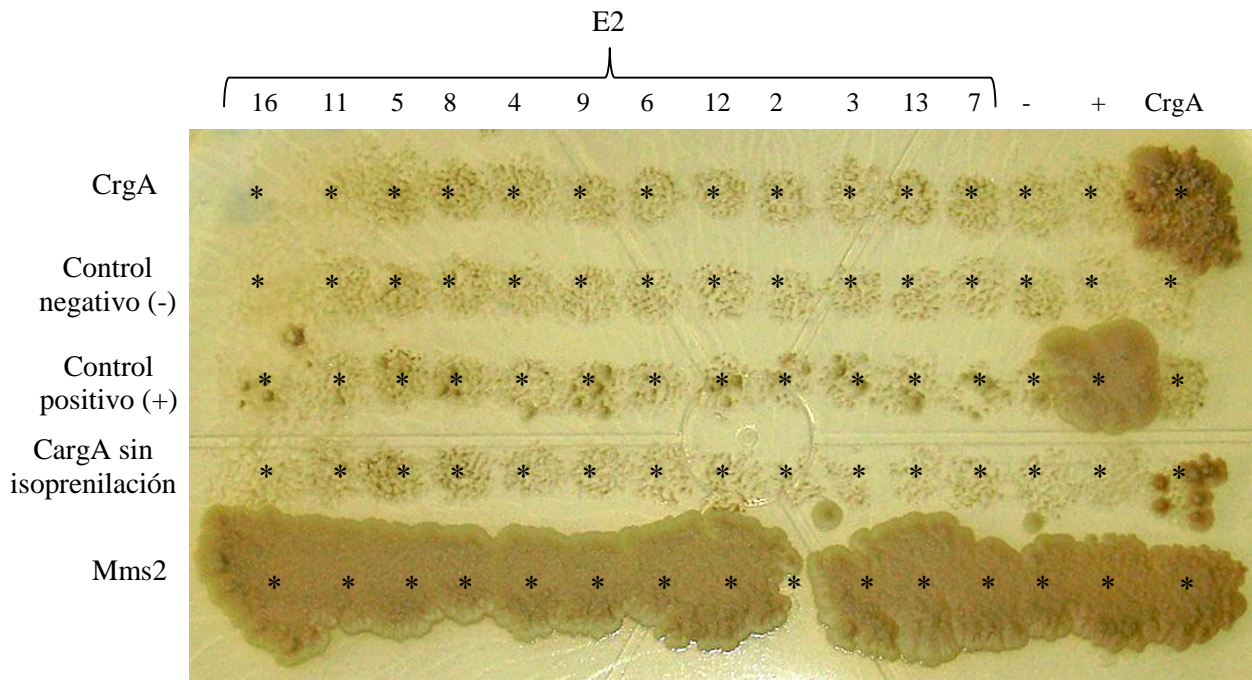


Figura 22. Experimento doble híbrido de levaduras.

Triple selección en medio SD-LWH donde se pueden observar las interacciones fuertes y débiles. La interacción entre proteínas se observa a través del crecimiento de las levaduras. Cada fila corresponde a una proteína fusionada al dominio de unión al DNA de GAL4 y cada columna a una proteína fusionada al dominio de activación de GAL4.

3.3. Identificación de genes regulados por *crgA* y/o *mcwc-1b*

La proteína *crgA* parece tener un papel regulador importante en *Mucor*, ya que participa en el control de varios procesos celulares, entre los que destacan la síntesis de carotenos y la producción de hifas aéreas y esporas asexuales (Navarro et al., 2001; Nicolás et al., 2007; Navarro et al., 2013). *CrgA* regula ambos procesos a través de la proteína *Mcwc-1b*, ya que el doble mutante nulo *crgAΔ mcwc-1bΔ* recupera el fenotipo silvestre para ambos procesos. Es muy probable que *CrgA* esté regulando otras funciones o procesos difíciles de observar a simple vista, por lo que para profundizar en la caracterización de los procesos regulados por *crgA*, así como identificar otros genes probablemente implicados en carotenogénesis y producción de esporas asexuales, se realizó un análisis transcriptómico que incluyese a la estirpe silvestre, mutante nulo para *crgA* y doble mutante para *crgA* y *mcwc-1b*.

3.3.1. Diseño experimental

Como estirpe silvestre se utilizó MU241, MU221 estirpe mutante nula para *crgA* y MU252 estirpe doble mutante nula para *crgA* y *mcwc-1b* (Figura 23). De cada estirpe se aisló RNA a partir de tres cultivos independientes crecido en medio mínimo durante 24 horas en condiciones de oscuridad, para evitar el efecto de la luz. Las preparaciones de RNA se marcaron fluorescentemente y se utilizaron como sondas en hibridaciones utilizando micromatrices (microarrays) que contenían oligonucleótidos correspondientes a todos los genes *Mucor* (véase **Materiales y métodos**). En cada una de las hibridaciones se compararon la expresión de los genes en dos muestras de dos estirpes distintas, utilizando un total de X micromatrices. Los datos

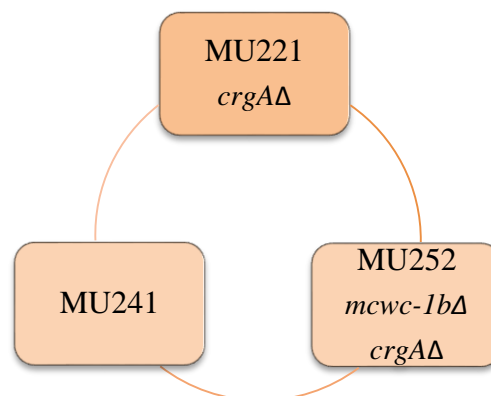


Figura 23. Diseño experimental del análisis transcritoómico.

Las líneas representan las hibridaciones en la que se comparaban dos transcriptomas, utilizando en todos los casos tres réplicas biológicas.

obtenidos en las diferentes comparaciones se sometieron a un análisis de calidad, normalización y análisis estadístico. Los datos normalizados se utilizaron para realizar las diferentes comparaciones, seleccionando como genes diferencialmente expresados aquellos en los que las diferencias de expresión mostraban un valor de p-ajustado inferior a 0,05 (95% de confianza estadística), nivel establecido como umbral de confianza, y la relación entre los valores de expresión entre dos estirpes era superior a 4 veces (LogFC mayor de 2).

3.3.2. Agrupación de los genes dependiendo de su regulación.

En la comparación del silvestre con el mutante *crgAΔ* aparecen 346 genes con diferencias significativas, En la comparación del mutante *crgAΔ* con el doble mutante *crgAΔ mcwc-1bΔ* aparecen 213, por último en la comparación entre el silvestre y el doble mutante *crgAΔ mcwc-1bΔ* aparecen 29 genes con expresión diferencial. Los genes diferencialmente expresados se distribuyeron en grupos dependiendo de las diferencias de expresión entre las estirpes incluidas en el experimento (**Tabla 7**). Para cada grupo se define un modelo de regulación acorde con los datos.

Resultados

Los grupos mayoritarios son B y D representando el 23% y el 42% respectivamente del total de genes diferencialmente expresados, son genes regulados por *crgA* a través de *Mcwc-1b*, el grupo B engloba los genes activados por *crgA* y el grupo D los inhibidos por *crgA*. El 70% de los genes regulados por *crgA* están en estos dos grupos, indicando que el mecanismo de acción de *crgA* es mayoritariamente a través de *mcwc-1b*, como ya se había visto en el caso de los genes carotenogénicos (Silva et al., 2008). De hecho los genes *carB* (ID 31317) y *mcwc-1c* (ID 94693) están presentes en el grupo D, lo que concuerda con datos ya publicados. A partir de los grupos anteriores se generaron los B y D especiales, de los que forman parte los genes regulados por *crgA* y en parte a través de *mcwc-1b*. La ausencia de *crgA* provoca un cambio en los niveles de expresión con respecto al silvestre, pero en la estirpe que carece de *crgA* y *mcwc-1b* sigue existiendo un cambio en los niveles de expresión con respecto a la estirpe silvestre, aunque de menor magnitud. La identificación de estos grupos sugiere que *crgA* regula la expresión de estos genes a través de dos mecanismos distintos, en uno de los cuáles participa la proteína *mcwc-1b*, pero no en el otro.

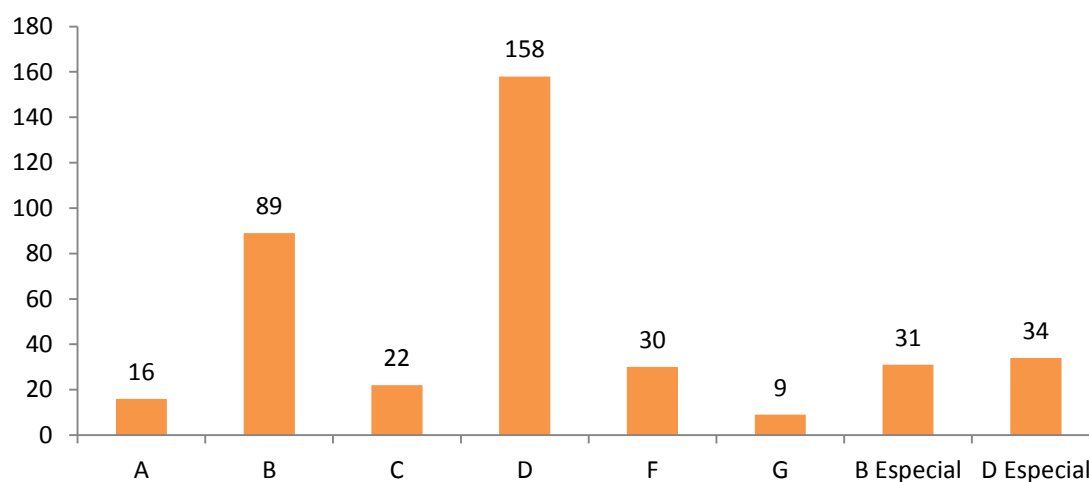
Los grupos A y C están formados por genes regulados por *crgA*, pero cuya expresión no depende de *mcwc-1b*, ya que las diferencias de expresión entre la estirpe mutante para *crgA* y mutante para *crgA* y *mcwc-1b* son similares. Este mecanismo de regulación independiente de *mcwc-1b* regula la expresión de genes tanto positivamente (Grupo A) como negativamente (Grupo C), que se traduce descenso o aumento, respectivamente, de la expresión de los genes regulados en las estirpes que carecen de *crgA*. Este mecanismo tendría un papel menor en el papel regulador de *crgA*, al menos en las condiciones estudiadas, ya que el número de genes de cada grupo es reducido.

En los grupos F y G se han catalogado los genes regulados por *mcwc-1b*, pero independientes de *crgA*, puesto que los genes incluidos en estos grupos muestran una expresión diferencial en la estirpe doble mutante con respecto a las estirpes silvestre y mutante nula para *crgA*. Como ya se verá en los siguientes apartados *Mcwc-1b* interviene en la regulación de numerosos genes por sí mismo.

Tabla 7. Grupos de genes pro *crgA* y/o *mcwc-1b*

Grupo	Tipo de regulación
A	Activados por <i>crgA</i> e independientes de <i>mcwc-1b</i>
B	Activados por <i>crgA</i> a través de <i>mcwc-1b</i>
C	Reprimidos por <i>crgA</i> e independientes de <i>mcwc-1b</i>
D	Reprimidos por <i>crgA</i> a través de <i>mcwc-1b</i>
F	Reprimidos por <i>Mcwc-1b</i> e independientes de <i>crgA</i>
G	Activados por <i>Mcwc-1b</i> e independientes de <i>crgA</i>
B especial	Activados por <i>crgA</i> en parte a través de <i>mcwc-1b</i>
D especial	Reprimidos por <i>crgA</i> en parte a través de <i>mcwc-1b</i>

Numero de Genes de cada grupo

**Figura 24.** Relación de genes en cada grupo. Cada gen tan solo está presente en un grupo concreto.

3.3.3. Validaciones

Para determinar la validez de los datos obtenidos en el análisis transcriptómico y de las conclusiones derivadas de ellos, se analizaron los niveles de mRNA de algunos genes seleccionados, mediante hibridaciones tipo Northern, en muestras de RNA total extraídas en las mismas condiciones. En el grupo de genes activados por *crgA* a través de *mcwc-1b* se seleccionaron los genes de una hidrolasa de isocorimato (ID: 35485, grupo B) y una sulfatasa (ID: 32338, grupo B especial). En consonancia con los resultados del análisis transcriptómico, la falta del gen *crgA* provoca una bajada en los niveles de transcrito de ambos genes (**Figura 25**). En el caso del gen perteneciente al grupo B especial, tal como indicaban los datos transcriptómicos, hay una mayor concentración de mRNA en la estirpe

Resultados

mutante doble (*crgA* Δ *mcwc-1b* Δ) que en la mutante simple *crgA* Δ , pero no llega a los niveles de la estirpe silvestre, confirmando la participación de un mecanismo de regulación adicional al que participa *mcwc-1b* en el control de la expresión de este gen. Del grupo D, los niveles de mRNA del gen seleccionado, *velB7* (ID: 79588, grupo D), muestran una mayor acumulación de mRNA en el mutante nulo para *crgA*, indicando que *crgA* actúa disminuyendo la acumulación de mRNA de este gen, tal como indicaban los datos de transcriptómica. En el caso del gen sulfurilasa de O-acetohomoserina (ID: 79596 grupo D especial), se observó una mayor acumulación de mRNA en el mutante *crgA* que en silvestre y doble mutante, pero este último presentó mayores niveles que la estirpe silvestre, confirmando que este gen está regulado, además de por *mcwc-1b* por un mecanismo independiente del mismo. Estos resultados confirman los patrones de regulación principales descubiertos en los experimentos con micromatrices.

El gen seleccionado para validar los resultados del grupo C fue un gen que cifra una hipotética reductasa de ribonucleótido (ID: 88856). Al estar reprimido por *crgA*, sin la intervención de *mcwc-1b* los niveles de mensajero son mayores en los dos mutantes respecto al silvestre e iguales entre ellos. Por otro lado, el gen con ID 94333 se seleccionó para validar los resultados del grupo F, caracterizado por estar regulado por el gen *mcwc-1b*, como se confirmó en los experimentos de *northern* (**Figura 25**). Este resultado es muy interesante porque indica que existen un mecanismo de regulación en el que participa *mcwc-1b*, regulando la expresión de algunos genes en oscuridad independiente de su estado de ubiquitilación. En general, los resultados obtenidos en las hibridaciones tipo *northern* coinciden con los patrones de expresión determinados por el análisis transcriptómico, lo que validación de los mismos.

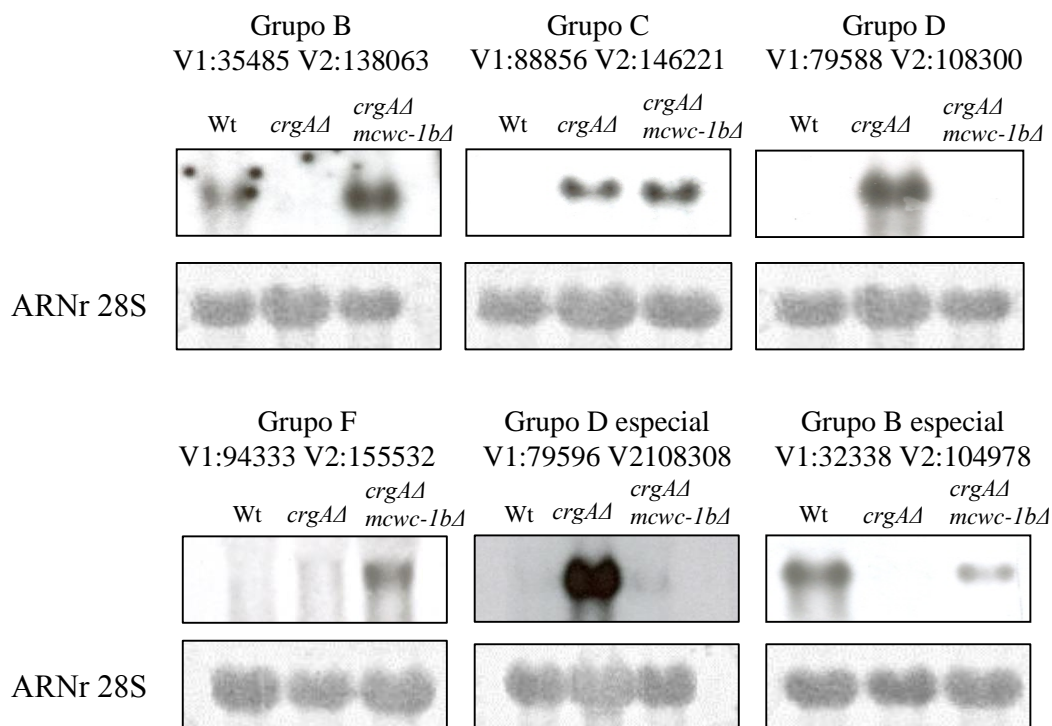


Figura 25. Validación de los resultados transcriptómicos de *crgA* mediante la técnica de Northern-blot.

RNA aislado de micelio de las estirpes MU241 (estirpe silvestre), MU221 (estirpe mutante nula para *crgA*) y MU252 (estirpe doble mutante nula para *crgA* y *mcwc-1b*), crecidos sobre medio sólido (YNB pH 4,5) durante 24 horas en oscuridad. Se generaron varias membranas y cada una se hibridó con varias sondas sucesivamente. Como control de carga se hibridó con una sonda del ARNr 28S.

3.3.4. Análisis funcional

Con el objetivo de determinar los procesos biológicos regulados por *crgA*, se realizó un análisis funcional de los genes regulados por *crgA*, utilizando la clasificación KOG (EuKaryotic Orthologous Groups, <http://genome.jgi.doe.gov/Tutorial/tutorial/kog.html#classes>) (Tabla 8). Más del 40% de los genes regulados por *crgA* no se encuadran en ninguna de las clases funcionales definidas en KOG, desconociéndose su función. Del resto de genes, algunas clases funcionales se encuentran enriquecidas en los grupos de regulación fijados respecto al genoma de *Mucor* (Figura 26). Si consideramos todos los genes regulados por *crgA*, nos encontramos que el 2,86% de los genes están implicados en el metabolismo secundario mientras que en el genoma es del 1,37%. Hay ciertas funciones más enriquecidas en los genes activados por *crgA* que en los reprimidos, el ejemplo más claro en los genes implicados en el metabolismo de aminoácidos. En el genoma un 2,69% de los genes están implicados en esta función, entre

Resultados

los genes regulados por *crgA* es el 5,71%, si observamos más específicamente los genes reprimidos un 1,88%, sin embargo, en los genes activados por *crgA* el 11,76% están implicados en el metabolismo de aminoácidos. El caso contrario ocurre en los genes implicados en el metabolismo secundario, esta función está más enriquecida en los genes reprimidos por *crgA* que en los genes activados (**Tabla 8**).

Dentro de los genes regulados por *crgA* hay una gran cantidad implicados en el metabolismo, ya sea metabolismo de aminoácidos, carbohidratos, lípidos o metabolismo secundario.

Tabla 8. Análisis funcional de los genes regulados por *crgA*.

Clase KOG	Genoma	Regulados por <i>crgA</i>	Reprimidos por <i>crgA</i>	Activados por <i>crgA</i>
Transporte y metabolismo de aminoácidos	2,69%	5,71%	1,88%	11,76%
Transporte y metabolismo de carbohidratos	3,84%	4,00%	1,88%	7,35%
Control del ciclo celular y división	2,34%	0,57%	0,94%	0,00%
Movilidad celular	0,09%	0,00%	0,00%	0,00%
Biogénesis de la pared celular, membrana o envoltura celular	1,22%	2,00%	2,82%	0,74%
Estructura y dinamismo de la cromatina	1,60%	0,29%	0,00%	0,74%
Transporte y metabolismo de coenzimas	0,87%	0,57%	0,94%	0,00%
Citoesqueleto	2,30%	0,29%	0,47%	0,00%
Mecanismos de defensa	0,62%	0,29%	0,47%	0,00%
Producción y conversión de energía	2,98%	4,57%	4,23%	5,15%
Estructuras extracelulares	0,26%	0,29%	0,00%	0,74%
Función desconocida	4,57%	1,43%	2,35%	0,00%
Función general (no incluida en ninguna clase)	11,73%	10,29%	10,80%	9,56%
Transporte y metabolismo de iones inorgánicos	2,01%	2,00%	2,82%	0,74%
Trafico intracelular, transporte y secreción de vesículas	4,46%	0,57%	0,47%	0,74%
Transporte y metabolismo de lípidos	3,54%	3,14%	3,76%	2,21%
Estructura nuclear	0,85%	0,86%	1,41%	0,00%
Transporte y metabolismo de nucleótidos	1,01%	1,14%	1,41%	0,74%
Modificaciones postranscripcionales, renovación de proteínas y chaperonas	6,89%	6,86%	5,16%	9,56%
Replicación recombinación y reparación del DNA	2,01%	0,86%	1,41%	0,00%
Procesamiento y modificación del RNA	2,97%	0,00%	0,00%	0,00%
Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios	1,37%	2,86%	3,76%	1,47%
Señales y mecanismos de trasducción	7,34%	4,57%	6,10%	2,21%
Transcripción	5,46%	4,29%	5,16%	2,94%
Biogénesis y traslación de ribosomas	4,39%	0,86%	0,94%	0,74%
No anotados	22,57%	41,71%	40,85%	42,65%

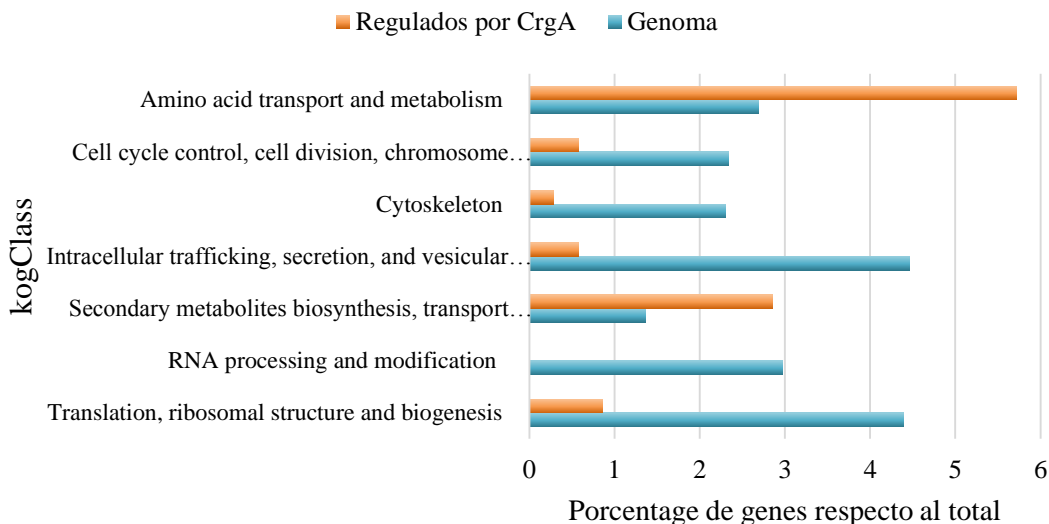


Figura 26. Porcentajes de funciones con diferencias estadísticamente significativas entre los genes regulados por *crgA* y genes presentes en el genoma.

3.4. Análisis del gen *velB7* con dominio velvet en *Mucor*

Los análisis globales de expresión revelaron la existencia de un gen (ID 108300) con dominio velvet fuertemente regulado por *crgA*, concretamente englobado en el grupo D, por lo tanto está reprimido por CrgA a través del bloqueo de Mcwc-1b, presentado elevados niveles en la estirpe mutante para *crgAΔ* y niveles silvestre en el doble mutante *crgAΔ mcwc-1bΔ*. Los genes con dominios velvet están implicados en la regulación de la esporulación y en la alternativa entre reproducción sexual y asexual, además de otras funciones como la producción de metabolitos secundarios en varias especies de ascomicetos (Kaefer, 1965; Kim *et al.*, 2002; Ni & Yu, 2007;). El fenotipo del mutante *crgAΔ* se caracteriza por, además de la sobreactumulación de caroteno, por un defecto en la reproducción asexual, que se traduce en una baja producción de esporas.

3.4.1. Características estructurales del gen *velB7*

La secuencia del gen *velB7* en el genoma de *Mucor* (<http://genome.jgi.doe.gov/Mucci2/Mucci2.home.html>) presenta 1.099 pb y está constituido por 5 exones y cuatro intrones, El tamaño de la secuencia codificante es de 822 pb, que daría lugar a una proteína de 273 aminoácidos.



Figura 27. Secuencias genómica y aminoacídica de la región codificante del gen *velB7* y de la proteína VelB7.

Se indican los exones codificantes en rojo y los intrones en verde.

La secuencia de aminoácidos del gen *velB7* contiene un dominio velvet, identificado mediante la herramienta PFAM, que comprende desde el residuo 91 hasta el 266 (PF11754, e-value: 2.3e-55). Las proteínas mejor caracterizadas con este dominio son las proteínas VeA, VelB, VosA y VelC de *A. nidulans*, que cumplen distintas funciones en el proceso de regulación (Bayram *et al.*, 2012, véase apartado 1.9 de introducción).

Cuando se realizó una búsqueda en el genoma de *Mucor* de genes con secuencias similares a *velB7*, utilizando la secuencia de aminoácidos de *velB7*, se identificaron 7 genes, los cuales presentan dominio velvet (**Figura 28**). La anotación del genoma denomina a varios de estos genes como *velB/velC*, ya que no parece claro si son homólogos a *velB* o *velC* de *A. nidulans*. De hecho el gen *velB7*, en realidad lo denomina *velB7/velC7*. Para clarificar esta situación, se realizó un análisis filogenético utilizando proteínas de la familia velvet (todos con dominio velvet) y representantes de sus posibles homólogos en otros grupos de hongos, que incluían cigomicetos y ascomicetos, entre ellos las proteínas de referencia de *A. nidulans*. Para la realización del estudio filogenético, se utilizó *Phylogeny* donde se procesan las secuencias de proteínas por varios programas: primero un alineamiento de secuencias con MUSCLE, posteriormente se eliminan huecos con Gbloks, se genera el árbol con PhyLM y, por último, se representa el árbol con TreeDyn.

El árbol filogenético muestra una agrupación clara de las proteínas homólogas a VosA y Vea, a la vez coloca a la proteína VelB7 en un grupo filogenético en el que se incluye la proteína VelB de *A. nidulans*, junto con otras proteínas VelB/VelC de *P. blakesleeanus* y *Mucor*, mientras que la proteína VelC de *A. nidulans* forma un grupo muy alejado de VelB7, sugiriendo que esta proteína realmente más próxima filogenéticamente a las proteínas de la familia VelB que a las de la familia VelC (**Figura 28**).

El dominio velvet es un dominio de unión al DNA, siendo el dominio de la proteína VosA de *A. nidulans* el mejor caracterizado (Ahmed *et al.*, 2013). Los residuos más importantes para la unión a DNA en la proteína VosA de *A. nidulans* son: K37, K39, R41, K42 y K160 (**Figura 29**), pero en VelB del mismo organismo el residuo correspondiente al K37 se elimina y el K42 es sustituido por un residuo arginina (**Figura 29**). La proteína VelB7 de *Mucor* conserva los residuos en el dominio velvet que VelB de *A. nidulans*, al igual que todas las proteínas homólogas de otros hongos, apoyando que es una proteína tipo VelB.

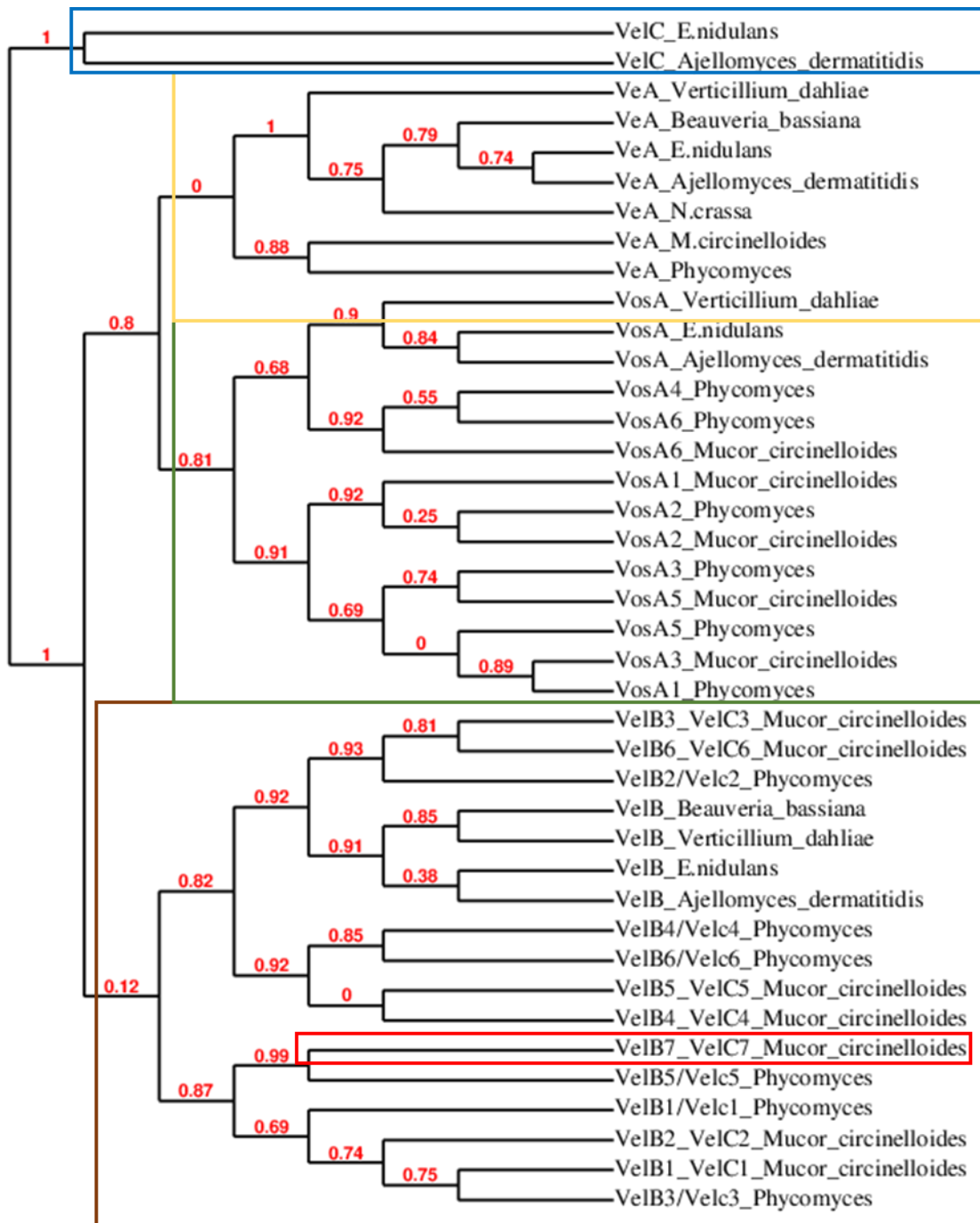


Figura 28. Filogenia de las proteínas con dominio Velvet en hongos.

