

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE LA
CAROTENOGÉNESIS EN *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex
Phaffia rhodozyma)**

Tesis

entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Microbiología

Facultad de Ciencias

Por

Patricia Beatriz Lodato

Diciembre de 2002

Director de Tesis: Dr. Víctor Cifuentes

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) por el otorgamiento de la beca que me permitió realizar estudios de Doctorado.

A la Universidad de Chile y a los profesores del Programa de Microbiología por la formación científica impartida.

Al Dr. Víctor Cifuentes por las facilidades brindadas para la ejecución de esta tesis.

A todos mis compañeros de laboratorio, especialmente a Salvador Barahona por su permanente buena disposición para ayudar a los demás.

A la Dra. Margarita Carú y a toda la gente de su laboratorio por la ayuda mutua y las relaciones cordiales que hemos mantenido durante estos años.

A Silvia Cardona quien siempre me ayudó en forma incondicional.

A mis amigos Rafael Guevara, Pilar Corredor, Mónica Chávez, Juan Carlos Tantaleán, Mario Barro y Gino Corsini por los buenos momentos compartidos y la colaboración que siempre me brindaron.

A Raquel Quatrini, por sus cualidades personales y científicas y, especialmente, por su gran amistad.

A mis padres Carmen Vilar y Antonio Lodato, quienes siempre me transmitieron su apoyo y estímulo permanente aún desde la distancia.

A todas aquellas personas que con sus pequeños detalles supieron darme fuerzas para lograr mis objetivos.

ÍNDICE DE MATERIAS

Agradecimientos	iii
Índice de materias	iv
Lista de Figuras	vii
Lista de Tablas	x
Lista de Abreviaturas	xi
Resumen	xii
Abstract	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Carotenoides: estructura, propiedades y funciones	1
1.2. <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	5
1.3. Genética molecular de la síntesis de carotenoides y astaxantina	7
1.4. Regulación de la síntesis de carotenoides	12
2. MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1. Cepas y plásmidos	16
2.2. Cultivo de <i>X. dendrorhous</i>	16
2.2.1. Cultivo en matraces	16
2.2.2. Cultivo en fermentador	16
2.3. Técnicas de biología molecular	18
2.3.1. Extracción de DNA cromosómico de <i>X. dendrorhous</i>	18
2.3.2. Extracción de DNA plasmidial	19
2.3.3. Digestiones con enzimas de restricción	19

2.3.4. Ligaciones de DNA	19
2.3.5. Preparación de células electrocompetentes	20
2.3.6. Electrotransformación	20
2.3.7. Electroforesis de DNA	21
2.3.8. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa	21
2.3.9. Extracción de RNA total de <i>X. dendrorhous</i>	21
2.3.10. Transcripción reversa	22
2.4. Amplificación por PCR	23
2.4.1. Amplificación del cDNA de los genes <i>crtI</i> y <i>crtYB</i>	23
2.4.2. Amplificación para determinar los niveles relativos de los mensajeros de carotenogénesis	23
2.4.3. PCR en tiempo real	24
2.5. Análisis de secuencias y números de acceso	26
2.6. Técnicas bioquímicas	27
2.6.1. Determinación de glucosa	27
2.6.2. Determinación de etanol	27
2.7. Extracción de carotenoides	27
2.8. Determinación de biomasa	28
3. RESULTADOS	29
3.1. Aislamiento de mensajeros procesados en forma alternativa	29
3.2. Estandarización de las condiciones de transcripción reversa acoplada a PCR (RT-PCR)	49

3.3. Estudios fisiológicos	57
3.3.1. Crecimiento de la cepa silvestre y de dos mutantes sobreproductoras de carotenoides en matraces	57
3.3.2. Cultivo de la cepa silvestre y de la mutante <i>atxS2</i> en un fermentador	59
3.3.2.1. Análisis de la producción de carotenoides y otras variables a lo largo del ciclo de vida	59
3.3.2.2. Análisis de la expresión de los genes de carotenogénesis en la cepa silvestre y en la mutante <i>atxS2</i>	63
3.3.2.2.1. Gen <i>idi</i> (isopentenil pirofosfato isomerasa)	63
3.3.2.2.2. Gen <i>crtE</i> (geranilgeranil pirofosfato sintasa)	63
3.3.2.2.3. Gen <i>crtYB</i> (fitoeno- β -caroteno sintasa)	66
3.3.2.2.4. Gen <i>crtI</i> (fitoeno desaturasa)	69
3.3.2.2.5. Gen <i>ast</i> (astaxantina sintetasa)	74
4. DISCUSIÓN	76
4.1. Análisis de la estructura y origen del primer intrón de los genes <i>crtYB</i> y <i>crtI</i>	76
4.2. Análisis de los mensajeros procesados en formas alternativa	85
4.3. Análisis de la producción de carotenoides y otras variables a lo largo del ciclo de crecimiento.	94
4.4. Análisis de la expresión de los genes de carotenogénesis	96
4.5. Modelo de la síntesis de carotenoides	101
5. CONCLUSIONES	105
6. BIBLIOGRAFIA	108

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de carotenoides	2
Figura 2. Ruta de biosíntesis de carotenoides	8
Figura 3. Amplificación mediante RT-PCR del cDNA del gen <i>crtI</i>	30
Figura 4. Esquema del mRNA maduro y alternativo del gen <i>crtI</i>	32
Figura 5. Alineamiento de los cDNAs del gen <i>crtI</i> de la cepa UCD 67-385 con el gen <i>crtI</i> de la cepa CBS 6938	33
Figura 6. Amplificación del gen <i>crtI</i> con los partidores CRTI1-CRTI4 y CRTI-AF-CRTI4	38
Figura 7. Nivel de expresión del gen <i>crtI</i> a lo largo del ciclo de crecimiento	40
Figura 8. Amplificación mediante RT-PCR del cDNA del gen <i>crtYB</i>	41
Figura 9. Esquema del mRNA maduro y alternativo del gen <i>crtYB</i>	42
Figura 10. Alineamiento de los cDNAs del gen <i>crtYB</i> de la cepa UCD 67-385 con el gen <i>crtYB</i> de la cepa CBS 6938	44
Figura 11. Nivel de expresión del gen <i>crtYB</i> a lo largo del ciclo de crecimiento	48
Figura 12. Amplificación mediante RT-PCR de los mRNA <i>idi</i> , <i>crtE</i> , <i>crtYB</i> , <i>ast</i> y <i>act</i>	50
Figura 13. Condiciones experimentales para las reacciones de RT-PCR según la concentración de cDNA de hebra simple y número de ciclos.	52
Figura 14. Condiciones experimentales para las reacciones de RT-PCR según la concentración inicial de RNA total.	53
Figura 15. Amplificación de los cDNAs de los genes <i>act</i> , <i>idi</i> y <i>crtE</i>	

mediante PCR en tiempo real	55
Figura 16. Amplificación de distinto número inicial de moléculas de cDNA de los genes <i>act</i> y <i>crtE</i>	56
Figura 17. Nivel de expresión de los mensajeros de carotenogénesis en la cepa silvestre y en mutantes por cultivo en matraces con medio YM	58
Figura 18. Producción de carotenoides en la cepa silvestre y la mutante atxS2 por cultivo en un fermentador con medio YM	60
Figura 19. Cinética de la expresión del gen <i>idi</i> en la cepa silvestre y en la mutante atxS2	64
Figura 20. Cinética de la expresión del gen <i>crtE</i> en la cepa silvestre y en la mutante atxS2	65
Figura 21. Cinética de los niveles de mRNA maduro y alternativo del gen <i>crtYB</i> en la cepa silvestre y en la mutante atxS2.	67
Figura 22. Cinética de los niveles de mRNA maduro y alternativo del gen <i>crtI</i> en la cepa silvestre y en la mutante atxS2	70
Figura 23. Cinética de la expresión del mRNA maduro del gen <i>crtI</i> en relación al mRNA alternativo en la cepa silvestre y en la mutante atxS2	73
Figura 24. Cinética de la expresión del gen <i>ast</i> en la cepa silvestre y en la mutante atxS2	75
Figura 25. Análisis del primer intrón del gen de la fitoeno- β -caroteno sintasa de hongos.	77
Figura 26. Alineamiento de madurasas	80
Figura 27. Análisis del primer intrón del gen de la fitoeno desaturasa de hongos	82

Figura 28. Alineamiento de las secuencias de la proteína fitoeno desaturasa de hongos	85
Figura 29. Alineamiento de las secuencias de la proteína fitoeno- β -caroteno sintasa de hongos	87
Figura 30. Modelo de la síntesis de carotenoides en <i>X. dendrorhous</i>	102

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en esta tesis	17
Tabla 2. Partidores utilizados en esta tesis.	25
Tabla 3. Producción de biomasa, carotenoides y etanol por la cepa silvestre UCD 67-385 y la mutante atxS2.	62

LISTA DE ABREVIATURAS

Ap, ampicilina

BSA, seroalbúmina bovina

cDNA, DNA complementario al mRNA

DEPC, Dietil pirocarbonato

EDTA, ácido etilén diamino tetraacético

GGPP, geranilgeranil pirofosfato

IPP, isopentenil pirofosfato

LB, Luria-Bertani

RT, transcripción reversa

TAE, Tris-acetato EDTA

X-Gal, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

RESUMEN

La astaxantina (3, 3'-dihidroxi- β , β caroteno-4, 4' diona) es un pigmento carotenoide con reconocidas propiedades antioxidantes sintetizado por la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Los genes que codifican para las enzimas involucradas en la biosíntesis de astaxantina en esta levadura han sido clonados y secuenciados. Dichos genes incluyen al *idi* (isopentenil pirofosfato isomerasa), *crtE* (geranilgeranil pirofosfato sintasa), *crtYB* (fitoeno- β -caroteno sintasa), *crtI* (fitoeno desaturasa) y *ast* (astaxantina sintetasa). Si bien en otros organismos carotenogénicos eucariotas existen numerosos trabajos a cerca de la expresión de los genes de carotenogénesis, en *X. dendrorhous* no había hasta el momento información al respecto.

En esta tesis se estudió la correlación entre la producción de carotenoides y la expresión de los genes de carotenogénesis a nivel de sus mRNAs.

Utilizando RT-PCR, se clonaron y secuenciaron dos tipos distintos de cDNAs del gen *crtI*. Uno de ellos, fue sintetizado a partir de un mRNA con todos sus intrones procesados en forma correcta, por lo cual este mRNA maduro se traduciría a la proteína fitoeno desaturasa activa. El otro cDNA se sintetizó a partir de un mRNA que conservó 80 bases del primer intrón. Este mensajero, denominado alternativo, sería procesado en un sitio 3' de 'splicing' alternativo (AG) no habitual. La traducción del mensajero alternativo genera codones de término de la traducción a lo largo de toda la secuencia, por lo cual no sería traducido a una proteína fitoeno desaturasa activa. De igual forma, se aislaron tres cDNAs distintos para el gen *crtYB*. Uno de los cDNAs fue sintetizado a partir del mRNA maduro y por lo tanto sería

traducido a la proteína fitoeno- β -caroteno sintasa activa. Sin embargo, el segundo cDNA tenía todos los intrones y por consiguiente, fue sintetizado a partir de un pre-RNA. El tercer cDNA se sintetizó a partir de un mensajero que había conservado 55 bases del primer intrón y había perdido 111 bases del segundo exón. Este mensajero, también denominado alternativo, sería procesado dentro del primer intrón en un sitio 5' de 'splicing' (GT) no esperado y dentro del segundo exón en un sitio 3' de 'splicing' (AG) alternativo. La traducción de este mensajero, genera como en el caso del mensajero alternativo del gen *crtI*, codones de término de la traducción prematuros. El análisis de la expresión de los mensajeros *crtI* y *crtYB* alternativos y maduros indica que se sintetizan con niveles variables a lo largo del ciclo de vida tanto en la cepa silvestre UCD 67-385 como en una cepa sobreproductora denominada atxS2. Con respecto al gen *crtI*, se observó que la proporción mensajero maduro/mensajero alternativo disminuye a lo largo del ciclo de crecimiento de la levadura. Es posible que la síntesis de mensajeros alternativos sea una forma de regular la síntesis de las proteínas de carotenogénesis.

La comparación de los primeros intrones de los genes de la fitoeno desaturasa entre *X. dendrorhous* y ascomicetes, indicaría que este grupo de hongos no tendría la forma de 'splicing' descrita en este trabajo, puesto que carecen de los sitios de 'splicing' alternativo. Un análisis similar con el gen que codifica la fitoeno- β -caroteno sintasa nos permitió arribar a la misma conclusión. Hasta el momento no se ha descrito 'splicing' alternativo en genes de carotenogénesis de otros organismos.

Con respecto a la síntesis de carotenoides, se observó que en la cepa UCD 67-385 la síntesis se induce al finalizar la fase exponencial de crecimiento. En la cepa mutante atxS2, la concentración celular de carotenoides es 4 veces más alta que en la

cepa silvestre durante la fase exponencial de crecimiento. Por consiguiente, la síntesis de carotenoides en la mutante está desregulada desde el inicio del ciclo de crecimiento. En relación con la expresión de los genes que codifican para las enzimas de carotenogénesis en la cepa UCD 67-385, los niveles de los mensajeros fueron máximos durante el período de inducción de la síntesis de carotenoides. Sin embargo, los niveles de los mensajeros *crtYB*, *crtI*, *ast* e *idi*, en menor medida, disminuyeron sus niveles al finalizar la fase exponencial de crecimiento. Con respecto al nivel del mRNA del gen *crtE*, el mismo se mantuvo elevado durante el período diauxia-fase estacionaria. Por otra parte, en la cepa atxS2 los niveles de los mensajeros *crtE*, *crtI* y *ast* son alrededor de 2 veces el nivel que se encuentra en la cepa silvestre en una etapa temprana del ciclo de crecimiento. El nivel del mRNA del gen *ast* en la cepa atxS2 también es más elevado que en la cepa silvestre durante la fase estacionaria. Estos resultados podría explicar al menos parcialmente, la mayor producción de carotenoides en la cepa mutante.

ABSTRACT

Astaxanthin (3, 3'-dihydroxy- β , β carotene-4, 4'-dione) is a carotenoid pigment with well-known antioxidant properties which is synthesized by the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. The genes controlling the astaxanthin biosynthesis in *X. dendrorhous* have been isolated. The cloned and sequenced genes include: *idi* (isopentenyl pyrophosphate isomerase), *crtE* (geranylgeranyl pyrophosphate synthase), *crtYB* (phytoene- β -carotene synthase), *crtI* (phytoene desaturase) and *ast* (astaxanthin synthetase). There are several studies on the expression of carotenogenic genes in eukaryotes. In this thesis the production of carotenoids in *X. dendrorhous* was studied in relation to the expression of carotenogenic genes at the mRNA level as in this yeast there are no studies about the carotenogenic transcripts or proteins levels.

Two different cDNAs of the *crtI* gene were cloned and sequenced using RT-PCR. One of them corresponded to the mature mRNA of the *crtI* gene as it has no intervening sequences and thus, it could be translated to active phytoene desaturase protein. The other cDNA was synthesized from a transcript which conserved 80 bases of the first intron. This transcript, named alternative, would follow an alternative splicing pathway using an unusual 3' splice site (AG). Nucleotide sequence translation of this messenger produces premature stop codons and therefore it would not be translated to the phytoene desaturase protein. Similarly, three different cDNAs were amplified using RT-PCR with specific primers for the *crtYB* gene. The sequence analysis of these cDNAs indicated that one of them corresponded to the mature transcript as it had no intervening sequences. However,

the second cDNA had all the intervening sequences and therefore it was synthesized from a pre-RNA. The third cDNA corresponded to a mRNA which had conserved 55 bases of the first intron and had lost 111 bases from the second exon. This alternative mRNA could have followed an alternative splicing pathway using an unexpected 5' splice site inside the first intron and an unexpected 3' splice site inside the second exon. As it was stated with the *crtI* alternative mRNA, nucleotide sequence translation of the *crtYB* alternative mRNA produces premature stop codons. In addition, mature and alternative transcripts of both *crtI* and *crtYB* genes are detected with varying levels along the yeast growth cycle in the wild-type strain UCD 67-385 and in the astaxanthin over-producing strain atxS2.

The ratio of mature messenger/alternative transcripts of the *crtI* gene diminished along the yeast life cycle. It is possible that the synthesis of alternative mRNAs could be a way to regulate the concentration of carotenogenic proteins.

On the other hand, the sequence comparison of the first intron of the phytoene desaturase gene among *X. dendrorhous* and ascomycetous fungi, suggests that the RNA of that gene in ascomycetes would not follow an alternative splicing pathway as described in *X. dendrorhous* because they lack the alternative splice sites. The same conclusion was obtained after performing a similar analysis with the phytoene- β -carotene synthase gene from fungi. As far as we know, alternative splicing has not been reported in carotenogenic genes before.

The carotenoid biosynthesis is induced after finishing the exponential phase of the growth cycle in the UCD 67-385 strain. In the atxS2 strain, the cellular concentration of carotenoids is four times greater than in the wild-type strain during the exponential phase of the growth cycle, and thus, the mutant is deregulated for

carotenoid production. With regard to the carotenogenic gene expression, the highest mRNA levels in the wild-type strain were during the induction period of carotenoid biosynthesis. However, the mRNA level of the *crtYB*, *crtI* and *ast* genes, and to a lesser extent the *idi* gene, diminished after the exponential phase of the growth cycle. With respect to the *crtE* gene, its mRNA level remained high after the exponential phase. In strain atxS2, mRNA levels of *crtE*, *crtI* and *ast* genes were approximately two times higher than in the wild-type strain in an early culture time of the growth cycle. In addition, the mRNA level of the *ast* gene is higher in the atxS2 strain than in the wild-type strain during stationary phase. These results could partially explain the increased carotenoid production by the mutant strain.

1. INTRODUCCION

1.1. Carotenoides: estructura, propiedades y funciones

Según Britton (1995), los carotenoides no son solamente 'otro grupo de pigmentos naturales'. Esta afirmación está basada en sus estructuras particulares y propiedades químicas que constituyen la base de sus variadas funciones biológicas, en prácticamente todos los organismos. Los carotenoides son sintetizados por organismos fotosintéticos y no fotosintéticos, tanto procariotas como eucariotas, mientras que los animales deben incorporarlos con la dieta (Armstrong, 1994; Armstrong, 1997; Britton, 1998). Si bien se ha descrito una gran variedad de compuestos (más de 600), todos los carotenoides presentan características químicas comunes: una estructura poli-isoprenoide, una larga cadena alifática con dobles enlaces conjugados y simetría. Esta estructura básica, puede ser modificada de diversas formas tal como la adición de grupos oxigenados. Los intensos colores amarillo, rojo y naranja de estos pigmentos se originan por su capacidad de absorber la luz entre los 400 y 500 nm. Algunos ejemplos de carotenoides que se encuentran en la naturaleza se muestran en la figura 1. Los carotenoides cuya estructura es una cadena hidrocarbonada con extremos cíclicos o no cíclicos se denominan carotenos, mientras que si tienen grupos oxigenados se denominan xantófilas. Los grupos oxigenados pueden ser hidroxilos, ceto, epoxi, metoxi, carboxi, etc.

La función más evidente de los carotenoides es la coloración que otorgan a flores y frutos para la atracción de polinizadores y agentes dispersantes de semillas.