Árbol filogenético resumen de las proteínas con dominio Velvet en hongos. Se indican los porcentajes de bootstrap sobre las divisiones

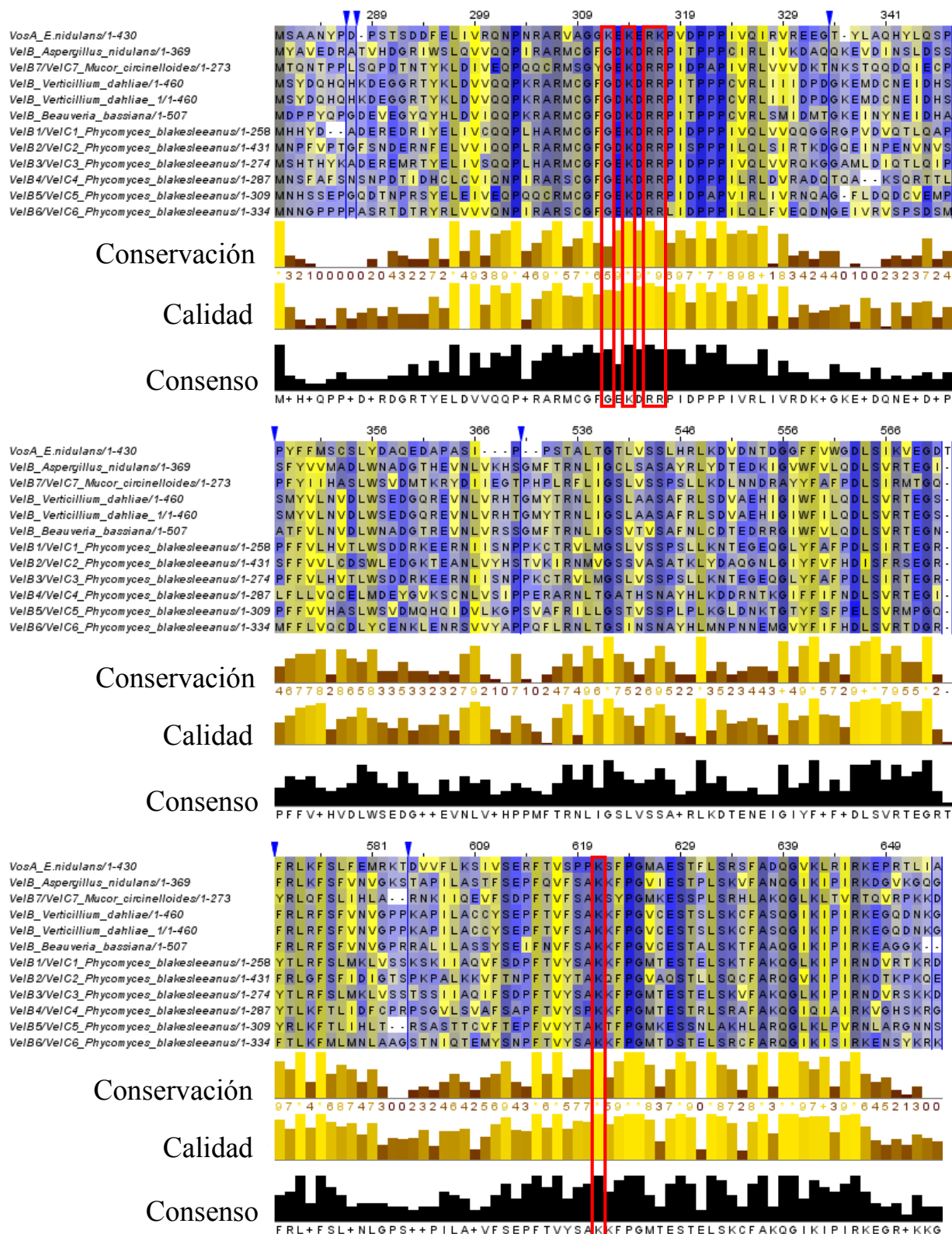


Figura 29. Alineamiento de los dominios velvet de VelB de hongos.

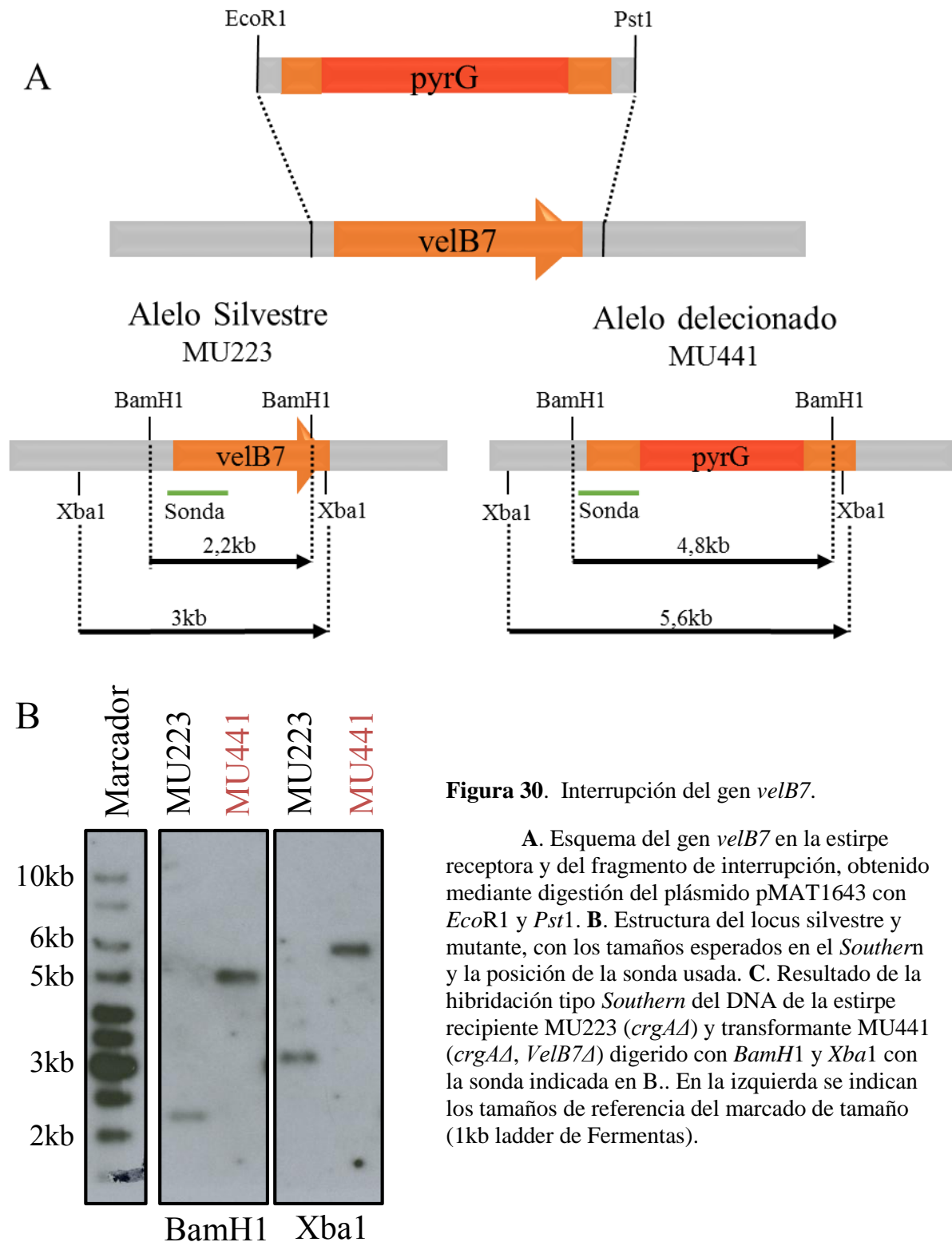
Alineamiento generado con T-Coffee y representado con Jalview. El sombreado en azul indica el grado de conservación e identidad (cuanto más intenso mayor grado de conservación). Las columnas recuadradas en rojo indican los residuos implicados en la unión a DNA. Las especies a las que pertenecen cada proteína se indica a la izquierda.

3.4.2. Generación de mutantes dobles *crgAΔ velB7Δ*

El gen *velB* está implicado en la reproducción asexual de hongos como *A. nidulans*, dependiendo con quien se asocie la inhibe (Bayram *et al.*, 2008b; Sarikaya Bayram *et al.*, 2010) o la favorece (Park *et al.*, 2012). La estrategia genética clásica para determinar la función de un gen es la generación o el aislamiento de sus mutantes. Por esa razón, para determinar si la sobreexpresión del gen *velB7* en el mutante nulo para *crgA* es el responsable de la baja esporulación de este mutante, se generó un mutante doble *crgAΔ velB7Δ*. Para ello, se reemplazó la mayor parte del gen *velB7* por el marcador de selección *pyrG* en un mutante *crgAΔ*. En este proceso, se construyeron vectores de interrupción que contenían el gen *pyrG* flanqueado por suficiente secuencia adyacente al gen *velB7* como para permitir la recombinación homóloga (véase apartado X.X de Materiales y Métodos para detalles). Fragmentos lineales de esta construcción se utilizaron para transformar la estirpe MU223, que presenta una delección del gen *crgA* y es auxótrofa para uracilo (*pyrG⁻*), obteniéndose 5 transformantes *ura⁺*.

Los transformantes de *Mucor* son normalmente heterocariontes, debido a la presencia de varios núcleos en los protoplastos y a que el DNA no se integra en todos los núcleos. La obtención de transformantes homocariontes requiere varios ciclos de crecimiento vegetativo en medio selectivo, para favorecer la pérdida de los núcleos no transformados. Tras varios ciclos de crecimiento en medio MMC, selectivo para *ura⁺*, se aisló un transformante homocarionte, denominado MU441.

Con el objetivo de comprobar la correcta interrupción del gen *velB7* en el transformante MU441, y descartar la posible existencia de integraciones ectópicas adicionales del fragmento de interrupción, se analizó el DNA del transformante MU441 mediante experimentos de hibridación tipo *Southern*. El DNA de transformante digerido con *BamH1* y con *Xba1* se hibridó con una sonda del gen *velB7* (**Figura 30**), que hibridaba tanto con el alelo silvestre como con el alelo con la delección, pero produciendo fragmentos de tamaños conocidos y distintos para cada estirpe. Las hibridaciones con la sonda produjeron los patrones de fragmentos esperados (**Figura 30**), confirmando la interrupción del gen *velB7*.



3.5.3. Fenotipo del doble mutante *crgAΔ velB7Δ*.

Una vez obtenido el doble mutante, se analizó su producción de esporas asexuales en comparación con el mutante nulo *crgAΔ* (MU221) y silvestre (MU241). La producción de

esporas fue muy similar a la estirpe mutante nula en *crgA* en el mutante doble *crgAΔ velB7Δ* (Figura 31), así como el crecimiento u otro fenotipo observable en las cajas. La ausencia de fenotipos visibles en el doble mutante puede deberse a la existencia de otros 6 genes *velB* identificados en el genoma de *Mucor*, uno de los cuales (*velB6/velC6*) también se sobreexpresa en ausencia de *crgA*, de tal forma que la falta de función de *velB7* sea compensada por otro gen *velB*.

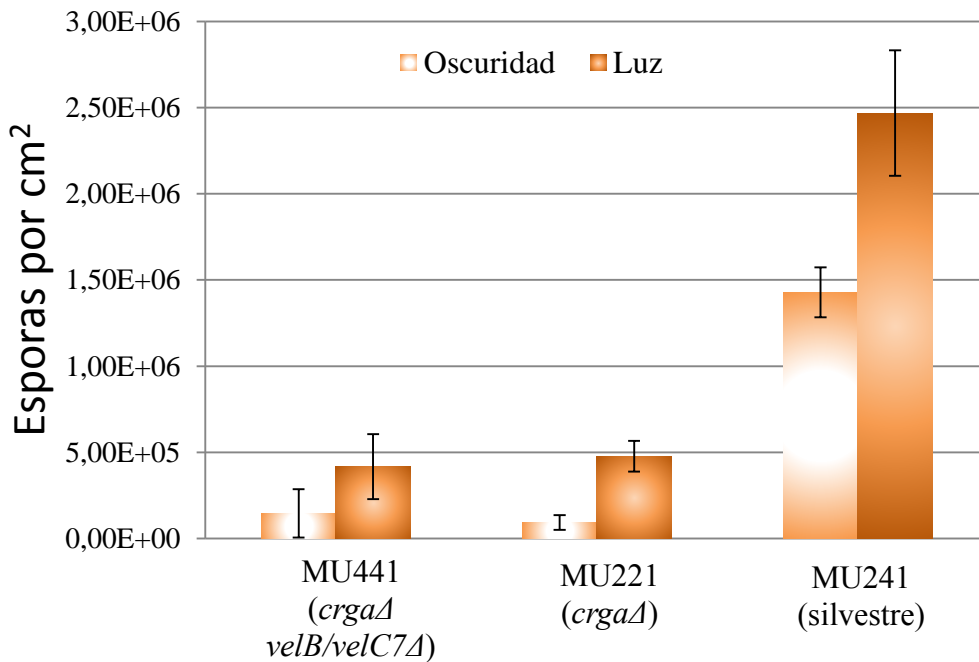


Figura 31. Análisis de la producción de esporas del mutante *crgAΔ velB7Δ*.

Esporas producidas por las estirpes indicadas, crecidas sobre medio sólido (YPG) en condiciones de oscuridad (72h en oscuridad) o luz (72h en luz). Se representan las medias \pm errores estándar de 4 experimentos distintos.

3.5. Análisis transcriptómico de las respuestas a la luz y de las funciones de los tres genes *mcwc-1* de *Mucor*.

Aunque la respuesta a la luz mejor caracterizada en el hongo *Mucor* es la biosíntesis de β -caroteno o fotocarotenogénesis, también se ha demostrado que los esporangióforos muestran fototropismo positivo (Silva et al., 2006) y que la luz induce la producción de esporas asexuales (Nicolás et al., 2008). No obstante, es probable que la luz también regule otros procesos fisiológicos, metabólicos y de desarrollo de *Mucor*, que no son fácilmente observables a simple vista, equivalentes a los descritos en otros hongos (Chen et al., 2009). Con el objetivo de identificar los genes que modifican su expresión en respuesta a un pulso de luz, y así conocer qué tipo de respuestas o adaptaciones regula este estímulo se ha

realizado un análisis transcriptómico a escala genómica. En el estudio se han incluido, además de la estirpe silvestre, los mutantes nulos para los tres genes *white collar-1* de *Mucor* (*mcwc-1a*, *mcwc-1b* y *mcwc-1c*) con el objetivo de determinar qué papel juega cada una de ellos en las respuestas a la luz.

3.5.1. Diseño experimental

La estirpe silvestre utilizada en estos experimentos fue R7B que, aunque es silvestre para las respuestas a la luz estudiadas, es auxótrofa para la leucina debido a una mutación en el gen *leuA*. La razón de utilizar esta estirpe fue descartar cualquier efecto de la auxotrofia en las comparaciones, ya que todos los mutantes en los genes *mcwc-1* analizados son auxótrofos para la leucina, llevando la misma mutación en el gen *leuA*. Las estirpes mutantes analizadas llevan deleciones de los genes *mcwc-1* (Silva et al., 2006) y fueron MU242 (*mcwc-1aΔ*), MU244 (*mcwc-1bΔ*) y MU247 (*mcwc-1cΔ*). De cada estirpe se aisló RNA a partir de micelios crecidos en oscuridad durante 18 horas (condición de oscuridad) y de micelios crecidos en oscuridad el mismo tiempo, pero posteriormente sometidos a un pulso de luz de 20 minutos (condición de luz) (véase **Materiales y Métodos** para detalles). Para el diseño de los microarrays se obtuvo por la plataforma de Agilent Technologies, las hibridaciones se realizaron por triplicado utilizando para ello 6 transcriptomas de cada estirpe, 3 en condiciones de luz y 3 en oscuridad. El experimento consistió en la comparación de los transcriptomas de cada estirpe en condiciones de luz y en oscuridad para identificar los genes regulados por luz y la función de cada gen *mcwc-1* en esa regulación, así como la comparación de los transcriptomas de las diferentes estirpes entre sí en las dos condiciones (**Figura 32**) para identificar genes cuya expresión en oscuridad o en luz estuvieran reguladas por los genes *mcwc-1*, independientemente de la regulación por luz. Los datos obtenidos en las diferentes comparaciones se sometieron a un análisis de calidad, normalización y análisis estadístico. De cada gen se seleccionaron dos valores que se utilizaron para obtener nuestras conclusiones: el cambio de expresión o fold change (LogFC) y el p-valor ajustado cuyo valor debe estar por debajo de 0,05 para que el valor de LogFC sea significativo.

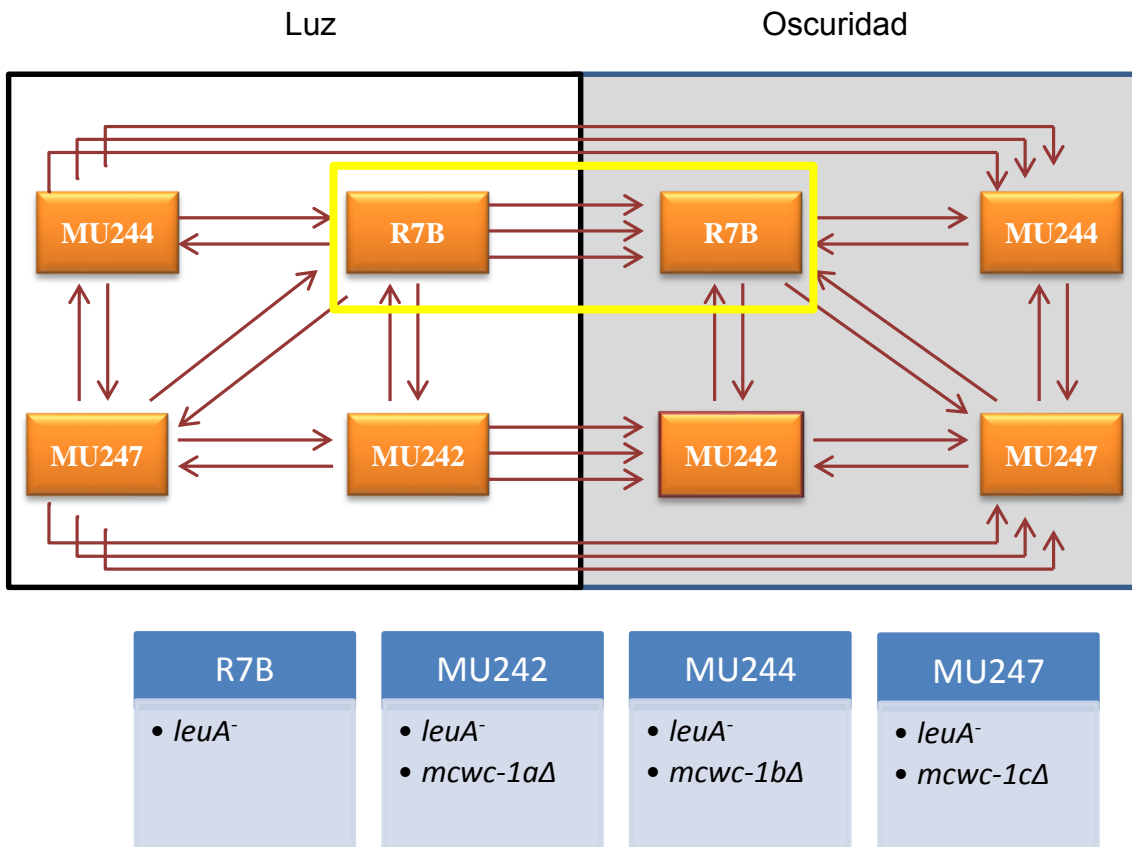


Figura 32. Diseño experimental del análisis transcritoico.

Cada flecha representa una hibridación en la que se comparaban dos transcriptomas, utilizando en todos los casos réplicas biológicas. Un cuadro amarillo señala la comparación de la estirpe silvestre en luz y oscuridad, que nos informa de los genes regulados por luz.

3.5.2. Análisis de los resultados y agrupación de los genes en función de su expresión.

El análisis de los resultados reveló que 390 genes mostraban una variación en los niveles de mRNA de al menos dos veces ($\text{LogFC} > 1$) en la luz con respecto a la oscuridad en la estirpe silvestre (**Figura 33**), indicando que están regulados por luz. La gran mayoría de genes están inducidos por luz, pero también hay reprimidos. En el mutante nulo para *mcwc-1a* la luz induce menos cambios de expresión, a diferencia de lo que ocurre en los otros dos mutantes que la respuesta al estímulo se mantiene muy parecida al silvestre. A partir del Heatmap podemos extraer ciertas conclusiones como por ejemplo que la luz induce más genes de los que inhibe y que *Mcwc-1a* es esencial en muchas de las respuestas a la luz, los demás WC-1 están implicados en menor medida. Esta conclusión se reafirma en las comparaciones del silvestre con los tres mutantes (5^a, 7^a y 9^a columna), en el mutante

Δmcwc-1a hay una bajada de expresión de la mayoría de genes inducidos por luz respecto al silvestre, sin embargo, esto no ocurre en los demás mutantes.

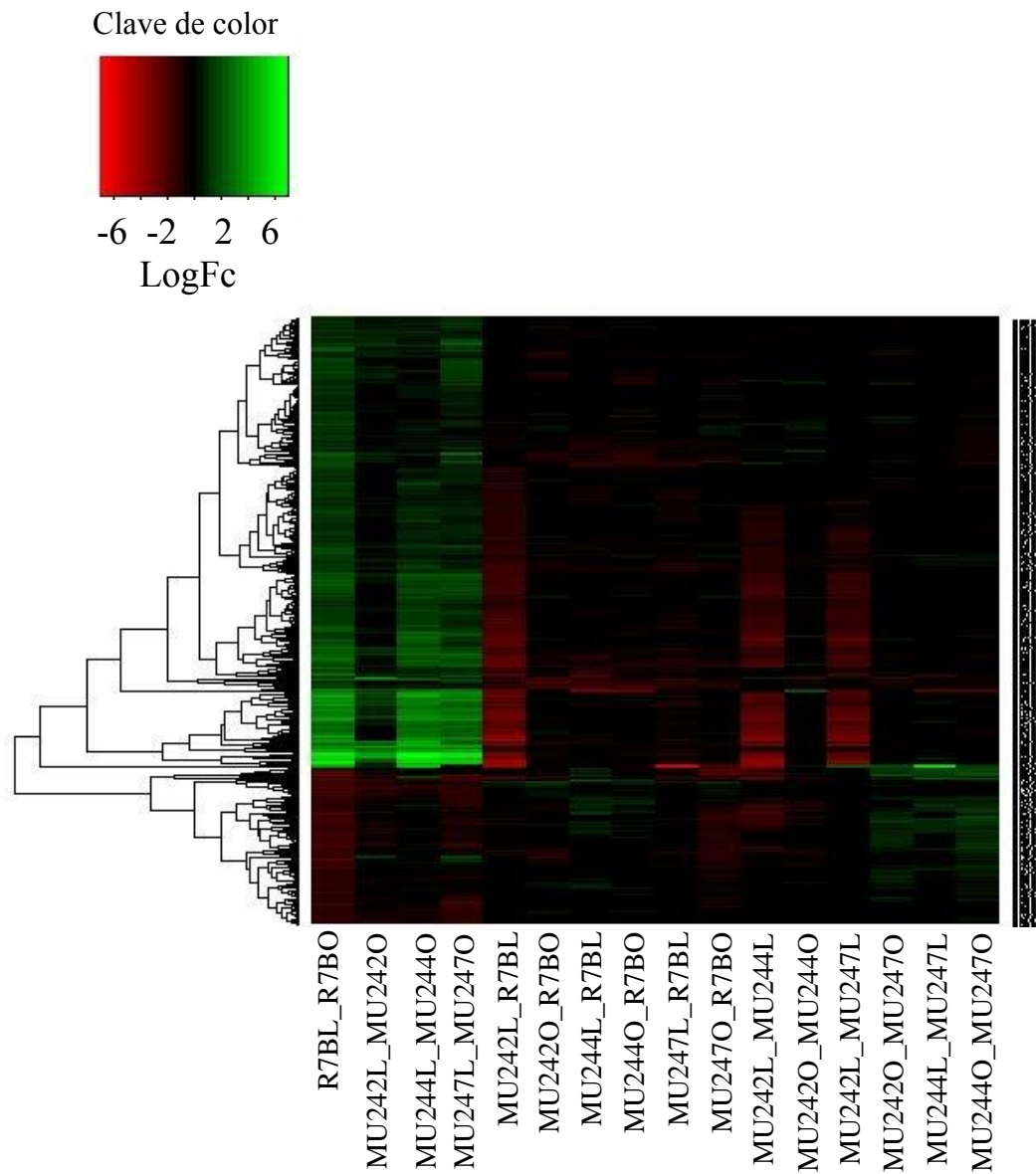


Figura 33. Heatmap de los genes regulados por luz, tanto inducidos como reprimidos.

Cada fila representa un gen y cada columna una comparación indicada en la base. El color verde indica una inducción de la expresión y el color rojo indica una bajada de la expresión, la intensidad del color es proporcional al cambio de expresión.

3.5.3. Agrupación de los genes en función de su regulación por la luz y los genes

mcwc-1

El Heatmap mostrado en la Figura 2 se realizó estableciendo un cambio mínimo de expresión de 2, pero para realizar un estudio en profundidad de los genes regulados por la luz se decidió ser más estricto y se analizaron solo los genes que mostraban un variación de expresión superior 3 ($\log_{2}FC > 1,6$). De esta forma, el número de genes regulados por luz se redujo a 146, que representan el 1,33% del total de transcritos detectables (**Tabla 9**). Los niveles de mRNA del 82,1% (120 genes) de los genes se incrementó en respuesta a la luz, mientras que el 27.9% (26) se redujo, indicando que la fundamentalmente induce la expresión génica. La expresión de 74 genes activados por luz fue dependiente de *mcwc-1a*, ya que mostraban una diferencia de acumulación de mRNA de 3 veces entre la estirpe silvestre y el mutante nulo en *mcwc-1a* en condiciones de luz. Estos genes representan el 50,7% de los genes regulados por luz, indicando que *Mcwc-1a* es el principal activador de la transcripción en condiciones de luz. El papel esencial de *mcwc-1a* en la regulación de la expresión génica por la luz se confirma cuando se analiza en el *heatmap* (**Figura 33**), ya que la columna correspondiente al mutante en *mcwc-1a* muestra una clara reducción en la acumulación de mRNA para prácticamente todos los genes, aunque la diferencia entre la estirpe silvestre y la estirpe mutante en condiciones de luz es menor de tres veces. Por otro lado, la dependencia de *mcwc-1a* no es completa, ya que el mutante nulo para *mcwc-1a* presenta una respuesta residual a la luz.

El papel de los genes *mcwc-1b* y *mcwc-1c* en la regulación por la luz es menor que *mcwc-1a*, ya que solo los niveles de mRNA de 3 genes están regulados por *mcwc-1b* y 1 por *mcwc-1c*. Al igual que ocurre con *mcwc-1a*, los mutantes nulos en *mcwc-1b* y *mcwc-1c* presentan una respuesta global a la luz disminuida, sin embargo, en menor medida que el mutante en *mcwc-1a* (**Figura 33**).

Además de los genes cuya regulación depende de los genes *mcwc-1*, el análisis transcriptómico ha revelado la existencia de 68 genes (**Tabla 9**), que representan un 46,6 % de los genes regulados por luz, cuya regulación es totalmente independientes de *mcwc-1*, sugiriendo la existencia en *Mucor* de otros fotorreceptores implicados en la transcripción mediada por luz.

3.5.4. Agrupación de los genes independiente de luz

A pesar de que las proteínas WC-1 son consideradas fotorreceptores los datos obtenidos sugieren que también actúan de forma independiente de la luz, ya que en un número significativo de genes se ha observa una diferencia en los niveles de los correspondientes mRNA superiores a 3 veces ($\log_{2}FC > 1,6$) entre los mutantes y la estirpe silvestre, tanto en condiciones de luz como de oscuridad. En concreto, se han identificado 13 genes regulados independientemente de luz y por uno o varios WC-1, 8 genes regulados por *mcwc-1a*, 9 regulados por *mcwc-1b* y 8 regulados por *mcwc-1c*, encontrándose que aproximadamente la mitad de los genes regulados por un *mcwc-1* están co-regulados por otro e incluso 6 genes están regulados por los 3 genes *mcwc-1*. Se han encontrado 2 genes que muestran un patrón de regulación por luz dependiente un gen *mcwc-1* y a su vez regulado de forma independiente a la luz por otro gen *mcwc-1*. Por ejemplo, el gen con ID 94903 está regulado por la luz a través de *mcwc-1a*, ya que en el mutante nulo la inducción por la luz es casi 3 veces menor que en el silvestre, pero además está regulado de forma independiente de la luz por *mcwc-1b*, puesto que los niveles de expresión tanto en luz como oscuridad son alrededor de 7 veces menor en el mutante nulo para *mcwc-1b* que en el silvestre, pero la inducción por la luz es la misma. Todos estos datos nos indica que los 3 genes *mcwc-1* están actuando de forma combinada en muchos casos. Como ya hemos visto *crgA* regula la función de Mcwc-1b mediante ubiquitilación, pero gracias a los estudios de *microarray* podemos determinar que Mcwc-1b activa la expresión de *crgA* de forma independiente de la luz (**Tabla S2**)

Tabla 9. Resumen de los genes regulados por la luz y/o los genes *mcwc-1*.