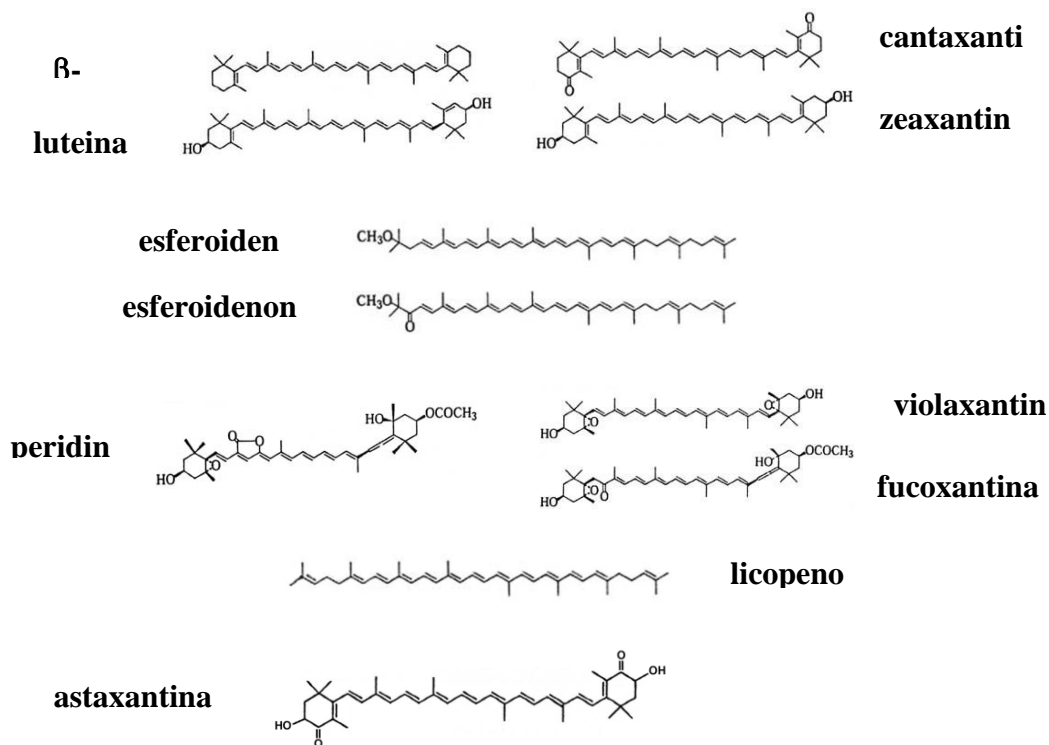


Figura 1. Algunas estructuras de carotenoides encontrados en la naturaleza

Sin embargo, la propiedad de los carotenoides de absorción de la luz, les otorga funciones esenciales en organismos fotosintéticos. Por un lado, colaboran en los sistemas de antena en la captación de luz mediada por la clorofila, pero aún más importante es su capacidad de disipar el exceso de radiación que puede pasar al oxígeno produciendo una forma destructiva denominada estado singlete o singulete ($^1\text{O}_2$) (Armstrong, 1997; Britton, 1995). Se ha descrito que mutantes incapaces de sintetizar

carotenoides bajo condiciones de estrés foto-oxidativo, presentan rearrreglos en el genoma y una mayor frecuencia de mutación (Ouchane y cols., 1997). Por otra parte, se ha descrito también un efecto protector de los carotenoides contra la radiación UV-B. (Sandmann y cols., 1998; Götz y cols.,1999).

Otra característica de los carotenoides que ha despertado enorme interés por su repercusión en la salud humana, es su capacidad de reaccionar con radicales derivados del oxígeno los cuales han sido implicados en envejecimiento y enfermedades degenerativas (Canfield y cols., 1992; Edge y Truscott, 1999). En trabajos realizados en cultivos de células y modelos animales se ha establecido un rol protector de los carotenoides contra la formación de células cancerosas (Bertram, 1999). Otro aspecto interesante relacionado con los efectos antitumorales de los carotenoides, es su actividad exaltadora del sistema inmune (Hughes, 2001).

La naturaleza hidrofóbica de los carotenoides determina que estén comúnmente localizados en membranas, y la estructura del carotenoide determina la orientación dentro de la misma. De esta forma, los carotenos hidrocarbonados como el β -caroteno o el licopeno, permanecen totalmente dentro de la bicapa lipídica en distintas orientaciones, mientras que la presencia de sustituyentes polares como grupos hidroxilos, afectan profundamente la orientación. La zeaxantina, por ejemplo, se encuentra atravesando la bicapa lipídica con los grupos polares hacia el exterior de la membrana, confiriéndole mayor rigidez y resistencia mecánica (Gruszecki, 1999; Young y Lowe, 2001). Estas características, determinan que los carotenoides como el licopeno, puedan reaccionar solamente en forma eficiente con radicales generados en la porción

hidrofóbica de la membrana, mientras que las xantófilas con sus grupos polares orientados hacia el exterior de la membrana, pueden reaccionar con radicales libres generados fuera de la porción hidrofóbica (Britton, 1995). Es decir, la presencia de carotenoides en las membranas biológicas tiene un profundo efecto en la fluidez, permeabilidad y protección contra estrés oxidativo de las mismas, y por consiguiente, en el funcionamiento celular y la comunicación célula-célula.

Finalmente, los carotenoides pueden ser precursores de otros metabolitos como vitamina A, ácido retinoico (regulador del crecimiento celular), retinal (cromóforo de pigmentos visuales) y ácido absícico (hormona vegetal) (Armstrong, 1994; Rock and Zeevaart, 1991; Britton, 1998).

La astaxantina (3, 3'-dihidroxi- β , β caroteno-4, 4'-diona) posee muchas de las propiedades de los carotenoides anteriormente mencionadas. Es sintetizada por bacterias marinas (*Agrobacterium aurantiacum*, *Pseudomonas* sp. y *Flavobacterium* sp) (Liaaen-Jensen, 1998), el alga *Haematococcus pluvialis* (Lorenz y Cysewski, 2000) y la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Andrews cols., 1976). Se ha demostrado en sistemas modelo de membrana, que es un potente antioxidante contra la peroxidación de lípidos (Palozza y Krinsky, 1992). Barros y cols. (2001) han sugerido que su efecto antioxidante estaría dado en parte por una disminución de la fluidez de las membranas, que impediría la penetración de agentes promotores de la peroxidación de lípidos. Por otra parte, se ha descrito que la astaxantina presenta propiedades antitumorales que estarían relacionadas con su efecto sobre el sistema inmune (Tanaka y cols., 1994; Jyonouchi y cols., 2000). La producción de este pigmento ha despertado gran interés, puesto que debe

suministrarse en el alimento de animales criados en cautiverio como salmónidos, para que la carne adquiriera la coloración adecuada y exigida por los consumidores (Johnson, 1977).

1.2. *Xanthophyllomyces dendrorhous*

X. dendrorhous es una levadura basidiomicete aislada de exudados de árboles de regiones frías y presenta como característica única entre las levaduras carotenogénicas, la capacidad de fermentar glucosa con producción de etanol (Andrewes y cols., 1976). La astaxantina es un 83-87 % del contenido total de carotenoides en *X. dendrorhous* y junto con el alga unicelular *Haematococcus pluvialis*, es el microorganismo productor de astaxantina con mayor interés biotecnológico (Miller y cols., 1976; Lorenz y Cysewski, 2000). En lo que respecta al rol que estaría cumpliendo la síntesis de astaxantina, se ha sugerido que el pigmento protegería a la levadura contra estrés oxidativo (Schroeder y Johnson, 1993; 1995a). Puesto que *X. dendrorhous* es un simbiote en árboles, la carotenogénesis sería una respuesta a la presencia de compuestos antifúngicos foto-activables producidos por el árbol (Schroeder y Johnson, 1995b). Por otra parte, según Shroeder y Johnson (1993) la levadura carece de algunos de los mecanismos de defensa frente a estrés oxidativo presentes en otros organismos como Fe-SOD (superóxido dismutasa) y Cu/Zn-SOD

X. dendrorhous como fuente de astaxantina presenta algunas ventajas sobre *H. pluvialis*. La levadura puede proliferar en forma heterótrofa, con mayor velocidad y con una buena producción de biomasa a pesar de ser moderadamente psicrófila. Por otra parte, puede proliferar en sustratos de bajo costo (Calo y González, 1995). Sin

embargo, a pesar de estas ventajas, el principal problema para el uso de *X. dendrorhous* como fuente de astaxantina es la baja producción del pigmento en las cepas silvestres (200 y 400 μg de astaxantina/g de peso seco), que resulta poco atractivo desde un punto de vista industrial. Este hecho, ha motivado la búsqueda de cepas que puedan producir un mayor contenido de astaxantina, y con este objetivo, se ha empleado mutagénesis por tratamiento con luz ultravioleta (Retamales y cols., 1998) o con agentes químicos (nitrosoguanidina y etil-metano-sulfonato) (An y cols., 1989; Lewis y cols., 1990; An, 1997; Bon y cols., 1997; Retamales y cols., 1998).

Por otra parte, se han estudiado las condiciones de cultivo que permiten una alta velocidad de crecimiento junto con una buena producción de astaxantina tanto en cepas silvestres como mutantes. De esta forma, se ha determinado el efecto de la temperatura y el pH del cultivo (Johnson y Lewis, 1979; Meyer y Du Preez, 1994), concentración de glucosa (Johnson y Lewis, 1979; Yamane y cols., 1997), tipos de fuentes de carbono y nitrógeno (Meyer y Du Preez, 1993; 1994; Fang y Cheng, 1993), aireación del cultivo (Yamane y cols., 1997) y efecto de la luz (An y Johnson, 1990).

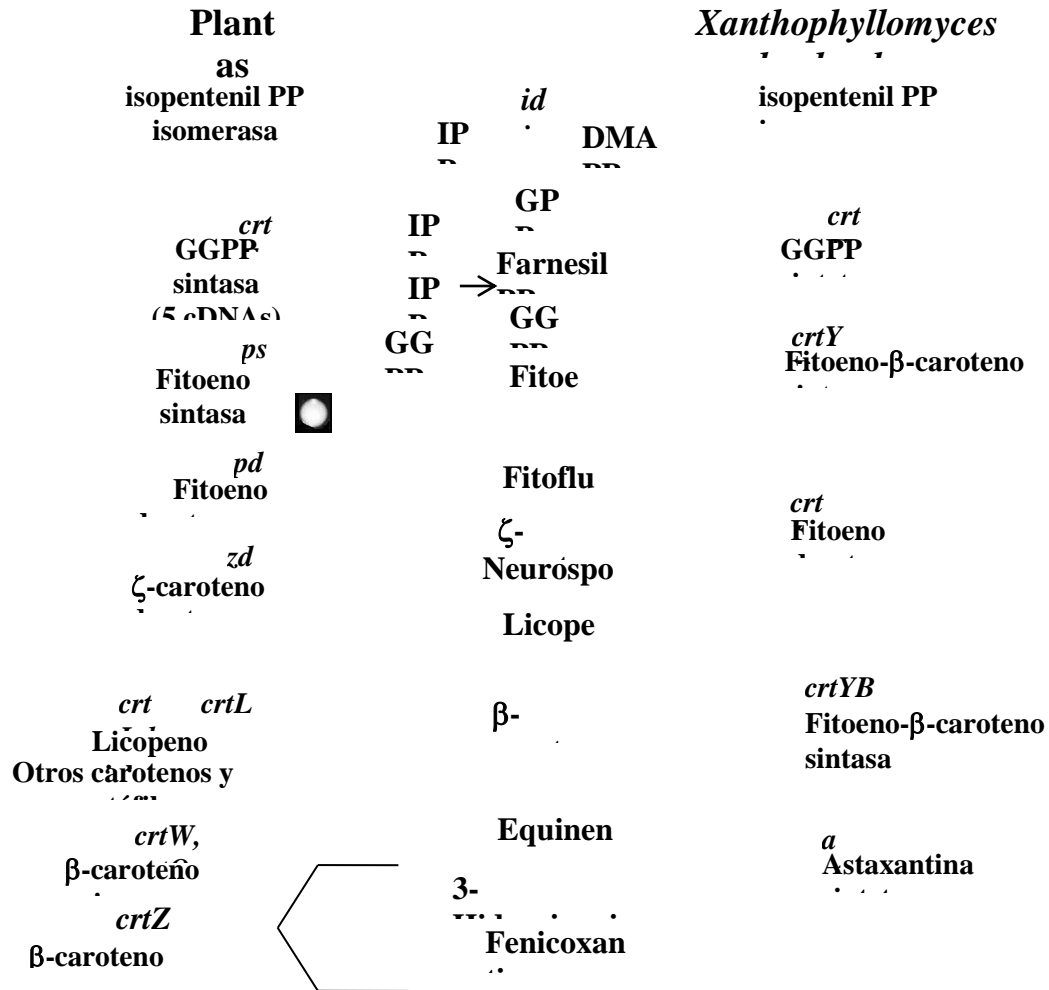
Si bien los trabajos mencionados han aportado información útil en cuanto a la fisiología de la levadura, la aplicación de técnicas tradicionales para el mejoramiento de las cepas silvestres de *X. dendrorhous* no ha conducido a resultados satisfactorios. La mutación al azar ha generado efectos no deseados como inestabilidad genética, falta de reproducibilidad en fermentaciones industriales, y una menor producción de biomasa de las cepas sobreproductoras en comparación con las cepas silvestres (Johnson y Schroeder, 1995). Sin embargo, en los últimos años, el aislamiento de los genes que

codifican para las enzimas de la ruta de biosíntesis de astaxantina permite una nueva aproximación al problema.

1.3. Genética molecular de la síntesis de carotenoides y astaxantina

Todos los carotenoides derivan de la ruta de síntesis de isoprenoides, que son compuestos sintetizados a partir de un metabolito central de 5 carbonos denominado isopentenil pirofosfato (IPP) (Figura 2). La biosíntesis de carotenoides comienza con la isomerización del IPP a dimetilalil pirofosfato (DMAPP), paso reversible catalizado por la enzima IPP isomerasa. En *X. dendrorhous*, se ha aislado un gen (*idi*) y el cDNA correspondiente que codifican para esta enzima (Kajiwara y cols., 1997). En *Arabidopsis* y en el alga *H. pluvialis* se han aislados dos cDNAs distintos (Cunningham y Gantt, 1998; Sun y cols., 1998). En *H. pluvialis*, se sintetizan dos proteínas de 32,5 kDa y 34 kDa que corresponderían a las dos formas de cDNA, y la proteína de 32,5 kDa sería la involucrada en la síntesis de astaxantina.

El siguiente paso de la ruta de biosíntesis es la síntesis del precursor de 20 C geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), por la adición secuencial de tres moléculas de IPP a DMAPP (Figura 2). Este paso está catalizado por la enzima GGPP sintasa. En *X. dendrorhous*, se ha aislado el cDNA del gen *crtE* que codifica para esta enzima (Patente WO9723633) y en nuestro laboratorio se dispone de su versión genómica. En *Arabidopsis*, se han aislado 5 cDNAs diferentes para esta enzima (Cunningham y Gantt, 1998; Hirschberg, 1998).



Astaxa

Figura 2. Esquema de la ruta de biosíntesis de carotenoides. A la derecha se indican los genes y enzimas de la ruta de biosíntesis de astaxantina en *X. dendrorhous*. A la izquierda se indican los genes que se han aislado de plantas y del alga *H. pluvialis*. En color, se muestran colonias de cepas de *E. coli* que

Posteriormente, se ha determinado que las 5 proteínas GGPP sintasas se localizan en distintos compartimientos celulares: citosol o retículo endoplásmico, plástidos y mitocondrias (Okaday cols., 2000). Esta complejidad se relaciona con el hecho que estos compuestos isoprenoides son precursores de otras vías metabólicas como prenilación de proteínas, síntesis de ergosterol, quinonas, giberelinas (en plantas), etc.

La síntesis de fitoeno a partir de la condensación de dos moléculas de GGPP, es el primer paso específico en la síntesis de carotenoides, catalizado por la enzima fitoeno sintasa (Figura 2). Las enzimas fitoeno sintasas de plantas, algas y bacterias comparten regiones de aminoácidos entre sí y con escualeno sintasas (Summers y cols., 1993). La fitoeno sintasa de cloroplastos de tomate (*Lycopersicon esculentum*) ha sido purificada en forma monomérica y activa, aunque también se encontró asociada en complejos proteicos con las enzimas IPP isomerasa y GGPP sintasa (Fraser y cols., 2000). En tomate, se han aislado dos cDNAs (*PSY1* y *PSY2*) que son 83 % idénticos entre sí, el transcripto *PSY1* predomina en semillas y en los estadios tardíos de la maduración de frutos, mientras que el transcripto *PSY2* predomina en hojas (Bartley y cols., 1992; Bartley y Scolnik, 1993).

En *X. dendrorhous*, se ha aislado el gen *crtYB* que codifica para una proteína bifuncional que tiene actividad fitoeno sintasa, pero además tiene actividad licopeno ciclasa (Verdoes y cols., 1999a; Alcaíno, 2002). El gen que codifica esta novedosa clase de enzima carotenogénica ha sido también aislado de los hongos *Neurospora crassa* (Ascomicete) (Arrach y cols., 2002), *Phycomyces blakesleeanus* (Zigomicete) (Arrach y cols., 2001) y *Mucor circinelloides* (Zigomicete) (Velayos y cols., 2000). La secuencia nucleotídica del gen que codifica para esta enzima presenta un número variable de

intrones en los distintos hongos mencionados, en el caso de *X. dendrorhous* la secuencia codificante está interrumpida por 4 intrones.

El siguiente paso en la ruta de síntesis consiste en 4 desaturaciones sucesivas del fitoeno para dar licopeno, paso catalizado por la enzima fitoeno desaturasa (Figura 2). En *X. dendrorhous*, se ha aislado el gen *crtI* que codifica para esta enzima y también su cDNA (Verdoes y cols., 1999b; León, 2000). En esta levadura la secuencia codificante está interrumpida por 11 intrones, mientras que en los hongos zigomicetes y ascomicetes en los cuales se conoce la estructura del gen, el número de intrones no supera los 3. En hongos, la enzima fitoeno desaturasa cataliza las 4 reacciones de desaturación, e incluso en *Neurospora crassa* se ha descrito que cataliza 5 desaturaciones (Hausmann y Sandmann, 2000). En plantas, las desaturaciones están catalizadas por dos enzimas: fitoeno desaturasa y ζ -caroteno desaturasa. La primera enzima, cataliza los pasos desde fitoeno a ζ -caroteno, mientras que la segunda, cataliza las desaturaciones desde ζ -caroteno a licopeno (Hirschberg, 1998). Es a partir de la síntesis de neurosporeno o licopeno, que se genera la enorme diversidad de estructuras químicas que caracterizan a los carotenoides, y por consiguiente, existe una gran diversidad de enzimas que modifican la estructura básica (Hirschberg, 1998).

En el caso de *X. dendrorhous*, la ruta de biosíntesis continúa con la ciclización de los extremos del licopeno para dar β -caroteno. Como se mencionó antes, el gen *crtYB* codifica para una novedosa enzima bifuncional, la fitoeno- β -caroteno sintasa, presente también en otros grupos de hongos.

Por otra parte, en la bacteria Gram positiva *Brevibacterium linens*, se ha descrito la presencia de un nuevo tipo de licopeno ciclasa heterodimérica (Krubasik y Sandmann, 2000a). En este caso, dos genes (*crtYc* y *crtYd*) contiguos y relacionados por su secuencia, codifican para dos polipéptidos, ambos necesarios para convertir licopeno en β -caroteno. Posteriormente, este tipo de ciclasa se descubrió en otras bacterias Gram positivas, todas pertenecientes al orden de los Actinomicetes (Krubasik y Sandmann, 2000b). Los genes de estas ciclasas no muestran similitud con los genes de otras ciclasas ya conocidas como las de plantas, excepto con el dominio ciclasa del gen bifuncional descrito en hongos.