Genes regulados por luz 146	Dependientes de <i>mcwc-1a</i> 74 (50,7%)
	Dependientes de <i>mcwc-1b</i> 3 (2%)
	Dependientes de <i>mcwc-1c</i> 1 (0,7%)
	Independientes de <i>mcwc-1</i> 68 (46,6%)
Genes regulados por Mcwc-1 independientes de luz 13	Dependientes de <i>mcwc-1a</i> 8 (61,5%)
	Dependientes de <i>mcwc-1b</i> 9 (69,2%)
	Dependientes de <i>mcwc-1c</i> 8 (61,5%)
	Dependientes de los tres <i>mcwc-1</i> 6 (46,2%)

3.5.4. Análisis de las funciones biológicas de los genes regulados por luz

Con el objetivo de determinar los procesos celulares regulados por luz, se realizó un análisis funcional siguiendo la clasificación KOG (EuKaryotic Orthologous Groups, <http://genome.jgi.doe.gov/Tutorial/tutorial/kog.html#classes>). Aproximadamente el 35% de los genes no se han podido encuadrar dentro de ninguna de las clases funcionales KOG. Hay grupos funcionales altamente enriquecidos en genes. Por ejemplo, los genes implicados en el metabolismo y transporte de lípidos comprenden el 7,53% de los genes regulados por luz, pero solo el 3,7% de los genes del genoma se incluyen. En este grupo podemos encuadrar los responsables de la síntesis de carotenos. De la misma forma, la frecuencia relativa de las clases que incluye genes implicados en la producción de energía (8.22%), metabolismo de aminoácidos (5,48%), metabolismo secundario (5.48%), producción y metabolismo de coenzimas (2.74%) o replicación, recombinación y reparación del DNA (4.11%) es mayor en los genes regulados por luz que en el genoma (**Tabla 10**).

Tabla 10. Análisis funcional de los genes regulados por luz.

kogClass	Porcentaje de genes en el de genoma (%)	Porcentaje de genes regulados por luz (%)
Función desconocida	20,27	32,19
Replicación recombinación y reparación del DNA	2,22	4,11
Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios	1,47	5,48
Metabolismo y transporte de lípidos	3,73	7,53
Transporte y metabolismo de lípidos	2,87	5,48
Producción y conversión de energía	3,16	8,22
Transporte y metabolismo de coenzimas	0,94	2,74
Transporte y metabolismo de nucleótidos	1,05	1,37
Estructura nuclear	1,15	1,37

3.5.5. Validación de los resultados de expresión

Para determinar la validez de los datos obtenidos en los experimentos de hibridación con micromatrices y de las conclusiones derivadas de ellos, se analizaron, mediante hibridaciones tipo *northern*, los niveles de mRNA de una muestra de los genes de cada grupo, en muestras de RNA total de todas las estirpes, crecidas en las mismas condiciones que para los experimentos de transcriptómica.

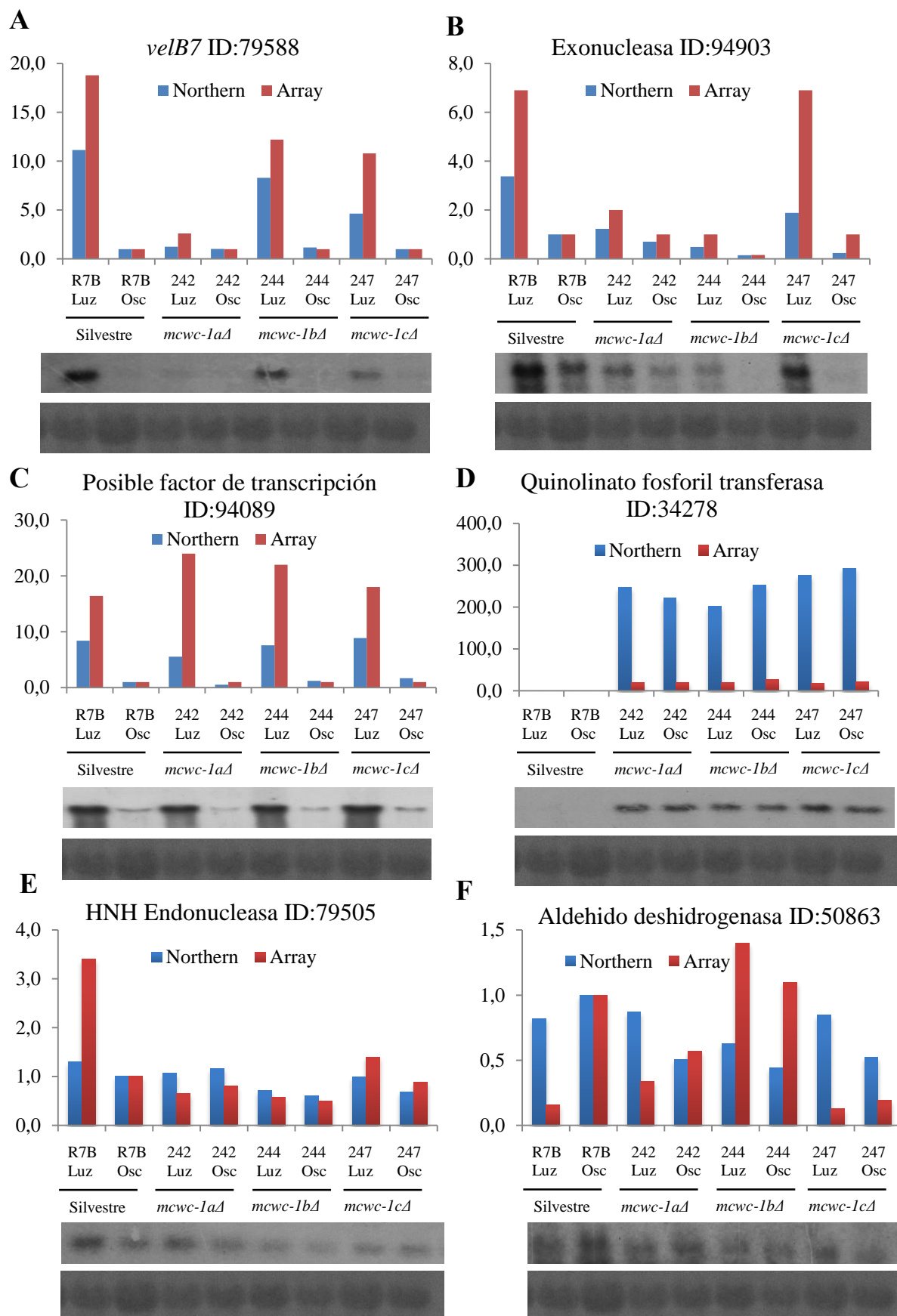
Los resultados confirman que los genes *mcwc-I* participan en varios tipos de regulación. En el grupo de genes regulados por luz a través de *mcwc-Ia*, se seleccionaron los genes *velB7* (ID 79588, estudiado con más detalle en el capítulo de esta tesis) y un gen que cifra una exonucleasa tipo ABC (ID 94903). En ambos genes se observó un aumento de expresión en condiciones de luz en todas las estirpes, excepto en el mutante nulo para *mcwc-Ia* (Figura 4), confirmando los resultados obtenidos en el análisis transcriptómico. El gen de la exonucleasa es especialmente interesante, ya que además de estar regulado por *mcwc-Ia* en cuanto a su respuesta a la luz, su nivel basal de expresión en la oscuridad está regulado por *mcwc-Ib* tal como refleja el hecho de que, el mutante nulo para *mcwc-Ia* no responda a la luz y que los niveles basales de mRNA en el mutante nulo para *mcwc-Ib* se vean reducidos, aunque sigan incrementándose en respuesta a la luz. Por tanto, con este gen se ha podido comprobar la validez de los resultados de dos grupos a la vez, los regulados por luz a través de *mcwc-Ia* y los regulados por *mcwc-Ib* independientemente de la luz.

Resultados

Otro grupo que se validó corresponde a los genes regulados por la luz, pero que no se ven afectados por la delección individual de cada gene *mcwc-1*. En este caso, el gen sometido a validación es un posible factor de transcripción (ID 94089), cuya expresión, según los datos de transcriptómica, se induce por la luz de forma similar en todas las estirpes. Los resultados de la hibridación tipo *northern* confirmaron este patrón de expresión (**Figura 34**), aunque el nivel de inducción no es tal alto, probablemente porque se trata de técnicas de distintas con diferentes limitaciones. Uno de los grupos más sorprendente es el constituido por genes cuya expresión está regulada por los tres genes *mcwc-1* independientemente de la luz. En este caso el gen seleccionado cifra una posible transferasa de fosforil quinolinato (ID 34278), cuya expresión está muy inducida, tanto en la oscuridad como en la luz, en los tres mutantes nulos y, por lo tanto reprimida por la presencia simultánea de los tres genes *mcwc-1*. Los resultados de las hibridaciones tipo, *northern* reflejan un patrón de expresión muy parecido al observado en el estudio de transcriptómica, validando ese patrón de expresión.

Los datos de transcriptómica sugieren que algunos genes presentan una regulación dependiente de luz y por más de un gen *mcwc-1*, aunque las diferencias de expresión son pequeñas, como un gen que cifra posible Endonucleasa HNH (ID: 79505). Se intentó validar estos resultados para obtener una conclusión clara del tipo de regulación a la que es sometida este gen y los que presentan un patrón de expresión parecido, pero los resultados mantienen la misma tendencia que en array, si parece que hay una regulación por luz pero no está clara la intervención de los 3 WC-1. En el grupo de los genes reprimidos por luz ocurre algo parecido, el gen seleccionado una aldehído deshidrogenasa (ID 50863) el patrón de expresión es similar en los dos experimentos para el silvestre y el mutante *mcwc-1bΔ*, pero diferente para los mutantes *mcwc-1aΔ* y *mcwc-1cΔ*. Las proteínas WC-1 parece que intervienen en la regulación pero no se puede afirmar con rotundidad.

De los genes sometidos a validación, sólo la expresión de uno de ellos (ID 81803) no se ha podido estudiar mediante hibridación tipo *northern*. Los datos transcriptómicos indicaban que la expresión de este gen es independiente de la luz y activada por los tres genes *mcwc-1*, pero la ausencia de señal, utilizando dos sondas diferentes, en dos experimentos tipo *Northern* independientes ha imposibilitado validar la expresión de este gen.



Resultados

Figura 34. Representación densitométrica de los datos obtenidos mediante *northern* una vez normalizados respecto al rRNA 28S.

En rojo se representan los datos obtenidos en el experimento de Microarray. Debajo de cada grafica se muestra la hibridación del gen y debajo de esta la hibridación con el RNA ribosómico 28S(A) Gen con ID 78588 regulado por luz y por Mcwc-1a. (B) Gen con ID 94903 regulado por luz y por Mcwc-1a y regulado por Mcwc-1b independientemente de luz. (C) Gen con ID 94089 regulado por luz e independiente de Mcwc-1. (D) Gen con ID 34278 regulado por los 3 WC-1 de forma independiente de luz. (E) Gen con ID 79505 regulado por luz en el silvestre pero no en los tres mutantes. (F) Gen con ID 50863 inhibido por luz.

4. Discusión

4.1. Ubiquitilación no degradativa de Mcwc-1b

La gen *crgA* es un gen ampliamente distribuido en eucariotas, pero que solo ha sido estudiado con detalle en *Mucor* y *Fusarium fujikuroi*, donde se denomina *carS* (Rodríguez-Ortiz et al., 2013). En ambos hongos, la pérdida de función de este gen provoca la sobreacumulación de carotenos, y en caso de *F. fujikuroi* de otros metabolitos (Rodríguez-Ortiz et al., 2009). En *Mucor*, el gen *crgA* además regula el desarrollo de los esporangioforos y la producción de esporas asexuales (Nicolás et al., 2007). CrgA regula la síntesis de carotenos y la producción de esporas asexuales mediante el control de la actividad de la proteína Mcwc-1b (Silva et al., 2008; Navarro et al., 2013). La forma activa, no ubiquitilada, de Mcwc-1b es capaz de activar la expresión de los genes de la carotenogénesis y reprimir los genes implicados en la producción de las esporas sexuales. CrgA media la ubiquitilación de Mcwc-1b, impidiendo que pueda llevar a cabo ambas funciones. Hasta la fecha, no se han identificado las señales de las que depende la ubiquitilación y desubiquitilación de Mcwc-1b, ni a las que responde *crgA*.

La presencia de dos dominios RING-finger esenciales para la función de CrgA (Lorca-Pascual et al., 2004; Murcia-Flores et al., 2007) sugiere que se trata de una ligasa de ubiquitina que transfiere la ubiquitina conjugada en una proteína E2. Los ensayos de dos híbridos de levadura realizados en esta tesis no han detectado interacción de CrgA con alguna de las proteínas E2 de *Mucor*, aunque si sugieren que CrgA interacciona consigo mismo. La ausencia de interacción de CrgA con alguna de las proteínas en sistema de dos híbridos de levadura podría explicarse porque la interacción fuese débil, alguna de las dos proteínas intervinientes deba modificarse específicamente en el citoplasma de *Mucor* o bien otras proteínas de *Mucor* participa en la interacción. Otras aproximaciones experimentales, como la purificación por afinidad en tándem (TAP) podría identificar proteínas que interaccionan con CrgA incluyendo la proteína E2.

La ubiquitilación de Mcwc-1b por CrgA no marca a la proteína para su degradación en el proteasoma (Silva et al., 2008), pero bloquea su función. Con el objetivo de identificar la lisina que es ubiquitilada en *Mucor*, y de esta forma tratar de explicar la base molecular

Discusión

del bloqueo de la función de Mcwc-1b, se generó un alelo de *mcwc-1b* que cifraba una proteína en la que se habían cambiado 21 lisinas, conservadas en las proteínas similares de mucorales, por arginina, que tiene carga positiva como la lisina, pero que no puede ser ubiquitilada. La introducción de este alelo en la estirpe que carece del gen *mcwc-1b*, pero presenta un gen *crgA* funcional, produjo un incremento de carotenos en oscuridad superior a la estirpe silvestre, indicando que a pesar de contener numerosas mutaciones la proteína Mcwc-1b es capaz de activar la carotenogénesis permitiendo la observación del fenotipo a simple vista. La generación de sucesivos alelos que cifraban proteínas con un número decreciente de lisinas cambiadas por argininas llevó a la identificación de una única lisina, la lisina 234 (**Figura 35**), que al ser cambiada por arginina provoca una sobreacumulación de carotenos en la oscuridad. La identificación de una única lisina sugiere que las moléculas de Mcwc-1b con 2 moléculas de ubiquitininas presentan una cadena corta de 2 ubiquitininas unidas a las lisina 234. El fenotipo del alelo con la mutación en la lisina 234 no reproducía completamente el del mutante nulo en *crgA*, ya que mostraba niveles de carotenos inferiores al mutante nulo en *crgA*. Ésto puede ser debido a una reducida funcionalidad de la proteína Mcwc-1b con la lisina 234 mutada o bien el alelo mutante se expresó en un plásmido autoreplicativo. Un resultado similar se había observado previamente en la complementación parcial de la estirpe mutante nula para *crgA* y *mcwc-1b* con el alelo silvestre de *mcwc-1b*, también expresado a partir de un plásmido autoreplicativo (Silva et al., 2008).

La proteína Mcwc-1b con la lisina 234 sustituida por arginina, así como el resto de proteínas mutantes con este cambio, no fueron modificados por ubiquitilación, observándose en los correspondientes transformantes únicamente la isoforma sin ubiquitilar, que indica que ésta es la diana de ubiquitilación, así como que la ausencia de ubiquitilación provoca la activación de la carotenogénesis, incluso en presencia de proteína CrgA funcional. Interesantemente, esta lisina se encuentra localizada en el dominio LOV, en una zona rodeada de residuos importantes del dominio implicados en la interacción con el cromóforo, sugiriendo que podría dificultar la posible función de este dominio, aunque aún no se ha encontrado una respuesta regulada por luz a través de Mcwc-1b. La importancia de esta lisina debe ser elevada porque también está conservada en las proteínas de mucorales similares a Mcwc-1b, sugiriendo que podrían estar también reguladas mediante ubiquitilación. Así mismo, se encuentra en las Mcwc-1a y Mcwc-1c, de las que no hay constancia que este reguladas por ubiquitilación, pero sí actúan como fotorreceptores en el fototropismo y la carotenogénesis, respectivamente (Silva et al., 2006). Es también llamativo el hecho de que

no aparezca en otros fotorreceptores de luz azul, como las proteínas WC-1 de *N. crassa* o fototropinas de plantas (**Figura 35**), aunque el dominio LOV de la fototropina 1 (Phot1) de *A. thaliana* es ubiquitilado (Deng *et al.*, 2014).

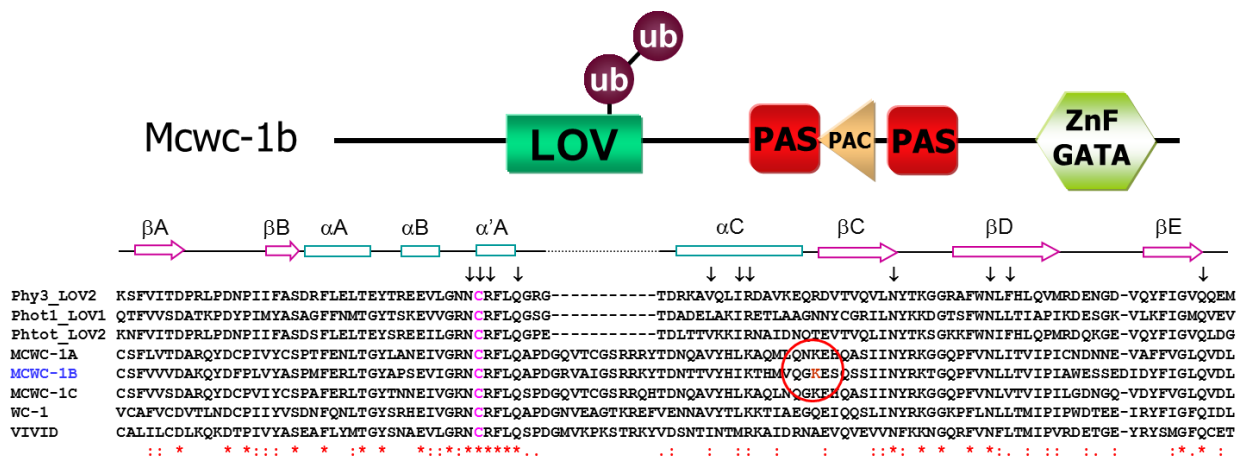


Figura 35. Esquema de la proteína Mcwc-1b.

La posición de los dominios de la proteína Mcwc-1b y su localización se representan a escala. Se indica la posición exacta del dominio LOV y la localización de los residuos importantes para la unión al cromóforo. En rojo se indica la lisina donde se unen las dos ubiquitinias.

La ubiquitinación del dominio LOV podría tener consecuencias distintas a la interferencia en la percepción de la luz por el dominio LOV. Así, para el correcto funcionamiento de las proteínas Wc-1 es imprescindible la unión con proteínas Wc-2 formando lo que se denomina el complejo White-collar (WCC). La ubiquitinación podría influir en la formación de estos complejos, al igual que ocurre con la proteína Nemo en humanos cuya di-ubiquitinación provoca un cambio en su conformación que le permite la activación del factor nuclear kB implicado en funciones tan importantes como el desarrollo, la homeostasis o la activación inmunológica (Rahighi *et al.*, 2009).

La ubiquitinación de Mcwc-1b también puede estar implicada en el transporte al núcleo. En proteínas como p53 la mono- y di-ubiquitinación provoca la expulsión del núcleo y, por lo tanto, su pérdida de función como regulador transcripcional. La hipótesis de que la ubiquitinación juegue el mismo papel en Mcwc-1b se ha tratado de estudiar en esta tesis mediante su fusión a proteínas fluorescentes, pero esto no ha sido posible debido a que la fusión no se expresó en *Mucor*.

4.2. Genes regulados por la ruta CrgA/Mcwc-1b

Los mutantes en *crgA* presentan un fenotipo muy claro, caracterizado por la acumulación de carotenos en oscuridad, baja producción de esporas y ausencia de hifas aéreas, este fenotipo es similar a los mutantes en *carS* de *F. oxysporum* (Avalos and Cerdá-Olmedo, 1987; Rodríguez-Ortiz *et al.*, 2012), sin embargo, esta proteína no es homóloga a CrgA. En otro cigomiceto, *Blakeslea trispora* se demostró la existencia de un gen ortólogo a *crgA* que es capaz de complementar los mutantes *crgAΔ* de *Mucor*, sugiriendo que debería regular la síntesis de carotenos en *B. trispora* (Quiles-Rosillo *et al.*, 2005) debido a las dificultades para manipular este hongo no se ha podido demostrar. Tampoco ha podido demostrarse si la carotenogénesis en *P. blakesleeanus* está regulada por alguno de los genes similares a *crgA* (genes *crg*).

La práctica totalidad de los eucariotas presentan secuencias similares a *crgA* en sus genomas, pero se desconoce que proteínas ubiquitina ya que fuera de los hongos no existen los genes *wc*. El hecho de que eucariotas alejados filogenéticamente presenten secuencias del tipo *crg* nos dice que estas están implicadas en funciones celulares básicas o al menos muy importantes. En el pez cebra (*Danio rerio*) se han estudiado los genes homólogos a CrgA, en este pez casi todas sus células pueden responder directamente a la luz (Weger *et al.*, 2011).

Los últimos datos obtenidos acerca de las funciones de CrgA, provenientes de un estudio de proteómica realizado recientemente en nuestro laboratorio, muestran la implicación de CrgA/Mcwc-1b en el metabolismo del carbono, en la síntesis de sideróforos, en el desarrollo vegetativo y en las respuestas al estrés por daño oxidativo (Navarro *et al.*, 2013). Estos datos son complementarios al estudio de transcriptómica realizado en este trabajo.

CrgA controla la expresión de al menos 350 genes que representan cerca del 3% (2.98%) de los genes identificados en *Mucor*. Gran parte de estos genes son regulados a través de Mcwc-1b, concretamente el 70.6% (247 genes) dependen totalmente de Mcwc-1b (Grupos B y D) y un 18,6% (65 genes) dependen parcialmente (Grupos B especial y D especial). El 10,8% (38 genes) son completamente independientes de Mcwc-1b (Grupos A y C). No solo la carotenogénesis y la esporulación están reguladas por CrgA a través de

Mcwc-1b sino que la mayoría de procesos dependientes de *crgA* lo son también de *mcwc-1b*. La existencia de genes cuya expresión es total o parcialmente independiente de Mcwc-1b sugiere la existencia de una ruta alternativa de regulación por parte de CrgA, es posible que medie en la ubiquitilación de una proteína desconocida de momento. Al ser los genes *wc* exclusivos de hongos esta nueva proteína ubiquitilada podría ser el nexo de unión entre las rutas controladas por el *crgA* de hongos y los *crg* del resto de eucariotas.

Hay que destacar la actuación en solitario de Mcwc-1b regulando 39 genes, reprimiendo 30 de ellos y activando 9 (Grupos F y G), es capaz de actuar independientemente de si esta ubiquitilado o no. Estos resultados se contradicen con la hipótesis de una expulsión del núcleo de la proteína ubiquitilada, ya que puede ejercer funciones reguladoras este o no ubiquitilada.

Un aspecto a tener en cuenta es cuál es la versión de Mcwc-1b activa la ubiquitilada o la no ubiquitilada. En el caso de la carotenogénesis parece ser claro, la versión activa es la no ubiquitilada, ya que la mutación en *crgA* provoca la síntesis de carotenos en oscuridad, pero que ocurre en el caso de los demás procesos regulados. En otros casos como Smad3, un factor transcripcional, la mono-ubiquitinación en múltiples residuos afecta a su capacidad de unión al DNA (Inui *et al.*, 2011). En la proteína Phot 1 de *Arabidopsis* ocurre que su internalización desde la membrana ocurre gracias a la mono- y oligoubiquitilación provocadas por la luz azul (Roberts *et al.*, 2011; Deng *et al.*, 2014).

4.3. Funciones de la ruta CrgA/Mcwc-1b

A través del análisis transcriptómico nos podemos hacer una idea de los procesos que controla CrgA y en qué pasos actúa. Dentro de los genes regulados por CrgA hay un enriquecimiento claro de los genes implicados en el metabolismo de aminoácidos y en la producción de metabolitos secundarios (**Tabla 11**), esto se comprobó mediante la prueba de la Chi cuadrado. El transporte y metabolismo de aminoácidos está activado por CrgA, por el contrario reprime el metabolismo secundario (**Tabla 11**).

Tabla 11. Resumen del análisis funcional de los genes regulados por *crgA*.

Los grupos con diferencias estadísticamente significativas se señalan con un asterisco

kogClass	Genoma	Regulados por CrgA	Reprimidos por CrgA	Activados por CrgA
Transporte y metabolismo de aminoácidos	2,69%	5,71%	1,88%	11,76%
Transporte y metabolismo de carbohidratos	3,84%	4,00%	1,88%	7,35%
Biogénesis de la pared celular, membrana o envoltura celular	1,22%	2,00%	2,82%	0,74%
Producción y conversión de energía	2,98%	4,57%	4,23%	5,15%
Modificaciones postranscripcionales, renovación de proteínas y chaperonas	6,89%	6,86%	5,16%	9,56%
Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios	1,37%	2,86%	3,76%	1,47%
No anotados	22,57%	41,71%	40,85%	42,65%

De 16 genes activados en presencia de CrgA implicados en el metabolismo de aminoácidos 9 son enzimas o subunidades de enzimas que forman parte de la ruta de síntesis o degradación de aminoácidos (**Figura 36, Tabla 12**). Parece estar activando la ruta de síntesis de Valina, Leucina, Isoleucina, Lisina, Triptofano, Metionina y Glutamina, también hay enzimas de la ruta de síntesis y degradación de Cisteína, en el caso de la Arginina la enzima controlada por CrgA cataliza el paso de Arginina a Ornitina y urea, es la Arginasa. El aminoácido Arginina es muy interesante, ya que es considerada una reserva de nitrógeno y de carbono en hongos como *N. crassa*, en condiciones de ausencia de nitrógeno el hongo puede acumular Arginina y glutamina (Espin and Mora, 1978; Espin et al., 1979).

En *Mucor* no se ha estudiado específicamente el fenotipo de los mutantes *crgA* respecto al metabolismo secundario dependiente de nitrógeno. Los estudios de proteómica realizados en nuestro laboratorio muestran la implicación de CrgA/Mcwc-1b en el metabolismo del carbono, en la síntesis de sideróforos, en el desarrollo vegetativo y en las respuestas al estrés por daño oxidativo (Navarro et al., 2013) Entre las proteínas con mayores diferencias de expresión se encuentra MasA, una proteína similar a NmrA de *A. nidulans* (Andrianopoulos et al., 1998, Navarro et al., 2013). Las proteínas tipo NmrA contienen un dominio de tipo Rossmann de unión a NAD(P)H/NAD(P)(+) y están implicadas en la regulación del metabolismo dependiente de nitrógeno en *A. nidulans* (Andrianopoulos et al., 1998; Macios et al., 2012). El gen *masA* no está catalogado en ningún grupo de expresión dependiente de CrgA, pero si aparece en los datos brutos con un aumento de expresión de 4,5 veces en el silvestre respecto al mutante nulo en *crgA*, por lo que parece estar activado por CrgA.

En *A. nidulans*, NmrA actúa interaccionando con el factor transcripcional AreA (Kotaka *et al.*, 2008; Lamb *et al.*, 2003). El dominio dedo de zinc tipo GATA de AreA es el responsable tanto de la unión a DNA como a la proteína NmrA, siendo la elección entre uno u otro de tipo competitiva, de manera que la asociación a NmrA va a impedir la unión al DNA e inhibir la actividad transcripcional de AreA (Kotaka *et al.*, 2008). El dominio GATA de AreA es el más parecido al hipotético dominio dedo de zinc de Mcwc-1b. En *A. nidulans* AreA es el principal regulador del metabolismo de nitrógeno (Kudla *et al.*, 1990) y junto a AreB reprimen el catabolismo de la Arginina reprimiendo la expresión de las enzimas Arginasa y Ornitina descarboxilasa, (Marcios *et al.*, 2012). El hecho del parecido en el dominio dedo de zinc tipo GATA de AreA y Mcwc-1b y la regulación de la enzima Arginasa sugiere un mecanismo de acción parecido de las proteínas Mcwc-1b, MasA y CrgA de *Mucor* y AreA, NmrA de *A. nidulans*.

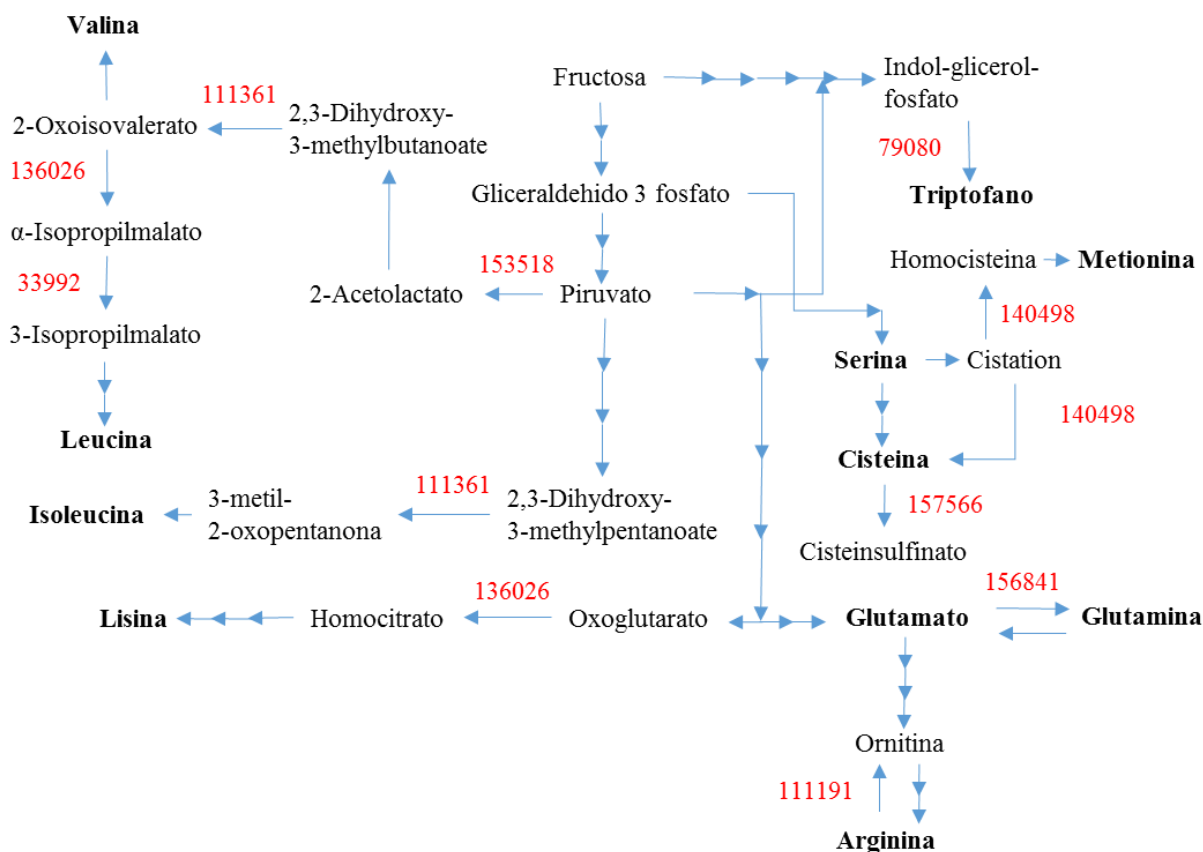


Figura 36. Ruta resumen de la síntesis de algunos aminoácidos.