La información obtenida hasta el momento permite postular que la clase única de enzima fitoeno- β -caroteno sintasa fue adquirida en forma temprana en la evolución de los hongos, antes de la separación de los tres grupos taxonómicos mencionados (zigomicetes, ascomicetes y basidiomicetes). El dominio licopeno ciclasa podría haberse originado de la fusión de dos genes similares a *crtYc* y *crtYd*, presentes en *Brevibacterium* (Krubasik y Sandmann, 2000b) o por la duplicación de un pequeño gen en un ancestro común de los hongos y *Brevibacterium* (Arrach y col., 2001). Posteriormente, la fusión de los genes tipo *crtYc*, *crtYd* y fitoeno sintasa en el ancestro de los hongos habría dado origen a la enzima bifuncional.

Finalmente, el β -caroteno es hidroxilado en las posiciones 3 y 3', y además se adicionan grupos ceto en las posiciones 4 y 4', dando lugar a la astaxantina (Figura 2). En *H. phuvialis*, se han aislado dos genes distintos que codifican para las actividades hidroxilasa y oxigenasa (Cunningham y Gantt, 1998; Linden, 1999). Recientemente, en

una patente europea (1035206 A1) se describe el aislamiento del gen *ast* de *X. dendrorhous*, en su versión genómica y como cDNA. Este gen codifica para una enzima tipo citocromo P450 que tiene ambas actividades, hidroxilasa y oxigenasa.

De lo expuesto, se puede ver que las plantas tienen gran diversidad de carotenoides en cuanto a estructura y funciones, que además son sintetizados en distintos tejidos (hojas, flores, frutos) y esta complejidad se refleja en el número de genes y/o cDNAs de carotenogénesis que se han aislado. Lo opuesto, puede afirmarse en relación a los hongos, donde existe un carotenoide principal, y su ruta de biosíntesis abarca solamente cuatro productos génicos involucrados en la catálisis de muchas más reacciones, desde la etapa temprana hasta la síntesis del producto final.

1.4. Regulación de la síntesis de carotenoides

En plantas, los genes de carotenogénesis se expresan de forma diferencial según el tejido que se considere (hojas, flores o frutos), por ejemplo como se mencionó anteriormente en el caso de los mensajeros *PSY1* y *PSY2* en tomate. En este fruto, también aumenta el nivel del mRNA de la fitoeno desaturasa durante su maduración (Hirschberg, 1998). En *H. pluvialis* la síntesis de astaxantina se induce bajo condiciones de estrés como un exceso de iluminación o deficiencia de nitrógeno. Bajo alguna de estas condiciones, aumenta el nivel de los dos mensajeros del gen *idi* (IPP isomerasa) (Sun y cols., 1998) y de los mensajeros de los genes de la fitoeno sintasa (Steinbrenner y Linden, 2001), fitoeno desaturasa (Grünewald y cols., 2000), hidroxilasa (Linden, 1999; Steinbrenner y Linden, 2001) y oxigenasa (Sun y cols., 1998). Además, se ha observado un aumento en el nivel de proteína de las enzimas fitoeno desaturasa (Grünewald y cols.,

2000), oxigenasa (Grünewald y cols., 2001) y la proteína de 32,5 kDa producto de uno de los mensajeros del gen *idi* (Sun y cols., 1998).

En cuanto al mecanismo molecular que determina el aumento del nivel de mensajeros de carotenogénesis, existen pocos trabajos al respecto. En el caso de tomate, Corona y cols. (1996) construyeron una fusión entre el promotor del gen de la fitoeno desaturasa y el gen reportero *GUS*, y analizaron su expresión en plantas transgénicas de tabaco y tomate. Entre otros resultados, encontraron altos niveles de expresión cuando se forman cromoplastos de pétalos, anteras y frutos en maduración. En conclusión, hay una regulación a nivel transcripcional del nivel de mensajero de la enzima fitoeno desaturasa según el estado de desarrollo de los tejidos.

En hongos, se ha estudiado principalmente la carotenogénesis como una respuesta a la luz azul. En el micelio de *N. crassa*, aumenta el nivel de carotenoides y el nivel de mensajeros *al-1* (fitoeno desaturasa), *al-2* (fitoeno sintasa) y *al-3* (GGPP sintasa) como una respuesta a la luz (Schmidhauser y cols., 1990; Schmidhauser y cols., 1994; Carattoli y cols., 1991). En este hongo, se han aislado dos genes (*wc-1* y *wc-2*) reguladores transcripcionales positivos frente a la luz, que se unen al promotor del gen *al-3*, y además formarían heterodímeros (Ballario y cols., 1996; Linden y Macino, 1997). Recientemente, en *M. circinelloides* se ha aislado el gen *crgA*, que regula la carotenogénesis como una respuesta a la luz, y que sería un regulador transcripcional aunque no muestra similitud con los genes *wc* de *N. crassa* (Navarro y cols., 2000). Por otra parte, en *P. blakesleanus*, el nivel de mensajero del gen de la fitoeno desaturasa se

incrementa como respuesta a la luz azul junto con el nivel de β -caroteno (Ruiz-Hidalgo y cols., 1997). Sin embargo, en este hongo aún no se han aislado genes reguladores.

Además, se han descrito formas de regulación a nivel post-transcripcional. Por ejemplo, en el alga unicelular *Dunaliella bardawil* un aumento de la concentración de β -caroteno, no está acompañado por un aumento de los niveles de mensajero y proteína de las enzimas fitoeno sintasa y fitoeno desaturasa. En este caso, la acumulación de β -caroteno es una consecuencia de su deposición en glóbulos de triglicéridos, lo cual removería al caroteno de la maquinaria de biosíntesis ubicada en la membrana conduciendo a mayores velocidades de reacción (Rabbani y cols., 1998). Puesto que la biosíntesis de carotenoides deriva de la ruta general de síntesis de compuestos isoprenoides, además deben existir mecanismos de regulación post-transcripcional que coordinen el flujo de intermediarios entre las distintas rutas según las necesidades fisiológicas de las células. Acerca de este último punto existe muy poca información, que sin embargo resulta fundamental para la construcción de organismos carotenogénicos sobreproductores.

En lo que respecta a *X. dendrorhous*, como se ha mencionado anteriormente, se han estudiado diversas variables de cultivo que regulan la síntesis de astaxantina. Si bien estos resultados son importantes para optimizar la producción de astaxantina, hasta el momento no existe información acerca del nivel de expresión de los mensajeros de los genes de carotenogénesis, ni tampoco de sus proteínas. Esta información, junto con los resultados fisiológicos, es relevante no sólo para entender cómo es el proceso total de

biosíntesis de astaxantina sino para aportar conocimientos básicos de la biosíntesis de carotenoides en organismos eucariotas.

Hipótesis:

En plantas, algas y hongos el contenido celular de carotenoides se incrementa como una respuesta a factores nutricionales, ambientales y de desarrollo, los cuales determinan a su vez un incremento en los niveles de mensajeros de una o varias de las enzimas de la ruta de biosíntesis de carotenoides. Por consiguiente, se postula que la producción de carotenoides en *X. dendrorhous* se correlaciona con el nivel de mensajeros de una o más enzimas de la biosíntesis de astaxantina en distintas condiciones fisiológicas.

Como objetivo general de esta tesis se propone estudiar el nivel de expresión de los genes que codifican para las enzimas de la ruta de biosíntesis de astaxantina en una cepa silvestre y en mutantes sobreproductoras de astaxantina derivadas de dicha cepa silvestre.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Cepas y plásmidos

En la Tabla 1 se muestran los nombres y descripción de las cepas y plásmidos que se utilizaron en este trabajo. El vector pBluescript SK se utilizó para el clonamiento de cDNA. La cepa mutante atxS1 de *X. dendrorhous* produce como principales carotenoides astaxantina (60 %) y β -caroteno (34 %) (Cifuentes y cols., 1997), mientras que la cepa mutante atxS2 produce astaxantina como principal carotenoide (85-90 %) según se estableció en trabajos previos de nuestro laboratorio.

2.2. Cultivo de *X. dendrorhous*

2.2.1. Cultivo en matraces

X. dendrorhous se cultivó en matraces de 250 ml con 50 ml de medio YM con la siguiente composición: 1 % de glucosa, 0,3 % de extracto de malta, 0,5 % de bactopectona, 0,3 % de extracto de levadura (An y cols., 1989). Los cultivos se mantuvieron por 3 días a 200 rpm y 22 °C.

2.2.2. Cultivo en fermentador

La cepa silvestre de *X. dendrorhous* y la mutante atxS2 se crecieron en un fermentador y de cada cultivo se colectaron muestras a distintos tiempos para extraer carotenoides, determinar biomasa y extraer RNA total. Para cada cepa se preparó un pre-cultivo en un matraz de 1 L con hendiduras conteniendo 400 ml de medio YM. A su vez, cada pre-cultivo fue inoculado con 4 mL de un cultivo de 2 días en medio YM. El fermentador

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio

Cepa/Plásmido	Genotipo/Características relevantes	Fuente/ referencia
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169deoRrecA1 <i>endA1hsdR17</i> (r $_k^-$,m $_k^+$) <i>phoA</i> supE44 λ^- <i>thi-1</i> gyrA96relA1	GIBCO BRL
<i>X. dendrorhous</i> UCD 67-385 o ATCC 24230 CBS 6938	Silvestre Silvestre	
atxS1	Cepa sobreproductora de astaxantina y β -caroteno por tratamiento con nitrosoguanidina de la cepa UCD 67-385	Cifuentes y cols.(1997)
atxS2	Cepa sobreproductora de astaxantina por tratamiento con nitrosoguanidina de la cepa UCD 67-385	Resultados no publicados
Plásmidos		
pL25	pBluescript (Ap ^r) que porta el gen <i>crtI</i> completo	León (2000)
pC13	pBluescript (Ap ^r) con un fragmento de 18,5 kb que contiene al gen <i>crtI</i> , aislado de una biblioteca genómica de <i>X. dendrorhous</i>	León (2000)
pI1	Clon que lleva el cDNA del gen <i>crtI</i> que conserva 80 pb del primer intrón en pBluescript (Ap ^r)	Este trabajo
pI43	Clon que lleva el cDNA del gen <i>crtI</i> que conserva 80 pb del primer intrón en pBluescript (Ap ^r)	Este trabajo
pI41	pBluescript (Ap ^r) con el cDNA que codifica para la fitoeno desaturasa de <i>X. dendrorhous</i>	Este trabajo
pYBm	pBluescript (Ap ^r) con el cDNA que codifica para la fitoeno- β -caroteno sintasa de <i>X. dendrorhous</i>	Alcaíno (2002) y este trabajo
pYBa	pBluescript (Ap ^r) con el cDNA <i>crtYB</i> que conserva 55 pb del primer intrón y 96 pb del segundo exón.	Alcaíno (2002) y este trabajo

(Ap^r) Resistencia a ampicilina

(New Brunswick) con 8,8 L de medio YM y 450 μ l de antiespumante de silicona (1520 EU, Dow Corning) se inoculó con 200 mL del pre-cultivo de dos días de la cepa silvestre o la mutante. La temperatura se controló a $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la agitación fue de 300 rpm. Se inyectó aire estéril a una velocidad de 8 L/min. Las muestras para extracción de carotenoides y RNA se centrifugaron a $1.300 \times g$ durante 10 min. para obtener los pellets celulares, los cuales fueron inmediatamente congelados en nitrógeno líquido y almacenados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento.

2.3. Técnicas de biología molecular

2.3.1. Extracción de DNA cromosómico de *X. dendrorhous*

Las células de *X. dendrorhous* se cosecharon por centrifugación a $1.300 \times g$ durante 10 min., a partir de 500 ml de un cultivo de 4-5 días en medio MMv (Retamales y cols., 2002) a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las células se lavaron con 200 ml de KCl 0,8 M y luego se resuspendieron en 16 ml de KCl 0,8 M. Se agregaron 4 ml de una solución de Novozym 234 (Novo) (4 mg/ml en KCl 0,8 M) y se incubó hasta obtener alrededor de un 100 % de protoplastos ($22\text{ }^{\circ}\text{C}$, toda la noche). Los protoplastos se lavaron con 20 ml de KCl 0,8 M y luego se resuspendieron en 21,6 ml de una solución Tris 10 mM, EDTA 25 mM. Los protoplastos se lisaron al agregar 2,4 ml de SDS al 10 % (p/v) e incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min. Luego se agregaron 200 μ l de Proteinasa K (20 mg/ml) incubándose a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora y, posteriormente, 40 μ l de RNasa (10 mg/mL) incubándose a temperatura ambiente por 10 min. Se agregó un volumen de fenol (saturado en Tris, pH 8) y se recuperó la fase acuosa. A la fase orgánica se le agregan 8 ml de una solución Tris 10 mM, EDTA 25 mM; se mezcló suavemente y se recuperó la fase acuosa. Ambas

fases acuosas se mezclaron y lavaron dos veces con fenol y luego, otras dos veces con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). El DNA de la fase acuosa se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol. El pellet de DNA se secó y se resuspendió en agua bidestilada estéril.

2.3.2. Extracción de DNA plasmidial

Se utilizaron cultivos de *E. coli* en medio LB con ampicilina (100 µg/ml) crecidos toda la noche a 37 °C y la extracción se realizó según Sambrook y cols. (1989). En el caso de que los plásmidos se utilizaran para secuenciación las extracciones se realizaron con E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I (Omega).

2.3.3. Digestiones de DNA con enzimas de restricción

Las digestiones de DNA plasmidial se realizaron de acuerdo a lo indicado por el proveedor de las enzimas New England Biolabs® o GIBCO BRL.

2.3.4. Ligaciones de DNA

Para facilitar las reacciones de ligación entre productos de PCR que poseen adenina en los extremos 3', el vector pBluescript SK se digirió con la enzima *EcoRV* y se le agregó una timidina en los extremos 3'. Se siguió el protocolo descrito por Lobos y cols. (1998). Brevemente, 20 µg del vector se trataron con 80 U de enzima *EcoRV* en un volumen final de 100 µl y se incubó a 37 °C durante 90 min. Luego el vector digerido se limpió con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto y se resuspendió en 224 µl de agua. A este volumen se le adicionó 40 µl de buffer de PCR 10 x, MgCl₂ 1,5 mM final, 40 µl de BSA 10 x, dTTP 2 mM final, *Taq* polimerasa 20 U, en un volumen final de 400 µl. Al cabo de 2 hrs de

incubación a 70 °C, el plásmido se extrajo con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y se precipitó con dos volúmenes de etanol. El pellet se resuspendió en agua de manera que el vector quedó a una concentración de 200 ng/μl. Las reacciones de ligamiento se hicieron siguiendo las recomendaciones del proveedor de la DNA ligasa. Se utilizó inserto en una proporción 3:1 con respecto al vector, con 2U de DNA ligasa (GIBCO BRL, New England Biolabs), en un volumen final de 10 μl. Se incubó a 14 °C toda la noche y luego se transformaron células electrocompetentes.

2.3.5. Preparación de células electrocompetentes

Se inoculó 1 L de medio LB con 10 mL de un cultivo de 12 hrs y se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica (560 nm) entre 0,5-0,8 (fase exponencial temprana-media). Se enfrió el matraz sobre hielo durante 15-30 min y luego se centrifugó en frío a 4000 x g durante 15 min para cosechar las células. Se removió tanto sobrenadante como fue posible y las células se lavaron dos veces con agua destilada enfriada en hielo, el primer lavado con 1 L y el segundo con 0,5 L. Las células se resuspendieron en 20 mL de glicerol 10 % (v/v) enfriado en hielo, se centrifugaron y se resuspendieron nuevamente en un volumen final de 2 a 3 mL de glicerol 10 % (v/v) enfriado en hielo. Esta suspensión, con una concentración celular de 1×10^{10} céls/mL, se fraccionó en alícuotas de 40-50 μl y las mismas se almacenaron a -70 °C hasta su utilización.

2.3.6. Electrotransformación

Las alícuotas de células electrocompetentes (40-50 μl) se descongelaron a temperatura ambiente, y luego se enfriaron en hielo al igual que las cubetas de electroporación. A la

suspensión de células se le agregó 2 μ l de DNA y la mezcla se electroporó en las siguientes condiciones: 25 μ F, 200 Ω y 2,5 kV (para cubetas de 0,2 cm). Inmediatamente, se adicionó 1 ml de medio LB, la suspensión de células se transfirió a un tubo Eppendorf y se incubó a 37 °C. Al cabo de 1 hora, se plaquearon alícuotas de 100 y 200 μ l en placas Petri con agar LB, ampicilina (100 μ g/ml) y X-Gal (0,024 mg/ml). Las placas se incubaron a 37 °C toda la noche y luego se seleccionaron colonias blancas de las cuales se extrajo el DNA plasmidial para su posterior análisis.

2.3.7. Electroforesis de DNA

Para visualizar el DNA plasmidial, cromosomal o los productos de PCR, se utilizaron geles de agarosa, y en algunos casos, de poliacrilamida. Los geles de agarosa se prepararon en amortiguador TAE 0.5X con una concentración de agarosa entre 0,7 y 3 % según el tamaño del DNA. Como estándares de peso molecular se utilizaron λ /HindIII (GIBCO BRL), ϕ 29/HindIII y 100 bp DNA Ladder (Winkler o Fermentas).

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

Los productos de las reacciones de RT-PCR que se clonaron se recuperaron previamente de los geles de agarosa y se purificaron con dióxido de sílica (Sigma S-5631) según el protocolo descrito por Boyle y Lew (1995).

2.3.9. Extracción de RNA total de *X. dendrorhous*

Se realizó de acuerdo al método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987) y modificado para *X. dendrorhous*. Se adicionaron al pellet celular proveniente de 40 ml de cultivo, 5 ml de solución de Chomczynski con fenol (solución Ch-P) (Chomczynski y Sacchi, 1987) junto con un volumen de perlas de vidrio (Sigma, 425-600 μ m). La

ruptura de las células se realizó por agitación en vórtex a máxima velocidad por 5 min. La mezcla se incubó por 10 min. a temperatura ambiente y luego se agregaron 0,2 ml de cloroformo por cada ml de solución Ch-P. Se agitó manualmente y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Luego se centrifugó a 12.100 x g y la fase acuosa se pasó a un tubo estéril. Se centrifugó nuevamente para eliminar posibles restos celulares y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo estéril donde se agregó un volumen de isopropanol. Se incubó durante 10 min. a temperatura ambiente y luego el RNA se precipitó por centrifugación a 12.100 x g durante 10 min. a 4 °C. El pellet de RNA se lavó con 1 mL de etanol 75 %. El RNA se resuspendió en agua (tratada con DEPC) y luego se almacenó a -70 °C. La concentración de RNA se determinó espectrofotométricamente a 260 nm y la integridad del RNA se chequeó por electroforesis en geles de agarosa denaturantes.2.3.10.

2.3.10. Transcripción reversa (RT)

Las muestras de RNA se trataron con 1U/μl de DNasa I (Roche) en 2,5 mM de MgCl₂ durante 30 min. a 25 °C. La reacción se detuvo por la adición de EDTA a una concentración final de 2,5 mM y calentamiento a 65 °C durante 15 min. La reacción RT se efectuó en un volumen de 25 μl con 3 μg de RNA total, 75 pmoles de oligodT₁₅₋₁₈, 0,5 mM de dNTPs y 200 U de transcriptasa reversa M-MLV (Promega). La mezcla de reacción se incubó por 60 min. a 42 °C y luego se calentó 10 min. a 65 °C.

2.4. Amplificación por PCR

2.4.1. Amplificación del cDNA de los genes *crtI* y *crtYB*

Para clonar los cDNAs de los genes *crtI* y *crtYB*, se diseñaron partidores específicos río arriba del codón de inicio de la traducción y río abajo del codón de término (Tabla 2). Las secuencias de los partidores se diseñaron según las secuencias publicadas de la cepa CBS 6938 y las de la cepa UCD 67-385 (Alcaíno, 2002; León, 2000). Las reacciones se efectuaron con 1 U de Vent_R DNA Polymerase (New England Biolabs) en un volumen final de 25 µl con los siguientes componentes: 2,5 µl de 10 x Vent_R DNA Polymerase buffer; 0,5 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de cada partidor 25 µM, 2 µl de reacción RT con cDNA de hebra simple y agua. Las reacciones de PCR se efectuaron en un termociclador DNA Thermal Cycler 2400 (Perkin-Elmer) con el siguiente programa: 95 °C por 3 min., 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 3 min., y una extensión final de 72 °C por 10 min.

2.4.2. Amplificación para determinar los niveles relativos de los mensajeros de carotenogénesis

Los partidores que se diseñaron para la detección de los cDNAs de los distintos genes se muestran en la Tabla 2. Las reacciones de PCR se realizaron con 2 U de *Taq* pol (Promega) en un volumen final de 25 µl con los siguientes componentes: 2,5 µl de 10 x *Taq* buffer; 0,5 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de cada partidor 25 µM, 1 o 2 µl de reacción RT con cDNA de hebra simple y agua. El programa de amplificación que se utilizó fue el mencionado anteriormente excepto que se emplearon 28 ciclos de amplificación. En el caso de los cDNAs del mmRNA *crtI* (mensajero maduro) y del amRNA *crtI* (mensajero

alternativo), se utilizó una temperatura de hibridación de 60 °C por 30 s. En el caso del cDNA del mRNA *ast* se utilizó una temperatura de hibridación de 57 °C por 30 s. Se corrieron en geles de agarosa volúmenes iguales de las reacciones de PCR y los productos se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. La cantidad de producto de amplificación se cuantificó con el programa Kodak Digital Science 1 D Analysis Software empleando como referencia un marcador de PM de concentración conocida (100 bp DNA Ladder, Fermentas). Todas las reacciones se hicieron al menos por duplicado.

Para normalizar la cantidad de producto amplificado debido a la variaciones entre muestras producidas por la eficiencia de las reacciones RT y PCR, en cada reacción se co-amplificó el cDNA del mensajero de actina (*act*). El mensajero de actina se ha utilizado en *Aspergillus niger* para normalizar la expresión de mensajeros en distintos momentos de cultivo (Ngiam y cols., 2000). En nuestros experimentos, se observó que los niveles del mensajero de actina se mantienen aproximadamente constantes en relación a la cantidad de RNA ribosomal a lo largo del ciclo de crecimiento. Los partidores para la amplificación del cDNA *act* se diseñaron según la secuencia publicada para *X. dendrorhous* (Wery y cols., 1996).

2.4.3. PCR en tiempo real

Se utilizó un termociclador LightCycler (Roche Diagnostics). Las reacciones se hicieron con la mezcla de reacción LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics), siguiendo las instrucciones del proveedor. Esta mezcla de reacción es una 'Hot Start Mix' que provee la *Taq* DNA polimerasa, los nucleótidos, el buffer y el agente intercalante de DNA SYBR Green I. Las reacciones se efectuaron en un volumen

Tabla 2. Partidores utilizados en este trabajo

Gen	Nombre Partidor ⁽¹⁾	Secuencia 5'→3' ⁽²⁾	Localización ⁽³⁾
<i>act</i>	ACT3	F actcctacggttggtgacgag	Entre exón 4-5 (1345)
	ACT4	R tcaagtctcgaccggccaag	Exón 5 (1801)
	ACT2	R cactttcgggtggacgatgga	Exón 5 (2366)
<i>crtI</i>	CRTIF (1)	F cctcgccgaatctaacttga	Río arriba inicio traducción (687)
	CRTIC (1)	R aacgaataaaaaagatgatgaaca	Río abajo término traducción (3753)
	CRTI-MF	F agctatcatcgtgggatgtgg (específico para mRNA maduro)	Entre exón 1-2 (764)
	CRTI1	F gtatcgggtggaatcgccact	Exón 2 (961)
	CRTI-AF	F agctatcatcgtggtttaatcc (específico para mRNA alternativo)	Entre exón 1 e intrón 1 (764)
	CRTI-MR	R gaccaatcttccatcttctct	Exón 5 (1882)
	CRTI-AR	R ttctcgaacaccgtgacct	Exón 2 (1009)
	CRTI4	R aacggatcgcgatcacgg	Exón 12 (3521)
	CRTI3	F ccacttccacgagaagagac	Exón 6-7 (1618)
	<i>crtYB</i>	PBS1 (1)	F ccgatctcggatagacatca
PBS2 (1)		R aggaagatgggggaaga	Río abajo término traducción (3622)
GPRN1 (1)		F tacccaactcgtatcatccc	Río arriba inicio traducción (1066)
GPRN2 (1)		R agtctttatggtctataacct	Río abajo término traducción (3753)
FS-M		F gcatattaccgatccatctg (específico para mRNA maduro)	Entre exón 1-2 (1301)
FS-A		F gtgtgcatatgtgttgcaacc (específico mRNA alternativo)	Entre intron 1 y exón 2 (1176)
FS-R2		R tctagaaacggttccaaacacg	Exón 2 (1432)
RTPBS1		F ggctgggttgactatacgca	Exón 4-5 (2358)
RTPBS2		F gctctgtctgcctgcatcat	Exón 3-4 (2033)
RTPBS3		R caatagctcggcgactgagc	Exón 5 (3013)
<i>crtE</i>	CRTE2	F ttcagtcttctgagtgtccc	(830)
	CRTE1	R cattgcgagaagacgaagact	(1494)
	CRTE3R	R ctccttgaagccttcttagtt	(1076)
<i>idi</i>	IDI1	F tacgatgaggagcaggtcag	Exón 1-2 (1044)
	IDI3R	R ctccaactttcgggacgca	Exón 4 (1771)
	IDI2	R ccgagagatcctccaacgat	Exón 5 (2232)
<i>ast</i>	CP450F	F gccacctacttttctccatagt	Río arriba inicio traducción (517)
	K450R	R gagccatgacgtccagagta	Exón 6 (1609)

(1) Partidores que se utilizaron para clonar los cDNAs de los genes *crtI* y *crtYB* provenientes de los mensajeros maduros y alternativos

(2) F, 'forward'; R, 'reverse'

(3) Los números entre paréntesis indican la posición del partidor en pares de bases dentro de las secuencias publicadas en la base de datos GenBank. En el caso del gen *crtE*, aún no se conoce el número de intrones y exones pero la secuenciación parcial de este gen en nuestro laboratorio indica que la secuencia del partidor CRTE2 está interrumpida por un intrón.

final de 20 μ l, con una concentración final de partidores de 0,5 μ M, y una concentración final de Mg^{2+} de 3 mM. El sustrato de las reacciones fue 1 μ l de reacción RT o productos de RT-PCR purificados. Se realizó un período de pre-incubación inicial de 95 °C durante 10 min. y luego 35-40 ciclos de amplificación con el siguiente programa: 95 °C por 15 s, 57 °C por 5 s y un período de extensión a 72 °C por 18 s. La adquisición de la señal de fluorescencia fue al final del período de extensión. Al finalizar los ciclos de amplificación, se hizo un análisis de ‘melting’ para determinar si se había amplificado un único producto. Este análisis se realizó en el rango de temperaturas 65-95 °C con una pendiente de 0.1 °C/s. Además, se corrieron geles de agarosa para confirmar que la curva de ‘melting’ obtenida correspondía a un único producto amplificado. Las curvas de calibración se efectuaron con diluciones de un estándar de cada gen a partir de un stock con un número inicial de moléculas conocido. El stock consistió del producto de RT-PCR purificado a partir de geles de agarosa de los genes *act*, *idi* y *crtE*. El número de moléculas se calculó teniendo como base la absorbancia a 260 nm.

2.5. Análisis de secuencias y números de acceso

Las secuencias nucleotídicas se determinaron con el DNA Sequencing Kit Big Dye™ Terminator v3.0 (Applied Biosystems). Las secuencias se analizaron con los programas Chromas versión 1.43 y Genetics Computer Group versión 10.0, de la Universidad de Wisconsin. Las secuencias de nucleótidos y proteínas se alinearon con el programa CLUSTAL W, versión 1.8 y con ajuste manual para incrementar la identidad. Las secuencias de los cDNAs de los transcritos mmRNA *crtI*, amRNA *crtI*, mmRNA *crtYB* y amRNA *crtYB* se depositaron en la base de datos GenBank con los números de acceso

AY177424, AY177425, AY177204 y AY174117, respectivamente. Estas secuencias serán de dominio público a partir del 30/12/03. Los números de acceso de la base de datos GenBank de los genes cuya expresión se analizó en esta tesis son: *act*, X89898; *crtE* A63889; *idi*, 15811; *crtI*, Y15007; *crtYB*, 133646; *ast* AX034666.

2.6. Técnicas bioquímicas

2.6.1. Determinación de glucosa

Se utilizó el test para determinación de glucosa por el método UV de Boehringer Mannheim. Este método se basa en la oxidación de la glucosa a D-gluconato-6-fosfato con las enzimas hexoquinasa y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, con formación de NADP reducido el cual se determina por absorbancia a 340 nm. Las reacciones se hicieron según las instrucciones del proveedor, utilizando como sustrato diluciones adecuadas de las muestras.

2.6.2. Determinación de etanol

Se utilizó el test para determinación de etanol por el método UV de Boehringer Mannheim. Este método se basa en la oxidación del etanol a acetato con las enzimas alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa. La formación de NAD reducido se sigue por medición de absorbancia a 340 nm. Las reacciones se hicieron según las instrucciones del proveedor, utilizando como sustrato diluciones adecuadas de las muestras.

2.7. Extracción de carotenoides

Para la extracción de carotenoides se utilizó el método de An y cols. (1989) con algunas modificaciones. Se centrifugaron entre 5 y 20 ml de cultivo, y al pellet de células se le agregaron entre 1 y 3 ml de acetona (Merck) según la biomasa obtenida, más un

volumen de perlas de vidrio (Sigma, 425-600 μm). La ruptura celular se realizó por agitación en vórtex a máxima velocidad durante 1 min., luego se recuperó la fase orgánica por centrifugación a 12.100 x g a 4°C. Este procedimiento se repitió hasta que los restos celulares se volvieron blancos. Los extractos de acetona se combinaron y se centrifugaron nuevamente a 12.100 x g para eliminar restos celulares. Luego, todo el pigmento en acetona se extrajo con éter de petróleo (Mallinckrodt) y se midió el volumen recuperado de éter de petróleo. Se determinó la absorbancia del extracto a 474 nm, que es el máximo de la absorbancia de la astaxantina en éter de petróleo. Para la cuantificación del contenido total de carotenoides se utilizó el coeficiente de extinción $1\% = 2100$. La determinación del contenido total de carotenoides es una buena estimación del contenido de astaxantina puesto que en las cepas silvestres la astaxantina es un 80 % o más del contenido total de carotenoides. Con respecto a la cepa atxS2, ya se mencionó anteriormente que la astaxantina es un 90 % del contenido total de carotenoides. Las determinaciones se hicieron por duplicado.

2.8. Determinación de biomasa

La concentración celular se determinó por medición de la densidad óptica a 560 nm o por recuento del número total de células en una cámara de Neubauer por triplicado. En los gráficos se presenta el promedio y desvío estándar de cada punto. Para la determinación de peso seco, se centrifugaron entre 1,5 y 3 ml de cultivo en tubos Eppendorf, las células se lavaron una vez con agua destilada y luego los pellets se secaron a 80 °C hasta obtener un peso constante. Las mediciones se hicieron por triplicado y el error que se obtuvo fue de un 5 % o menos.

3. RESULTADOS

3.1 Aislamiento de mensajeros procesados en forma alternativa

Con el objetivo de clonar el cDNA de los genes *crtI* y *crtYB* se diseñaron partidores río-arriba del sitio de inicio de la traducción y río-abajo del codón de término. Las secuencias de los partidores se indican en la Tabla 2 (sección Materiales y Métodos). Se sintetizó cDNA de hebra simple a partir de RNA total de la cepa UCD 67-385, previamente tratado con DNasa libre de RNasa. Posteriormente, se sintetizó cDNA de hebra doble mediante PCR con una *Taq* DNA polimerasa con actividad correctora. La amplificación del cDNA del gen *crtI* con los partidores CRTIF y CRTIC resultó en un producto principal de 2,1 kb aproximadamente (Figura 3A), el cual se purificó a partir del gel de agarosa y se ligó en el vector pBluescript SK. Luego, con la reacción de ligación se transformaron por electroporación células electrocompetentes de la cepa DH5 α de *E. coli*. Como resultado, se obtuvieron numerosos transformantes y de 28 de ellos se extrajo DNA plasmidial. El análisis de restricción indicó que 16 transformantes eran portadores de un inserto de cDNA de 2,1 kb aproximadamente, mientras que 12 transformantes portaban un cDNA de alrededor de 2 kb (Figura 3B). Este resultado sugiere la presencia de dos fragmentos distintos de cDNA del gen *crtI* sintetizados a partir de RNA total de la levadura.

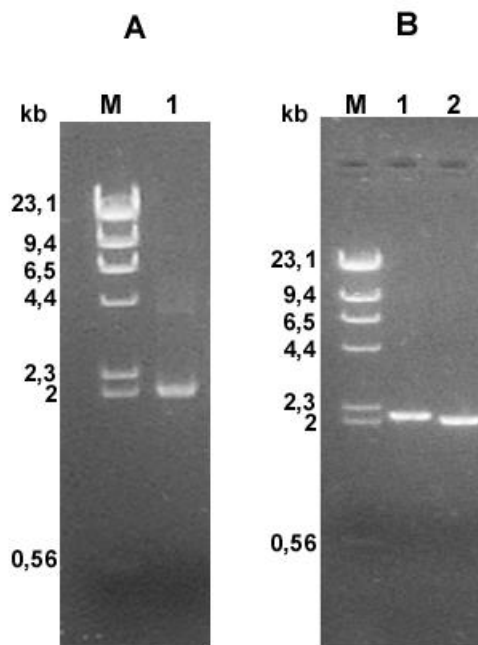


Figura 3. Amplificación mediante RT-PCR del cDNA del gen *crtI* a partir de una muestra de RNA total de la cepa UCD 67-385 con los partidores CRTIF y CRTIC (A). La banda obtenida se clonó en pBluescript SK, y con la reacción de ligamiento se transformó *E. coli*. Los transformantes Ap^R portaban plásmidos con insertos de dos tamaños (B). M, Marcador de tamaño molecular λ /Hind III. Las reacciones de RT-PCR se corrieron en un gel de agarosa 1 % (A) o 0,7 % (B) y las bandas se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

Por consiguiente, se secuenció el inserto de cDNA de mayor tamaño de dos clones distintos (clones 1 y 43) y el cDNA de 2 kb de un clon representativo de menor tamaño (clon 41). El análisis de la secuencia de los clones 1 y 43 indica que se trata de la misma secuencia. El cDNA de estos clones contiene 80 pb correspondientes al primer intrón y los intrones 2 hasta 11 fueron procesados adecuadamente. Este cDNA podría haberse sintetizado a partir de un mensajero procesado en un sitio 3' (AG) de 'splicing' no habitual (Figura 4) (manuscrito enviado).

El análisis de la secuencia del cDNA perteneciente al clon 41, indica que correspondió con la del mensajero maduro con todos sus intrones procesados en la forma esperada (denominado mmRNA) (Figura 4). Adicionalmente, el análisis comparativo de las secuencias de los cDNAs de la cepa silvestre UCD 67-385 con la secuencia publicada en base de datos de la cepa silvestre CBS 6938, dio como resultado que hay algunas diferencias correspondientes a sustituciones de bases que en dos casos darían lugar a cambios de aminoácidos (Figura 5). Por otra parte, la traducción del mensajero *crtI* que conserva 80 bases del primer intrón, denominado amRNA, genera codones de término de la traducción a lo largo de toda la secuencia.

El aislamiento del nuevo mensajero hizo surgir como interrogante si en el genoma de *X. dendrorhous* se encontraría un gen *crtI* distinto al descrito previamente (Verdoes y cols., 1999b; León, 2000) o si el mensajero proviene de un pre-mensajero procesado por 'splicing' alternativo. Para responder esta pregunta se usaron los partidores CRTI1 ubicado en el exón 2, CRTI4 ubicado en el exón 12 y CRTI-AF cuya secuencia comprende parte del exón 1 y parte del intrón 1 conservado sólo en el amRNA (Figura 4)

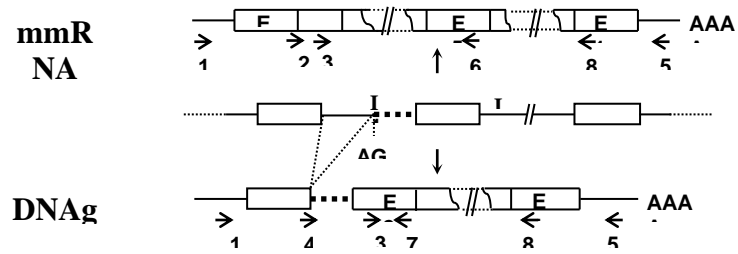


Figura 4. Esquema de la estructura del DNA genómico (DNAg) y del mensajero maduro (mmRNA) y alternativo (amRNA) del gen *crtI*. E, exón; I, intrón. Con una línea punteada en negrita se señala el fragmento del intrón 1 que se conserva en el mensajero alternativo. Las flechas indican la ubicación de los partidores empleados en los distintos experimentos: 1, CRTIF; 2, CRTI-MF; 3, CRTI1; 4, CRTI-AF; 5, CRTIC; 6, CRTI-MR; 7, CRTI-AR; 8, CRTI4.

```

1
clon41 CCTCGCCGAA TCTAACTTGA CACATAACTC TAGTATCTAT ACTCGATGGG AAAAGAACAA GATCAGGATA
clon43 CCTCGCCGAA TCTAACTTGA CACATAACTC TAGTATCTAT ACTCGATGGG AAAAGAACAA GATCAGGATA
crtI CCTCGCCGAA TCTAACTTGA CACATAACTC TAGTATCTAT ACTCGATGGG AAAAGAACAA GATCAGGATA

140
clon41 AACCCACAGC TATCATCGTG G.....
clon43 AACCCACAGC TATCATCGTG G.....
crtI AACCCACAGC TATCATCGTG GGTGAGTGTG AGGCCATCAC CTTTGAAGC ATATACCCAT CACTTGATTG

210
clon41 .....
clon43 ..... TT TAATCCGTAT CAGCTAACAT
crtI ATGGGTTTTC CATTGATTG AAACCTTGTT TCCGAATGGT TCTCTAGTT TAATCCGTAT CAGCTAACAT

280
clon41 .....GA TGTGGTATCG
clon43 TCTCTTGATC AATTGTTGCT TTTGCTTACT CGTGACTCTT TCCGTTCCCTA CTTGTTAGGA TGTGGTATCG
crtI TCTCTTGATC ACTTGTGCT TTTGCTTACT CGTTACTCTT TCCGTTCCCTA CTTGTTAGGA TGTGGTATCG

350
clon41 GTGGAATCGC CACTGCCGCT CGTCTTGCTA AAGAAGGTTT CCAGGTCACG GTGTTTCGAGA AG.....
clon43 GTGGAATCGC CACTGCCGCT CGTCTTGCTA AAGAAGGTTT CCAGGTCACG GTGTTTCGAGA AG.....
crtI GTGGAATCGC CACTGCCGCT CGTCTTGCTA AAGAAGGTTT CCAGGTCACG GTGTTTCGAGA AGGTATGCTT

420
clon41 .....
clon43 .....
crtI CCTCGCTCAC TCATGAAATG TACCTCACAT CGGTCAAATA TGGAAATCGAG ATCGTACAAA ACTGATCGAC

490
clon41 .....
clon43 .....
crtI CCGCTATTCT TATTGTGTC CACCTCTTTC TTTCCCTCT CATCATTCGT CCACATCGCT AATACCCGCT

560
clon41 ..... ..AACGACTA CTCCGGAGGT CGATGCTCTT TAATCGAGCG AGATGGTTAT .....
clon43 ..... ..AACGACTA CTCCGGAGGT CGATGCTCTT TAATCGAGCG AGATGGTTAT .....
crtI TGTC AACCTT AGAAACGACTA CTCCGGAGGT CGATGCTCTT TAATCGAGCG AGATGGTTAT GTCAGTTCCT

630
clon41 .....
clon43 .....
crtI CCGATCATCA GGCAAGAGCA TCGTTCATTT CTCCAATACT AACCCAGCGG CCTTTTCTCT CTCTCTCCGT

700
clon41 ..... .CGATTCGAT CAG.....
clon43 ..... .CGATTCGAT CAG.....
crtI CTGACCCCTC CGATTTAACA A GCGATTCGAT CAGGTTAGAA TACTCTCTTG CGCTGTCTCT CAACACAATA

770
clon41 .....G GGCCAGTTT GCTGCTCTTG CCAGATCTCT
clon43 .....G GGCCAGTTT GCTGCTCTTG CCAGATCTCT
crtI TCAAAAGACT GACCTCAACT TTAATGCTTG GCCTTCCAGG GGCCAGTTT GCTGCTCTTG CCAGATCTCT

840
clon41 TCAAGCAGAC ATTCCAAGAT TTGGGAGAGA AGATGGAAGA TTGGGTCGAT CTCATCAAGT .....
clon43 TCAAGCAGAC ATTCCAAGAT TTGGGAGAGA AGATGGAAGA TTGGGTCGAT CTCATCAAGT .....
crtI TCAAGCAGAC ATTCCAAGAT TTGGGAGAGA AGATGGAAGA TTGGGTCGAT CTCATCAAGT GTATGTCTAG

910
clon41 .....
clon43 .....
crtI AGCTTGATC TTCAGAATCG TCTTGGTTGC TCATCCTCCT CTCATTTCCT TTTCTTTAAA ACAAATATAA