Discusión

Las flechas indican reacciones enzimáticas, varias flechas unidas indican varias reacciones e intermediarios, en negrita se indican los aminoácidos y en rojo la ID de las enzimas activadas por *crgA*.

Tabla 12. Genes activados en presencia de CrgA que cifran probables enzimas implicadas en el metabolismo de aminoácidos.

Se indica la ID, la posible función, la diferencia de expresión en el silvestre respecto al mutante en *crgA* y los autores.

ID	Proteína (Definición Kog)	LogFC 241/221	Bibliografía
111191	Arginasa	3,10	Kossel and Dakin, 1904
142350	Meionina sintasa II (independiente de cobalamina)	2,69	Gonzalez <i>et al.</i> , 1996
157566	Cisteína dioxigenasa	2.46	Sakakibara <i>et al.</i> , 1976
111361	Dihidroxi-ácido deshidratasa	2,38	Myers, 1961
79080	Triptofano sintasa subunidad β	2.34	Wilson and Crawford, 1965
136026	α -Isopropilmalato sintasa/homocitrato sintasa	2.15	Webster and Gross, 1965
140498	Cistation β -liasa/cistation γ -sintasa	4,15	Anderson and Thompson, 1979
153518	Acetolactato sintasa, subunidad pequeña	2,64	Bauerle <i>et al.</i> , 1964
33992	3-isopropilmalato deshidratasa	2.58	Cross <i>et al.</i> , 1963
156841	Glutamina sintetasa	2,45	Tempest <i>et al.</i> , 1970

Una probable consecuencia de la pérdida de expresión en las enzimas encargadas del metabolismo de aminoácidos debería ser un retraso en el crecimiento del hongo. Se conoce la regulación que ejerce *crgA* sobre *cigA* un gen implicado en el crecimiento vegetativo e inducible por luz (Quiles-Rosillo *et al.*, 2003).

En nuestro laboratorio se han llevado a cabo estudios de crecimiento comparando el crecimiento de la estirpe silvestre con la estirpe mutante *crgA Δ* , estirpe mutante *mcwc-1b Δ* y doble mutante *crgA Δ mcwc-1b Δ* . En medio rico (YPG) no se encontraron diferencias de crecimiento entre las cuatro estirpes, pero en medio mínimo (YNB) si hay diferencia en el tamaño de las colonias del mutante *crgA Δ* con respecto al silvestre y el resto de mutantes (**Figura 37**). En medio rico se le proporciona al hongo peptona, extracto de levadura y glucosa con lo cual no tiene limitación de fuente de carbono, ni fuente de nitrógeno proporcionándole además los aminoácidos necesarios para su desarrollo, no teniendo la necesidad de sintetizarlos. En medio mínimo lo único que se le proporciona es glucosa, ácido glutámico y una fuente de nitrógeno inorgánico (sulfato amónico), en este caso si debe sintetizar todos los aminoácidos excepto el ácido glutámico, estando en clara desventaja el mutante *crgA Δ* ya que muchas de las enzimas del metabolismo de aminoácidos esta reprimidas. Algo similar ocurre en *A. nidulans* con los mutantes en *nrmA*, *areA* y *areB* donde

dependiendo la fuente de carbono y nitrógeno el crecimiento puede ser diferente al silvestre (Marcios *et al.*, 2012; Won *et al.*, 2007).

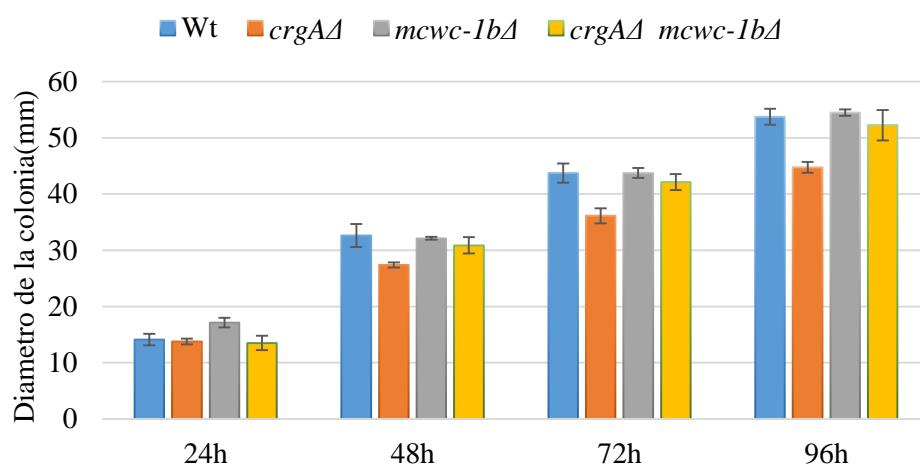


Figura 37. Diámetro de las colonias de las estirpes silvestre (MU241), Mutante *crgAΔ*, mutante *mcwc-1bΔ* y doble mutante *crgAΔ mcwc-1bΔ*.

Crecidas en medio sólido (YNB 4,5), se inoculan gotas de 2μl con suspensión de esporas en el centro de las cajas. Se mide el diámetro del micelio (mm) cada 24 horas. Las diferencias de crecimiento entre el silvestre y el mutante en *crgA* sin estadísticamente significativas a partir de las 48 horas.

Una de las funciones más enriquecidas en los genes reprimidos por CrgA respecto al genoma son los implicados en el metabolismo secundario. Dentro de este grupo hay proteínas del tipo Alcohol deshidrogenasa (clase V) con funciones muy diversas, la más destacada es la degradación de xenobioticos junto con citocromos P450 (Yasunami *et al.*, 1991). Los más interesantes son los genes que cifran proteínas del tipo Citocromo P450, pero estos no solo se encuentran clasificados dentro del metabolismo secundario, sino también en el metabolismo de lípidos. En total se han identificado 8 genes con características similares al citocromo P450 regulados por *crgA*, 6 reprimidos y 2 activados (Tabla 4).

Los citocromos P450 son enzimas ampliamente distribuidas, dentro de los hongos filamentosos están implicadas en numerosas funciones (George *et al.*, 1998; Carballeira *et al.*, 2009). De los 8 genes regulados por 3 pertenecen a la familia CYP2 implicada en el metabolismo de compuestos esteroideos y fármacos, 4 de ellas tiene homología con las familias CYP4, CYP19 y CYP26 estas están más implicadas en el metabolismo de ácidos grasos, síntesis de compuestos aromáticos y ácido retinoico (Nelson, 2005)

Tabla 13. Genes regulados por *crgA* que cifran probables Citocromos P45.

Se indica la ID, la posible función, la diferencia de expresión en el silvestre respecto al mutante en *crgA* y los autores.

ID V1	ID V2	Clase Kogg	Definición Kogg	MU241 Vs MU241
74535	153863	Metabolismo de lípidos	CYP450 Subfamilias CYP4/CYP19/CYP26	-3,99
77373	77373	Metabolismo de metabolitos secundarios	CYP450 Subfamilia CYP2	-3,63
92795	185607	Metabolismo de metabolitos secundarios	CYP450 Subfamilia CYP2	-3,44
77956	107637	Metabolismo de lípidos	CYP450 Subfamilias CYP4/CYP19/CYP26	-2,74
46568	168498	Metabolismo de metabolitos secundarios	CYP450	-2,74
96002	157402	Metabolismo de lípidos	CYP450 Subfamilias CYP4/CYP19/CYP26	-2,42
82345	144434	Metabolismo de lípidos	CYP450 Subfamilias CYP4/CYP19/CYP26	2,3
93430	185910	Metabolismo de metabolitos secundarios	CYP450 Subfamilia CYP2	2,74

En hongos los citocromos P450 realizan funciones implicadas tanto en el metabolismo primario como en el metabolismo secundario, dentro del metabolismo secundario realizan una importante función en la detoxificación de xenobioticos siendo estas enzimas inducibles en presencia de su sustrato (da Silva *et al.*, 2004). Estudios de secuenciación, de microarray y de PCR en tiempo real relacionan la expresión de los diferentes P450 con diferentes estados del desarrollo y condiciones de crecimiento. En el hongo *Phanerochaete chrysosporium* 27 de los 150 genes que cifran Citocromos P450 se expresan diferencialmete dependiendo de la disponibilidad de nitrógeno (Doddapaneni *et al.*, 2005; Subramanian *et al.*, 2008). Algo parecido ocurre con el hongo *Aspergillus oryzae* donde estas enzimas cobran gran importancia a la hora de las síntesis de sustancias con interés biotecnológico (Nazmul-Hussain-Nazir *et al.*, 2010).

Además de los Citocromos P450 *crgA* también regula otras enzimas encargadas de la detoxificación de especies reactivas de oxígeno como las catalasas, se han encontrado tres genes similares dentro de los reprimidos por *crgA*. Otro gen regulado que puede tener un gran interés es una quitinasa (ID 82118). La quitina o N-acetilglucosamina es el componente fundamental en la pared celular de los hongos (Austin *et al.*, 1981; Peberdy, 1990), las enzimas implicadas en la degradación de este compuesto están presentes tanto en bacterias como en hongos (Cabib, 1987). Esta enzima está relacionada con la liberación de las esporas, el crecimiento del pie de los basidiomicetos, con la autólisis del micelio en cultivo y el crecimiento y diferenciación de las hifas (Iten and Matile, 1970; Isaac and Gokhale, 1982;

Vries and Wessels, 1973; Bartnicki-Garcia, 1973; Burnett, 1979; Wessels, 1984). El mutante en *crgA* presenta graves defectos en el desarrollo de hifas aéreas, el aumento de expresión de este gen podría contribuir a este fenotipo. En nuestro laboratorio se han hecho pruebas de autólisis del micelio en varios mutantes afectados en el silenciamiento génico (Vila, 2014), este tipo de estudios se han realizado también en el mutante en *crgA*, pero los resultados están sin confirmar, la sobreexpresión en el mutante de este gen podría contribuir al fenómeno de autólisis prematura del micelio.

Es significativo la gran cantidad de genes a los que no se le asigna ninguna función por falta de homología con otras especies, en el genoma encontramos que el 22,5% de los genes no están anotados, mientras que en los genes regulados por *crgA* es el 41,71% casi el doble (**Tabla 8**). El enriquecimiento en genes no anotados nos sugiere que *crgA* puede estar regulando genes muy específicos de este grupo de hongos, tiene sentido ya que está modulando la actividad de *Mcwc-1b* y este es un gen exclusivo de hongos.

4.4. Genes *velB* de *Mucor*

El gen *velB7* (IDV1: 79588, IDV2: 108300, **Tabla S1**, **Tabla S2**) está presente en los dos análisis globales de expresión, por un lado está reprimido por *CrgA* a través de *Mcwc-1b* (grupo D) y por otro la expresión esta activada por luz y es dependiente de *mcwc-1b*. El gen *velB* de *A. nidulans* es el más estudiado, formando varios complejos y regulando varias funciones (Bayram *et al.*, 2008b; Sarikaya Bayram *et al.*, 2010). En *Mucor* existen 7 copias de *velB*, tres están reguladas por *CrgA*, 2 reprimidas y 1 activada. En los análisis de expresión de luz aparecen 2 reguladas de la misma forma activadas por luz dependientes de *mcwc-1a* (**Tabla 14**).

Es posible que las funciones realizadas en *A. nidulans* por su único *velB* estén repartidas entre los diferentes genes, eso explicaría que las diferencias de expresión no sean en todos los casos iguales, además es posible que los genes donde no se encuentran diferencias de expresión sea constitutivos. La duplicidad de función explicaría por que el mutante doble *crgA*, *velB* no presenta fenotipo observable, ya que la falta de función de uno puede complementarse con otro.

Tabla 14. Genes homologos a *velB* presentes en el genoma de *Mucor*.

Se indica la ID de las versiones 1 y 2 y las diferencias de expresión en el silvestre con respecto al mutante en *crgA* y las diferencias de expresión en condiciones de luz y oscuridad en el silvestre

Gen	V1	V2	LogFC Wt vs <i>crgAΔ</i>	LogFC R7BL vs R7BO
<i>VelB1</i>	93866	154790	#N/A	#N/A
<i>VelB2</i>	82770	82770	#N/A	#N/A
<i>VelB3</i>	81564	110453	#N/A	#N/A
<i>VelB4</i>	88977	156923	2,83	3,91
<i>VelB5</i>	71817	104867	#N/A	#N/A
<i>VelB6</i>	80078	80078	-3,79	#N/A
<i>VelB7</i>	79588	108300	-7,2	4,24

4.5 Análisis de las rutas reguladas por luz y los diferentes genes *wc-1* de *Mucor*

La luz regula como mínimo 149 genes que representan el 1,24% del genoma, 74 (50,7%) de estos genes están regulados a través de *mcwc-1a*. El 46,6% restantes parecen tener una cierta independencia de *mcwc-1a*, sin embargo, podemos observar en el *heatmap* (**Figura 33**) que la mayoría de genes inducidos por luz son dependientes de *mcwc-1a*, pero esta dependencia puede ser parcial, ya que en mutante la respuesta a la luz está muy disminuida, pero todavía está presente. En *N. crassa* ocurre algo similar, la mayoría de respuestas a la luz dependen de su único gen *wc-1*, pero el mutante nulo también presenta una inducción residual (Chen et al., 2009).

Los genes *mcwc-1b* y *mcwc-1c* no parece que tengan un papel importante en la regulación transcriptómica mediada por luz. Los tres genes *wc-1* de *Mucor* regulan la expresión de genes de forma independiente de luz, esto ya se había observado para *Mcwc-1b*, pero no para *Mcwc-1a* y *Mcwc-1c*. En algunos casos la regulación es llevada a cabo por los tres genes *wc-1* de *Mucor*.

5. Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta tesis han permitido extraer las siguientes conclusiones:

1. Se ha identificado la lisina de Mcwc-1b que es diana de la ubiquitilación mediada por CrgA, demostrándose que la expresión de un alelo con esta lisina sustituida por una arginina provoca un incremento de carotenos en oscuridad y luz.
2. El análisis transcriptómico de los genes regulados por *crgA* ha revelado que la expresión de al menos 350 genes que representan cerca del 3% de los genes identificados en *Mucor*, revelando el importante papel de *crgA* en la regulación de la expresión génica. De esos 350 genes 213 son reprimidos y 137 activados por *crgA*.
3. El control de la expresión génica por *crgA* se ejerce principalmente a través del control de la expresión de *mcwc-1b* (89,2% de los genes), aunque un reducido número es a través de un mecanismo independiente de *mcwc-1b* (10,8 % de los genes). Así mismo, *mcwc-1b* también es capaz de regular la expresión de algunos genes independientemente de CrgA.
4. Entre los genes regulados por *crgA* hay un enriquecimiento en genes que participan rutas del metabolismo de aminoácidos y el metabolismo de metabolitos secundarios. Entre estos genes destaca el gen *velB7* con dominio velvet que podría estar implicado en la esporulación.
5. Se han identificado 146 genes (1,24 % del genoma) regulados por luz en *Mucor*, estando la mayoría regulados a través de *mcwc-1a*, aunque no parece ser el único, ya que el mutante nulo para este gene presenta cierta respuesta a la luz.
6. Los genes Mcwc-1 también presenta funciones reguladoras en la oscuridad, ya que controlan la expresión de un grupo de genes, probablemente mediante la formación de complejos de las proteínas cifradas por los tres genes.

6. Bibliografía

- Alcaraz, A., Mrowiec, A., Insausti, C. L., García-Vizcaíno, E. M., Ruiz-Canada, C., López-Martínez, M. C., Nicolás, F. J. (2012). Autocrine TGF- β Induces Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Amniotic Epithelial Cells. Cell Transplantation.
- Anaya, N., y Roncero, M.I.G. (1991). Transformation of a methionine auxotrophic mutant of *Mucor circinelloides* by direct cloning of the corresponding wild type gene. *Molecular Genetics and Genomics*, 230, 449-455.
- Arpaia, G., Cerri, F., Baima, S., and Macino, G. (1999). Involvement of protein kinase C in the response of *Neurospora crassa* to blue light. *Molecular and General Genetics MGG*, 262(2).
- Arrach, N. (2001). Biosíntesis de carotenoides en hongos: los genes *carA* de *Phycomyces* y *al-2* de *Neurospora*. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.
- Avalos, J., Mehta, B. and Cerdá-Olmedo, E. (1992). Profiles on Biotechnology, T.G. Villa and J. Abalde (Eds.), Publications Service, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 323.
- Awad, M. F., and Kraume, M. (2011). Keratinophilic fungi in activated sludge of wastewater treatment plants with MBR in Berlin, Germany. Keratinophilic fungi in activated sludge of wastewater treatment plants with MBR in Berlin, Germany.
- Ballario, P., Vittorioso, P., Magrelli, A., Talora, C., Cabibbo, A. and Macino, G. (1996). White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *EMBO Journal*, 15, 1650-1657.

Bibliografía

- Ballario, P., Talora, C., Galli, D., Linden, H. and Macino, G. (1998). Roles in dimerization and blue light photoresponse of the PAS and LOV domains of *Neurospora crassa* white collar proteins. *Molecular Microbiology*, 29, 719-729.
- Barredo, J.-L., Iturriaga, E. A., Papp, T., Álvarez, M., and Eslava, A. P. (2012). *Methods in Molecular Biology*TM. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 898, 109-122.
- Barredo, J.-L., Torres-Martínez, S., Ruiz-Vázquez, R. M., Garre, V., López-García, S., Navarro, E., and Vila, A. (2012). *Methods in Molecular Biology*TM. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.),
- Bayram, O., and Braus, G. H. (2012). Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS microbiology reviews*, 36(1), 1-24.
- Bayram, O., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J. W., Helmstaedt, K., Valerius, O., Braus, G. H. (2008). VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* (New York, N.Y.), 320(5882), 1504-1506.
- Bayram, Ö., Krappmann, S., Seiler, S., Vogt, N., and Braus, G. H. (2008). *Neurospora crassa* ve-1 affects asexual conidiation. *Fungal Genetics and Biology*, 45(2), 127-138.
- Bejarano, E.R., Parra, F., Murillo, F.J. and Cerdá-Olmedo, E. (1988). End-product regulation of carotenogenesis in *Phycomyces*. *Archives of Microbiology*, 150, 209-214.

- Belden, W. J., Loros, J. J., and Dunlap, J. C. (2007). Execution of the circadian negative feedback loop in *Neurospora* requires the ATP-dependent chromatin-remodeling enzyme CLOCKSWITCH. *Molecular cell*, 25(4), 587-600.
- Benito, E.P., Campuzano, V., López-Matas, M.A., De Vicente, J.J. and Eslava, A.P. (1995). Isolation, characterization and transformation, by autonomous replication, of *Mucor circinelloides* OMPdecase-deficient mutants. *Molecular and General Genetics*, 248, 126-135.
- Berndsen, C. E., Wiener, R., Yu, I. W., Ringel, A. E., and Wolberger, C. (2013). A conserved asparagine has a structural role in ubiquitin-conjugating enzymes. *Nature chemical biology*, 9(3), 154-156.
- Bhanja, A., Minde, G., Magdum, S., and Kalyanraman, V. (2014). Comparative Studies of Oleaginous Fungal Strains (*Mucor circinelloides* and *Trichoderma reesei*) for Effective Wastewater Treatment and Bio-Oil Production. *Biotechnology Research International*, 2014.
- Borden, K.L.B. and Freemont, P.S. (1996). The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Current Opinion in Structural Biology*, 6, 395-401.
- Bramley, P.M. and Mackenzie, A. (1988). Regulation of carotenoid biosynthesis. *Current Topics in Cellular Regulation*, 29, 291-343.
- Bramley, P.M. and Mackenzie, A. (1992). *Handbook of Applied Mycology*, D.K. Arora, R.P. Elander and K.G. Mukerji (Eds.). Marcel Dekker, New York, 4, 401.
- Britton, G. (1983). *The biochemistry of natural pigments*. Cambridge: Cambridge University Press.

- Britton, G. (1993). Carotenoids in chloroplast pigment-protein complexes. En M. Sundqvist and m. Ryberg (Eds.), *Pigments-protein complexes in plastids: synthesis and assembly*. (pp. 447-484). San Diego. California: Academic Press.
- Brod, F. C. A., Dinon, A. Z., Kolling, D. J., Faria, J. C., and Arisi, A. C. M. (2013). Development of Plasmid DNA Reference Material for the Quantification of Genetically Modified Common Bean Embrapa 5.1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(20), 4921-4926.
- Calo, S., Nicolás, F. E., Vila, A., Torres-Martínez, S., and Ruiz-Vázquez, R. M. (2012). Two distinct RNA-dependent RNA polymerases are required for initiation and amplification of RNA silencing in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Molecular microbiology*, 83(2), 379-394.
- Carattoli, A., Kato, E., Rodríguez-Franco, M., Stuart, W.D. and Macino, G. (1995). A chimeric light-regulated amino acid transport system allows the isolation of blue light regulator (blr) mutants of *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 92, 6612-6616.
- Casas-Flores, S., Rios-Momberg, M., Bibbins, M., Ponce-Noyola, P., Herrera-Estrella, A., 2004. BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology (Reading, UK)* 150, 3561–3569.
- Casas-Flores, S. et al., (2006). Cross talk between a fungal blue-light perception system and the cyclic AMP signaling pathway. *Eukaryotic Cell*, 5(3),499–506,
- Cerdá-Olmedo, E. (1985). Carotene mutants of *Phycomyces*. *Methods in Enzymology*, 110, 220-243.

- Cerdá-Olmedo, E. (1987). Carotene. En E. Cerdá-Olmedo and E.D.Lipson (Eds), *Phycomyces*. (pp. 199-222). New York: Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor.
- Cerdá-Olmedo, E. and Corrochano, L.M. (1996). Photoregulation of fungal gene expression. En Jennings et al., (Eds.), *Light as an energy source and information carrier in plant physiology* (pp. 285-392). Plenum Press New York.
- Cerdá-Olmedo, E. (2001). *Phycomyces and the biology of light and color*. FEMS Microbiol. Rev., 25(5):503–512,
- Chen, C.-H. H., Ringelberg, C. S., Gross, R. H., Dunlap, J. C., and Loros, J. J. (2009). Genome-wide analysis of light-inducible responses reveals hierarchical light signalling in *Neurospora*. *The EMBO journal*, 28(8), 1029-1042.
- Chen, C.-H., Dunlap, J.C., Loros, J.J., (2010). *Neurospora* illuminates fungal photoreception. *Fungal Genet. Biol.* 47, 922–929.
- Cheng, P., Yang, Y., Gardner, K.H., and Liu, Y. (2002) PAS domain-mediated WC-1/WC-2 interaction is essential for maintaining the steady-state level of WC-1 and the function of both proteins in circadian clock and light responses of *Neurospora*. *Mol Cell Biol* 22: 517–524.
- Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., He, Q., and Liu, Y. (2003a) WHITE COLLAR-1, a multifunctional *neurospora* protein involved in the circadian feedback loops, light sensing, and transcription repression of *wc-2*. *J Biol Chem* 278: 3801–3808.

Bibliografía

- Cheng, P., He, Q., Yang, Y., Wang, L., and Liu, Y. (2003b) Functional conservation of light, oxygen, or voltage domains in light sensing. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:5938–5943
- Choi, D. K. (2005). Differential screening of novel gene in apoptotic neuronal cells and its functional study during embryonic development,
- Christie, J. M.,... Salomon, M., Nozue, K., Wada, M and Briggs W. R. (1999). LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (*nph1*): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96(15):8779–8783.
- Collett, M. A., Garceau, N., Dunlap, J. C and Loros J. J. (2002). Light and clock expression of the *Neurospora* clock gene frequency is differentially driven by but dependent on WHITE COLLAR-2. *Genetics*, 160(1),149–158.
- Colot, H. V., Park, G., Turner, G. E., Ringelberg, C., Crew, C. M., Litvinkova, L., Dunlap, J. C. (2006). A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(27), 10352-10357.
- Conaway, R.C., Brower, C.S. and Conaway, J.W. (2002). Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science*, 296, 1254-1258.
- Corrochano, L.M., (2007). Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behaviour. *Photochem. Photobiol. Sci.* 6, 725–736.
- Corrochano, L. M. (2011). Fungal photobiology: a synopsis. *IMA fungus*, 2(1), 25-28. doi:10.5598/ima fungus.2011.02.01.04

- Corrochano, L. M., and Garre, V. (2010). Photobiology in the Zygomycota: multiple photoreceptor genes for complex responses to light. *Fungal genetics and biology* : FG and B, 47(11), 893-899.
- Courey, A.J., Holtzman, D.A., Jackson, S.P. and Tijan, R. (1989). Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1. *Cell*, 59, 827-836.
- Crešnar, B., and Petrič, S. (2011). Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. *Biochimica et biophysica acta*, 1814(1), 29-35.
- Crosson, S., and Moffat, K. (2002) Photoexcited structure of a plant photoreceptor domain reveals a light-driven molecular switch. *Plant Cell* 14: 1067–1075.
- Crosson, S., Rajagopal, S., and Moffat, K. (2003) The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry* 42: 2–10.
- de Haro, J. P., Calo, S., Cervantes, M., Nicolás, F. E., Torres-Martínez, S., and Ruiz-Vázquez, R. M. (2009). A single dicer gene is required for efficient gene silencing associated with two classes of small antisense RNAs in *Mucor circinelloides*. *Eukaryotic cell*, 8(10), 1486-1497.
- Degli-Innocenti, F and Russo, V.E (1984). Isolation of new *white collar* mutants of *Neurospora crassa* and studies on their behavior in the blue light-induced formation of protoperithecia. *J. Bacteriol.*, 159(2):757–761.
- Demarsy, E., and Fankhauser, C. (2009). Higher plants use LOV to perceive blue light. *Current opinion in plant biology*, 12(1), 69-74.

- Denault, D. L. Loros, J. J and Dunlap. J. C. (2001). WC-2 mediates WC-1-FRQ interaction within the PAS protein-linked circadian feedback loop of *Neurospora*. *EMBO J.*, 20(1- 2), 109–117
- Deng, Z., Oses-Prieto, J. A., Kutschera, U., Tseng, T.-S. S., Hao, L., Burlingame, A. L., . . . Briggs, W. R. (2014). Blue light-induced proteomic changes in etiolated *Arabidopsis* seedlings. *Journal of proteome research*, 13(5), 2524-2533.
- Deshaies R. J and Joazeiro. C. A (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Biochem.*, 78:399–434.
- Dikic, I., Wakatsuki, S., and Walters, K. J. (2009). Ubiquitin-binding domains - from structures to functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(10).
- Dong, M., Yang, D., Lang, Q., Zhou, W., Xu, S., and Xu, T. (2013). Microarray and Degradome Sequencing Reveal MicroRNA Differential Expression Profiles and Their Targets in *Pinellia pedatisecta*. *PloS one*, 8(9).
- Elvin, M. Loros, J. J. Dunlap J. C and Heintzen C (2005). The PAS/LOV protein VIVID supports a rapidly dampened daytime oscillator that facilitates entrainment of the *Neurospora* circadian clock. *Genes Dev.*, 19(21):2593–2605.
- Espín, G., Palacios, R., and Mora, J. (1979). Glutamine metabolism in nitrogen-starved conidia of *Neurospora crassa*. *Journal of General Microbiology*, 115(1), 59-68. 115-1-59
- Escher, D., Bodmer-Glavas, M., Barberis, A. and Schaffner, W. (2000). Conservation of glutamine-rich transactivation function between yeast and humans. *Molecular and Cellular Biology*, 20, 2774-2782.

- Estrada, A. F., and Avalos, J. (2008). The White Collar protein WcoA of *Fusarium fujikuroi* is not essential for photocarotenogenesis, but is involved in the regulation of secondary metabolism and conidiation. *Fungal genetics and biology : FG and B*, 45(5), 705-718.
- Evans, T. N., and Seviour, R. J. (2011). Estimating Biodiversity of Fungi in Activated Sludge Communities Using Culture-Independent Methods. *Microbial Ecology*, 63(4), 773-786.
- Falvey, E. Fleury-Olela, F and Schibler U (1995). The rat hepatic leukemia factor (HLF) gene encodes two transcriptional activators with distinct circadian rhythms, tissue distributions and target preferences. *EMBO J.*, 14(17), 4307–4317.
- Foote C. S and. Denny R. W. (1968) Chemistry of singlet oxygen. VII. Quenching by beta- carotene. *J. Am. Chem. Soc.*, 90(22), 6233–6235.
- Froehlich, A.C., Liu, Y., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (2002) White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science* 297: 815–819.
- Galland P (1990). Phototropism of the *Phycomyces* sporangiophore: A comparison with higher plants. *Photochemistry and Photobiology*, 52:233–248.
- Galland P (1998). Reception of far-ultraviolet light in *Phycomyces*: antagonistic interaction with blue and red light. *Planta*, 205(2),269–276, Jun.
- Galland, P., and Lipson, E.D. (1987) Blue-light reception in *Phycomyces* phototropism: evidence for two photosystems operating in low- and high-intensity ranges. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 104–108.