```

980
clon41 .GTGAACCCA ACTATGTTTG CCACTTCCAC GAT.....
clon43 .GTGAACCCA ACTATGTTTG CCACTTCCAC GAT.....
crtI GGTGAACCCA ACTATGTTTG CCACTTCCAC GATGTATGTA CCCTCGTAGG CTCGATATCA TTCCTCTTTC

1050
clon41G AAGAGACTTT CACTCTTTCA ACCGACATGG
clon43G AAGAGACTTT CACTCTTTCA ACCGACATGG
crtI CAAGACCACT GACATCCTAC AACCATTTTC ACCGTTCAGG AAGAGACTTT CACTTTTTTCA ACCGACATGG

1120
clon41 CGTTGCTCAA GCGGGAAGTC GAGCGTTTTG AAGGCAAAGA TGGATTGAT CGGTTCTTGT CGTTTATCCA
clon43 CGTTGCTCAA GCGGGAAGTC GAGCGTTTTG AAGGCAAAGA TGGATTGAT CGGTTCTTGT CGTTTATCCA
crtI CGTTGCTCAA GCGGGAAGTC GAGCGTTTTG AAGGCAAAGA TGGATTGAT CGGTTCTTGT CGTTTATCCA

1190
clon41 AGAA.....
clon43 AGAA.....
crtI AGAAGTTCGT GAATGTTTGT CATCTCACTC ATGACCAAGT GGTGGTTCTG ACTCCATCGC ATTACGGTCT

1260
clon41GCCAC AGACATTACG AGCTTGCTGT CGTTCACGTC CTGCAGAAGA ACTTCCTGG CTTCGCAGCA
clon43GCCAC AGACATTACG AGCTTGCTGT CGTTCACGTC CTGCAGAAGA ACTTCCTGG CTTCGCAGCA
crtI ATAGGCCAC AGACATTACG AGCTTGCTGT CGTTCACGTC CTGCAGAAGA ACTTCCTGG CTTCGCAGCA

1330
clon41 TTCTTACGGC TACAGTTCAT TGGCCAAATC CTGGCTCTTC ACCCCTTCGA G.....
clon43 TTCTTACGGC TACAGTTCAT TGGCCAAATC CTGGCTCTTC ACCCCTTCGA G.....
crtI TTCTTACGGC TACAGTTCAT TGGCCAAATC CTGGCTCTTC ACCCCTTCGA GGTCAGTGAC ATCTGCCAAA

1400
clon41T CTATCTGGAC
clon43T CTATCTGGAC
crtI CATATTCTGTT TCACATGGCC TTTTTTTGAC TATCGATAGT GTGTTGTCAA TATCACAGT CTATCTGGAC

1470
clon41 AAGAGTTTGT CGATATTTCA AGACCGACAG ATTACGAAGA GTCTTCTCGT TTGCAGTGAT GTACATGGGT
clon43 AAGAGTTTGT CGATATTTCA AGACCGACAG ATTACGAAGA GTCTTCTCGT TTGCAGTGAT GTACATGGGT
crtI AAGAGTTTGT CGATATTTCA AGACCGACAG ATTACGAAGA GTCTTCTCGT TTGCAGTGAT GTACATGGGT

1540
clon41 CAAAGCCCAT ACAGTGCGCC CGGAACATAT TCCTTGCTCC AATACACCGA ATTGACCGAG GGCATCTGGT
clon43 CAAAGCCCAT ACAGTGCGCC CGGAACATAT TCCTTGCTCC AATACACCGA ATTGACCGAG GGCATCTGGT
crtI CAAAGCCCAT ACAGTGCGCC CGGAACATAT TCCTTGCTCC AATACACCGA ATTGACCGAG GGCATCTGGT

1610
clon41 ATCCGAGAGG AGGCTTTTGG CA.....
clon43 ATCCGAGAGG AGGCTTTTGG CA.....
crtI ATCCGAGAGG AGGCTTTTGG CAGTTCGTGC TCATCCTGAT CCTTATGTTT GGTTCCTTCC GCTTCAGAGA

1680
clon41 GGTTCCTAAT ACTCTTCTTC
clon43 GGTTCCTAAT ACTCTTCTTC
crtI ATTAACAATT ACTGACAGAA AATCGTATCA ACGCAGCCTT TCTCCAATAG GGTTCCTAAT ACTCTTCTTC

1750
clon41 AGATCGTCAA GCGCAACAAT CCCTCAGCCA AGTTCAATTT CAACGCTCCA GTTTCCCAGG TTCTTCTCTC
clon43 AGATCGTCAA GCGCAACAAT CCCTCAGCCA AGTTCAATTT CAACGCTCCA GTTTCCCAGG TTCTTCTCTC
crtI AGATCGTCAA GCGCAACAAT CCCTCAGCCA AGTTCAATTT CAACGCTCCA GTTTCCCAGG TTCTTCTCTC

1751
clon41 TCCTGCCAAG GACCGAGCGA CTGGTGTTTCG ACTTGAATCC GCGGAGGAAC ATCACGCCGA TGTTGTGATT
clon43 TCCTGCCAAG GACCGAGCGA CTGGTGTTTCG ACTTGAATCC GCGGAGGAAC ATCACGCCGA TGTTGTGATT
crtI TCCTGCCAAG GACCGAGCGA CTGGTGTTTCG ACTTGAATCC GCGGAGGAAC ATCACGCCGA TGTTGTGATT

1820

1890
clon41 GTCAATGCTG ACCTCGTTTA CGCCTCCGAG CACTTGATTC CTGACGATGC CAGAAACAAG ATTGGCCAAC
clon43 GTCAATGCTG ACCTCGTTTA CGCCTCCGAG CACTTGATTC CTGACGATGC CAGAAACAAG ATTGGCCAAC
crtI GTCAATGCTG ACCTCGTTTA CGCCTCCGAG CACTTGATTC CTGACGATGC CAGAAACAAG ATTGGCCAAC

1900 1901
1960
clon41 TGGGTGAAGT CAAGAGAAGT TGGTGGGCTG ACTTAGTTGG TGGAAAGAAG CTCAAGGGAA GTTGCAGTAG
clon43 TGGGTGAAGT CAAGAGAAGT TGGTGGGCTG ACTTAGTTGG TGGAAAGAAG CTCAAGGGAA GTTGCAGTAG
crtI TGGGTGAAGT CAAGAGAAGT TGGTGGGCTG ACTTAGTTGG TGGAAAGAAG CTCAAGGGAA GTTGCAGTAG

2030
clon41 TTTGAGCTTC TACTGGAGCA TGGACCGAAT CGTGGACGGT CTGGGCGGAC ACA.....
clon43 TTTGAGCTTC TACTGGAGCA TGGACCGAAT CGTGGACGGT CTGGGCGGAC ACA.....
crtI TTTGAGCTTC TACTGGAGCA TGGACCGAAT CGTGGACGGT CTGGGCGGAC ACAGTGCGTA GTCCATCCCC

2100
clon41ATATCTTCT
clon43ATATCTTCT
crtI CGAAATCCTC TTTCAAAATC GTAAGTGCAG AGGCTGAAGT TTATTTTAC ACTTTATCTA A GATATCTTCT

2170
clon41 TGGCCGAGGA CTTCAAGGGA TCATTCGACA CAATCTTCGA GGAGTTGGGT CTCCCAGCCG ATCCTTCCTT
clon43 TGGCCGAGGA CTTCAAGGGA TCATTCGACA CAATCTTCGA GGAGTTGGGT CTCCCAGCCG ATCCTTCCTT
crtI TGGCCGAGGA CTTCAAGGGA TCATTCGACA CAATCTTCGA GGAGTTGGGT CTCCCAGCCG ATCCTTCCTT

2240
clon41 TTACGTGAAC GTTCCCTCGC GAATCGATCC TTCTGCCGCT CCCGAAGGCA AAGATGCTAT CGTCATTCTT
clon43 TTACGTGAAC GTTCCCTCGC GAATCGATCC TTCTGCCGCT CCCGAAGGCA AAGATGCTAT CGTCATTCTT
crtI TTACGTGAAC GTTCCCTCGC GAATCGATCC TTCTGCCGCT CCCGAAGGCA AAGATGCTAT CGTCATTCTT

2310
clon41 GTG.....
clon43 GTG.....
crtI GTGGTATGTG CTATTCTCTG TACTTTCGTT TTTGCGCCGC CATGATGTCT CGATTCTCAA ACATACTATA

2380
clon41CCGTG TGGCCATATC GACGCTTCGA ACCCTCAAGA TTACAACAAG CTTGTTGCTC
clon43CCGTG TGGCCATATC GACGCTTCGA ACCCTCAAGA TTACAACAAG CTTGTTGCTC
crtI TCGAACCCCC CTTAGCCGTG TGGCCATATC GACGCTTCGA ACCCTCAAGA TTACAACAAG CTTGTTGCTC

2450
clon41 GGGCAAGGAA GTTTGTGATC CACACGCTTT CCGCCAAGCT TGGACTTCCC GACTTTGAAA AAATGATTGT
clon43 GGGCAAGGAA GTTTGTGATC CACACGCTTT CCGCCAAGCT TGGACTTCCC GACTTTGAAA AAATGATTGT
crtI GGGCAAGGAA GTTTGTGATC CAAACGCTTT CCGCCAAGCT TGGACTTCCC GACTTTGAAA AAATGATTGT

2520
clon41 GGCAGAGAAG GTTACAGATG CTCCTCTTG GGAGAAAGAA TTCAACCTCA AGGACGGAAG CATCTTGGGA
clon43 GGCAGAGAAG GTTACAGATG CTCCTCTTG GGAGAAAGAA TTCAACCTCA AGGACGGAAG CATCTTGGGA
crtI GGCAGAGAAG GTTACAGATG CTCCTCTTG GGAGAAAGAA TTCAACCTCA AGGACGGAAG CATCTTGGGA

2590
clon41 CTGGCTCACA ACTTTATGCA AGTTCTTGGT TTCAGGCCGA GCACCAGACA TCCCAAGTAT GACAAGTTGT
clon43 CTGGCTCACA ACTTTATGCA AGTTCTTGGT TTCAGGCCGA GCACCAGACA TCCCAAGTAT GACAAGTTGT
crtI CTGGCTCACA ACTTTATGCA AGTTCTTGGT TTCAGGCCGA GCACCAGACA TCCCAAGTAT GACAAGTTGT

2660
clon41 TCTTTGTCGG GGCTTCGACT CATCCCGGAA CTGGGGTTCC CATCGTCTTG GCTGGAGCCA AGTTAACTGC
clon43 TCTTTGTCGG GGCTTCGACT CATCCCGGAA CTGGGGTTCC CATCGTCTTG GCTGGAGCCA AGTTAACTGC
crtI TCTTTGTCGG GGCTTCGACT CATCCCGGAA CTGGGGTTCC CATCGTCTTG GCTGGAGCCA AGTTAACTGC

2730
clon41 CAACCAAGTT CTCGAATCCT TTGACCGATC CCCAGCTCCA GATCCCAATA TGTCACCTCTC CGTACCATAT
clon43 CAACCAAGTT CTCGAATCCT TTGACCGATC CCCAGCTCCA GATCCCAATA TGTCACCTCTC CGTACCATAT
crtI CAACCAAGTT CTCGAATCCT TTGACCGATC CCCAGCTCCA GATCCCAATA TGTCACCTCTC CGTACCATAT

```

                                                    2800
clon41  GGAAAACCTC TCAAATCAAA TGGAACGGGT ATCGATTCTC AGGTCCAGCT GAAGTTCAGA TGGGTATAACC
clon43  GGAAAACCTC TCAAATCAAA TGGAACGGGT ATCGATTCTC AGGTCCAGCT GAAGTTCAGA TGGGTATAACC
  crtI  GGAAAACCTC TCAAATCAAA TGGAACGGGT ATCGATTCTC AGGTCCAGCT GAAGTTCAGA TGGGTATAACC

                                                    2870
clon41  TTTTGGTATT GTTGATTGGG GCCGTGATCG CTCGATCCGT TGGTGTTCCT GCTTTCTGAA GCAAGACAAC
clon43  TTTTGGTATT GTTGATTGGG GCCGTGATCG CTCGATCCGT TGGTGTTCCT GCTTTCTGAA GCAAGACAAC
  crtI  TTTTGGTGTT GTTGATTGGG GCCGTGATCG CTCGATCCGT TGGTGTTCCT GCTTTCTGAA GCAAGACAAC

                                                    2940
clon41  GATCCTTTCT TAGAGTTTTA TTTTAGTCTC TTCCTGTGTT CTCTCTATAT ACATACTCTG CTCGTCTGTT
clon43  GATCCTTTCT TAGAGTTTTA TTTTAGTCTC TTCCTGTGTT CTCTCTATAT ACATACTCTG CTCGTCTGTT
  crtI  GATCGTTTCT TAGAGTTTT. TTTTAGTCTC TTCCTGTGTT CTCTCTATAT ACATACTCTG CTCGTCTGTT

                2950 2951
clon41  CTCTTCTCGA GGGTTCCTCT TTACTTTGTG TCAGAGTCAT ACCCGG..TC TCTCAACGTC CGTTTGAGGG
clon43  CTCTTCTCGA GGGTTCCTCT TTACTTTGTG TCAGAGTCAT ACCCGG..TC TCTCAACGTC CGTTTGAGGG
  crtI  CTCTTCTCGA GGGTTCCTCT TTACTTTGTG TCAGAGTCAT ACCCGGTCTC TCTCAACGTC CGTTTGAGGG

                                                    3078
clon41  CTAGACAATT GTTAGTCTCG AAATCTCCAT CACCTCAAGT CTGATGTTCa TCATCTTTTT TATTTCGTT
clon43  CTAGACAATT GTTAGTCTCG AAATCTCCAT CACCTCAAGT CTGATGTTCa TCATCTTTTT TATTTCGTT
  crtI  CTAGACAATT GTTAGTCTCG AAATCTCCAT CACCTCAAGT CTGATGTTCa TCATCTTTTT TATTTCGTT

```

Figura 5. Alineamiento del gen *crtI* de la cepa CBS 6938 (GenBank, N° de acceso Y15007) con los cDNAs de la cepa UCD 67-385 (clon 41 y clon 43). La línea punteada indica las secuencias que están ausentes en los cDNAs. En amarillo se destaca el fragmento del intrón 1 presente en el cDNA del clon 43. El sitio de procesamiento alternativo 3' (AG) se señala en azul y en recuadrado. Los sitios de procesamiento adecuado 5' y 3' de los intrones se indican subrayados y en negrita. Los sitios de inicio y fin de la traducción se encuentran en negrita. Las diferencias puntuales entre la secuencia de la cepa CBS 6938 y las secuencias de la cepa UCD 67-385 se indican en rojo. Los cambios de codones UUU → CUU y CAA → CAC, que se señalan en un recuadro, ocasionan cambios de aminoácidos, Phe a Leu y Gln a His, respectivamente.

Estos partidores se usaron para amplificar DNA genómico de la levadura, cDNA de hebra simple (reacción RT) y DNA de los plásmidos pL25 y pC13. Ambos plásmidos consisten en el vector pBluescript SK en el cual se ha clonado al gen *crtI* amplificado por PCR (pL25) y un fragmento de DNA genómico de 18,5 kb que contiene al gen *crtI* (pC13). Cuando se utilizó como sustrato DNA genómico o plasmidial con los partidores CRTI1 y CRTI4 se amplificó un producto principal del tamaño esperado (~2600 pb) mientras que con cDNA de hebra simple como sustrato se obtuvo una banda de tamaño menor (~ 1700 pb) debido a la ausencia de intrones (Figura 6). Por otra parte, con los partidores CRTI-AF - CRTI4 y con DNA genómico o plasmidial como sustrato no se obtuvo producto de amplificación, mientras que con cDNA como sustrato se obtuvo como producto una banda del tamaño esperado (~1800 pb). Estos resultados indican que no existe en el genoma un gen con la estructura del nuevo cDNA aislado, sino que el mensajero alternativo se originaría por un procesamiento alternativo a partir de un pre-mensajero que proviene del gen *crtI* ya descrito.

Con el objeto de establecer si los transcriptos mmRNA y amRNA se expresaban a lo largo del ciclo de vida, se analizaron por RT-PCR muestras de RNA total de la cepa UCD 67-385 y de la cepa mutante *atxS2* en distintos momentos del ciclo de crecimiento. Para la detección del mmRNA se diseñaron los partidores CRTI-MF y CRTI-MR (Figura 4 y Tabla 2), con los cuales se esperaba un producto de amplificación de 227 pb. Para la detección del amRNA se utilizaron los partidores CRTI-AF y CRTI-AR (Figura 4 y Tabla 2), con los cuales se esperaba un producto de amplificación de 167 pb.

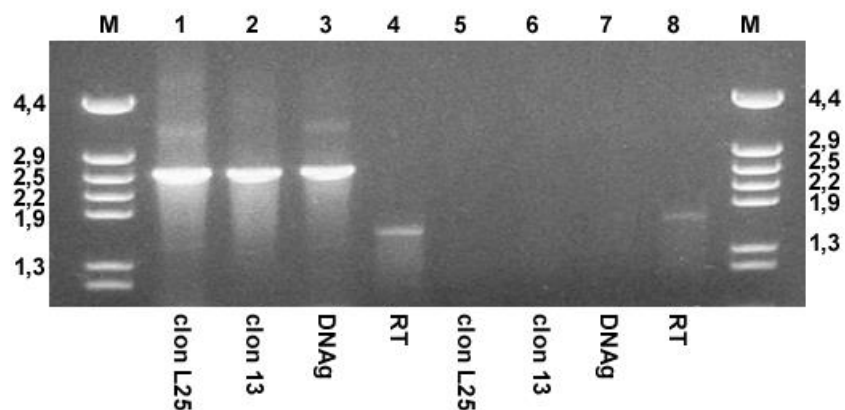


Figura 6. Amplificación del gen *crtI* con los partidores CRTI1-CRTI4 (carriles 1, 2, 3, 4) y con los partidores CRTIAF-CRTI4 (carriles 5, 6, 7, 8). Los sustratos fueron reacción RT (cDNA de hebra simple) (carriles 4 y 8), DNA genómico (carriles 3 y 7), DNA del plásmido pL25 (carriles 1 y 5) y DNA del plásmido pC13 (carriles 2 y 6). M, Marcador de tamaño molecular $\phi 29/Hind$ III. Los productos de las reacciones se corrieron en un gel de agarosa 1 % y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

Los resultados mostraron que se habían amplificado los productos del tamaño esperado para ambas cepas. Por otra parte, los niveles de expresión de ambos mensajeros son levemente variables a lo largo del ciclo de crecimiento tanto en la cepa silvestre como en la mutante, cuando sus niveles se comparan con el nivel del mensajero *act* (Figura 7 A y B).

Con respecto al gen *crtYB*, la amplificación de cDNA a partir de RNA total de la cepa UCD 67-385 con los partidores GPRN1 y GPRN2 resultó en una banda de aproximadamente 2,3 kb (Figura 8A). Dicha banda se purificó del gel de agarosa y se clonó en el vector Bluescript SK como se describió anteriormente. Por otra parte, la síntesis de cDNA a partir de otra muestra de RNA total de la misma cepa con los partidores PBS1 y PBS2 resultó en dos bandas de aproximadamente 2,6 kb y 2,2 kb que también se clonaron (Figura 8B).

La secuenciación de los dos productos de PCR mostrados en la Figura 8B indicó que la banda de mayor tamaño correspondía a un pre-mensajero con todos sus intrones sin procesar, mientras que la banda de menor tamaño correspondía al mensajero maduro. Por otra parte, el análisis de la secuencia de uno de los clones que portaba el cDNA que se muestra en la Figura 8A, indicó que dicho cDNA se había sintetizado a partir de un mensajero con una estructura distinta a la del mensajero maduro. Este cDNA conserva 55 pb del primer intrón y pierde 111 pb del segundo exón, mientras que el resto de los intrones y exones están procesados en forma correcta (Alcaíno, 2002). El mensajero podría haber sido sintetizado a partir de un RNA que siguió una vía de ‘splicing’ alternativo en un sitio 5’ (GT) dentro del primer intrón y en un sitio 3’ (AG) dentro del segundo exón (Figura 9).

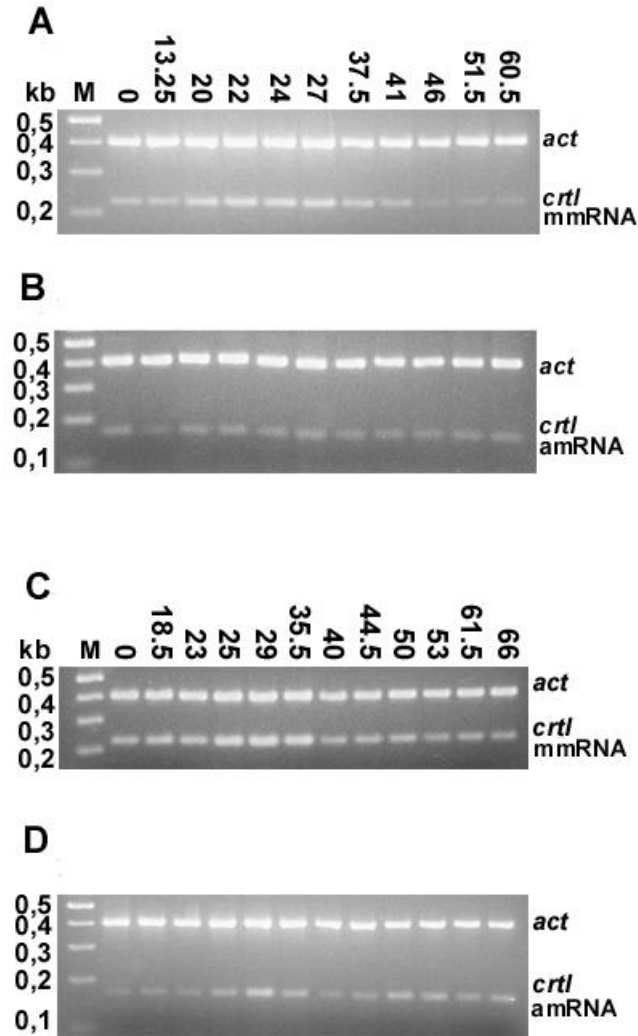


Figura 7. Amplificación mediante RT-PCR del cDNA correspondiente al mRNA de actina (*act*), del cDNA correspondiente al mRNA maduro del gen *crtI* (mmRNA) y del cDNA correspondiente al mRNA alternativo del gen *crtI* (amRNA). Se aislaron muestras de RNA total de un cultivo de la cepa UCD 67-385 (A-B) y de un cultivo de la cepa atxS2 (C-D) en distintos tiempos del ciclo de crecimiento (hrs), los cuales se indican en la parte superior de cada panel. Los productos de las reacciones se corrieron en un gel de agarosa 3 % y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Se cargaron volúmenes iguales de las reacciones en cada carril.

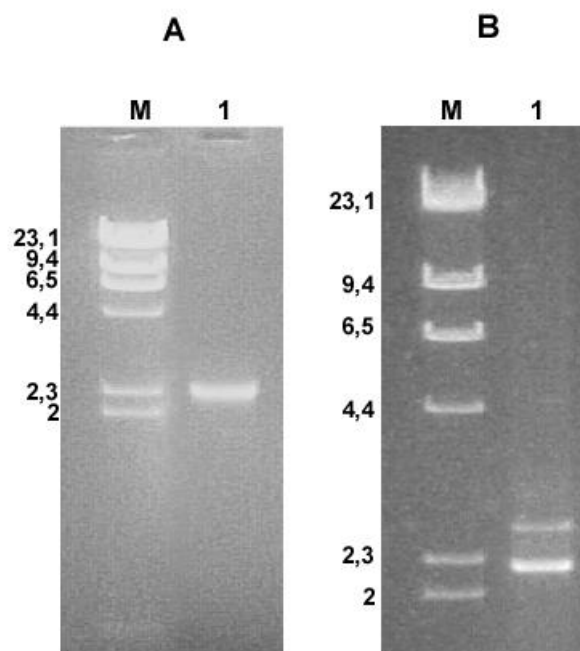


Figura 8. Amplificación mediante RT-PCR del cDNA del gen *crtYB* con los partidores GPRN1-GPRN2 (A) y PBS1-PBS2 (B). M, Marcador de tamaño molecular λ /*Hind* III. Los productos de las reacciones se corrieron en un gel de agarosa 1 % y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

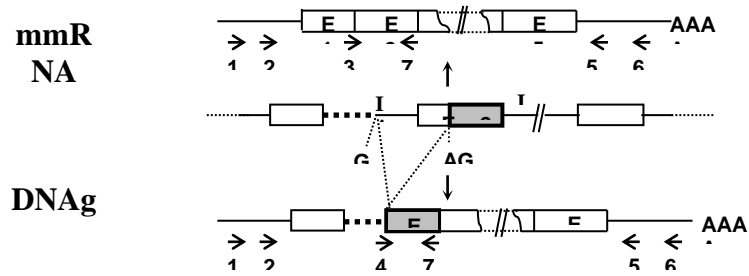


Figura 9. Esquema de la estructura del DNA genómico (DNAg) y del mensajero maduro (mmRNA) y alternativo (amRNA) del gen *crtYB*. E, exón; I, intrón. Con una línea punteada en negrita se señala el fragmento del primer intrón que se conserva en el mensajero alternativo. En color gris se señala la secuencia del segundo exón que se conserva en el mensajero alternativo. Las flechas indican la ubicación de los partidores: 1, PBS1; 2, GPRN1; 3, FS-M; 4, FS-A; 5, PBS2; 6, GPRN2; 7, FS-R2. El diagrama no está a escala.

El alineamiento de la secuencia de los mensajeros del gen *crtYB* de la cepa UCD 67-385 con la secuencia de la cepa CBS 6938, señala que además existen algunos cambios de bases que resultan en la sustitución de un aminoácido (Figura 10). La traducción del amRNA del gen *crtYB* produce, como en el caso del gen *crtI*, codones de término de la traducción a lo largo de toda la secuencia.

Con el objetivo de establecer si los transcriptos mmRNA del gen *crtYB* y amRNA del gen *crtYB* se expresaban a lo largo del ciclo de vida, se diseñaron partidores específicos para cada uno (Figura 9 y Tabla 2). La amplificación del mensajero maduro por RT-PCR con los partidores FS-M y FS-R2 resultó en un producto del tamaño esperado (~ 220 pb). Por otra parte, la amplificación con los partidores FS-A y FS-R resultó en un producto de 110 pb aproximadamente, que es el tamaño esperado para la amplificación por RT-PCR del amRNA (Figura 11). Los niveles de ambos mensajeros son levemente variables a lo largo del ciclo de crecimiento para la cepa silvestre y la mutante.

Por otra parte, el análisis de estos resultados indica que el producto de PCR obtenido con los partidores GPRN1 - GPRN2 y la banda de menor tamaño obtenida con los partidores PBS1 - PBS2, deben ser poblaciones mixtas de cDNAs sintetizados a partir de los mensajeros maduro y alternativo. Puesto que estos cDNAs sólo difieren en 56 pb no se separaron en las condiciones de electroforesis que se emplearon.

	1						70		
m-cDNA	TACCCA	ACTC	GTATCAT	CCC	CAACAGATAG	AGTTTTTGTC	GCAATGACGG	CTCTCGCATA	TTACCAGAT
a-cDNA	TACCCA	ACTC	GTATCAT	CCC	CAACAGATAG	AGTTTTTGTC	GCAATGACGG	CTCTCGCATA	TTACCAGAT
crtYB	TACCCA	ACTC	GTATCAT	CCC	CAACAGATAG	AGTTTTTGTC	GCA ATG ACGG	CTCTCGCATA	TTACCAGAT
							140		
m-cDNA		
a-cDNA	TTTGTCTCCA	TACCTCTTCT	TCGTTTTGCA	CACCACTCAT	GTGTGCATAT	GTGT		
crtYB	TTTGTCTCCA	TACCTCTTCT	TCGTTTTGCA	CACCACTCAT	GTGTGCATAT	GTGT	GTGCGT	CCTTCCAAAT	
							210		
m-cDNA	CCATCTGATC	TATACTCTCC	CAATTCTTGG	
a-cDNA	
crtYB	CITTTCAATGA	CTAACATCTT	TACCGTGCTC	TTCTTCTT AG	CCATCTGATC	TATACTCTCC	CAATTCTTGG		
							280		
m-cDNA	TCTTCTCGGC	CTGCTCACTT	CCCCGATTTT	GACAAAATTT	GACATCTACA	AAATATCGAT	CCTCGTATTT		
a-cDNA		
crtYB	TCTTCTCGGC	CTGCTCACTT	CCCCGATTTT	GACAAAATTT	GACATCTACA	AAATATCGAT	CCTCGTATTT		
							300		
m-cDNA	ATTCGTTT A	GTGCAACCAC	ACCATGGGAC	TCATGGATCA	TCAGAAATGG	CGCATGGACA	TATCCATCAG		
a-cDNA		
crtYB	ATTCGTTT	GTGCAACCAC	ACCATGGGAC	TCATGGATCA	TCAGAAATGG	CGCATGGACA	TATCCATCAG		
							301		
m-cDNA	CGGAGAGTGG	CCAAGGCGTG	TTTGGAACGT	TTCTAGA...		
a-cDNA	CGGAGAGTGG	CCAAGGCGTG	TTTGGAACGT	TTCTAGA...		
crtYB	CGGAGAGTGG	CCAAGGCGTG	TTTGGAACGT	TTCTAGA GT	AGTCGACCGT	TAATACTCTT	AGCCGCGCGT		
							420		
m-cDNA		
a-cDNA		
crtYB	CGTTTCCGCG	ATTACATTTA	ACATCTGAAT	TTATCCCTGA	TCAAC AG TGT	TCCATATGAA	GAGTACGCTT		
							490		
m-cDNA		
a-cDNA		
crtYB	CGTTTCCGCG	ATTACATTTA	ACATCTGAAT	TTATCCCTGA	TCAAC AG TGT	TCCATATGAA	GAGTACGCTT		
							560		
m-cDNA	TCTTTGTCAT	TCAAACCGTA	ATCACCGGCT	TGGTCTACGT	CTTGGCAACT	AGGCACCTTC	TCCCATCTCT		
a-cDNA	TCTTTGTCAT	TCAAACCGTA	ATCACCGGCT	TGGTCTACGT	CTTGGCAACT	AGGCACCTTC	TCCCATCTCT		
crtYB	TCTTTGTCAT	TCAAACCGTA	ATCACCGGCT	TGGTCTACGT	CTTGGCAACT	AGGCACCTTC	TCCCATCTCT		
							630		
m-cDNA	CGCGCTTCCC	AAGACTAGAT	CGTCCGCCCT	TTCTCTCGCG	CTCAAGGCGC	TCATCCCTCT	GCCCATATATC		
a-cDNA	CGCGCTTCCC	AAGACTAGAT	CGTCCGCCCT	TTCTCTCGCG	CTCAAGGCGC	TCATCCCTCT	GCCCATATATC		
crtYB	CGCGCTTCCC	AAGACTAGAT	CGTCCGCCCT	TTCTCTCGCG	CTCAAGGCGC	TCATCCCTCT	GCCCATATATC		
							700		
m-cDNA	TACCTATTTA	CCGCTCACCC	CAGCCCATCG	CCCGACCCGC	TCGTGACAGA	TCACTACTTC	TACATGCGGG		
a-cDNA	TACCTATTTA	CCGCTCACCC	CAGCCCATCG	CCCGACCCGC	TCGTGACAGA	TCACTACTTC	TACATGCGGG		
crtYB	TACCTATTTA	CCGCTCACCC	CAGCCCATCG	CCCGACCCGC	TCGTGACAGA	TCACTACTTC	TACATGCGGG		
							701		
m-cDNA	CACTCTCCTT	ACTCATCACC	CCACCTACCA	TGCTCTTGGC	AGCATTATCA	GGCGAATATG	CTTTCGATTG		
a-cDNA	CACTCTCCTT	ACTCATCACC	CCACCTACCA	TGCTCTTGGC	AGCATTATCA	GGCGAATATG	CTTTCGATTG		
crtYB	CACTCTCCTT	ACTCATCACC	CCACCTACCA	TGCTCTTGGC	AGCATTATCA	GGCGAATATG	CTTTCGATTG		
							770		
m-cDNA	GAAAAGTGGC	CGAGCAAAGT	CAACTATTGC	AGCAATCATG	ATCCCGACGG	TGTATCTGAT	TTGGGTAGAT		
a-cDNA	GAAAAGTGGC	CGAGCAAAGT	CAACTATTGC	AGCAATCATG	ATCCCGACGG	TGTATCTGAT	TTGGGTAGAT		
crtYB	GAAAAGTGGC	CGAGCAAAGT	CAACTATTGC	AGCAATCATG	ATCCCGACGG	TGTATCTGAT	TTGGGTAGAT		
							840		
m-cDNA	TATGTTGCTG	TCGGTCAAGA	CTCTTGGTCG	ATCAACGATG	AGAAGATTGT	AGGGTGGAGG	CTTGGAGGTG		
a-cDNA	TATGTTGCTG	TCGGTCAAGA	CTCTTGGTCG	ATCAACGATG	AGAAGATTGT	AGGGTGGAGG	CTTGGAGGTG		
crtYB	TATGTTGCTG	TCGGTCAAGA	CTCTTGGTCG	ATCAACGATG	AGAAGATTGT	AGGGTGGAGG	CTTGGAGGTG		
							910		
m-cDNA	TATGTTGCTG	TCGGTCAAGA	CTCTTGGTCG	ATCAACGATG	AGAAGATTGT	AGGGTGGAGG	CTTGGAGGTG		
a-cDNA	TATGTTGCTG	TCGGTCAAGA	CTCTTGGTCG	ATCAACGATG	AGAAGATTGT	AGGGTGGAGG	CTTGGAGGTG		
crtYB	TATGTTGCTG	TCGGTCAAGA	CTCTTGGTCG	ATCAACGATG	AGAAGATTGT	AGGGTGGAGG	CTTGGAGGTG		