Bibliografía

- Galperin, M. Y. Nikolskaya, A. N and. Koonin, E. V (2001). Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol. Lett.*, 203(1):11–21.
- Gao Q and Garcia-Pichel F. (2011) Microbial ultraviolet sunscreens. *Nat. Rev. Microbiol.*, 9(11), 791–802.
- Garcia-Pichel F. (1994). A model for internal self-shading in planktonic organisms and its implications for the usefulness of ultraviolet sunscreens. *Limnology and Oceanography*, 39, 1804–1717.
- Gin, E., Diernfellner, A. C., Brunner, M., and Höfer, T. (2013). The *Neurospora* photoreceptor VIVID exerts negative and positive control on light sensing to achieve adaptation. *Molecular systems biology*, 9, 667.
- Gooday, G.W. (1973). Differentiation in the Mucorales. *Symposium of the Society of General Microbiology*, 23, 269-293.
- Gooday, G.W., Fawcett, P., Green, D. and Shaw, G. (1973). The formation of fungal sporopollenin in the zygosporangium wall of *Mucor mucedo*; A role for the sexual carotenogenesis in the Mucorales. *Journal of General Microbiology*, 74, 233-239.
- Goodwin, T.W. (1980). The biochemistry of carotenoids. En *Plants*, vol 1. London: Chapman and Hall.
- Gómez Mateo J (2005) Análisis estructural y funcional de los genes *crgB* y *mcw-1a* de *Mucor circinelloides*. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

- Grönroos, E., Kingston, I. J., Ramachandran, A., Randall, R. A., Vizán, P., and Hill, C. S. (2012). Transforming growth factor β inhibits bone morphogenetic protein-induced transcription through novel phosphorylated Smad1/5-Smad3 complexes. *Molecular and cellular biology*, 32(14), 2904-2916.
- Guoyao, W. U., and Morris, S. M. (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal*, 336(1), 1-17.
- Gutiérrez, A., López-García, S., and Garre, V. (2011). High reliability transformation of the basal fungus *Mucor circinelloides* by electroporation. *Journal of microbiological methods*, 84(3), 442-446.
- Harding R. W. and Turner. R. V (1981). Photoregulation of the Carotenoid Biosynthetic Pathway in Albino and White Collar Mutants of *Neurospora crassa*. *Plant Physiol.*, 68(3), 745–749.
- Haglund K. and Dikic I (2005). Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J.*, 24(19), 3353– 3359.
- He. Q. et al. (2005). Light-independent phosphorylation of WHITE COLLAR-1 regulates its function in the *Neurospora* circadian negative feedback loop. *J. Biol. Chem.*, 280(17), 17526–17532.
- He, Q.Y., and Liu, Y. (2005) Molecular mechanism of light responses in *Neurospora*: from light-induced transcription to photoadaptation. *Genes Dev* 19: 2888–2899.
- He, Q., Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., Gardner, K.H., and Liu, Y. (2002) White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science* 297: 840–843.

Bibliografía

- Heebøll, S., Thomsen, K., Pedersen, S. B., Vilstrup, H., George, J., and Grønbæk, H. (2014). Effects of resveratrol in experimental and clinical non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Hepatology*, 6(4), 188.
- Herrera-Estrella, A., and Horwitz, B. A. (2007). Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception. *Molecular microbiology*, 64(1), 5-15.
- Heintzen, C. Loros, J. J and. Dunlap J. C. (2001). The PAS protein VIVID defines a clock- associated feedback loop that represses light input, modulates gating, and regulates clock resetting. *Cell*, 104(3):453–464.
- Hunt S. M. Elvin, M. Crosthwaite, S. K and. Heintzen C. (2007). The PAS/LOV protein VIVID controls temperature compensation of circadian clock phase and development in *Neurospora crassa*. *Genes Dev.*, 21(15):1964–1974.
- Hunt, S. M. Thompson S. Elvin. M, and. Heintzen. (2010). C VIVID interacts with the WHI- TE COLLAR complex and FREQUENCY-interacting RNA helicase to alter light and clock responses in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107(38),16709–16714.
- Ichinose, H. (2012). Molecular and functional diversity of fungal cytochrome P450s. *Biological and pharmaceutical bulletin*, 35(6), 833-837. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22687471>
- Idnurm A, and Crosson S (2009). The photobiology of microbial pathogenesis. *PLoS Pathog.*, 5(11):e1000470.
- Idnurm A, and. Heitman J. (2005). Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom. *PLoS Biol.*, 3(4):e95.

- Idnurm A. and Heitman J (2010). Ferrochelatase is a conserved downstream target of the blue light-sensing White collar complex in fungi. *Microbiology (Reading, Engl.)*, 156(Pt 8):2393–2407.
- Idnurm A et al. (2006). The *Phycomyces madA* gene encodes a blue-light photoreceptor for phototropism and other light responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103(12):4546– 4551, Mar.
- Idnurm A, Verma S, and Corrochano L. M. (2010). A glimpse into the basis of vision in the kingdom Mycota. *Fungal Genet. Biol.*, 47(11):881–892.
- Imura, Y., Molho, M., Chuang, C., and Nagy, P. D. (2015). Cellular Ubc2/Rad6 E2 ubiquitin-conjugating enzyme facilitates tombusvirus replication in yeast and plants. *Virology*, 484, 265-275.
- Inui, M., Manfrin, A., Mamidi, A., Martello, G., Morsut, L., Soligo, S., Piccolo, S. (2011). USP15 is a deubiquitylating enzyme for receptor-activated SMADs. *Nature cell biology*, 13(11), 1368-1375.
- Jackson, P. K., Eldridge, A. G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J. Y., Kaiser, B. K., and Reimann, J. D. (2000). The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends in cell biology*, 10(10), 429-439.
- James, P., Halladay, J., and Craig, E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, 144(4), 1425-1436. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8978031>
- Key, T. J., Appleby, P. N., Travis, R. C., Albanes, D., Alberg, A. J., Barricarte, A., Group, E. (2015). Carotenoids, retinol, tocopherols, and prostate cancer risk: pooled analysis of 15 studies. *The American journal of clinical nutrition*.

Bibliografía

- Kilic, U., Gok, O., Bacaksiz, A., Izmirli, M., Elibol-Can, B., and Uysal, O. (2014). SIRT1 Gene Polymorphisms Affect the Protein Expression in Cardiovascular Diseases. *PloS one*, 9(2).
- Komander, D. (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochemical Society transactions*, 37(Pt 5), 937-953.
- Kozak, M. (1987). At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *Journal of Molecular Biology*, 196, 947-950.
- Krauss U. et al. (2009). Distribution and phylogeny of light-oxygen-voltage-blue-light- signaling proteins in the three kingdoms of life. *J. Bacteriol.*, 191(23):7234–7242,
- Kubo H. (2009). Isolation of madA homologs in *Pilobolus crystallinus*. *Mycoscience*, 50:400– 406.
- Kühlbrandt, W., Wang, D.N. and Fujiyoshi, Y. (1994). Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature*, 367, 614-621.
- Letunic I., Doerks T., and Bork P. (2012). SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.*, 40(Database issue):D302–305.
- Li, M., Rasulova, F., Melnikov, E.E., Rotanova, T.V., Gustchina, A., Maurizi, M.R., Wlodawer, A., 2005. Crystal structure of the N-terminal domain of *E. coli* Lon cv. *Protein Sci.* 14, 2895–2900.

- Lin C., Ahmad M., Gordon D., and Cashmore A. R. (1995). Expression of an *Arabidopsis* cryptochrome gene in transgenic tobacco results in hypersensitivity to blue, UV-A, and green light. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92(18):8423–8427, Aug.
- Lin C. and Todo T. (2005). The cryptochromes. *Genome Biol.*, 6(5):220,
- Linden, H. and Macino, G. (1997). White collar-2, a partner in blue light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. *EMBO Journal*, 16, 98-109.
- Linden, H. and Macino, G. (1997). White collar-2, a partner in blue light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. *EMBO Journal*, 16, 98-109.
- Linden, H., Ballario, P. and Macino, G. (1997a). Blue light regulation in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 22, 141-150.
- Linden, H., Rodríguez-Franco, M. and Macino, G. (1997b). Mutants of *Neurospora crassa* defective in regulation of blue light perception. *Molecular and General Genetics*, 254, 111-118.
- Linden, H., Ballario, P., Arpaia, G. and Macino, G. (1999). Seeing the light: News in *Neurospora* blue light signal transduction. *Advances in Genetics*, 41, 35-55.
- Linnemannströms, P., Prado, M.M., Fernández-Martín, R., Tudzynski, B. and Avalos, J. (2002). A carotenoid biosynthesis gene cluster in *Fusarium fujikuroi*: the genes *carB* and *carRA*. *Molecular Genetics and Genomics*, 267, 593-602.

- Lipkowitz S. and Weissman A. M. (2011) RINGs of good and evil: RING finger ubiquitin ligases at the crossroads of tumour suppression and oncogenesis. *Nat. Rev. Cancer*, 11(9):629–643.
- Liu, F., Liu, Y., Li, D., Zhu, Y., Ouyang, W., Xie, X. and Jin, B. (2002). The transcription co-repressor TLE1 interacted with the intracellular region of gp139 through its Q domain. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 232, 163-167.
- Liu, Y, He., Q and Cheng., P (2003). Photoreception in *Neurospora*: a tale of two White Collar proteins. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60(10):2131–2138.
- Liu T. et al. (2004) DNA and RNA binding by the mitochondrial Lon protease is regulated by nucleotide and protein substrate. *J. Biol. Chem.*, 279(14):13902–13910.
- Liu, T., Yoza, B. K., Gazzar, M., Vachharajani, V. T., and McCall, C. E. (2011). NAD⁺-dependent SIRT1 deacetylase participates in epigenetic reprogramming during endotoxin tolerance. *The Journal of biological chemistry*, 286(11), 9856-9864.
- Lombardi L. M. and Brody S (2005). Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: clock gene homologues in fungi. *Fungal Genet. Biol.*, 42(11):887–892.
- Lorca-Pascual, J. M., Murcia-Flores, L., Garre, V., Torres-Martínez, S., and Ruiz-Vázquez, R. M. (2004). The RING-finger domain of the fungal repressor *crgA* is essential for accurate light regulation of carotenogenesis. *Molecular microbiology*, 52(5), 1463-1474.
- Losi A. and Gärtner. W. (2011). Old chromophores, new photoactivation paradigms, trendy applications: flavins in blue light-sensing photoreceptors. *Photochem. Photobiol.*, 87(3):491–510.

- Lyons, P. C., Evans, J. J., and Bacon, C. W. (1990). Effects of the Fungal Endophyte *Acremonium coenophialum* on Nitrogen Accumulation and Metabolism in Tall Fescue. *Plant physiology*, 92(3), 726-732. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1062360/>
- Lu et al. (2007). Roles for the human ATP-dependent Lon protease in mitochondrial DNA maintenance. *J. Biol. Chem.*, 282(24):17363–17374.
- Macios, M., Caddick, M. X., Weglenski, P., Scazzocchio, C., and Dzikowska, A. (2012). The GATA factors AREA and AREB together with the co-repressor NMRA, negatively regulate arginine catabolism in *Aspergillus nidulans* in response to nitrogen and carbon source. *Fungal genetics and biology : FG and B*, 49(3), 189-198.
- Maheux, A. F., Picard, F. J., Boissinot, M., Bissonnette, L., Paradis, S., and Bergeron, M. G. (2009). Analytical comparison of nine PCR primer sets designed to detect the presence of *Escherichia coli*/*Shigella* in water samples. *Water research*, 43(12), 3019-3028.
- McLean, K. J., Luciakova, D., Belcher, J., Tee, K. L., and Munro, A. W. (2015). Biological diversity of cytochrome P450 redox partner systems. *Advances in experimental medicine and biology*, 851, 299-317.
- Molla, A., Fakhru'l-Razi, A., Abd-Aziz, S., Hanafi, M., and Alam, M. (2001). In-vitro compatibility evaluation of fungal mixed culture for bioconversion of domestic wastewater sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(9), 849-856.
- Mora, Y., Espin, G., Will, K., and Mora, J. (1978). Nitrogen Accumulation in Mycelium of *Neurospora crassa*. *Journal of General Microbiology*, 104(2), 241-250.

Bibliografía

- More, T. T., Yan, S., Tyagi, R. D., and Surampalli, R. Y. (2010). Potential use of filamentous fungi for wastewater sludge treatment. *Bioresource Technology*, 101(20), 7691-7700.
- Murcia-Flores, L., Lorca-Pascual, J. M., Garre, V., Torres-Martínez, S., and Ruiz-Vázquez, R. M. (2007). Non-AUG translation initiation of a fungal RING finger repressor involved in photocarotenogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 282(21), 15394-15403.
- Murillo, F.J. and Cerdá-Olmedo, E. (1976). Regulation of carotene synthesis in *Phycomyces*. *Molecular and General Genetics*, 18, 19-24.
- Nanbru C. et al. (1997). Alternative translation of the proto-oncogene c-myc by an internal ribosome entry site. *J. Biol. Chem.*, 272(51):32061–32066, Dec.
- Navarro, E., Sandmann, G. and Torres-Martínez, S. (1995). Mutants of the carotenoid biosynthesis pathway of *Mucor circinelloides*. *Experimental Mycology*, 19, 186-190.
- Navarro, E., Ruiz-Pérez, V.L. and Torres-Martínez, S. (2000). Overexpression of the *crgA* gene abolishes light requirement for carotenoid biosynthesis in *Mucor circinelloides*. *European Journal of Biochemistry*, 267, 800-807.
- Navarro, E., Lorca-Pascual, J., Quiles-Rosillo, M., Nicolás, F., Garre, V., Torres-Martínez, S., and Ruiz-Vázquez, R. (2001). A negative regulator of light-inducible carotenogenesis in *Mucor circinelloides*. *Molecular Genetics and Genomics*, 266(3), 463-470.
- Navarro, E., Peñaranda, A., Hansberg, W., Torres-Martínez, S., and Garre, V. (2013). A white collar 1-like protein mediates opposite regulatory functions in *Mucor circinelloides*. *Fungal genetics and biology : FG and B*, 52, 42-52.

- Nelson, M.A., Morelli, G., Carattoli, A., Romano, N. and Macino, G. (1989). Molecular cloning of a *Neurospora crassa* carotenoid biosynthesis gene (*al-3*) regulated by blue light and the products of the white collar genes. *Molecular and Cellular Biology*, 9, 1271-1276.
- Nicolas, F. E., Moxon, S., de Haro, J. P., Calo, S., Grigoriev, I. V., Torres-Martínez, S., Dalmay, T. (2010). Endogenous short RNAs generated by Dicer 2 and RNA-dependent RNA polymerase 1 regulate mRNAs in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Nucleic acids research*, 38(16), 5535-5541.
- Nicolás, F. E., Torres-Martínez, S., and Ruiz-Vázquez, R. M. (2003). Two classes of small antisense RNAs in fungal RNA silencing triggered by non-integrative transgenes. *The EMBO journal*, 22(15), 3983-3991.
- Nishino, H. (1995). Cancer chemoprevention by natural carotenoids and their related compounds. *The Journal of Cellular Biochemistry, Supplement*, 22, 231-235.
- Nyilasi, I., Acs, K., Papp, T., Nagy, E., and Vagvolgyi, C. (2005) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Mucor circinelloides*. *Folia Microbiol (Praha)* 50: 415–420.
- Núñez-Corcuera, B., Serafimidis, I., Arias-Palomo, E., Rivera-Calzada, A., and Suarez, T. (2008). A new protein carrying an NmrA-like domain is required for cell differentiation and development in *Dictyostelium discoideum*. *Developmental biology*, 321(2), 331-342.
- Olmedo, M., Ruger-Herreros, C., Luque, E. M., and Corrochano, L. M. (2010). A complex photoreceptor system mediates the regulation by light of the conidiation genes *con-10* and *con-6* in *Neurospora crassa*. *Fungal genetics and biology : FG and B*, 47(4), 352-363.

Bibliografía

- Ortiz-Guerrero J. M., Polanco M. C., Murillo F. J., Padmanabhan S., and. Elias-Arnanz M. (2011). Light-dependent gene regulation by a coenzyme B12-based photoreceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108(18):7565–7570, May.
- Pant, V., and Lozano, G. (2014). Limiting the power of p53 through the ubiquitin proteasome pathway. *Genes and Development*, 28(16), 1739-1751. doi:10.1101/gad.247452.114
- Park, H.-S., Ni, M., Jeong, K., Kim, Y., and Yu, J.-H. (2012). The Role, Interaction and Regulation of the Velvet Regulator VelB in *Aspergillus nidulans*. *The Role, Interaction and Regulation of the Velvet Regulator VelB in Aspergillus nidulans*, 7(9).
- Pruss, S., Fetzner, R., Seither, K., Herr, A., Pfeiffer, E., Metzler, M., Fischer, R. (2014). Role of the *Alternaria alternata* blue-light receptor LreA (white-collar 1) in spore formation and secondary metabolism. *Applied and environmental microbiology*, 80(8), 2582-2591.
- Punta M. et al. (2012) .The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.*, 40(Database issue):290–301.
- Purschwitz J., Muller S., Kastner C., and Fischer R. (2006). Seeing the rainbow: light sensing in fungi. *Curr. Opin. Microbiol.*, 9(6):566–571.
- Qi, J., Kim, H., Scortegagna, M., and Ronai, Z. e. A. (2013). Regulators and Effectors of Siah Ubiquitin Ligases. *Cell biochemistry and biophysics*.
- Quevillon E. et al. (2005). InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res.*, 33(Web Server issue):W116–120.
- Quiles-Rosillo, M.D. (2001). Genes de *Mucor circinelloides* regulados por *crgA*, un gen regulador de la carotenogénesis. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

- Quiles-Rosillo M. D., Torres-Martinez S., and Garre V. *cigA*, (2003). a light-inducible gene involved in vegetative growth in *Mucor circinelloides* is regulated by the carotenogenic repressor *crgA*. *Fungal Genet. Biol.*, 38(1):122–132, Feb
- Quiles-Rosillo, M. D., Ruiz-Vázquez, R. M., Torres-Martínez, S., and Garre, V. (2005). Light induction of the carotenoid biosynthesis pathway in *Blakeslea trispora*. *Fungal genetics and biology : FG and B*, 42(2), 141-153.
- Rawlings N. D. and Barrett. A. J. (1994) Families of cysteine peptidases. *Meth. Enzymol.*, 244:461–486.
- Roberts, D., Pedmale, U. V., Morrow, J., Sachdev, S., Lechner, E., Tang, X., Liscum, E. (2011). Modulation of phototropic responsiveness in *Arabidopsis* through ubiquitination of phototropin 1 by the CUL3-Ring E3 ubiquitin ligase CRL3(NPH3). *The Plant cell*, 23(10), 3627-3640.
- Robinow, C.F. (1957). The structure and behaviour of the nuclei in spores and growing hyphae of *Mucorales* I. *Mucor hiemalis* and *Mucor fragilis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 3, 771.
- Rock, C.D. and Zeevaart, J.A.D. (1991). The *aba* mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 88, 7496-7499.
- Rodríguez-Frometa R. A., Gutiérrez A., Torres-Martinez S., and Garre V. (2012). Malic enzyme activity is not the only bottleneck for lipid accumulation in the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Oct.
- Rodríguez-Romero, J., and Corrochano, L. M. (2004). The gene for the heat-shock protein HSP100 is induced by blue light and heat-shock in the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *Current genetics*, 46(5), 295-303.

Bibliografía

- Rodriguez-Ortiz R., Limon M. C, and Avalos J. (2009). Regulation of carotenogenesis and secondary metabolism by nitrogen in wild-type *Fusarium fujikuroi* and carotenoid- overproducing mutants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(2):405–413, Jan.
- Rodriguez-Ortiz R., Michielse C., Rep M., Limon M. C., and Avalos J (2012). Genetic basis of carotenoid overproduction in *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet. Biol.*, 49(9):684– 696.
- Rodriguez-Saiz M. et al. (2004) *Blakeslea trispora* genes for carotene biosynthesis *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(9):5589–5594, Sep.
- Roncero, M.I.G. (1984) Enrichment method for the isolation of auxotrophic mutants of *Mucor* using the polyene anti-biotic N-glycosyl-polyfungin. *Carlsberg Res Commun* 49: 685–690.
- Roncero, M.I.G., Jepsen, L.P., Strøman, P., and van Heeswijck, R. (1989) Characterization of a *leuA* gene and an ARS
- Rotanova T. V. et al (2004). Classification of ATP-dependent proteases Lon and comparison of the active sites of their proteolytic domains. *Eur. J. Biochem.*, 271(23-24):4865–4871.
- Ruiz-Hidalgo, M.J., Benito, E.P., Sandmann, G. and Eslava, A.P. (1997). The phytoene dehydrogenase gene of *Phycomyces*: regulation of its expression by blue light and vitamin A. *Molecular and General Genetics*, 253, 734-744.
- Ruiz-Roldán, M.C., Garre, V., Guarro, J., Mariné, M., Roncero, M.I.G., 2008. Role of the white collar 1 photoreceptor in carotenogenesis, UV resistance, hydrophobicity, and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Euk. Cell* 7, 1227–1230.

- Ruger-Herreros, C., Rodríguez-Romero, J., Fernández-Barranco, R., Olmedo, M., Fischer, R., Corrochano, L. M., and Canovas, D. (2011). Regulation of conidiation by light in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 188(4), 809-822.
- Sanz, C., Benito E. P, Orejas M., Alvarez, M. I and. Eslava A. P. (2010). Protein-DNA interactions in the promoter region of the *Phycomyces carB* and *carRA* genes correlate with the kinetics of their mRNA accumulation in response to light. *Fungal Genet. Biol.*, 47(9):773–781.
- Sanz C. et al. (2009). *Phycomyces* MADB interacts with MADA to form the primary photoreceptor complex for fungal phototropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106(17):7095– 7100.
- Sanz C., Velayos A., Alvarez M. I., Benito E. P., and. Eslava A. P. (2011). Functional analysis of the *Phycomyces carRA* gene encoding the enzymes phytoene synthase and lycopene cyclase. *PLoS ONE*, 6(8):e23102.
- Salgado, L.M., Bejarano, E.R. and Cerdá-Olmedo, E. (1989). Carotene-superproducing mutants of *Phycomyces blakesleeana*. *Experimental Mycology*, 13, 332-336.
- Sandmann, G. (1994). Carotenoid biosynthesis in microorganism and plants. *European Journal of Biochemistry*, 223, 7-24.
- Sano, H., Kaneko, S., Sakamoto, Y., Sato, T., and Shishido, K. (2009). The basidiomycetous mushroom *Lentinula edodes* white collar-2 homolog PHRB, a partner of putative blue-light photoreceptor PHRA, binds to a specific site in the promoter region of the *L. edodes* tyrosinase gene. *Fungal genetics and biology : FG and B*, 46(4),
- Schafmeier, T., and Diernfellner, A. C. (2011). Light input and processing in the circadian clock of *Neurospora*. *FEBS letters*, 585(10), 1467-1473.

- Selby and C. P. Sancar. A. A. (2006). cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 103(47):17696–17700.
- Shick J. M. and Dunlap. W. C. (2002) Mycosporine-like amino acids and related Gadusols: biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. Annu. Rev. Physiol., 64:223–262.
- Schmidhauser, T.J., Lauter, F.R., Russo, V.E.A. and Yanofsky, C. (1990). Cloning, sequence and photoregulation of al-1, a carotenoid biosynthetic gene of *Neurospora crassa*. Molecular and Cellular Biology, 10, 5064-5070.
- Schmidhauser, T.J., Lauter, F.R., Schumacher, M., Zhou, W., Russo, V.E.A. and Yanofsky, C. (1994). Characterization of al-2, the phytoene synthase gene of *Neurospora crassa*. Cloning, sequence analysis, and photoregulation. The Journal of Biological Chemistry, 269, 12060-12066.
- Schwerdtfeger C. and Linden H. 2003 VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. EMBO J., 22(18):4846–4855.
- Silva, F., Navarro, E., Peñaranda, A., Murcia-Flores, L., Torres-Martínez, S., and Garre, V. (2008). A RING-finger protein regulates carotenogenesis via proteolysis-independent ubiquitylation of a white collar-1-like activator. Molecular microbiology, 70(4), 1026-1036.
- Silva, F., Torres-Martínez, S., and Garre, V. (2006). Distinct white collar-1 genes control specific light responses in *Mucor circinelloides*. Molecular microbiology, 61(4), 1023-1037.
- Silva, (2013). Regulación de las respuestas a la luz en el hongo *Mucor circinelloides*. Tesis doctoral, Universidad de Murcia.

- Smith, K. M., Sancar, G., Dekhang, R., Sullivan, C. M., Li, S., Tag, A. G., . . . Freitag, M. (2010). Transcription factors in light and circadian clock signaling networks revealed by genomewide mapping of direct targets for neurospora white collar complex. *Eukaryotic cell*, 9(10), 1549-1556.
- Soding, J. Biegert A., and. Lupas A. N. (2005). The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res.*, 33(Web Server issue):W244–248.
- Talora, C., Franchi, L., Linden, H., Ballario, P. and Macino, G. (1999). Role of a white-collar 1-white collar-2 complex in blue light signal transduction. *EMBO Journal*, 18, 4961- 4968.
- Tagua García. V (2012). Una aproximación genómica a la regulación por la luz de la trans- cripción en *Phycomyces blakesleeanus*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Terashima K., Yuki, K. Muraguchi H., Akiyama, M. and Kamada T. (2005). The *dst1* gene involved in mushroom photomorphogenesis of *Coprinus cinereus* encodes a putative photoreceptor for blue light. *Genetics*, 171(1):101–108.
- Tian, L. (2015). Recent advances in understanding carotenoid-derived signaling molecules in regulating plant growth and development. *Frontiers in plant science*, 6, 790.
- Tian, M., Lou, L., Liu, L., Yu, F., Zhao, Q., Zhang, H., . . . Xie, Q. (2015). The RING finger E3 ligase STRF1 is involved in membrane trafficking and modulates salt-stress response in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 82(1), 81-92.
- Topisirovic I. et al. (2009). Control of p53 multimerization by Ubc13 is JNK-regulated. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106(31):12676–12681.

- Torres-Martinez S. et al. (2012). Molecular tools for carotenogenesis analysis in the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Methods Mol. Biol.*, 898:85–107.
- Trizeenberg J. (1995). Structure and function of transcriptional activation domains. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 5(2):190–196.
- Tsolakis, G., Parashi, E., Galland, P., and Kotzabasis, K. (1999). Blue light signaling chains in *Phycomyces*: phototransduction of carotenogenesis and morphogenesis involves distinct protein kinase/phosphatase elements. *Fungal genetics and biology : FG and B*, 28(3), 201-213.
- Verma, S., and Idnurm, A. (2013). The Uve1 endonuclease is regulated by the white collar complex to protect *Cryptococcus neoformans* from UV damage. *PLoS genetics*, 9(9).
- Welchman R. L., Gordon C., and Mayer R. J. (2005). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6(8):599–609.
- Weger B. D. et al. (2011). The light responsive transcriptome of the zebrafish: function and regulation. *PLoS ONE*, 6(2):e17080.
- Wertz, I. E., and Dixit, V. M. (2008). Ubiquitin-mediated regulation of TNFR1 signaling. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 19(3-4), 313-324.
- Wijayanti, I., Watanabe, D., Oshiro, S., and Takagi, H. (2015). Isolation and functional analysis of yeast ubiquitin ligase Rsp5 variants that alleviate the toxicity of human α -synuclein. *Journal of biochemistry*, 157(4), 251-260.
- Wolff, A., Appel, K. F., Petersen, J., Poulsen, U., and Arnau, J. (2002). Identification and analysis of genes involved in the control of dimorphism in *Mucor circinelloides* (syn. *racemosus*). *FEMS Yeast Research*, 2.

- Wolff, A. M., and Arnau, J. (2002). Cloning of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding genes in *Mucor circinelloides* (Syn. *racemosus*) and use of the *gpd1* promoter for recombinant protein production. *Fungal genetics and biology : FG and B*, 35(1), 21-29.
- Wong, K. H., Hynes, M. J., Todd, R. B., and Davis, M. A. (2007). Transcriptional control of *nmrA* by the bZIP transcription factor *MeaB* reveals a new level of nitrogen regulation in *Aspergillus nidulans*. *Molecular microbiology*, 66(2), 534-551.
- Xie, C.-M., Wei, W., and Sun, Y. (2013). Role of SKP1-CUL1-F-Box-Protein (SCF) E3 Ubiquitin Ligases in Skin Cancer. *Journal of Genetics and Genomics*, 40(3), 97-106.
- Yang, Q., Chen, Y., and Ma, Z. (2013). Involvement of *BcVeA* and *BcVelB* in regulating conidiation, pigmentation and virulence in *Botrytis cinerea*. *Fungal genetics and biology : FG and B*, 50, 63-71.
- Yelton, M. M., Hamer, J. E., de Souza, E. R., Mullaney, E. J., and Timberlake, W. E. (1983). Developmental regulation of the *Aspergillus nidulans* *trpC* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(24), 7576-7580.
- Zhou, L. W., Haas, H., and Marzluf, G. A. (1998). Isolation and characterization of a new gene, *sre*, which encodes a GATA-type regulatory protein that controls iron transport in *Neurospora crassa*. *Molecular and general genetics, MGG*, 259(5), 532-540.
- Zhou, W., Wei, W., and Sun, Y. (2013). Genetically engineered mouse models for functional studies of SKP1-CUL1-F-box-protein (SCF) E3 ubiquitin ligases. *Cell research*, 23(5), 599-619.

7. Anexos

Tabla S1.

ID Proteína V1	ID Proteína V2	Log ₂ tasa de cambio <i>crgaΔ</i> vs Wt	Log ₂ tasa de cambio <i>crgaΔ</i> vs <i>crgaΔ mcwc-1bΔ</i>	Log ₂ tasa de cambio <i>crgaΔ mcwc-1bΔ</i> vs Wt
10693	139679	-3,31	-2,19	-1,12
11099	117651	2,27	1,63	#N/A
12729	107647	2,24	2,12	#N/A
13821	146840	3,05	2,94	#N/A
15755	15755	3,11	3,46	#N/A
16504	122090	-2,23	-1,11	-1,11
17076	147670	-2,34	-2,75	#N/A
19038	125365	4,97	4,66	#N/A
20135	#N/A	#N/A	1,02	-1,20
21116	21116	2,90	2,20	0,69
22098	143079	#N/A	1,59	-1,08
22228	130929	-2,27	-1,59	-0,68
24330	24330	-3,94	-3,12	-0,82
24652	134236	-5,39	-3,16	-2,23
25183	#N/A	-2,07	-2,80	#N/A
25610	#N/A	-0,98	-2,16	1,18
25669	154735	2,12	2,57	-0,53
26040	#N/A	-3,79	-4,00	#N/A
26072	155412	4,15	1,85	2,30
26528	186396	3,73	3,02	#N/A
26558	155202	-3,68	-4,86	1,18
26812	155573	-5,06	-5,28	#N/A
29061	180235	5,59	4,50	#N/A
29487	29487	2,35	1,51	0,89
29884	173198	2,20	1,14	1,06

Anexos

30063	173013	#N/A	-1,27	1,07
30241	157314	-4,40	-3,93	#N/A
30775	181639	3,24	3,53	#N/A
30832	157445	-2,51	-0,60	-1,91
30895	174866	2,08	1,88	#N/A
31254	136560	3,74	4,31	-0,57
31317	#N/A	5,61	4,70	0,90
31390	#N/A	-0,72	-1,81	1,09
31980	136063	#N/A	1,10	-1,43
32013	135213	-2,08	-0,66	-1,43
32338	104978	-6,95	-4,88	-2,07
32509	#N/A	2,22	1,72	#N/A
33456	159099	#N/A	-1,75	1,61
33615	33615	-2,28	-1,23	#N/A
33887	139381	-2,72	-1,47	-1,24
33896	33896	-2,44	-1,90	-0,53
33992	33992	-2,58	-1,36	-1,22
34100	106882	-4,28	-4,86	0,57
34172	34172	-2,69	-1,46	-1,23
34593	#N/A	-2,62	-1,17	-1,45
34654	106367	3,64	1,81	1,83
34897	137463	2,88	3,17	#N/A
34994	137620	-2,83	-2,71	#N/A
35194	139417	2,39	1,66	#N/A
35399	139153	-5,05	-5,57	#N/A
35485	138063	-5,57	-5,87	#N/A
35727	140498	-4,15	-1,92	-2,23
36136	36136	-2,70	-1,54	-1,15
37099	139818	2,77	0,96	1,81
37552	142188	2,32	#N/A	1,80

37616	153075	-2,46	-2,49	#N/A
37803	#N/A	3,50	3,83	-0,33
37940	37940	4,92	3,54	1,38
37959	142191	-4,19	-2,63	-1,56
38051	142131	3,38	2,88	#N/A
38379	143450	2,05	0,97	1,08
38924	142041	4,07	1,91	2,16
38974	142504	3,38	2,83	#N/A
39289	112015	-6,13	-0,32	-5,80
39765	39765	-2,72	-1,35	-1,37
39836	153150	-2,48	-3,51	1,34
39895	145201	2,09	0,88	1,21
40758	113502	2,66	#N/A	1,43
40808	40808	2,28	2,63	#N/A
41367	146716	4,66	4,28	#N/A
41369	121364	-2,13	-2,60	#N/A
41616	113678	#N/A	-1,22	1,44
41935	157277	#N/A	-1,15	1,18
42170	42170	2,88	2,88	#N/A
42398	114551	2,23	2,58	#N/A
42439	#N/A	-0,58	-1,62	1,04
42570	148433	2,81	2,26	#N/A
43007	#N/A	2,57	1,95	#N/A
43308	112467	-3,29	#N/A	-3,11
43336	43336	2,02	0,92	1,10
43622	151062	2,55	1,98	#N/A
44099	146996	3,26	1,75	1,50
45959	#N/A	-4,29	-4,05	#N/A
46067	#N/A	2,10	1,57	0,53
46183	46183	#N/A	-1,24	1,01

Anexos

46358	#N/A	2,28	0,65	1,63
46482	154748	-3,04	-1,87	#N/A
46499	31317	5,61	4,77	0,84
46568	168498	2,74	1,04	1,71
46935	#N/A	-2,24	-1,56	#N/A
47003	137297	0,63	1,87	-1,24
47101	#N/A	3,10	2,54	0,56
47347	155237	2,03	2,47	#N/A
47486	186366	2,65	2,48	#N/A
48272	#N/A	2,88	1,36	1,51
48630	#N/A	3,29	3,08	#N/A
48826	110207	-3,24	-3,33	#N/A
48858	#N/A	-2,69	-1,75	#N/A
49450	#N/A	2,52	3,14	-0,62
49761	#N/A	#N/A	-2,10	1,36
49861	173295	-3,65	-1,47	-2,18
50331	50331	-2,76	-1,67	-1,08
50337	#N/A	2,47	1,78	#N/A
50500	157171	2,25	1,90	#N/A
50643	#N/A	-2,29	-2,10	#N/A
50782	156744	2,34	2,66	#N/A
50863	179978	#N/A	-2,03	1,73
50895	184845	2,00	0,82	1,18
51101	174448	-5,17	-3,53	-1,64
51136	#N/A	2,79	2,11	#N/A
51423	180763	#N/A	1,32	-1,13
51581	150159	2,18	2,18	#N/A
51595	157383	2,43	1,10	1,34
51766	#N/A	-2,83	-1,94	-0,89
51822	#N/A	2,47	#N/A	2,32

68719	154992	2,07	1,60	#N/A
69353	155157	-3,19	-2,25	-0,94
71067	157091	2,58	2,93	#N/A
71463	71463	2,00	1,69	#N/A
72591	151878	#N/A	-1,58	1,67
72634	138374	2,50	2,34	#N/A
73166	#N/A	#N/A	1,56	-1,70
73240	73240	2,71	2,11	0,61
73433	73433	-2,08	-1,59	-0,49
73464	109938	2,18	1,35	0,83
73803	156269	-2,94	-3,40	#N/A
73858	#N/A	-2,12	-0,80	-1,32
73967	111191	-3,10	-0,52	-2,58
74030	111361	-2,38	-1,71	#N/A
74496	74496	3,95	3,86	#N/A
74535	153863	3,99	1,67	2,32
74867	#N/A	-2,06	-0,91	-1,15
75718	75718	2,31	0,85	1,46
76090	76090	-2,06	-2,35	#N/A
76321	158979	2,09	2,39	#N/A
76563	105502	2,35	2,37	#N/A
76671	105388	#N/A	-1,21	1,49
76674	136026	-2,15	-1,64	#N/A
76791	158515	-4,03	-3,86	#N/A
76797	158509	-2,00	-1,80	#N/A
76993	76993	2,06	2,09	#N/A
77231	158084	-2,37	-1,74	-0,63
77268	104734	-2,39	-4,24	1,84
77275	104727	-2,32	-3,74	1,42
77321	157997	-3,00	#N/A	-2,87

Anexos

77324	77324	-0,67	-1,89	1,23
77336	104660	-2,24	-2,38	#N/A
77373	77373	3,63	2,34	1,28
77469	157848	-0,81	-2,24	1,43
77489	135169	-7,04	-1,22	-5,82
77541	104432	5,05	4,59	#N/A
77555	77555	-2,69	-2,31	-0,38
77661	77661	2,40	1,61	0,79
77853	107749	-3,30	-2,21	#N/A
77911	77911	3,14	#N/A	2,32
77947	107646	5,40	5,18	0,64
77956	107637	2,74	3,97	-1,66
77965	160634	2,02	0,98	1,04
78309	160302	-2,49	-1,47	-1,01
78391	107142	-4,44	-2,21	-2,22
78504	#N/A	-4,84	-5,31	#N/A
78599	83961	4,41	2,60	1,82
78600	78600	#N/A	-2,00	1,69
78608	#N/A	2,06	0,93	1,13
78651	78651	-3,22	-2,45	#N/A
78799	#N/A	2,04	2,21	#N/A
78840	159785	-2,56	-1,90	#N/A
78856	159770	#N/A	-1,73	1,65
78968	78968	2,62	1,93	#N/A
79080	79080	-2,34	-1,47	#N/A
79112	106371	2,73	2,61	#N/A
79272	107961	2,02	2,34	#N/A
79302	141303	-3,19	#N/A	-2,86
79350	#N/A	2,12	2,00	#N/A
79439	161073	#N/A	-1,08	1,51

79587	#N/A	3,24	3,40	#N/A
79588	108300	7,20	7,04	#N/A
79596	108308	5,57	4,46	1,10
79620	161248	2,37	1,40	0,97
80053	80053	-3,42	-2,74	#N/A
80057	80057	-2,22	-1,89	-0,32
80077	108830	3,00	2,28	0,72
80078	80078	3,79	3,59	#N/A
80135	#N/A	2,10	1,82	#N/A
80256	80256	-2,95	-2,96	#N/A
80525	162126	-4,22	-4,23	#N/A
80593	80593	2,14	2,06	#N/A
80678	155942	3,77	3,16	0,60
80685	162281	-3,08	-3,28	#N/A
80845	109667	-2,83	-2,92	#N/A
81165	110009	3,00	1,93	1,06
81172	110016	5,20	5,06	#N/A
81202	121218	-3,43	-3,56	#N/A
81420	162997	-3,05	-2,62	#N/A
81492	163068	2,28	1,89	#N/A
81515	163092	-2,31	-2,07	#N/A
81553	81553	2,40	2,38	#N/A
81555	110443	3,23	3,31	#N/A
81565	81565	3,82	3,69	#N/A
81703	110600	3,97	4,08	#N/A
81832	163406	2,13	2,17	#N/A
81939	110868	-2,57	-2,53	#N/A
81990	156314	3,94	3,46	#N/A
82003	110939	-2,01	-1,82	#N/A
82118	82118	5,16	4,98	#N/A

Anexos

82156	82156	2,96	1,77	1,20
82199	163770	2,07	1,84	#N/A
82256	143897	2,02	1,78	#N/A
82345	144434	-2,30	-1,86	#N/A
82385	#N/A	#N/A	-1,75	1,70
82450	111422	-2,92	-2,33	-0,59
82527	111504	5,78	5,74	#N/A
82557	111534	-4,62	-3,72	-0,89
82723	111711	2,22	1,95	#N/A
82820	164360	-3,01	-2,70	#N/A
82840	111836	2,12	2,01	#N/A
82987	164522	-3,18	-2,00	#N/A
83076	165218	2,17	2,39	#N/A
83078	153639	2,41	2,00	#N/A
83143	83143	2,33	1,20	1,13
83155	112858	2,45	2,65	#N/A
83196	112901	-3,08	-2,70	-0,38
83201	165338	2,56	2,79	#N/A
83206	165343	-2,71	-2,46	#N/A
83215	165351	2,92	1,93	0,99
83289	153706	-2,72	#N/A	-2,97
83520	83520	2,60	2,30	#N/A
83523	165921	3,95	3,79	#N/A
83525	83525	2,56	2,31	#N/A
83559	113522	4,63	4,45	#N/A
83606	165840	2,01	0,94	1,07
83702	113369	-2,21	-1,21	-1,00
83734	113332	-2,38	-3,07	0,69
83789	113272	2,04	0,96	1,09
83906	#N/A	5,12	5,20	#N/A

83951	166448	#N/A	-1,42	1,09
83961	83961	4,55	2,65	1,90
83968	83968	3,51	3,53	#N/A
84003	166503	-2,29	-0,34	-1,95
84232	166730	2,19	1,23	0,96
84241	114486	-2,28	-2,14	#N/A
84366	166860	-4,07	-1,68	-2,39
84451	114717	-2,41	-2,32	#N/A
84457	166949	-3,12	-3,14	#N/A
84459	114725	-4,35	-4,39	#N/A
84487	149173	#N/A	6,06	-5,97
84520	#N/A	3,69	2,52	1,17
84587	167074	3,10	2,89	#N/A
84623	165149	-2,28	-1,04	-1,25
84690	165083	-2,76	-2,41	#N/A
84706	112602	2,34	2,03	0,31
84827	164956	2,08	1,70	0,38
85183	164609	2,01	2,08	#N/A
85208	114898	3,94	4,00	#N/A
85285	167180	3,11	3,04	#N/A
85288	114986	-2,15	-1,49	-0,66
85325	#N/A	-2,44	-2,05	#N/A
85481	#N/A	2,09	1,84	#N/A
85502	85502	-4,54	-4,38	#N/A
85517	85517	-2,11	-1,72	#N/A
85522	115223	2,39	2,40	#N/A
85591	168205	6,52	6,67	#N/A
85667	116243	2,11	1,08	1,03
85723	113779	-2,07	-3,19	1,12
85878	113953	-2,18	-2,11	#N/A

Anexos

85880	113955	-2,63	#N/A	-1,40
85906	113981	-2,29	-1,42	-0,88
85909	166283	2,23	1,90	#N/A
85949	154006	-2,52	-0,30	-2,22
86086	167418	-0,44	-1,71	1,27
86100	149824	3,27	1,07	2,20
86144	115304	-2,52	-1,25	-1,27
86165	115325	2,82	2,25	0,57
86352	150149	2,00	1,92	#N/A
86578	86578	-3,45	-2,01	-1,44
86618	167705	-2,12	-1,92	#N/A
86735	150588	2,00	2,01	#N/A
86874	#N/A	2,09	2,14	#N/A
86893	116296	-3,36	-2,91	#N/A
86952	155115	#N/A	2,12	-1,79
87002	155061	3,28	1,59	1,69
87172	154889	2,01	1,29	0,72
87317	154750	3,64	1,56	2,08
87437	155500	-3,18	-3,58	#N/A
87459	155482	2,08	1,17	0,92
87797	182779	-2,09	-1,96	#N/A
87941	#N/A	-2,77	-2,13	#N/A
87985	#N/A	3,51	2,76	0,75
88125	155852	2,03	2,46	#N/A
88235	155982	2,80	2,56	#N/A
88300	156049	-2,91	-3,64	0,73
88301	#N/A	2,83	2,97	#N/A
88421	88421	2,78	1,70	1,09
88439	156187	3,70	3,44	0,26
88855	156806	-3,34	-2,90	#N/A

88856	#N/A	3,56	#N/A	2,75
88977	156923	-2,83	-2,26	-0,57
89160	#N/A	2,27	1,92	0,35
89225	156750	4,14	3,47	#N/A
89532	157063	2,26	0,87	1,39
89755	157510	2,53	1,90	#N/A
89920	155019	#N/A	-1,25	1,23
90000	182515	5,02	3,77	1,24
90065	188035	2,87	2,98	#N/A
90081	#N/A	-2,92	-3,59	#N/A
90434	188821	2,17	2,03	#N/A
90667	90667	2,04	2,06	#N/A
90887	#N/A	4,79	5,09	#N/A
90896	176428	4,21	3,00	1,21
91100	139712	2,54	1,97	0,57
91402	155879	2,12	1,99	#N/A
91438	141273	#N/A	1,87	-1,38
91505	155974	3,05	3,44	-0,39
91533	#N/A	2,78	3,17	#N/A
91619	91619	#N/A	-1,51	1,44
91638	178553	-2,78	-1,75	#N/A
91719	#N/A	-2,74	-2,46	#N/A
91806	#N/A	4,89	6,15	-1,27
91840	#N/A	-0,48	-1,77	1,29
91862	#N/A	2,57	2,42	#N/A
91872	156250	#N/A	-1,59	1,57
91956	156315	3,63	3,08	#N/A
92287	190180	2,98	2,28	0,69
92317	112823	3,76	2,57	1,20
92495	185166	-2,46	-0,86	-1,63

Anexos

92561	#N/A	-2,53	-2,24	#N/A
92574	156869	-3,37	-3,58	#N/A
92575	#N/A	-2,28	-2,35	#N/A
92595	#N/A	-2,47	-3,13	#N/A
92795	185607	3,52	3,60	#N/A
92813	157286	3,63	3,02	#N/A
92869	184878	2,11	2,50	#N/A
92903	156692	2,31	0,81	1,50
92915	#N/A	2,70	2,66	#N/A
92933	#N/A	-2,65	-1,34	-1,31
92955	#N/A	2,37	1,67	#N/A
93002	#N/A	#N/A	-1,12	1,17
93061	181379	-2,29	-2,55	#N/A
93062	#N/A	3,21	2,82	#N/A
93153	157566	-2,46	-3,19	0,73
93158	93158	5,16	5,15	#N/A
93212	185293	#N/A	-1,67	1,36
93244	157058	-2,24	-2,60	0,36
93247	#N/A	4,44	2,65	1,79
93337	#N/A	2,64	1,83	#N/A
93430	185910	-2,74	-1,61	-1,14
93511	191377	3,14	1,71	1,44
93546	93546	2,99	2,32	#N/A
93855	154804	4,84	3,75	1,09
93882	154774	#N/A	-1,38	1,13
94060	155429	2,75	2,87	#N/A
94066	155423	3,06	2,71	0,36
94163	#N/A	2,59	2,18	0,41
94307	155149	2,20	0,78	1,44
94333	155532	#N/A	-1,97	2,44

94382	155589	3,39	2,74	0,65
94384	155591	-2,05	#N/A	-1,64
94435	155646	3,51	2,08	1,43
94549	155780	3,67	2,87	0,79
94624	141257	2,36	1,93	0,44
94645	155883	3,51	#N/A	2,48
94663	#N/A	2,87	2,51	#N/A
94693	155942	3,81	3,33	0,48
94757	156021	2,31	2,33	#N/A
94814	186878	#N/A	-1,43	1,76
94879	178798	-2,65	-2,96	#N/A
94903	156197	3,82	3,96	#N/A
94909	156203	2,27	#N/A	2,11
94988	156290	2,19	1,87	#N/A
95007	156313	-2,13	-3,02	#N/A
95070	#N/A	4,09	2,93	1,16
95081	#N/A	2,19	1,96	#N/A
95149	156465	2,73	3,11	#N/A
95223	156546	2,46	2,49	#N/A
95344	156841	-2,42	#N/A	-1,69
95351	157010	2,14	2,08	#N/A
95585	157221	2,12	1,46	0,66
95593	157229	2,48	2,06	#N/A
95628	157280	3,63	3,72	#N/A
95724	156654	2,07	1,91	#N/A
95734	156641	3,93	3,52	#N/A
95744	156630	5,28	2,39	2,89
95794	#N/A	4,28	3,46	#N/A
95848	157564	-2,11	-1,76	#N/A
95867	157584	#N/A	-1,12	1,30

95922	157062	2,40	#N/A	2,14
95924	157064	2,51	1,71	#N/A
96002	157402	2,44	2,06	0,38
96023	#N/A	-6,86	-1,52	-5,34

Tabla S2

ID V1	R7BL- R7BO	242L- 242O	244L- 244O	247L- 247O	242L- R7BL	242O- R7BO	244L- R7BL	244O- R7BO	247L- R7BL	247O- R7BO	242L- 244L	242O- 244O	242L- 247L	242O- 247O	244L- 247L	244O- 247O
10744	1,49	0,29	0,89	1,04	-0,87	-0,06	0,03	-0,04	-0,34	-0,01	-0,90	-0,02	-0,53	-0,05	0,37	-0,03
12376	-1,44	-0,07	0,19	-0,90	-0,54	-0,87	0,07	-0,03	-0,78	-0,89	-0,61	-0,84	0,24	0,02	0,85	0,86
12708	1,11	0,59	0,53	1,28	0,15	0,36	0,36	0,40	0,28	0,22	-0,21	-0,04	-0,13	0,14	0,08	0,18
13426	-1,21	-0,57	-0,37	-1,09	0,03	0,23	0,31	0,05	-0,12	-0,15	-0,28	0,18	0,15	0,39	0,43	0,21
14504	1,24	0,64	0,44	0,43	-0,56	-0,01	-0,56	-0,03	-0,37	-0,06	0,00	0,01	-0,19	0,05	-0,19	0,04
17529	1,25	-0,19	-0,04	0,75	0,02	0,27	-0,11	0,08	0,11	0,35	0,12	0,19	-0,09	-0,09	-0,21	-0,28
19096	1,23	0,98	-0,24	1,32	0,07	-0,36	-0,61	-0,60	-0,28	-0,37	0,68	0,24	0,35	0,01	-0,34	-0,23
21313	1,48	-0,36	0,44	0,09	-0,16	0,64	-0,50	-0,13	-0,31	0,57	0,34	0,77	0,15	0,08	-0,20	-0,70
22967	4,75	2,13	5,32	5,23	-3,75	-0,11	-0,12	-0,10	-0,24	0,00	-3,63	-0,02	-3,51	-0,12	0,12	-0,10
23985	1,17	0,31	0,31	0,61	-0,61	-0,52	-0,67	-0,66	-0,48	-0,35	0,06	0,14	-0,13	-0,17	-0,19	-0,31
23994	1,13	0,70	0,50	1,02	-0,01	-0,31	-0,10	0,02	0,11	0,05	0,09	-0,32	-0,12	-0,36	-0,21	-0,03
24134	-1,08	-1,18	-0,35	-1,18	-0,23	0,08	0,36	-0,06	-0,13	-0,37	-0,59	0,14	-0,10	0,45	0,49	0,32
24981	2,90	-0,01	0,95	1,20	-0,52	0,22	-0,14	-0,03	0,09	0,46	-0,38	0,25	-0,62	-0,24	-0,24	-0,49
25610	-1,05	-0,22	0,29	-0,56	-0,49	-0,42	0,54	0,47	-0,32	-0,80	-1,03	-0,89	-0,17	0,38	0,86	1,27
26113	1,08	1,45	1,28	1,37	-0,21	-0,06	-0,19	0,04	0,01	0,07	-0,01	-0,10	-0,22	-0,13	-0,21	-0,03
26129	1,04	-0,16	-0,20	0,56	0,24	-0,16	-0,08	-0,28	0,08	-0,01	0,32	0,11	0,16	-0,15	-0,16	-0,27
26282	-1,35	-0,29	-0,26	-0,22	0,36	0,26	0,97	0,44	0,40	-0,27	-0,61	-0,18	-0,04	0,53	0,57	0,71
26620	-1,65	0,04	0,44	-0,49	-0,32	-0,50	0,93	-0,25	-0,76	-2,16	-1,25	-0,25	0,44	1,66	1,69	1,90
26638	1,02	-0,03	-0,02	0,81	0,25	0,05	0,21	0,17	0,21	0,24	0,04	-0,12	0,04	-0,19	-0,01	-0,08
26849	1,85	-0,16	0,35	0,89	-0,70	-0,43	-1,34	-0,80	-1,20	-0,27	0,64	0,37	0,50	-0,16	-0,14	-0,53
26858	1,31	0,70	0,22	1,57	0,04	-0,21	0,08	0,19	0,13	0,20	-0,04	-0,40	-0,08	-0,41	-0,05	-0,01

26919	1,14	0,70	0,99	0,87	-0,39	-0,67	-0,03	-0,52	-0,23	-0,25	-0,36	-0,15	-0,15	-0,42	0,20	-0,27
26972	-1,02	-0,39	-0,13	-0,30	-0,28	0,22	0,46	0,09	0,09	-0,45	-0,75	0,13	-0,37	0,67	0,38	0,54
27259	-1,67	-0,47	-0,08	-0,68	-0,41	0,26	0,58	0,36	-0,04	-0,73	-0,99	-0,10	-0,37	0,99	0,62	1,09
27267	-1,24	-0,01	0,11	0,08	-0,86	-0,92	-0,24	-0,54	-0,60	-1,12	-0,62	-0,37	-0,26	0,20	0,36	0,58
27388	1,26	0,20	0,87	0,43	-0,84	-0,16	-0,47	-0,22	-0,62	-0,13	-0,37	0,06	-0,22	-0,02	0,15	-0,09
27863	1,34	0,09	1,21	1,09	-0,72	-0,13	-0,38	-0,38	-0,65	-0,15	-0,34	0,25	-0,07	0,02	0,27	-0,23
27982	-1,47	-0,15	0,38	-0,52	-0,67	-0,26	0,88	0,15	-0,60	-1,64	-1,55	-0,41	-0,07	1,38	1,48	1,79
28148	-1,42	-0,10	0,07	-0,47	-0,68	-0,30	0,42	0,21	-0,22	-0,77	-1,10	-0,51	-0,46	0,47	0,64	0,98
28294	-1,98	-0,39	-0,27	-0,90	-0,44	0,01	0,57	0,20	-0,24	-0,81	-1,01	-0,19	-0,20	0,82	0,81	1,01
28312	1,82	0,14	1,49	1,56	-1,11	0,34	0,35	0,46	0,07	0,29	-1,47	-0,13	-1,18	0,04	0,28	0,17
28553	1,49	-0,11	1,49	1,17	-1,78	0,05	-0,21	-0,04	-0,51	-0,17	-1,57	0,09	-1,28	0,22	0,30	0,13
29024	-1,28	-0,33	-0,08	-0,34	-0,46	0,01	0,37	0,29	0,11	-0,63	-0,82	-0,28	-0,56	0,64	0,26	0,92
29038	2,95	0,13	2,74	2,59	-2,57	0,17	-0,03	-0,12	-0,21	0,16	-2,54	0,29	-2,36	0,01	0,18	-0,28
29061	2,70	0,06	1,06	0,83	-1,27	-0,20	-1,02	-0,67	-0,95	-0,25	-0,25	0,46	-0,32	0,05	-0,07	-0,42
29155	1,46	-0,08	1,62	1,81	-1,69	0,13	0,43	0,05	-0,36	-0,07	-2,11	0,08	-1,33	0,19	0,79	0,11
29487	3,32	1,63	3,41	2,93	-1,90	-0,11	-0,26	-0,36	-0,82	-0,36	-1,64	0,25	-1,08	0,26	0,56	0,01
29726	-1,79	-0,44	-0,19	-0,91	-0,57	-0,28	0,75	0,28	-0,17	-0,99	-1,32	-0,56	-0,40	0,71	0,92	1,27
29884	-1,09	-0,26	-0,27	-0,18	0,27	0,59	0,65	0,00	0,53	0,12	-0,38	0,59	-0,26	0,47	0,12	-0,12
30003	1,39	0,00	1,18	0,64	-1,06	0,26	0,02	0,19	-0,08	-0,01	-1,08	0,07	-0,99	0,27	0,09	0,20
30775	1,12	0,16	0,20	1,71	-1,60	-1,67	-1,59	-1,06	-1,14	-0,58	-0,01	-0,61	-0,46	-1,09	-0,45	-0,48
31254	2,10	0,39	0,82	0,29	-1,41	-1,19	-1,36	-1,38	-1,08	-0,95	-0,05	0,18	-0,33	-0,24	-0,28	-0,42
31317	6,39	4,29	6,60	6,21	-3,53	-0,41	-0,50	-0,62	-1,08	-0,33	-3,03	0,21	-2,44	-0,08	0,59	-0,29
31617	1,33	0,09	0,90	0,77	-1,13	-0,13	-0,21	-0,07	-0,21	-0,10	-0,91	-0,06	-0,92	-0,03	-0,01	0,03
32199	2,52	0,26	1,70	1,76	-1,67	0,03	-0,30	-0,05	-0,31	-0,03	-1,37	0,08	-1,35	0,07	0,01	-0,02
32205	1,68	0,24	1,18	1,14	-1,19	0,08	-0,42	-0,04	-0,23	0,05	-0,77	0,12	-0,96	0,04	-0,19	-0,09
32250	1,07	0,08	0,68	0,43	-1,00	0,14	-0,21	0,05	-0,40	0,14	-0,79	0,09	-0,60	0,00	0,19	-0,09
32288	-1,97	-0,84	-0,18	-1,10	-0,66	0,03	0,81	0,29	-0,19	-0,85	-1,46	-0,26	-0,47	0,88	1,00	1,14
32382	2,60	0,65	2,97	1,87	-2,32	-0,34	-0,64	-0,42	-0,68	-0,33	-1,68	0,09	-1,64	-0,01	0,05	-0,10
32505	-1,41	-0,32	-0,48	-1,23	0,09	0,01	0,05	0,07	0,05	-0,23	0,04	-0,06	0,04	0,24	0,00	0,30
32728	2,74	0,77	2,67	1,92	-1,75	-0,44	-0,32	-0,66	-0,68	-0,16	-1,43	0,21	-1,07	-0,28	0,36	-0,50
33175	1,52	0,03	-0,05	1,30	0,13	0,08	0,08	0,00	0,17	0,13	0,05	0,08	-0,04	-0,05	-0,09	-0,13
33352	3,12	0,33	3,07	2,94	-2,80	0,26	-0,22	-0,04	-0,40	0,29	-2,58	0,30	-2,40	-0,04	0,18	-0,33
33456	-1,64	-0,34	0,32	-0,51	-1,12	-0,50	0,53	0,30	-0,66	-1,53	-1,64	-0,79	-0,45	1,03	1,19	1,83
34109	0,77	0,42	-0,35	0,92	-1,17	-1,74	-2,02	-1,58	-1,79	-1,37	0,84	-0,16	0,62	-0,37	-0,22	-0,21
34278	-0,09	-0,05	-0,04	0,03	4,28	4,34	4,36	4,79	4,19	4,41	-0,09	-0,45	0,08	-0,07	0,17	0,38
34622	-1,33	-0,59	-0,24	-0,69	-0,26	0,15	0,29	0,14	-0,19	-0,61	-0,55	0,01	-0,07	0,75	0,48	0,75
34766	1,98	-0,08	0,92	0,96	-1,30	0,21	-0,14	0,16	-0,31	0,20	-1,16	0,05	-0,99	0,01	0,17	-0,04
34994	-1,80	0,99	0,06	1,35	-0,65	-0,63	0,15	-0,44	0,12	-1,00	-0,80	-0,18	-0,77	0,37	0,03	0,56
35147	-1,05	-1,08	-0,69	-1,23	-0,59	-0,18	-0,89	-0,44	-0,56	-0,93	0,30	0,26	-0,03	0,76	-0,33	0,50
35215	1,37	-0,09	0,38	1,02	-0,54	-0,05	-0,31	-0,02	-0,24	0,03	-0,23	-0,04	-0,30	-0,08	-0,07	-0,04
35488	1,13	0,17	0,95	0,92	-1,12	0,35	-0,17	0,08	-0,10	0,18	-0,96	0,27	-1,02	0,17	-0,06	-0,10
35551	1,32	0,25	1,35	1,28	-1,59	-0,17	-0,46	-0,20	-0,47	-0,17	-1,12	0,03	-1,11	0,00	0,01	-0,04
35727	-1,67	-1,03	-0,42	-1,22	-0,58	0,22	0,85	0,37	-0,22	-0,86	-1,43	-0,15	-0,36	1,08	1,07	1,23
36119	1,24	0,07	0,27	0,34	0,03	0,18	-0,36	0,18	-0,25	0,50	0,39	0,00	0,28	-0,32	-0,10	-0,32
36198	-1,46	-0,42	0,03	-1,27	-0,73	-0,46	0,66	0,26	-0,45	-1,10	-1,39	-0,72	-0,28	0,64	1,11	1,36