							980
m-cDNA	TACTACCCAT	TGAGGAAGCT	ATGTTCTTCT	TACTGACGAA	TCTAATGATT	GTTCTGGGTC	TGTCTGCCTG
a-cDNA	TACTACCCAT	TGAGGAAGCT	ATGTTCTTCT	TACTGACGAA	TCTAATGATT	GTTCTGGGTC	TGTCTGCCTG
crtYB	TACTACCCAT	TGAGGAAGCT	ATGTTCTTCT	TACTGACGAA	TCTAATGATT	GTTCTGGGTC	TGTCTGCCTG
							1050
m-cDNA
a-cDNA
crtYB	<u>GT</u> AAGTTGAT	CTCATCCTCT	CTTCCTTTGG	TGAAAAAAGC	TGTTTGGCTG	ATTGCTGCGA	ACTCACCCAT
							1120
m-cDNACGATCATA	CTCAGGCCCT	ATACCTGCTA	CACGGTCGAA	CTATTTATGG	CAACAAAAAG
a-cDNACGATCATA	CTCAGGCCCT	ATACCTGCTA	CACGGTCGAA	CTATTTATGG	CAACAAAAAG
crtYB	CGGAATCTGT	<u>AG</u> CGATCATA	CTCAGGCCCT	ATACCTGCTA	CACGGTCGAA	CTATTTATGG	CAACAAAAAG
							1190
m-cDNA	ATGCCATCTT	CATTTCCCCT	CATTACACCG	CCTGTGCTCT	CCCTGTTTTT	TAGCAGCCGA	CCATACTCTT
a-cDNA	ATGCCATCTT	CATTTCCCCT	CATTACACCG	CCTGTGCTCT	CCCTGTTTTT	TAGCAGCCGA	CCATACTCTT
crtYB	ATGCCATCTT	CATTTCCCCT	CATTACACCG	CCTGTGCTCT	CCCTGTTTTT	TAGCAGCCGA	CCATACTCTT
	1200	1201					1260
m-cDNA	CTCAGCCAAA	ACGTGACTTG	GAACTGGCAG	TCAAGTTGTT	GGAG <u>G</u> AAAAG	AGCCGGAGCT	TTTTTGTTC
a-cDNA	CTCAGCCAAA	ACGTGACTTG	GAACTGGCAG	TCAAGTTGTT	GGAG <u>G</u> AAAAG	AGCCGGAGCT	TTTTTGTTC
crtYB	CTCAGCCAAA	ACGTGACTTG	GAACTGGCAG	TCAAGTTGTT	GGAG <u>A</u> AAAAG	AGCCGGAGCT	TTTTTGTTC
							1330
m-DNA	CTCGGCTGGA	TTCCTAGCG	AAGTTAGGGA	GAGGCTGGTT	GGACT.....
a-DNA	CTCGGCTGGA	TTCCTAGCG	AAGTTAGGGA	GAGGCTGGTT	GGACT.....
crtYB	CTCGGCTGGA	TTCCTAGCG	AAGTTAGGGA	GAGGCTGGTT	GGACT <u>GT</u> GAG	CACGCATTCT	TTAGGTTTGT
							1400
m-cDNAATACG
a-cDNAATACG
crtYB	TGGTCTTTC	ACCTTCATGT	GCATTCGCTG	ATCAGTTTTC	TTGGTGATCC	GGGACCTGCA	TAC <u>AG</u> ATACG
							1470
m-cDNA	CATTCTGCCG	GGTGACTGAT	GATCTTATCG	ACTCTCCTGA	AGTATCTTCC	AACCCGCATG	CCACAATTGA
a-cDNA	CATTCTGCCG	GGTGACTGAT	GATCTTATCG	ACTCTCCTGA	AGTATCTTCC	AACCCGCATG	CCACAATTGA
crtYB	CATTCTGCCG	GGTGACTGAT	GATCTTATCG	ACTCTCCTGA	AGTATCTTCC	AACCCGCATG	CCACAATTGA
							1540
m-cDNA	CATGGTCTCC	GATTTTCTTA	CCCTACTATT	TGGGCCCCCG	CTACACCCTT	CGCAACCTGA	CAAGATCCTT
a-cDNA	CATGGTCTCC	GATTTTCTTA	CCCTACTATT	TGGGCCCCCG	CTACACCCTT	CGCAACCTGA	CAAGATCCTT
crtYB	CATGGTCTCC	GATTTTCTTA	CCCTACTATT	TGGGCCCCCG	CTACACCCTT	CGCAACCTGA	CAAGATCCTT
							1610
m-cDNA	TCTTCGCCTT	TACTTCCTCC	TTCGCACCCT	TCCCGACCCA	CGGGAATGTA	TCCCCTCCCG	CCTCCTCCTT
a-cDNA	TCTTCGCCTT	TACTTCCTCC	TTCGCACCCT	TCCCGACCCA	CGGGAATGTA	TCCCCTCCCG	CCTCCTCCTT
crtYB	TCTTCGCCTT	TACTTCCTCC	TTCGCACCCT	TCCCGACCCA	CGGGAATGTA	TCCCCTCCCG	CCTCCTCCTT
							1680
m-cDNA	CGCTCTCGCC	TGCCGAGCTC	GTTCAATTCC	TTACCGAAAG	GGTTCCCGTT	CAATACCATT	TCGCCTTCAG
a-cDNA	CGCTCTCGCC	TGCCGAGCTC	GTTCAATTCC	TTACCGAAAG	GGTTCCCGTT	CAATACCATT	TCGCCTTCAG
crtYB	CGCTCTCGCC	TGCCGAGCTC	GTTCAATTCC	TTACCGAAAG	GGTTCCCGTT	CAATACCATT	TCGCCTTCAG
		1700	1701				1750
m-cDNA	GTTGCTCGCT	AAGTTGCAAG	GGCTGATCCC	TCGATACCCA	CTCGACGAAC	TCCTTAGAGG	ATACACCACT
a-cDNA	GTTGCTCGCT	AAGTTGCAAG	GGCTGATCCC	TCGATACCCA	CTCGACGAAC	TCCTTAGAGG	ATACACCACT
crtYB	GTTGCTCGCT	AAGTTGCAAG	GGCTGATCCC	TCGATACCCA	CTCGACGAAC	TCCTTAGAGG	ATACACCACT
	1751						1820
m-cDNA	GATCTTATCT	TTCC <u>T</u> TTATC	GACAGAGGCA	GTCCAGGCTC	GGAAGACGCC	TATCGAGACC	ACAGCTGACT
a-cDNA	GATCTTATCT	TTCC <u>T</u> TTATC	GACAGAGGCA	GTCCAGGCTC	GGAAGACGCC	TATCGAGACC	ACAGCTGACT
crtYB	GATCTTATCT	TTCCCTTATC	GACAGAGGCA	GTCCAGGCTC	GGAAGACGCC	TATCGAGACC	ACAGCTGACT

1890
m-cDNA TGCTGGACTA TGGTCTATGT GTAGCAGGCT CAGTCGCCGA GCTATTGGTC TATGTCTCTT GGGCAAGTGC
a-cDNA TGCTGGACTA TGGTCTATGT GTAGCAGGCT CAGTCGCCGA GCTATTGGTC TATGTCTCTT GGGCAAGTGC
crtYB TGCTGGACTA TGGTCTATGT GTAGCAGGCT CAGTCGCCGA GCTATTGGTC TATGTCTCTT GGGCAAGTGC

1960
m-cDNA ACCAAGTCAG GTCCTTGCCA CCATAGAAGA AAGAGAAGCT GTGTTAGTGG CAAGCCGAGA GATGGGAACT
a-cDNA ACCAAGTCAG GTCCTTGCCA CCATAGAAGA AAGAGAAGCT GTGTTAGTGG CAAGCCGAGA GATGGGAACT
crtYB ACCAAGTCAG GTCCTTGCCA CCATAGAAGA AAGAGAAGCT GTGTTAGTGG CAAGCCGAGA GATGGGAACT

2030
m-cDNA GCCCTTCAGT TGGTGAACAT TGCTAGGGAC ATTTAAAGGGG ACGCAACAGA AGGGAGATTT TACCTACCAC
a-cDNA GCCCTTCAGT TGGTGAACAT TGCTAGGGAC ATTTAAAGGGG ACGCAACAGA AGGGAGATTT TACCTACCAC
crtYB GCCCTTCAGT TGGTGAACAT TGCTAGGGAC ATTTAAAGGGG ACGCAACAGA AGGGAGATTT TACCTACCAC

2100
m-cDNA TCTCATTCTT TGGTCTTCGG GATGAATCAA AGCTTGCGAT CCCGACTGAT TGGACGGAAC CTCGGCCTCA
a-cDNA TCTCATTCTT TGGTCTTCGG GATGAATCAA AGCTTGCGAT CCCGACTGAT TGGACGGAAC CTCGGCCTCA
crtYB TCTCATTCTT TGGTCTTCGG GATGAATCAA AGCTTGCGAT CCCGACTGAT TGGACGGAAC CTCGGCCTCA

2101
m-cDNA AGATTTTCGAC AAACCTCTCA GTCTATCTCC TTCGTCCACA TTACCATCTT CAAACGCCTC AGAAAGCTTC
a-cDNA AGATTTTCGAC AAACCTCTCA GTCTATCTCC TTCGTCCACA TTACCATCTT CAAACGCCTC AGAAAGCTTC
crtYB AGATTTTCGAC AAACCTCTCA GTCTATCTCC TTCGTCCACA TTACCATCTT CAAACGCCTC AGAAAGCTTC

2240
m-cDNA CGGTTTCGAAT GGAAGACGTA CTCGCTTCCA TTAGTCGCCT ACGCAGAGGA TCTTGCCAAA CATTCTTATA
a-cDNA CGGTTTCGAAT GGAAGACGTA CTCGCTTCCA TTAGTCGCCT ACGCAGAGGA TCTTGCCAAA CATTCTTATA
crtYB CGGTTTCGAAT GGAAGACGTA CTCGCTTCCA TTAGTCGCCT ACGCAGAGGA TCTTGCCAAA CATTCTTATA

2310
m-cDNA AGGGAATTGA CCGACTTCCT ACCGAGGTTT AAGCGGGAAT GCGAGCGGCT TGCGCGAGCT ACCTACTGAT
a-cDNA AGGGAATTGA CCGACTTCCT ACCGAGGTTT AAGCGGGAAT GCGAGCGGCT TGCGCGAGCT ACCTACTGAT
crtYB AGGGAATTGA CCGACTTCCT ACCGAGGTTT AAGCGGGAAT GCGAGCGGCT TGCGCGAGCT ACCTACTGAT

2380
m-cDNA CGGCCGAGAG ATCAAAGTCG TTTGGAAAGG AGACGTCGGA GAGAGAAGGA CAGTTGCCGG ATGGAGGAGA
a-cDNA CGGCCGAGAG ATCAAAGTCG TTTGGAAAGG AGACGTCGGA GAGAGAAGGA CAGTTGCCGG ATGGAGGAGA
crtYB CGGCCGAGAG ATCAAAGTCG TTTGGAAAGG AGACGTCGGA GAGAGAAGGA CAGTTGCCGG ATGGAGGAGA

2450
m-cDNA GTACGGAAAG TCTTGAGTGT GGTTCATGAGC GGATGGGAAG GGCAGTAAGA CAGCGGAAGA ATACCGACAG
a-cDNA GTACGGAAAG TCTTGAGTGT GGTTCATGAGC GGATGGGAAG GGCAGTAAGA CAGCGGAAGA ATACCGACAG
crtYB GTACGGAAAG TCTTGAGTGT GGTTCATGAGC GGATGGGAAG GGCAG**TAAGA** CAGCGGAAGA ATACCGACAG

2520
m-cDNA ACAATGATGA GTGAGAATAA AATCATCCTC AATCTTCTTT CTCTAGGTGC TCTTTTTTGT TTTCTATTAT
a-cDNA ACAATGATGA GTGAGAATAA AATCATCCTC AATCTTCTTT CTCTAGGTGC TCTTTTTTGT TTTCTATTAT
crtYB ACAATGATGA GTGAGAATAA AATCATCCTC AATCTTCTTT CTCTAGGTGC TCTTTTTTGT TTTCTATTAT

2590
m-cDNA GACCAACTCT AAAGGAACTG GCCTTGCAGA TATTTCTCTT CCCCCATCT TCCTCCTTTC CATCGTTTGT
a-cDNA GACCAACTCT AAAGGAACTG GCCTTGCAGA TATTTCTCTT CCCCCATCT TCCTCCTTTC CATCGTTTGT
crtYB GACCAACTCT AAAGGAACTG GCCTTGCAGA TATTTCTCTT CCCCCATCT TCCTCCTTTC CATCGTTTGT

2660
m-cDNA TCTTTCATT TTTGTCGGTT TACTATGTCA ATTCTTTTTT TGCTTTTTTC TTATCAATCT AGACAATTCT
a-cDNA TCTTTCATT TTTGTCGGTT TACTATGTCA ATTCTTTTTT TGCTTTTTTC TTATCAATCT AGACAATTCT
crtYB TCTTTCATT TTTGTCGGTT TACTATGTCA ATTCTTTTTT TGCTTTTTTC TTATCAATCT AGACAATTCT

2705
m-cDNA ATAGATGTTT AGAATGTATA CATTGACAGG TTATAGACCA TAAAG
a-cDNA ATAGATGTTT AGAATGTATA CATTGACAGG TTATAGACCA TAAAG
crtYB ATAGATGTTT AGAATGTATA CATTGACAGG TTATAGACCA TAAAG

Figura 10. Alineamiento del gen *crtYB* (GenBank, N° de acceso AJ133646) de la cepa CBS 6938 con los cDNAs (a-cDNA y m-cDNA) del gen *crtYB* de la cepa UCD 67-385, provenientes de un mensajero procesado en forma alternativa y de un mensajero maduro, respectivamente. Con línea punteada se indican las secuencias ausentes en los cDNAs. En azul y recuadrados se muestran los sitios de procesamiento alternativo 5' (GT) dentro del primer intrón y 3' (AG) dentro del segundo exón. Los sitios de procesamiento adecuado de los intrones se muestran subrayados y en negrita. En amarillo se destaca el fragmento del primer intrón que se conserva en el cDNA debido al procesamiento alternativo y en rojo se destaca la secuencia del segundo exón que falta en el cDNA que corresponde al mRNA alternativo. Los sitios de inicio y fin de la traducción se señalan en negrita, mientras que en rojo se señalan las diferencias puntuales entre ambas secuencias. El cambio en el codón AAA → GAA, que se señala en un recuadro, lleva a un cambio del aminoácido Lys a Glu.

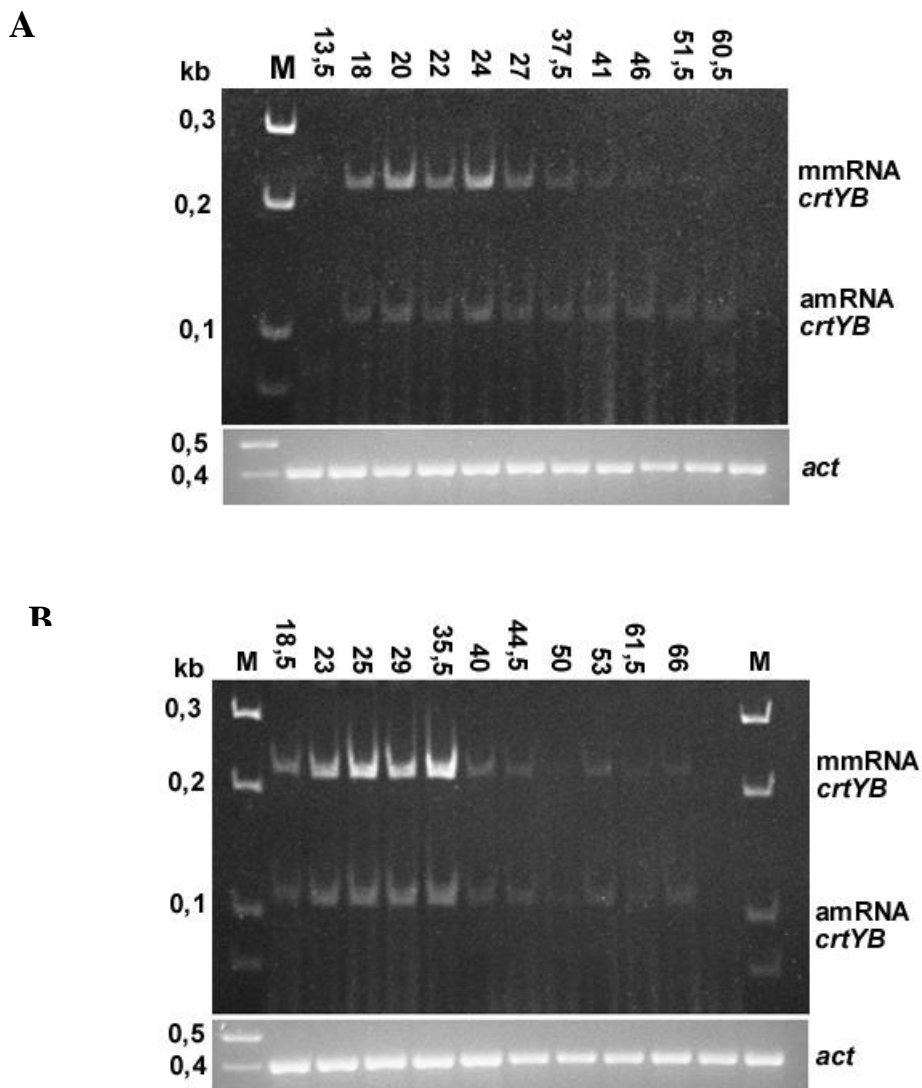


Figura 11. Amplificación mediante RT-PCR de los cDNAs correspondientes al mRNA de actina (*act*), mRNA maduro del gen *crtYB* (mmRNA) y mRNA alternativo del gen *crtYB* (amRNA). Se aislaron muestras de RNA total de un cultivo de la cepa UCD 67-385 (A) y de un cultivo de la cepa atxS2 (B) en distintos tiempos del ciclo de crecimiento (hrs), los cuales se indican en la parte superior de cada panel. Los productos de las reacciones para el gen *act* se corrieron en un gel de agarosa 3 % y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Se cargaron volúmenes iguales de las reacciones en cada carril. Los productos de la amplificación para el gen *crtYB* se corrieron en un gel de poliacrilamida 4,5 % y se tiñeron con bromuro de etidio. Se cargó el volumen total de las reacciones en cada carril.

3.2. Estandarización de las condiciones de transcripción reversa asociada a PCR (RT-PCR)

Los ensayos de RT-PCR han sido utilizados con éxito en el análisis de los niveles de mRNA de genes de carotenogénesis de plantas (Giuliano y cols., 1993; Bartley y Scolnik, 1993; Josse y cols., 2000) y del alga *Haematococcus pluvialis* (Grunewald y cols., 2000) debido a su alta sensibilidad, especialmente útil en el caso de transcritos con una baja concentración celular. En esta tesis se empleó dicha metodología en la determinación de los niveles de los mRNA de carotenogénesis para la cual se diseñaron partidores específicos para cada gen. Las secuencias de los partidores 5'→3' abarcaron dos exones adyacentes dentro de un gen de forma tal de evitar la amplificación, si hubiera, de pequeñas contaminaciones de DNA genómico.

Todos los partidores que se diseñaron para cada gen permitieron la amplificación de un único producto del tamaño esperado, tanto si se utilizaba como sustrato muestras de RNA total de distintas fases del ciclo de crecimiento o de distintas cepas (silvestre y mutantes) (manuscrito en revisión). En la figura 12 A se muestran los productos de amplificación que se obtuvieron con algunos de los partidores diseñados, para los genes *idi* (carril 1), *crtYB* (carriles 2 y 3) y *crtE* (carril 4) a los 3 días de crecimiento de la levadura. En la figura 12 B se muestra la amplificación del gen *ast* a los 2 días de crecimiento. En todas las reacciones de RT-PCR se utilizaron partidores específicos para el gen de actina que se empleó como un estándar interno.

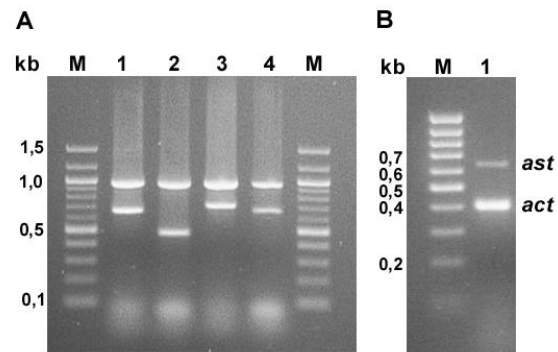


Figura 12. Amplificación mediante RT-PCR de los mensajeros *idi*, *crtE*, *crtYB*, *ast* y *act*. M, marcador de tamaño molecular (100bp). (A) Carriles 1-4, *act* (970 pb); Carril 1, *idi* (669 pb); Carril 2, *crtYB* (484 pb); Carril 3, *crtYB* (728 pb); Carril 4, *crtE* (685pb). Se cargaron volúmenes iguales de las reacciones de PCR en un gel de agarosa 1 % que se tiñó con bromuro de etidio. (B) Carril 1, *act* (405 pb), *ast* (638 pb). Los productos se corrieron en un gel de agarosa 3% y se tiñeron con bromuro de etidio. Entre paréntesis se indican los tamaños esperados de los productos.

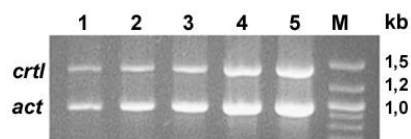
Por otra parte, se estandarizaron las condiciones de RT-PCR según la cantidad de cDNA de hebra simple que se utilizó en las reacciones de PCR, la cantidad de RNA total inicial en las reacciones RT y el número de ciclos.

La amplificación simultánea de cDNAs *act* y *crtI* utilizando como sustrato volúmenes variables de la reacción RT (cDNA de hebra simple), resultó en cantidades crecientes de cada producto según la concentración inicial de cDNA de hebra simple (Figura 13 A y B). Por otra parte, la amplificación simultánea de los cDNAs *act* e *idi*, resultó en una acumulación exponencial de los productos hasta el ciclo número 31 (Figura 13 C).