Anexos

36772	-2,91	-1,58	-0,85	-2,35	-0,02	0,17	1,42	-0,09	-0,24	-2,13	-1,44	0,26	0,22	2,30	1,66	2,05
36925	3,43	1,38	3,73	3,43	-2,48	0,06	-0,04	-0,08	-0,11	0,01	-2,45	0,15	-2,38	0,05	0,07	-0,09
37566	2,00	0,56	1,13	1,14	-1,26	-0,12	-0,47	-0,31	-0,29	-0,35	-0,79	0,18	-0,98	0,22	-0,19	0,04
37869	-1,06	-0,54	1,16	-1,12	-0,93	-0,63	0,92	0,25	-0,64	-0,67	-1,85	-0,88	-0,29	0,03	1,56	0,92
37940	1,11	0,10	-0,01	1,80	-0,08	-0,01	-0,35	-0,72	-0,37	-0,75	0,27	0,71	0,29	0,74	0,02	0,03
38454	1,52	0,26	1,39	1,26	-1,61	-0,15	-0,57	-0,07	-0,38	-0,08	-1,04	-0,09	-1,24	-0,07	-0,20	0,01
38509	-1,10	-0,18	-0,11	-0,52	0,03	0,11	0,31	0,16	0,13	-0,13	-0,27	-0,04	-0,09	0,25	0,18	0,29
38543	-1,20	-0,80	-1,01	-0,68	1,00	0,91	0,51	0,35	0,64	0,26	0,49	0,56	0,35	0,65	-0,14	0,09
38919	-1,76	-0,45	-0,11	-1,43	-0,38	-0,38	0,48	0,03	-0,09	-0,59	-0,86	-0,41	-0,30	0,21	0,57	0,62
38924	1,03	0,03	0,54	0,27	0,10	0,05	-0,33	-0,31	-0,25	0,37	0,43	0,36	0,35	-0,32	-0,08	-0,68
39104	1,32	-0,58	-0,81	-0,58	0,78	0,06	-1,07	-0,42	-0,93	-0,58	1,85	0,48	1,71	0,63	-0,14	0,15
39231	2,99	0,79	2,51	2,85	-2,07	-0,09	-0,25	-0,11	0,11	-0,08	-1,82	0,02	-2,18	-0,01	-0,36	-0,03
39289	-1,83	-1,29	-1,08	-0,88	0,56	0,82	0,86	0,82	0,43	0,23	-0,30	0,01	0,12	0,59	0,42	0,59
39344	0,82	1,04	0,98	1,22	-0,45	-0,32	-1,80	-1,77	-0,12	-0,09	1,35	1,45	-0,32	-0,23	-1,68	-1,68
40403	-1,51	-0,13	-0,09	-0,70	-0,01	0,01	0,39	0,11	-0,18	-0,33	-0,40	-0,10	0,17	0,34	0,57	0,44
41276	1,06	0,74	0,27	1,07	-0,20	-0,76	-0,66	-0,76	-0,40	-0,51	0,46	0,00	0,21	-0,25	-0,25	-0,25
41289	-1,09	-0,53	-0,03	-0,57	-0,26	0,49	0,73	0,50	-0,01	-0,50	-0,99	-0,01	-0,25	0,99	0,74	1,00
41561	-1,11	-0,37	0,04	-0,67	-0,51	-0,41	0,75	0,06	-0,09	-0,70	-1,26	-0,47	-0,43	0,29	0,83	0,76
41581	-1,20	-0,24	0,07	-0,99	-0,67	-0,43	0,54	0,38	-0,43	-0,89	-1,21	-0,81	-0,24	0,46	0,97	1,27
41763	1,29	0,73	0,21	1,37	0,20	-0,83	-0,38	-0,51	0,05	-0,21	0,58	-0,32	0,15	-0,62	-0,43	-0,30
41941	-1,41	-0,61	-0,03	-0,80	-0,79	0,23	0,67	0,52	-0,29	-1,01	-1,46	-0,29	-0,50	1,25	0,96	1,54
42275	-1,53	-0,60	-0,20	-0,70	-0,27	0,26	0,54	0,34	-0,08	-0,65	-0,80	-0,07	-0,19	0,91	0,61	0,98
42770	1,42	-0,04	0,28	0,99	-0,54	0,25	-0,29	-0,03	-0,18	0,16	-0,24	0,28	-0,35	0,09	-0,11	-0,19
42777	1,21	0,10	1,48	0,92	-1,36	0,06	-0,03	-0,06	-0,45	-0,17	-1,33	0,13	-0,91	0,24	0,41	0,11
43336	1,35	-0,05	0,77	0,42	-0,57	0,13	-0,14	0,12	-0,36	0,21	-0,42	0,01	-0,21	-0,08	0,21	-0,09
43749	-1,55	-0,94	-0,30	-0,96	-0,14	0,42	0,82	0,31	-0,14	-0,74	-0,96	0,11	0,00	1,15	0,96	1,04
43858	1,85	0,64	1,81	1,03	-1,20	-0,31	-0,55	-0,44	-0,70	-0,31	-0,65	0,13	-0,50	0,00	0,15	-0,13
44238	-1,22	-0,36	-0,95	-1,54	0,64	-0,01	-0,07	0,05	0,03	0,07	0,71	-0,06	0,61	-0,08	-0,10	-0,02
44426	1,01	0,79	0,64	0,45	-0,23	-0,40	-0,31	0,19	-0,13	0,08	0,08	-0,59	-0,09	-0,49	-0,18	0,11
44509	1,01	-0,25	-0,07	0,57	-0,09	-0,04	0,15	-0,09	0,10	-0,04	-0,24	0,05	-0,20	0,00	0,05	-0,05
44594	1,19	0,29	1,09	0,69	-0,85	-0,07	-0,29	-0,09	-0,55	-0,04	-0,56	0,02	-0,30	-0,04	0,26	-0,06
45044	2,13	-0,03	2,21	0,91	-1,73	-0,19	-0,31	-0,20	-0,53	-0,10	-1,42	0,01	-1,20	-0,09	0,23	-0,10
45627	-0,92	-0,86	-0,47	-1,43	0,94	1,74	0,80	1,21	1,33	1,81	0,13	0,53	-0,39	-0,07	-0,52	-0,60
45940	-1,20	-0,35	-0,15	0,13	0,05	0,54	0,68	0,24	0,57	-0,16	-0,63	0,30	-0,52	0,69	0,11	0,40
46067	1,08	0,42	1,19	0,91	-1,05	-0,45	-0,28	0,10	-0,63	-0,08	-0,77	-0,55	-0,41	-0,36	0,36	0,19
46387	1,15	0,29	0,84	0,76	-0,55	-0,46	-0,28	-0,14	-0,17	-0,01	-0,27	-0,32	-0,39	-0,45	-0,11	-0,12
46499	6,47	4,44	6,92	6,37	-3,51	-0,49	-0,46	-0,66	-1,03	-0,39	-3,06	0,17	-2,48	-0,10	0,57	-0,27
46668	1,93	-0,07	2,15	1,49	-2,31	0,33	0,49	0,20	0,29	-0,07	-2,80	0,13	-2,60	0,40	0,21	0,26
47003	1,54	0,37	0,93	0,36	-0,86	-0,41	-0,70	-0,41	-0,35	0,26	-0,16	0,00	-0,51	-0,67	-0,35	-0,67
47080	-1,67	0,95	0,07	0,85	-0,51	-0,58	0,17	-0,19	0,20	-0,93	-0,68	-0,40	-0,71	0,34	-0,03	0,74
47101	1,44	0,76	2,02	2,18	-2,69	-0,98	-0,48	-0,75	-0,62	-1,08	-2,21	-0,24	-2,07	0,09	0,14	0,33
47486	4,58	2,00	4,69	3,57	-2,63	-0,26	-0,26	0,13	-0,73	0,05	-2,37	-0,39	-1,90	-0,31	0,47	0,08
47534	0,02	0,53	-0,27	0,13	3,58	2,72	3,26	3,27	3,23	3,20	0,32	-0,55	0,35	-0,47	0,02	0,07
47535	-0,54	-0,04	-0,25	-1,07	2,93	3,03	2,71	2,92	2,35	2,88	0,22	0,10	0,58	0,15	0,35	0,05
47574	6,14	0,31	4,27	4,72	-4,08	0,04	-0,28	-0,12	-0,98	-0,25	-3,80	0,16	-3,09	0,28	0,70	0,12

48488	-1,17	-0,42	0,02	-0,86	-0,58	-0,20	0,24	0,07	-0,43	-0,81	-0,82	-0,28	-0,15	0,61	0,68	0,89
48689	3,99	2,54	4,41	3,72	-2,54	-0,28	-0,48	-0,31	-0,67	-0,17	-2,06	0,03	-1,87	-0,12	0,19	-0,14
48729	1,42	0,38	1,73	1,30	-1,42	0,03	-0,12	-0,02	-0,13	0,00	-1,30	0,05	-1,30	0,03	0,00	-0,02
48745	1,31	1,00	-0,21	0,95	-0,38	-1,89	-1,44	-0,97	-1,29	-1,07	1,06	-0,92	0,91	-0,82	-0,15	0,10
48826	-1,31	-0,89	-0,34	-0,99	0,14	0,35	0,54	0,40	-0,21	-0,30	-0,40	-0,05	0,35	0,65	0,75	0,70
48945	3,19	1,24	3,00	2,81	-2,37	-0,15	-0,65	-0,14	-0,44	-0,08	-1,72	0,00	-1,93	-0,07	-0,21	-0,07
49171	1,17	0,17	1,06	0,63	-0,89	-0,26	-0,27	-0,10	-0,43	-0,08	-0,63	-0,16	-0,46	-0,19	0,17	-0,03
49359	3,66	0,82	3,20	3,22	-2,25	0,00	-0,19	-0,10	-0,20	0,01	-2,07	0,10	-2,06	-0,02	0,01	-0,12
49406	1,20	-0,18	-0,03	1,06	-0,35	-0,07	0,08	-0,08	0,14	-0,06	-0,43	0,01	-0,49	-0,01	-0,06	-0,02
49450	1,48	0,37	2,45	2,21	-2,25	-0,13	-0,45	-0,41	-0,43	-0,15	-1,79	0,29	-1,81	0,03	-0,02	-0,26
49506	-1,46	-0,63	0,33	-0,92	-0,43	0,42	0,88	0,55	-0,24	-0,33	-1,30	-0,13	-0,19	0,75	1,12	0,88
49692	-1,58	-0,72	-0,60	-1,28	0,10	0,50	-0,44	0,23	-0,35	0,49	0,55	0,27	0,45	0,01	-0,09	-0,26
50331	2,37	-0,01	-0,34	1,16	-0,03	0,12	-0,22	0,07	0,11	0,08	0,19	0,05	-0,14	0,04	-0,33	-0,01
50477	1,22	0,72	1,31	0,92	-1,03	-0,38	-0,06	0,07	-0,57	-0,24	-0,97	-0,45	-0,46	-0,15	0,51	0,31
50483	-2,07	-0,78	-0,10	-0,93	-0,46	0,14	0,98	0,47	-0,20	-1,07	-1,44	-0,33	-0,26	1,21	1,18	1,54
50500	2,75	0,04	2,05	1,61	-2,39	-0,06	-0,76	-0,28	-0,93	0,10	-1,63	0,22	-1,46	-0,16	0,18	-0,38
50657	1,94	0,67	1,67	1,55	-1,27	0,05	-0,37	0,03	-0,27	0,24	-0,90	0,03	-1,00	-0,19	-0,10	-0,21
50863	-2,61	-0,71	0,41	-0,54	-1,44	-0,81	0,86	0,15	-0,84	-2,34	-2,30	-0,96	-0,60	1,53	1,70	2,49
50908	-1,18	-0,74	0,47	-0,50	-0,55	-0,34	0,61	-0,15	-0,35	-0,55	-1,16	-0,19	-0,20	0,21	0,96	0,40
50966	1,08	1,09	0,00	1,09	0,74	-1,19	0,01	-0,09	-0,09	-0,10	0,73	-1,09	0,83	-1,08	0,10	0,01
50977	1,82	0,13	0,33	1,51	-0,02	-0,10	0,19	0,00	0,29	-0,07	-0,21	-0,10	-0,31	-0,03	-0,10	0,06
50986	1,48	0,19	0,62	0,93	-0,75	0,05	-0,15	-0,07	-0,09	-0,07	-0,60	0,12	-0,66	0,12	-0,06	0,00
51101	1,08	0,02	2,21	-1,14	-2,17	-0,73	-0,07	-0,08	-1,54	-0,60	-2,10	-0,65	-0,63	-0,13	1,47	0,52
51215	-1,68	-0,40	0,01	-0,40	-0,24	0,05	0,69	0,01	0,26	-0,77	-0,93	0,04	-0,50	0,81	0,43	0,77
51339	-1,22	-0,28	0,01	-0,62	-0,15	0,12	0,74	0,46	-0,15	-0,83	-0,90	-0,34	-0,01	0,96	0,89	1,30
51484	1,30	-0,21	1,00	-0,02	-0,71	0,47	-0,05	0,11	-0,26	0,38	-0,66	0,36	-0,45	0,10	0,21	-0,27
51581	4,46	1,73	3,28	2,31	-2,38	-0,13	-1,07	-0,29	-1,29	0,03	-1,31	0,16	-1,09	-0,16	0,22	-0,32
51876	1,24	0,32	2,95	1,05	-2,16	0,22	0,07	0,06	0,01	0,15	-2,24	0,16	-2,17	0,07	0,06	-0,09
68689	3,26	1,82	3,63	3,28	-2,29	-0,28	0,01	-0,30	-0,21	-0,30	-2,30	0,01	-2,08	0,02	0,22	0,00
68843	1,04	0,11	-0,09	NA	-0,43	0,06	0,26	-0,44	0,01	-0,77	-0,69	0,50	-0,43	0,83	0,25	0,33
69035	-1,64	-0,22	-0,38	0,02	-0,36	-0,36	0,25	-0,01	-0,46	-0,89	-0,61	-0,35	0,09	0,54	0,70	0,89
70452	-1,03	-0,64	0,11	-0,45	0,25	0,69	0,75	0,20	0,17	0,25	-0,50	0,49	0,08	0,44	0,58	-0,05
71324	1,13	0,08	1,41	0,65	-1,37	-0,03	-0,23	-0,25	-0,45	-0,25	-1,14	0,22	-0,92	0,21	0,22	-0,01
71506	-1,10	-0,41	-0,22	-0,16	-0,12	0,43	0,57	0,13	0,13	-0,48	-0,69	0,30	-0,25	0,91	0,44	0,61
71749	-1,92	-0,34	0,25	-0,56	-0,96	-0,32	0,46	0,00	-0,92	-1,24	-1,42	-0,32	-0,03	0,93	1,39	1,24
71817	2,39	0,81	0,87	1,80	-0,54	0,21	-0,38	-0,25	-0,29	-0,34	-0,16	0,47	-0,25	0,55	-0,09	0,09
72273	1,68	0,24	0,30	1,26	-0,38	-0,49	-1,63	-0,81	-0,88	0,02	1,25	0,31	0,49	-0,51	-0,75	-0,83
72278	0,22	-0,03	0,10	0,41	-3,15	-2,93	0,35	0,42	0,16	-0,01	-3,50	-3,34	-3,30	-2,92	0,19	0,43
72854	1,23	0,63	0,45	0,69	-0,04	-0,42	-0,47	-0,20	-0,40	-0,09	0,43	-0,22	0,37	-0,33	-0,07	-0,11
74361	4,21	0,11	3,71	3,10	-4,46	0,02	-0,70	0,03	-0,98	-0,15	-3,76	-0,01	-3,48	0,17	0,29	0,18
75065	1,55	0,20	1,02	0,50	-0,92	0,07	-0,27	0,18	-0,41	0,22	-0,65	-0,11	-0,51	-0,15	0,14	-0,03
75175	-1,03	-0,08	-0,05	-1,31	-0,26	-0,15	0,21	0,04	-0,17	-0,56	-0,47	-0,18	-0,08	0,41	0,39	0,60
76134	1,70	0,32	1,16	1,18	-0,88	-0,27	-0,11	-0,01	-0,38	-0,05	-0,77	-0,26	-0,50	-0,22	0,27	0,04
76680	1,37	0,84	0,02	0,93	0,23	-0,65	-0,71	-0,32	-0,17	-0,19	0,93	-0,33	0,40	-0,45	-0,53	-0,13
76818	-1,16	-0,50	-0,31	-0,20	-0,14	0,09	0,59	0,00	0,02	-0,58	-0,72	0,09	-0,15	0,66	0,57	0,57

Anexos

76904	1,46	0,91	1,52	1,85	-0,89	-0,62	-0,01	-0,08	-0,27	-0,31	-0,87	-0,54	-0,62	-0,31	0,26	0,24
76960	1,56	0,28	2,27	1,14	-2,26	-0,15	-0,30	-0,02	-0,41	-0,15	-1,97	-0,14	-1,86	0,00	0,11	0,13
77002	1,30	-0,05	0,91	0,76	-1,05	0,20	-0,02	0,19	-0,28	0,02	-1,03	0,01	-0,77	0,18	0,26	0,17
77196	-1,29	-0,40	-0,05	-0,74	-0,27	0,39	0,81	0,43	-0,15	-0,53	-1,08	-0,04	-0,12	0,91	0,96	0,96
77235	1,36	0,27	1,33	1,10	-1,19	-0,06	-0,01	0,20	-0,23	0,12	-1,18	-0,26	-0,95	-0,18	0,22	0,08
77256	1,59	-0,28	0,46	-0,23	-0,58	0,58	0,37	0,55	-0,39	0,24	-0,95	0,03	-0,19	0,34	0,76	0,31
77330	1,07	0,31	0,67	0,68	-0,91	-0,22	-0,48	0,13	-0,18	-0,02	-0,43	-0,34	-0,72	-0,19	-0,29	0,15
77364	2,31	-0,10	1,36	1,09	-2,38	-0,07	-0,50	-0,22	-0,25	-0,03	-1,88	0,15	-2,12	-0,04	-0,24	-0,19
77373	1,11	0,38	0,63	0,42	-0,86	-0,27	-0,60	-0,22	-0,74	-0,23	-0,26	-0,05	-0,12	-0,04	0,14	0,01
77404	-1,48	-0,80	-0,21	-1,88	-0,57	-0,15	0,49	0,04	-0,54	-1,12	-1,05	-0,19	-0,02	0,97	1,03	1,16
77427	2,45	0,96	2,77	2,34	-1,98	0,02	-0,06	0,19	-0,31	-0,01	-1,92	-0,16	-1,67	0,04	0,25	0,20
77656	1,36	-0,18	1,01	0,41	-1,23	0,14	-0,20	-0,10	0,06	0,02	-1,04	0,24	-1,29	0,12	-0,26	-0,12
77665	1,94	0,03	-0,18	0,74	0,45	0,38	-0,28	-0,26	-0,06	-0,14	0,73	0,64	0,51	0,52	-0,22	-0,12
77947	1,58	0,55	0,87	0,93	-1,62	-0,21	-1,42	-0,31	-0,97	-0,09	-0,20	0,10	-0,65	-0,13	-0,45	-0,23
78042	-1,13	-0,94	-0,75	-1,27	0,11	0,29	0,88	0,16	0,13	0,31	-0,77	0,12	-0,02	-0,02	0,75	-0,15
78057	-1,09	-0,33	-0,13	-0,83	-0,41	-0,07	0,34	0,16	-0,16	-0,59	-0,74	-0,23	-0,25	0,52	0,50	0,75
78423	1,05	0,07	0,30	0,29	-0,57	-0,23	-0,67	-0,55	-0,46	-0,25	0,09	0,32	-0,11	0,02	-0,20	-0,30
78616	2,04	0,36	0,36	0,56	-0,52	-0,90	-0,59	-1,15	-0,34	-0,67	0,07	0,24	-0,18	-0,23	-0,25	-0,48
78716	1,32	0,42	1,12	1,14	-1,04	-0,11	-0,16	-0,01	-0,41	-0,10	-0,88	-0,10	-0,62	0,00	0,26	0,09
79048	1,25	0,37	1,01	0,22	-1,04	-0,42	-0,43	-0,29	-0,55	-0,26	-0,61	-0,12	-0,49	-0,16	0,12	-0,03
79088	2,43	1,20	2,46	1,56	-1,46	-0,02	-0,47	-0,18	-0,72	-0,11	-0,99	0,16	-0,74	0,09	0,25	-0,07
79110	1,06	0,12	0,36	0,97	-0,13	0,16	-0,07	-0,12	-0,17	-0,02	-0,07	0,29	0,04	0,18	0,10	-0,11
79111	1,17	0,23	0,83	0,99	-0,38	0,28	0,25	-0,07	-0,09	-0,03	-0,62	0,35	-0,29	0,31	0,33	-0,05
79150	1,02	0,63	0,18	-0,38	-0,91	-1,50	-1,28	-1,39	-1,02	-1,13	0,38	-0,11	0,11	-0,37	-0,26	-0,26
79180	-0,13	-0,11	-0,02	-0,17	2,89	2,71	3,00	2,79	3,04	2,59	-0,11	-0,07	-0,15	0,12	-0,04	0,20
79272	2,13	-0,01	2,40	2,28	-2,38	-0,29	-0,63	-1,16	-0,89	-0,82	-1,76	0,87	-1,49	0,53	0,26	-0,34
79274	1,07	0,23	0,24	0,31	0,13	-0,12	-0,44	-0,65	-0,16	-0,16	0,57	0,54	0,29	0,04	-0,28	-0,49
79505	1,77	-0,27	0,21	0,71	-0,80	-0,30	-1,44	-0,80	-1,19	-0,18	0,64	0,50	0,39	-0,12	-0,25	-0,62
79588	4,24	1,42	3,62	3,44	-2,81	-0,05	-0,32	0,22	-0,07	0,09	-2,48	-0,27	-2,74	-0,14	-0,25	0,13
79596	1,71	0,79	0,42	2,36	-0,47	-0,59	-0,95	-1,29	-1,03	-1,29	0,47	0,71	0,55	0,70	0,08	0,00
80198	1,17	0,20	0,68	0,90	-0,84	-0,12	0,01	-0,06	-0,24	-0,06	-0,84	-0,06	-0,60	-0,06	0,25	0,00
80213	2,81	0,68	3,31	2,73	-2,67	0,19	-0,16	0,07	-0,09	-0,03	-2,51	0,12	-2,59	0,22	-0,08	0,10
80266	1,05	0,10	0,79	0,75	-0,99	0,03	-0,20	-0,12	-0,23	-0,08	-0,79	0,15	-0,76	0,11	0,03	-0,04
80406	-1,48	-0,46	-0,58	-1,29	0,38	0,29	0,00	0,35	-0,09	0,33	0,37	-0,06	0,46	-0,05	0,09	0,01
80421	3,31	0,84	1,34	0,95	-2,21	0,02	-1,35	0,01	-0,44	0,02	-0,86	0,01	-1,77	0,00	-0,91	0,00
80593	1,35	0,01	0,17	0,37	-0,55	0,15	-0,41	-0,26	-0,27	0,06	-0,15	0,41	-0,28	0,09	-0,13	-0,32
80678	4,28	1,07	5,04	0,07	-3,60	-0,02	-0,27	-0,57	-5,78	-1,86	-3,34	0,55	2,17	1,84	5,51	1,29
80988	-1,33	-0,26	NA	-0,77	-0,52	0,14	0,30	0,02	-0,14	-0,65	-0,82	0,12	-0,38	0,79	0,43	0,67
81006	1,54	0,15	0,81	0,67	-1,15	-0,02	-0,26	0,00	-0,31	-0,02	-0,90	-0,02	-0,84	0,01	0,06	0,03
81030	2,66	0,59	1,75	2,29	-2,42	-0,29	-1,23	-0,25	-0,61	-0,01	-1,20	-0,05	-1,81	-0,29	-0,62	-0,24
81038	3,19	0,76	2,97	2,62	-1,97	-0,09	0,04	0,09	-0,28	0,13	-2,01	-0,18	-1,69	-0,22	0,32	-0,04
81126	1,81	0,68	1,89	1,82	-1,76	-0,54	-0,46	-0,47	-0,38	-0,24	-1,29	-0,08	-1,38	-0,30	-0,09	-0,22
81172	1,59	0,21	0,38	0,36	-0,83	-0,24	-0,48	-0,08	-0,68	-0,15	-0,35	-0,16	-0,15	-0,09	0,20	0,07
81220	-1,39	-0,50	0,13	-1,24	-0,28	-0,15	1,09	0,78	-0,20	-0,76	-1,37	-0,93	-0,08	0,61	1,29	1,54
81516	1,61	0,42	1,28	0,90	-0,96	0,09	-0,26	0,23	-0,46	0,22	-0,70	-0,14	-0,50	-0,13	0,20	0,01

81520	1,07	-0,05	1,50	1,37	-1,14	0,01	0,03	0,06	-0,26	0,11	-1,18	-0,05	-0,88	-0,10	0,29	-0,05
81613	1,53	0,15	1,00	2,26	-1,59	0,17	-1,20	-0,61	-0,42	0,04	-0,40	0,77	-1,17	0,13	-0,78	-0,64
81803	-0,16	0,24	-0,37	-0,55	-1,85	-2,27	-2,65	-2,35	-2,47	-2,07	0,80	0,08	0,62	-0,20	-0,18	-0,28
81842	1,41	0,26	0,09	1,29	-0,59	-0,30	-0,02	-0,09	-0,21	-0,18	-0,57	-0,22	-0,38	-0,12	0,19	0,09
81987	3,35	0,33	2,74	1,96	-3,02	-0,08	-0,67	0,00	-0,71	0,12	-2,36	-0,07	-2,31	-0,20	0,04	-0,12
81990	2,29	0,86	0,77	2,83	-0,73	-0,77	-0,82	-0,97	-0,29	-0,43	0,09	0,19	-0,44	-0,34	-0,53	-0,54
82032	1,35	0,15	0,89	0,72	-0,95	0,12	-0,12	0,20	0,00	0,10	-0,83	-0,09	-0,95	0,01	-0,12	0,10
82118	1,24	0,49	0,39	1,58	-0,62	-0,28	-1,15	-0,35	-0,53	-0,07	0,53	0,08	-0,09	-0,21	-0,61	-0,29
82154	-2,59	-0,72	-0,27	-0,63	-0,25	-0,02	0,81	-0,20	-0,46	-1,53	-1,06	0,18	0,21	1,52	1,26	1,33
82261	2,27	0,59	1,18	1,52	-1,61	-0,37	-1,07	-0,38	-0,48	0,05	-0,55	0,01	-1,13	-0,42	-0,59	-0,42
82302	1,07	0,71	0,78	1,03	-0,44	-0,43	-0,16	0,03	-0,25	-0,07	-0,28	-0,46	-0,19	-0,36	0,09	0,10
82547	1,01	0,39	0,30	0,62	-0,26	-0,71	-0,26	-0,45	-0,14	-0,41	0,00	-0,26	-0,12	-0,30	-0,12	-0,04
82616	1,32	1,14	0,34	1,46	-0,02	-0,83	-0,71	-0,69	-0,21	-0,33	0,69	-0,15	0,19	-0,50	-0,50	-0,36
82674	1,87	1,19	2,17	1,82	-1,63	-0,24	-0,34	-0,40	-0,67	-0,28	-1,30	0,17	-0,96	0,04	0,33	-0,13
82679	2,17	0,10	1,58	1,04	-1,58	0,24	-0,15	0,15	-0,76	0,01	-1,43	0,09	-0,82	0,23	0,61	0,14
82857	1,02	0,31	0,45	0,76	-0,34	0,00	-0,02	0,02	-0,05	0,13	-0,32	-0,03	-0,29	-0,14	0,03	-0,11
83016	1,20	-0,13	1,29	0,00	-0,95	0,03	-0,05	0,35	-0,61	0,04	-0,90	-0,32	-0,34	-0,01	0,56	0,31
83098	2,56	0,62	1,87	2,26	-2,43	-0,41	-1,16	-0,20	-0,61	-0,08	-1,27	-0,21	-1,82	-0,33	-0,55	-0,12
83109	1,10	1,08	0,35	1,84	0,22	-0,47	-0,04	-0,15	0,27	-0,14	0,26	-0,32	-0,05	-0,33	-0,30	-0,01
83196	-1,47	1,40	-0,02	1,77	-0,58	-1,28	0,15	-0,34	0,04	-0,99	-0,73	-0,94	-0,61	-0,29	0,12	0,65
83201	1,11	0,13	-0,39	0,76	0,49	0,01	-0,49	-0,06	-0,22	0,14	0,98	0,07	0,72	-0,13	-0,27	-0,20
83326	1,23	0,66	0,72	1,65	-0,61	-0,34	-0,37	-0,49	-0,15	-0,14	-0,24	0,15	-0,46	-0,20	-0,22	-0,34
83446	1,25	1,10	0,62	0,11	-0,30	-0,16	-0,77	0,11	-0,29	0,13	0,48	-0,27	0,00	-0,29	-0,48	-0,02
83594	2,10	0,38	0,93	1,12	-1,29	-0,13	-0,65	0,06	-0,54	0,10	-0,63	-0,19	-0,75	-0,23	-0,11	-0,04
83606	1,75	0,38	0,51	1,07	-0,56	-0,36	-0,34	-0,23	-0,50	-0,15	-0,22	-0,13	-0,06	-0,21	0,16	-0,08
83624	1,51	0,83	-0,12	1,34	0,01	-0,84	-0,80	-0,94	-0,14	-0,61	0,81	0,10	0,15	-0,23	-0,66	-0,33
83634	1,51	0,83	2,74	2,00	-1,98	-0,35	-0,08	-0,43	-0,33	-0,26	-1,91	0,08	-1,66	-0,09	0,25	-0,16
83748	1,27	0,19	1,17	0,40	-1,32	-0,54	-0,35	-0,25	-0,84	-0,33	-0,96	-0,29	-0,48	-0,21	0,48	0,07
83879	1,43	0,21	0,46	0,57	-0,54	-0,17	-0,21	-0,02	0,07	0,14	-0,33	-0,15	-0,60	-0,31	-0,28	-0,16
83937	-1,06	-0,71	-0,21	-1,01	-0,11	0,26	0,16	-0,21	-0,15	-0,50	-0,27	0,47	0,04	0,76	0,32	0,29
83987	-0,11	0,12	0,05	-0,23	0,13	0,08	-0,21	-0,13	1,67	1,81	0,34	0,21	-1,53	-1,72	-1,88	-1,94
84003	-1,27	-0,45	-0,38	-1,64	0,10	0,20	1,01	0,87	-0,09	-0,25	-0,91	-0,67	0,19	0,45	1,10	1,12
84068	1,31	0,31	0,42	0,63	-0,68	-0,40	-0,77	-0,46	-0,58	-0,37	0,09	0,06	-0,10	-0,02	-0,18	-0,09
84331	1,71	-0,04	0,10	0,28	-0,39	0,03	-0,15	-0,16	-0,01	0,02	-0,24	0,18	-0,39	0,01	-0,14	-0,17
84381	-1,31	-0,48	-0,01	-1,81	-0,16	-0,09	0,20	-0,10	-0,30	-0,38	-0,36	0,01	0,14	0,29	0,50	0,27
84487	-0,44	-0,14	-0,06	-0,40	-0,06	0,14	-4,40	-4,57	-0,02	0,03	4,34	4,70	-0,04	0,11	-4,38	-4,60
84571	1,85	0,18	0,35	1,60	-0,21	-0,07	0,19	0,16	0,29	0,21	-0,40	-0,23	-0,50	-0,28	-0,10	-0,05
84587	2,37	0,22	1,68	1,81	-2,31	-0,36	-0,57	-0,28	-0,77	-0,35	-1,74	-0,08	-1,54	-0,01	0,20	0,07
84617	1,52	0,56	0,32	0,45	-0,60	-0,88	-0,89	-0,97	-0,50	-0,63	0,29	0,09	-0,10	-0,26	-0,39	-0,34
84706	2,51	0,09	1,22	1,53	-1,72	-0,31	-0,13	-0,09	-0,65	-0,33	-1,60	-0,22	-1,07	0,02	0,52	0,24
84711	1,53	0,20	1,19	1,29	-1,43	-0,05	-0,47	-0,40	-0,84	-0,40	-0,96	0,35	-0,59	0,34	0,37	-0,01
84716	1,36	0,12	1,14	0,82	-1,32	-0,54	-0,59	-0,38	-0,59	-0,33	-0,72	-0,16	-0,73	-0,21	0,00	-0,05
84851	1,04	0,12	0,50	0,65	-0,44	0,15	0,17	0,36	0,08	0,26	-0,61	-0,21	-0,52	-0,11	0,09	0,10
84866	1,11	0,51	0,80	1,51	-0,50	-0,04	-0,11	0,01	-0,20	0,23	-0,40	-0,04	-0,30	-0,27	0,10	-0,22
85341	1,06	0,03	0,07	0,53	-0,20	-0,28	-0,24	-0,38	-0,30	-0,18	0,05	0,11	0,10	-0,10	0,06	-0,21

Anexos

85771	1,16	0,11	0,69	0,60	-1,05	0,01	-0,32	-0,10	0,07	-0,02	-0,74	0,11	-1,13	0,03	-0,39	-0,08
85795	1,70	0,01	1,77	1,88	-1,62	0,29	0,22	0,13	-0,09	0,09	-1,85	0,16	-1,54	0,20	0,31	0,03
85799	1,61	0,31	1,22	1,27	-1,12	0,04	-0,06	-0,26	-0,14	-0,15	-1,06	0,30	-0,98	0,19	0,08	-0,11
85858	-0,32	0,00	-0,07	0,32	0,08	0,10	-0,02	-0,19	2,58	2,27	0,10	0,30	-2,50	-2,16	-2,60	-2,46
86109	2,34	0,47	2,40	2,26	-2,29	-0,14	-0,06	0,02	-0,52	0,03	-2,24	-0,16	-1,77	-0,17	0,47	-0,01
86316	-1,06	0,43	0,42	0,69	-0,40	-0,48	0,25	-0,30	-0,13	-0,63	-0,65	-0,18	-0,27	0,15	0,38	0,33
86422	1,13	-0,02	0,31	0,33	-0,68	-0,11	-0,58	-0,19	-0,36	-0,04	-0,10	0,08	-0,32	-0,07	-0,22	-0,15
86607	2,96	-0,06	2,41	2,91	-2,58	0,01	-0,19	0,17	-0,29	0,10	-2,39	-0,16	-2,29	-0,09	0,10	0,07
86666	2,61	1,84	4,97	3,73	-3,39	-0,54	-0,03	-0,50	-0,09	-0,33	-3,36	-0,04	-3,29	-0,22	0,06	-0,17
87023	1,37	0,47	1,19	0,64	-1,06	-0,11	-0,08	0,14	-0,61	-0,21	-0,97	-0,25	-0,45	0,10	0,52	0,36
87298	0,78	-0,09	-0,23	1,22	-1,06	-1,47	-1,73	-0,95	-1,52	-0,40	0,67	-0,52	0,45	-1,06	-0,22	-0,54
87437	-1,67	-0,22	-0,37	-0,23	-0,33	-0,40	0,11	0,12	-0,38	-0,86	-0,45	-0,53	0,05	0,46	0,49	0,99
87466	1,14	0,38	0,71	1,16	-0,16	-0,11	-0,17	-0,02	-0,24	0,25	0,00	-0,09	0,08	-0,36	0,07	-0,26
87690	2,31	0,70	2,05	1,52	-1,32	0,22	0,00	-0,05	-0,41	0,01	-1,33	0,26	-0,91	0,21	0,42	-0,06
87941	1,17	0,27	0,87	1,04	-0,80	-0,32	-0,18	-0,23	-0,30	-0,08	-0,62	-0,09	-0,50	-0,25	0,12	-0,15
88032	-0,22	0,40	-0,10	-0,13	3,29	3,42	0,08	-0,01	0,14	0,19	3,20	3,43	3,15	3,23	-0,06	-0,20
88125	1,75	0,22	1,13	1,05	-1,23	-0,04	-0,29	-0,29	-0,25	-0,06	-0,94	0,25	-0,98	0,02	-0,04	-0,23
88137	1,36	0,34	1,36	0,95	-1,31	-0,20	-0,29	0,00	-0,42	-0,15	-1,03	-0,20	-0,89	-0,05	0,13	0,15
88180	-1,08	-0,31	-0,17	-0,47	-0,14	0,39	0,52	0,16	-0,35	-0,29	-0,66	0,23	0,21	0,67	0,87	0,45
88358	-1,23	0,07	0,21	0,27	-1,25	-0,58	0,19	-0,13	-0,36	-1,17	-1,44	-0,45	-0,89	0,59	0,55	1,03
88380	-1,19	-0,51	-0,69	-0,82	0,06	0,35	0,17	0,09	0,04	0,11	-0,11	0,27	0,01	0,24	0,12	-0,03
88389	1,62	0,12	1,49	1,16	-1,59	0,07	-0,13	-0,12	-0,37	0,03	-1,46	0,19	-1,22	0,04	0,24	-0,15
88467	-2,26	-0,42	-0,12	-0,61	0,05	0,18	1,48	1,39	0,72	-0,98	-1,43	-1,20	-0,67	1,17	0,76	2,37
88670	-1,07	-0,56	-0,61	-0,27	0,00	0,30	0,22	-0,09	0,09	-0,54	-0,22	0,39	-0,09	0,84	0,13	0,45
88759	1,52	0,00	1,89	1,63	-1,50	0,33	-0,07	-0,16	-0,11	0,32	-1,43	0,49	-1,39	0,01	0,04	-0,48
88809	3,27	0,86	3,25	2,30	-2,65	0,00	-0,24	0,11	-0,52	0,08	-2,40	-0,11	-2,13	-0,08	0,28	0,03
88977	3,91	1,02	3,16	3,94	-1,82	0,54	0,15	0,42	-0,22	0,22	-1,97	0,12	-1,60	0,33	0,37	0,20
89138	1,09	0,47	0,09	0,67	-0,02	0,14	-0,36	-0,13	-0,13	0,03	0,34	0,26	0,11	0,11	-0,23	-0,16
89159	1,36	0,57	0,81	1,45	-0,67	-0,22	-0,41	-0,55	-0,02	-0,18	-0,26	0,33	-0,65	-0,04	-0,39	-0,37
89209	4,08	0,70	3,61	3,94	-3,03	-0,02	-0,04	-0,09	-0,30	-0,13	-2,99	0,07	-2,73	0,11	0,27	0,04
89225	2,81	2,64	2,86	1,80	-1,25	-0,86	-1,18	-1,09	-1,82	-0,65	-0,07	0,24	0,57	-0,21	0,64	-0,45
89415	2,47	0,21	2,64	2,37	-2,54	0,36	0,14	0,22	-0,27	0,16	-2,68	0,14	-2,27	0,21	0,41	0,06
89464	-1,02	-0,16	0,32	0,17	-0,58	-0,16	0,13	-0,03	0,07	-0,35	-0,71	-0,13	-0,65	0,19	0,06	0,32
89467	2,47	0,99	2,41	1,89	-1,77	-0,36	-0,32	-0,26	-0,55	-0,28	-1,45	-0,09	-1,22	-0,08	0,23	0,02
89501	1,01	0,66	0,36	0,85	-0,22	-0,37	-0,34	-0,02	-0,15	-0,04	0,12	-0,35	-0,07	-0,33	-0,19	0,02
89727	1,55	0,40	1,24	1,58	-0,86	0,09	0,06	0,14	0,23	0,29	-0,91	-0,05	-1,09	-0,21	-0,17	-0,16
89818	-1,19	-0,52	-0,24	-0,73	-0,09	0,42	0,04	0,09	0,07	0,03	-0,13	0,33	-0,15	0,39	-0,03	0,06
89871	3,99	1,40	4,12	3,37	-2,48	-0,35	-0,21	-0,29	-0,62	-0,26	-2,27	-0,06	-1,86	-0,09	0,41	-0,03
89964	2,05	0,02	1,73	1,67	-1,77	0,12	-0,12	-0,14	-0,26	0,01	-1,65	0,26	-1,51	0,11	0,14	-0,16
90031	1,24	0,67	0,60	0,44	-0,73	-1,24	-1,11	-1,33	-1,04	-0,89	0,38	0,09	0,31	-0,35	-0,06	-0,44
90081	-1,20	0,29	-0,03	0,47	-0,62	-0,70	0,24	0,23	-0,36	-0,39	-0,85	-0,94	-0,26	-0,31	0,60	0,63
90114	1,39	0,13	0,69	0,50	-0,92	0,05	-0,47	-0,13	-0,58	-0,06	-0,45	0,19	-0,34	0,11	0,11	-0,07
90132	1,20	-0,15	1,30	0,68	-1,06	-0,13	-0,17	0,27	-0,51	0,13	-0,89	-0,40	-0,55	-0,26	0,34	0,14
90215	1,01	0,65	0,06	1,34	0,39	-0,43	-0,44	-0,44	0,08	-0,13	0,83	0,01	0,31	-0,30	-0,52	-0,31
90223	1,40	0,07	-0,06	0,42	0,64	0,34	0,37	0,77	-0,20	0,40	0,27	-0,43	0,84	-0,05	0,57	0,38

90323	4,56	1,94	5,10	4,75	-3,75	-0,05	0,01	-0,18	-0,11	-0,24	-3,76	0,13	-3,64	0,19	0,12	0,06
90355	1,24	0,25	0,58	0,43	-0,53	-0,27	-0,43	-0,12	-0,69	0,01	-0,10	-0,15	0,16	-0,28	0,26	-0,13
90446	1,29	-0,20	1,36	0,89	-1,88	0,02	-0,31	-0,12	-0,71	-0,13	-1,57	0,14	-1,17	0,15	0,40	0,01
90495	-1,03	-0,63	-0,34	-1,01	0,16	0,29	0,79	0,53	0,12	-0,33	-0,62	-0,24	0,04	0,62	0,66	0,86
90558	1,19	0,91	0,75	0,54	-0,56	-0,76	-0,41	-0,32	-0,45	-0,47	-0,16	-0,44	-0,12	-0,29	0,04	0,15
90650	-1,18	-0,39	-0,18	-0,08	-0,15	0,34	0,47	0,46	0,40	-0,02	-0,62	-0,12	-0,55	0,36	0,07	0,48
90719	1,48	0,68	0,62	2,51	-1,69	-0,07	-2,17	-0,66	-0,18	0,03	0,48	0,59	-1,51	-0,11	-1,99	-0,69
90738	1,34	4,20	1,83	0,57	0,43	-1,82	-0,65	0,44	-0,28	0,13	1,07	-2,26	0,71	-1,95	-0,36	0,31
90887	2,41	1,66	3,00	3,05	-1,74	-0,43	-0,71	-0,41	-0,37	0,00	-1,03	-0,02	-1,37	-0,42	-0,34	-0,41
90896	-1,66	-1,02	-0,01	-0,40	-0,84	0,26	1,31	0,87	-0,04	-0,72	-2,14	-0,61	-0,80	0,98	1,34	1,59
90904	-1,09	-0,51	0,01	-1,11	0,13	0,26	0,74	0,91	0,01	0,42	-0,61	-0,64	0,11	-0,15	0,73	0,49
90908	-1,13	-0,49	-0,56	-0,91	0,05	0,07	-0,35	-0,08	-0,21	0,01	0,41	0,16	0,26	0,07	-0,14	-0,09
90921	0,02	0,15	0,30	0,07	4,11	4,27	4,38	4,54	4,28	4,47	-0,27	-0,27	-0,18	-0,20	0,09	0,07
90956	1,52	0,34	1,13	0,51	-1,06	-0,89	-0,42	-0,31	-0,53	-0,49	-0,64	-0,58	-0,52	-0,40	0,12	0,18
90969	1,76	0,23	0,47	0,19	-1,17	-0,11	-0,48	-0,25	-0,33	-0,24	-0,68	0,14	-0,84	0,13	-0,15	-0,02
90989	1,60	0,12	0,40	1,73	-0,30	-0,09	0,43	0,06	0,41	0,00	-0,73	-0,15	-0,71	-0,09	0,02	0,06
91063	1,25	-0,07	1,45	0,53	-1,71	0,17	-0,24	0,05	-0,65	-0,09	-1,47	0,12	-1,06	0,26	0,41	0,14
91077	1,01	0,52	0,93	0,78	-0,41	0,02	0,13	0,07	0,01	0,01	-0,53	-0,06	-0,41	0,01	0,12	0,07
91125	1,05	0,03	0,50	0,36	-0,43	-0,02	-0,15	-0,16	-0,15	-0,09	-0,28	0,14	-0,28	0,07	0,00	-0,07
91144	1,06	0,29	0,12	0,14	0,35	-0,11	-0,60	-0,21	-0,28	0,29	0,95	0,11	0,63	-0,40	-0,32	-0,51
91173	2,74	-0,03	2,78	2,44	-2,64	0,22	-0,07	0,24	-0,12	0,15	-2,58	-0,02	-2,52	0,07	0,06	0,09
91183	1,62	0,24	1,04	0,70	-0,95	0,05	-0,19	-0,10	-0,47	-0,04	-0,76	0,15	-0,48	0,09	0,28	-0,06
91224	2,61	0,00	3,63	3,96	-3,39	0,04	0,13	-0,11	-0,45	0,30	-3,53	0,15	-2,95	-0,26	0,58	-0,41
91363	1,20	0,34	1,32	0,98	-1,15	-0,12	-0,23	-0,12	-0,33	0,00	-0,92	0,00	-0,82	-0,13	0,10	-0,12
91496	1,55	0,27	0,85	0,69	-0,96	-0,20	-0,56	-0,59	-0,40	-0,18	-0,40	0,39	-0,56	-0,01	-0,16	-0,41
91514	-1,03	-0,52	-0,08	-0,12	-0,87	-0,16	-0,08	-0,05	-0,17	-0,51	-0,79	-0,10	-0,70	0,36	0,09	0,46
91519	3,88	1,47	2,71	2,77	-2,02	-0,14	-0,71	-0,17	-0,29	-0,06	-1,31	0,04	-1,73	-0,07	-0,42	-0,11
91563	-1,13	-0,20	0,40	-0,50	-0,70	-0,72	0,31	-0,16	-0,62	-1,18	-1,00	-0,56	-0,07	0,46	0,93	1,02
91588	2,24	0,21	2,27	1,48	-1,97	0,14	-0,02	-0,04	-0,26	0,07	-1,94	0,18	-1,71	0,07	0,24	-0,11
91614	1,45	0,39	0,78	1,01	-0,74	-0,12	-0,43	-0,29	-0,31	-0,03	-0,31	0,17	-0,43	-0,09	-0,13	-0,26
91658	1,11	0,25	0,48	0,66	-0,95	-0,38	-0,68	-0,22	-0,50	-0,17	-0,27	-0,16	-0,45	-0,20	-0,17	-0,05
91672	-1,40	-0,05	-0,03	-0,94	0,32	-0,09	0,59	0,84	0,10	0,23	-0,27	-0,93	0,22	-0,31	0,49	0,62
91764	1,13	0,15	0,44	0,34	0,09	0,17	-0,30	0,16	-0,26	0,34	0,39	0,00	0,36	-0,17	-0,03	-0,18
91784	-1,05	-0,41	-0,29	-0,71	-0,13	0,07	0,37	0,04	0,05	-0,26	-0,50	0,02	-0,17	0,33	0,33	0,30
91806	3,61	2,61	2,94	3,03	-2,18	-0,33	-2,74	-1,67	-0,53	0,20	0,55	1,34	-1,65	-0,53	-2,21	-1,87
91956	2,15	0,99	0,69	2,75	-0,47	-0,92	-0,63	-0,89	-0,19	-0,42	0,16	-0,03	-0,28	-0,50	-0,44	-0,47
91998	1,16	0,21	0,63	0,60	-0,70	-0,07	-0,35	0,15	-0,29	0,17	-0,34	-0,22	-0,41	-0,24	-0,07	-0,02
92132	1,00	0,33	0,20	0,36	0,09	-0,11	-0,09	0,33	-0,12	0,03	0,17	-0,44	0,20	-0,14	0,03	0,29
92148	1,14	0,12	1,11	0,79	-0,93	-0,04	-0,15	-0,39	-0,21	-0,11	-0,78	0,35	-0,72	0,07	0,06	-0,27
92271	-1,84	-0,71	-0,53	-0,71	0,36	0,73	-0,20	0,97	-0,16	1,01	0,56	-0,25	0,52	-0,29	-0,04	-0,04
92273	3,62	3,43	4,89	2,59	-2,59	-0,73	-0,83	-0,49	-0,48	-0,47	-1,76	-0,24	-2,11	-0,26	-0,35	-0,02
92287	1,54	0,77	0,45	1,48	0,70	0,41	0,65	0,12	0,11	-0,03	0,06	0,29	0,59	0,44	0,53	0,15
92341	-1,08	-0,02	0,18	-0,70	-0,16	-0,07	0,12	0,25	-0,12	-0,03	-0,28	-0,32	-0,04	-0,04	0,24	0,28
92352	1,02	1,07	1,34	0,44	-0,25	-0,34	0,14	0,09	0,10	0,27	-0,38	-0,44	-0,34	-0,61	0,04	-0,18
92496	1,03	0,14	0,02	0,86	-0,36	-0,19	-0,46	-0,16	-0,31	-0,31	0,10	-0,03	-0,05	0,12	-0,15	0,16

Anexos

92526	1,15	0,16	0,72	0,42	-0,57	0,06	-0,38	-0,09	-0,46	0,19	-0,19	0,15	-0,11	-0,13	0,08	-0,28
92574	-1,65	1,33	-0,01	1,60	-0,38	-1,09	0,39	-0,15	0,34	-0,90	-0,77	-0,93	-0,73	-0,19	0,04	0,74
92584	-1,05	-0,31	-0,12	-0,34	-0,39	-0,01	0,38	-0,06	-0,14	-0,75	-0,77	0,05	-0,25	0,74	0,52	0,69
92601	1,22	0,60	-0,02	1,54	0,03	-0,44	-0,60	-0,74	-0,03	-0,34	0,63	0,30	0,06	-0,11	-0,57	-0,41
92652	1,09	0,10	0,60	0,73	-0,76	-0,04	-0,23	-0,15	-0,13	-0,01	-0,53	0,11	-0,63	-0,03	-0,10	-0,14
92915	1,43	0,28	1,03	0,92	-0,95	-0,06	-0,32	-0,05	-0,65	0,02	-0,62	-0,01	-0,30	-0,08	0,32	-0,07
92926	3,13	0,56	2,86	2,50	-2,03	0,31	0,14	0,08	-0,66	0,05	-2,17	0,23	-1,37	0,26	0,80	0,03
93008	1,47	0,23	1,35	0,49	-1,40	-0,50	-0,22	-0,09	-0,68	-0,45	-1,18	-0,41	-0,72	-0,05	0,46	0,36
93062	4,93	3,05	4,38	4,78	-1,45	-0,15	-0,40	-0,20	-0,81	-0,03	-1,05	0,05	-0,64	-0,12	0,41	-0,17
93071	3,39	0,89	3,27	2,84	-2,48	0,14	-0,20	0,16	-0,61	0,14	-2,27	-0,02	-1,87	0,00	0,40	0,02
93091	2,23	0,28	1,63	1,62	-1,49	0,18	-0,13	0,07	-0,37	0,17	-1,36	0,11	-1,12	0,02	0,24	-0,09
93098	2,33	0,75	2,12	2,13	-1,63	-0,17	-0,13	0,12	-0,42	0,08	-1,50	-0,29	-1,21	-0,25	0,29	0,05
93247	1,28	0,13	1,95	0,48	-2,04	-0,24	-0,11	-0,26	-0,59	-0,62	-1,92	0,02	-1,44	0,38	0,48	0,36
93536	1,38	0,13	1,20	0,48	-1,05	-0,10	-0,27	0,06	-0,58	0,00	-0,79	-0,16	-0,48	-0,10	0,31	0,07
93715	-2,14	-1,32	-1,29	-1,27	0,51	0,56	-0,69	0,27	-0,01	0,64	1,21	0,29	0,52	-0,07	-0,69	-0,36
93745	2,03	0,18	1,89	1,14	-2,11	0,00	-0,18	-0,02	-0,51	-0,08	-1,93	0,02	-1,60	0,08	0,33	0,06
93754	1,27	0,11	1,39	1,07	-1,82	-0,04	-0,32	-0,16	-0,40	-0,06	-1,49	0,13	-1,42	0,02	0,07	-0,10
93837	2,14	0,51	0,64	1,49	-0,54	-0,35	-0,42	-0,53	-0,32	-0,32	-0,13	0,18	-0,22	-0,03	-0,09	-0,21
93855	-1,13	-1,43	-0,66	-0,33	1,35	1,82	0,94	0,98	1,06	1,51	0,41	0,83	0,29	0,30	-0,12	-0,53
93912	1,41	0,04	0,31	0,80	-0,87	0,09	-0,43	-0,25	-0,31	-0,22	-0,45	0,34	-0,57	0,31	-0,12	-0,03
93926	-1,30	-0,60	-0,36	-0,57	0,76	0,55	0,13	0,50	0,08	0,91	0,63	0,05	0,68	-0,36	0,05	-0,41
93983	1,06	0,28	0,53	0,63	-0,21	0,30	-0,30	-0,61	-0,37	-0,26	0,09	0,91	0,16	0,56	0,07	-0,35
93988	-2,06	-1,06	-0,57	-1,50	-0,03	0,49	0,19	0,25	0,02	0,17	-0,22	0,23	-0,05	0,32	0,17	0,08
94003	2,09	0,65	2,05	2,05	-1,67	-0,01	-0,06	0,06	-0,33	0,02	-1,61	-0,07	-1,34	-0,03	0,27	0,04
94033	1,53	1,00	1,40	0,83	-1,35	-0,45	-0,71	-0,50	-0,67	-0,29	-0,64	0,05	-0,67	-0,15	-0,03	-0,20
94043	3,63	1,69	3,53	2,73	-2,04	-0,22	-0,22	-0,11	-0,74	-0,09	-1,82	-0,11	-1,30	-0,13	0,52	-0,02
94089	4,04	4,47	4,37	4,27	-0,65	-0,08	-0,43	0,28	-0,20	0,26	-0,22	-0,36	-0,45	-0,34	-0,23	0,02
94094	1,01	-0,09	0,71	0,35	-0,96	-0,04	0,10	0,15	0,01	0,03	-1,06	-0,20	-0,97	-0,08	0,09	0,12
94165	1,22	0,53	0,30	0,90	0,73	-0,35	-0,31	-0,19	-0,04	0,01	1,04	-0,17	0,77	-0,36	-0,27	-0,20
94317	1,07	-0,11	0,53	0,74	-0,30	0,61	0,05	-0,05	-0,10	0,33	-0,36	0,66	-0,20	0,27	0,16	-0,39
94340	2,66	1,27	2,27	2,03	-1,21	-0,09	-0,36	-0,26	-0,47	-0,23	-0,85	0,17	-0,74	0,14	0,11	-0,03
94397	4,81	-0,18	3,09	3,03	-3,59	-0,08	-0,47	-0,22	-0,58	-0,03	-3,12	0,14	-3,01	-0,05	0,11	-0,19
94435	1,35	1,57	0,57	2,63	-0,16	-0,99	-0,71	-0,63	-0,30	-0,56	0,54	-0,35	0,14	-0,43	-0,40	-0,07
94488	-1,21	-0,14	0,20	-0,23	-0,31	0,23	0,69	0,23	-0,22	-0,90	-1,00	0,00	-0,09	1,12	0,91	1,12
94508	0,10	0,40	0,09	0,34	-1,49	-1,61	-1,51	-1,68	-1,49	-1,31	0,02	0,07	0,01	-0,30	-0,01	-0,37
94519	1,17	1,14	0,57	1,62	-0,28	-0,63	-0,24	-0,17	-0,24	-0,05	-0,05	-0,46	-0,05	-0,59	0,00	-0,12
94549	1,65	0,22	0,72	0,23	-0,55	0,03	-0,07	0,41	-0,31	0,63	-0,48	-0,38	-0,24	-0,60	0,24	-0,22
94693	4,34	1,13	5,05	0,24	-4,07	-0,03	-0,45	-0,59	-6,33	-2,00	-3,62	0,56	2,27	1,97	5,88	1,41
94757	1,89	0,25	1,55	1,87	-1,64	-0,16	-0,23	-0,34	-0,34	-0,19	-1,41	0,18	-1,30	0,02	0,11	-0,15
94762	4,14	0,46	3,84	2,77	-3,77	-0,11	-1,04	-0,25	-0,38	0,40	-2,73	0,14	-3,39	-0,51	-0,65	-0,64
94768	-1,03	-0,60	-0,64	-0,75	-0,22	0,43	0,23	0,34	0,13	0,32	-0,45	0,09	-0,35	0,11	0,10	0,02
94824	1,09	1,06	0,54	1,90	0,06	-0,59	0,21	-0,01	0,21	-0,21	-0,15	-0,58	-0,15	-0,38	0,00	0,20
94903	2,81	1,05	2,78	3,28	-2,20	-0,16	-2,76	-2,78	-0,34	-0,16	0,56	2,63	-1,86	0,01	-2,42	-2,62
94937	1,65	0,04	0,29	0,80	-0,73	0,12	-0,42	-0,35	-0,30	-0,19	-0,31	0,47	-0,43	0,31	-0,12	-0,16
94953	5,51	3,43	6,29	4,72	-2,82	-0,10	0,34	-0,03	-0,69	-0,09	-3,16	-0,07	-2,13	-0,01	1,03	0,06

94975	2,34	0,29	1,30	1,22	-1,88	0,00	-0,46	0,04	-0,41	0,02	-1,42	-0,04	-1,46	-0,02	-0,05	0,02
95035	1,69	0,09	1,80	1,49	-1,81	-0,07	-0,02	0,11	-0,16	-0,02	-1,79	-0,19	-1,64	-0,06	0,15	0,13
95039	1,28	0,07	0,66	0,90	-0,54	-0,06	-0,05	-0,14	-0,21	0,11	-0,49	0,08	-0,33	-0,16	0,16	-0,25
95127	2,77	2,21	4,10	1,79	-2,97	-0,73	-0,56	-0,22	-0,65	-0,39	-2,41	-0,52	-2,32	-0,34	0,09	0,18
95149	5,50	4,68	6,83	6,16	-2,56	-0,28	0,08	-0,11	-0,30	-0,24	-2,64	-0,17	-2,26	-0,05	0,39	0,12
95180	1,95	0,43	1,68	1,61	-1,76	0,09	-0,26	-0,33	-0,30	-0,17	-1,50	0,42	-1,46	0,26	0,04	-0,16
95230	1,48	-0,02	0,33	0,70	-0,86	0,14	-0,38	-0,15	-0,27	-0,09	-0,48	0,29	-0,59	0,23	-0,11	-0,06
95243	1,00	-0,71	0,06	0,23	0,01	0,36	-0,60	-0,97	-0,65	-0,28	0,61	1,34	0,66	0,64	0,05	-0,70
95324	-1,55	-0,92	-0,63	-1,11	-0,39	0,53	0,33	0,74	0,06	0,13	-0,72	-0,21	-0,45	0,40	0,27	0,61
95350	1,59	0,00	0,36	0,76	-0,73	0,17	-0,34	-0,32	-0,20	-0,15	-0,39	0,49	-0,53	0,32	-0,14	-0,16
95354	-1,48	-0,54	0,87	-1,38	-2,04	-1,27	0,74	-0,16	-1,41	-2,01	-2,78	-1,11	-0,63	0,74	2,15	1,85
95476	1,45	-0,02	0,65	0,22	-0,90	0,19	0,05	0,70	-0,05	0,41	-0,95	-0,51	-0,85	-0,22	0,09	0,29
95484	1,35	0,18	2,28	1,74	-1,82	0,11	-0,40	-0,71	-0,32	0,09	-1,42	0,82	-1,50	0,02	-0,08	-0,80
95570	1,26	0,55	0,46	1,06	-0,39	-0,23	-0,51	-0,04	-0,34	0,11	0,12	-0,19	-0,05	-0,34	-0,17	-0,15
95724	2,05	0,27	0,61	1,47	-0,67	-0,09	-0,36	-0,16	-0,15	0,01	-0,31	0,08	-0,52	-0,10	-0,21	-0,18
95734	1,64	0,55	1,81	0,61	-1,83	-0,69	-0,67	-0,45	-0,96	-0,52	-1,16	-0,24	-0,87	-0,17	0,29	0,07
95789	3,52	2,74	2,81	2,54	-0,53	-0,28	-0,54	-0,12	-0,40	0,09	0,01	-0,16	-0,13	-0,37	-0,14	-0,21
95795	1,88	0,72	2,19	2,23	-1,59	-0,16	0,02	-0,03	-0,28	-0,20	-1,61	-0,13	-1,31	0,04	0,30	0,17
95867	-1,10	-0,51	-0,11	-0,58	-0,40	0,15	0,47	0,24	-0,25	-0,82	-0,88	-0,09	-0,15	0,97	0,72	1,06
95880	1,03	0,95	0,50	0,91	-0,34	-1,05	-0,28	-0,37	-0,10	-0,41	-0,07	-0,67	-0,25	-0,64	-0,18	0,03
96002	6,53	2,24	6,03	5,68	-4,42	0,05	-0,37	-0,03	-0,71	-0,20	-4,05	0,08	-3,71	0,25	0,34	0,17
96023	-2,45	-1,37	-0,78	-1,79	1,04	0,96	2,38	1,33	1,12	0,32	-1,34	-0,37	-0,08	0,63	1,27	1,01
96051	3,91	3,32	4,33	3,88	-1,43	-0,24	-0,18	-0,26	-0,45	-0,20	-1,25	0,01	-0,97	-0,05	0,28	-0,06
96073	1,27	0,04	0,29	0,23	-0,49	-0,02	-0,33	-0,20	-0,15	0,08	-0,16	0,18	-0,34	-0,10	-0,18	-0,28
96109	1,49	0,40	1,19	1,23	-1,16	0,04	0,11	0,12	-0,25	0,27	-1,27	-0,08	-0,91	-0,23	0,35	-0,15