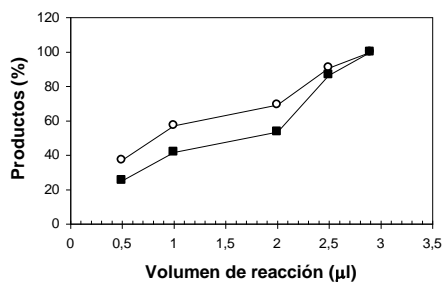
Por otra parte, la cantidad de producto que se obtuvo con distintas concentraciones iniciales de RNA total, fue proporcional a la cantidad de RNA total inicial en las reacciones RT (Figura 14). La respuesta obtenida fue semilogarítmica y está de acuerdo con los resultados presentados por Giuliano y cols. (1993) para otro sistema.

Los resultados anteriores permitieron definir las condiciones experimentales de las reacciones RT-PCR para los estudios realizados posteriormente. Por consiguiente, los experimentos se realizaron empleando 3 µg de RNA total, 1 o 2 µl de reacción RT y 28 ciclos de amplificación.

Adicionalmente, los ensayos de RT-PCR estandarizados según se ha explicado anteriormente, fueron validados por PCR en tiempo real. Con este objetivo, se determinó por esta metodología, el número de moléculas de cDNA de los genes *act*, *crtE* e *idi* a partir de reacciones RT de muestras de RNA de fase exponencial y estacionaria.



B



C

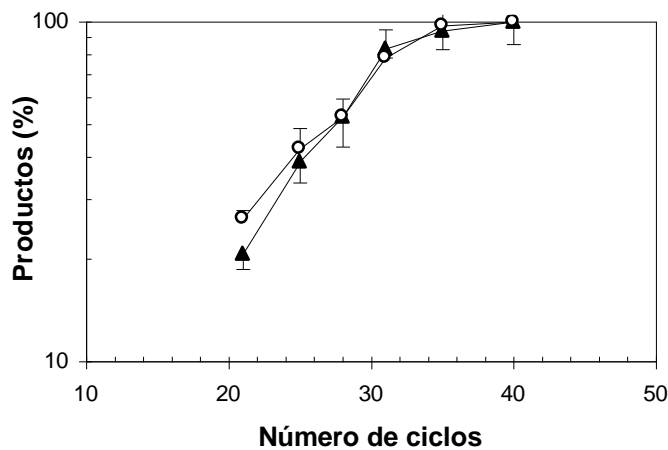


Figura 13. Las condiciones experimentales para las reacciones de RT-PCR se establecieron para la concentración de cDNA de hebra simple y el número de ciclos. (A) M, marcador de tamaño molecular (100 pb). El cDNA *act* y *crtI* se amplificó por 28 ciclos con los siguientes volúmenes de reacción RT: 0,5 μl (carril 1), 1 μl (carril 2), 2 μl (carril 3), 2,5 μl (carril 4) y 3 μl (carril 5). Se corrieron volúmenes iguales de las reacciones en un gel de agarosa 1 % que se tiñó con bromuro de etidio. (B) Cuantificación de los productos que se muestran en (A), *act* (o) y *crtI* (■). (C) Amplificación del cDNA *act* (o) e *idi* (▲) con distinto número de ciclos. Se emplearon 2 μl de reacción RT para cada punto de la curva.

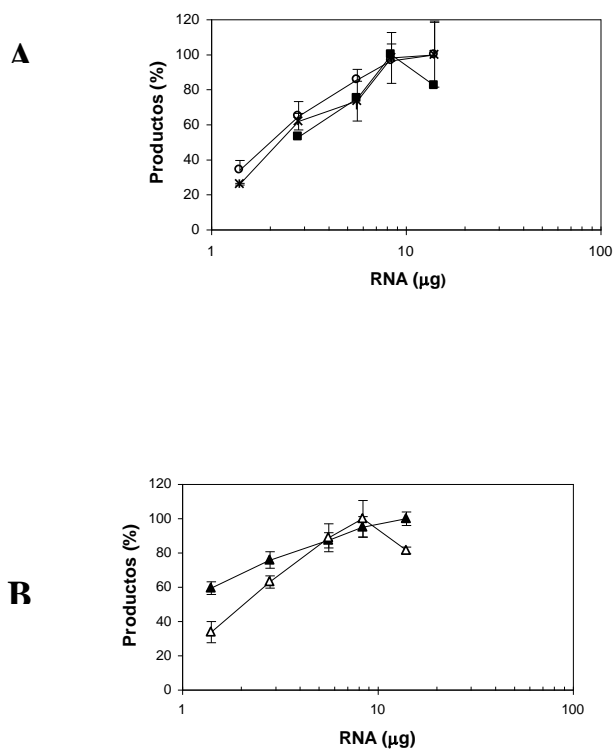


Figura 14. Cuantificación de los productos de RT-PCR luego de 28 ciclos de amplificación con diferentes cantidades de RNA total inicial en las reacciones RT (1,4 μg, 2,8 μg, 5,6 μg, 8,4 μg y 14 μg). (A) *act* (o), *crtI* (■), *crtE* (*). (B) *idi* (▲), *crtYB* (Δ).

La amplificación por PCR en tiempo real del cDNA de los genes mencionados, tanto de hebra simple (reacción RT) como de hebra doble, dio lugar a la formación de un único producto lo cual se puso de manifiesto por el análisis de las curvas de ‘melting’ (Figura 15A, B y C). Para cada gen se obtuvo un único producto, puesto que se observa un único pico en la curva de ‘melting’, y además este producto tiene la misma T_m tanto

si se utiliza como sustrato cDNA de hebra simple o doble. La formación de un único producto de amplificación por PCR en tiempo real se confirmó por electroforesis en un gel de agarosa (Figura 15D). La cuantificación del número de moléculas de cDNA de los genes *act*, *crtE* e *idi* por esta metodología (ver Materiales y Métodos) permitió establecer un rango entre 10^4 - 10^6 moléculas/ μ l de reacción RT, según la muestra analizada.

Luego, se purificó cDNA de doble hebra de los mensajeros *act* y *crtE*, se cuantificó el número de moléculas basándose en la medición de la absorbancia a 260 nm y se realizaron reacciones de PCR convencional en las condiciones establecidas anteriormente con partidores internos para cada cDNA. En la figura 16 se observa que la cantidad de producto obtenida fue proporcional al log del número inicial de moléculas, y dentro de este rango se encuentra el número de moléculas presentes en 2 μ l de reacción RT, según lo que se había determinado previamente por PCR en tiempo real.

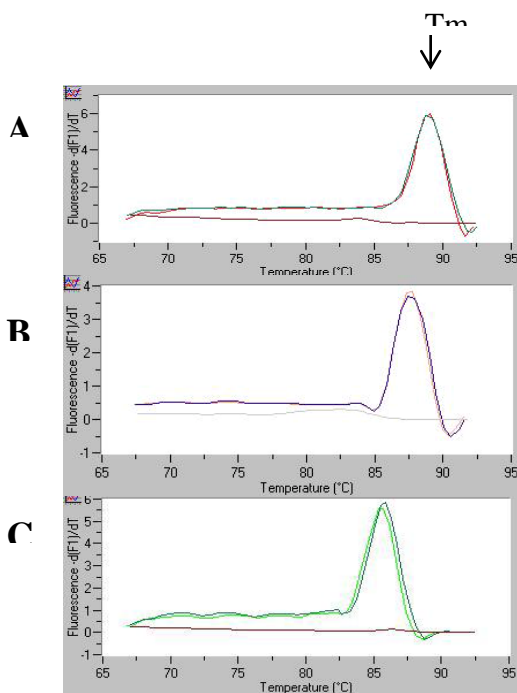
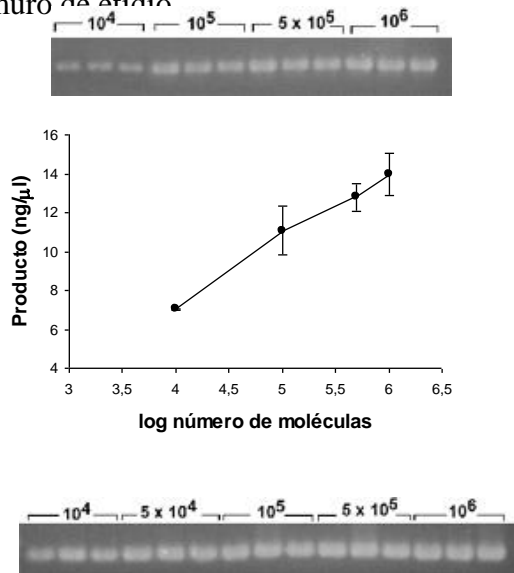


Figura 15. Curvas de ‘melting’ del producto de amplificación obtenido por PCR en tiempo real del cDNA *act* (A), *idi* (B) y *crtE* (C). En cada panel se muestran la curva correspondiente al producto que se obtiene cuando se utiliza como sustrato cDNA doble hebra purificado, reacción RT y agua (control negativo). (D) Productos de amplificación por PCR en tiempo real de los cDNAs de los genes *act* (carril 1), *idi* (carril 2) y *crtE* (carril 3). Los productos se corrieron en un gel de agarosa 3 % y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio.

A



B

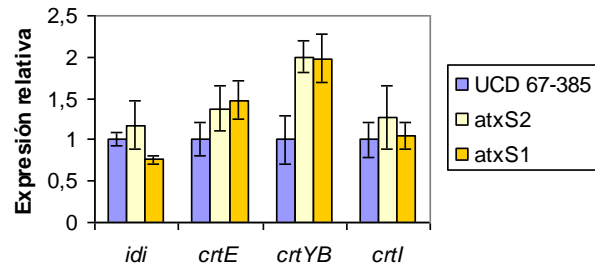
Figura 16. Amplificación de distinto número inicial de moléculas de cDNA de los genes *act* (A) y *crtE* (B). Los productos se corrieron en un gel de agarosa 3%, se tiñeron con bromuro de etidio y luego se cuantificaron.

3.3. Estudios fisiológicos

3.3.1. Crecimiento de la cepa silvestre y dos mutantes sobreproductoras en matraces

La cepa silvestre y las mutantes sobreproductoras atxS1 y atxS2 se crecieron en matraces con medio YM durante 3 días, al cabo de los cuales se determinó la concentración celular de carotenoides y el nivel de los mensajeros *idi*, *crtE*, *crtYB* y *crtI* en relación al nivel del mensajero *act*.

Con respecto a la concentración celular de carotenoides, la producción de la cepa atxS1 fue de casi 8 veces la producción de la cepa silvestre, mientras que la relación fue de 4,6 veces en el caso de la cepa atxS2. La expresión relativa de los mensajeros de carotenogénesis se muestra en la Figura 17. La diferencia más notoria en la expresión de los genes de carotenogénesis de las cepas mutantes en relación a la cepa silvestre, fue en el nivel del mensajero *crtYB*. Sin embargo, en el momento en que se hizo este experimento no se conocía la existencia de mensajeros procesados en forma alternativa, y por lo tanto, los partidores que se emplearon amplificaron por lo menos dos poblaciones distintas de mensajeros (maduro y alternativo). Lo mismo es válido para el caso del mensajero *crtI*. Con respecto al mensajero *crtE*, su nivel de expresión es un 47 % más alto en la cepa atxS1 en relación a la cepa silvestre, mientras que es un 37 % más alto en la cepa atxS2. Puesto que las diferencias en la expresión de los genes de carotenogénesis en las cepas mutantes en relación a la cepa silvestre son modestas, y están prácticamente dentro del error experimental, se decidió analizar a lo largo del ciclo de crecimiento la producción de carotenoides y el nivel de expresión de los genes de carotenogénesis en la cepa silvestre y en la mutante atxS2.



D

Figura 17. Nivel de expresión de los mensajeros de carotenogénesis en la cepa silvestre y en las mutantes *atxS1* y *atxS2* al cabo de tres días de crecimiento en medio YM. Cada mensajero se cuantificó en relación al mensajero de actina. Se muestran los valores relativos a los niveles que se encuentran en la cepa silvestre (igual a 1).

D

3.3.2. Cultivo de la cepa silvestre UCD 67-385 y de la mutante *atxS2* en un fermentador.

En los siguientes experimentos, la cepa silvestre y la mutante sobreproductora atxS2 se cultivaron en un fermentador y se analizaron distintas variables a lo largo del ciclo de crecimiento de la levadura. Se analizó la producción de carotenoides, biomasa (como recuento del número total de células y medición de densidad óptica), consumo de glucosa, producción de etanol, y nivel de expresión de los genes de carotenogénesis.

3.3.2.1. Análisis de la producción de carotenoides y otras variables a lo largo del ciclo de vida

En la Figura 18A se muestran las distintas variables analizadas para la cepa silvestre. Se observa que el aumento del número de células está acompañado por el consumo de glucosa, y que además hay producción de etanol. En hongos, la síntesis de etanol es el resultado del metabolismo fermentativo de la glucosa, donde parte del ácido pirúvico resultante de la glicólisis es metabolizado a etanol para la regeneración de NAD oxidado (NAD^+). Durante este período de activa producción de biomasa y síntesis de etanol, la producción de carotenoides por unidad de biomasa es baja, e incluso tiende a disminuir. Es decir, la velocidad de producción de biomasa es mayor que la velocidad de síntesis de carotenoides. Sin embargo, cuando se agota la glucosa en el medio de cultivo, la velocidad de crecimiento baja y se comienza a utilizar como fuente de carbono el etanol que previamente se produjo, llevando nuevamente a un leve aumento del número de células. Es durante este período de agotamiento de la glucosa cuando se induce la

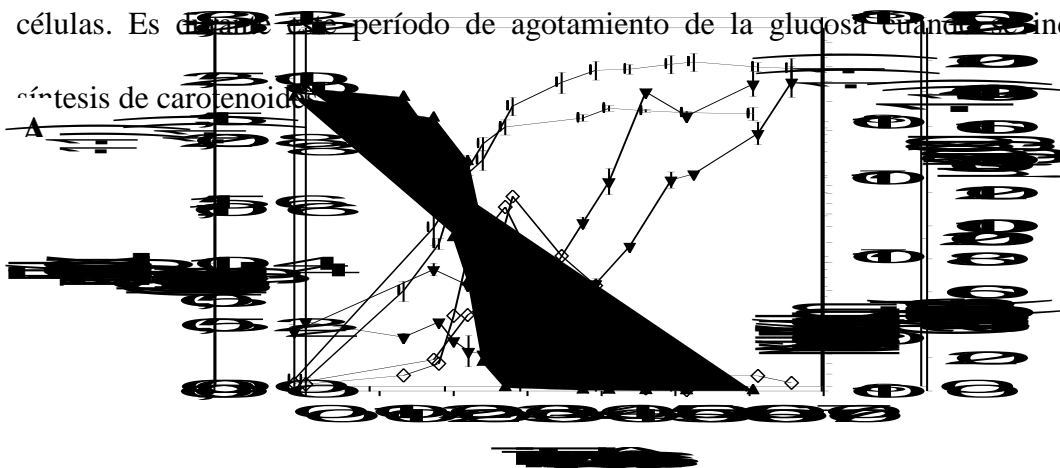


Figura 18. Producción de carotenoides por *X. dendrorhous* UCD 67-385 (A) y de la mutante atxS2 (B) en medio YM en un fermentador en 'batch'. Símbolos: (●), número de células; (▼), carotenoides; (▲), glucosa; (◇), etanol.

Para la producción de carotenoides durante esta etapa, no sólo debe utilizarse etanol dado que su concentración es baja (0,1 %), sino que deberían usarse precursores sintetizados durante la fase exponencial de crecimiento, o bien, carbohidratos o lípidos de reserva.

En lo que respecta a la cepa atxS2, también se observa que hay producción de etanol durante la fase exponencial de crecimiento, y un posterior consumo del mismo (Figura 18B). Sin embargo, a diferencia de lo observado con la cepa silvestre, la síntesis de carotenoides se mantiene aproximadamente constante durante todo el período que contempla el aumento del número de células, el agotamiento de la glucosa y el comienzo del consumo del etanol acumulado durante la fermentación. Posteriormente, se induce la síntesis de carotenoides cuando el número de células ya no aumenta. En esta etapa, debe emplearse el etanol que resta en el medio de cultivo y, posiblemente sustancias de reserva o precursores sintetizados durante la fase exponencial, tal como se mencionó en el caso de la cepa silvestre

En la Tabla 3 se comparan las variables analizadas entre la cepa silvestre y la mutante. Como puede observarse, el número de células que alcanzó el cultivo de la cepa atxS2 fue un 42 % con respecto a la cepa silvestre, sin embargo el peso seco que alcanzó la cepa mutante fue un 84,7 % del peso seco de la cepa silvestre. Por otra parte, la producción de carotenoides por unidad de biomasa de la cepa mutante fue de 4 veces

con respecto a la cepa silvestre durante la fase exponencial, mientras que la producción de etanol por unidad de biomasa de la cepa mutante resultó ser 2,4 veces la producción de la cepa silvestre.

TABLA 3 . Producción máxima de biomasa, carotenoides y etanol en *X. dendrorhous* UCD 67-385 y en la mutante atxS2 por fermentación en 'batch'

		Silvestre (1)	Mutante (2)	(2)/(1)
Biomasa final	Células (x mL ⁻¹)	1,26 ± 0,061 x 10 ⁸	5,3 ± 0,68 x 10 ⁷	0,42
	Peso seco (mg x mL ⁻¹)	6,62 ± 0,077	5,61 ± 0,182	0,847
Carotenoides (μg x g ⁻¹)	f. exponencial	42 ± 0,93	173 ± 5	4,12
	f. estacionaria	186 ± 7,6	426 ± 67	2,3
Producción de etanol (g x L ⁻¹)		1,01	1,54	1,52
Producción específica de etanol (g x g ⁻¹ biomasa)		0,214	0,523	2,44

3.3.2.2. Análisis de la expresión de los genes de carotenogénesis en la cepa silvestre UCD 67-385 y en la mutante atxS2

3.3.2.2.1. Gen *idi* (isopentenil pirofosfato isomerasa)

En la Figura 19A se muestra el nivel de expresión del gen *idi* a lo largo del ciclo de crecimiento para la cepa silvestre UCD 67-385. Se observa que su nivel disminuye gradualmente hasta las 37 horas de cultivo, y que a partir de este momento el nivel de mensajero disminuye en forma más acentuada, coincidiendo con un agotamiento de la glucosa y del etanol del medio de cultivo (Figura 18A). Por otra parte, durante el período de inducción de la síntesis de carotenoides (flecha, Figura 19A) no hay asociado un aumento del nivel de expresión de este gen.

Con respecto a la cepa atxS2, la cinética de la expresión del gen es similar a la observada en la cepa silvestre. El nivel del mensajero decae especialmente a partir de las 44 horas de cultivo (Figura 19B), momento en el cual ya no hay glucosa o etanol en el medio de cultivo (Figura 18B). Por otra parte, tal como se estableció con la cepa silvestre el período de inducción de la síntesis de carotenoides (flecha, Figura 19B) no está asociado con un aumento del nivel del mensajero del gen *idi*.

3.3.2.2.2. Gen *crtE* (geranilgeranil pirofosfato sintasa)

El nivel de expresión del gen *crfE* en la cepa silvestre, aumenta durante la fase exponencial (Figura 20A). Cuando se induce la síntesis de carotenoides (flecha, Figura 20A), se alcanza el nivel de mensajero más elevado y se mantiene aproximadamente constante mientras continúa la síntesis de carotenoides.

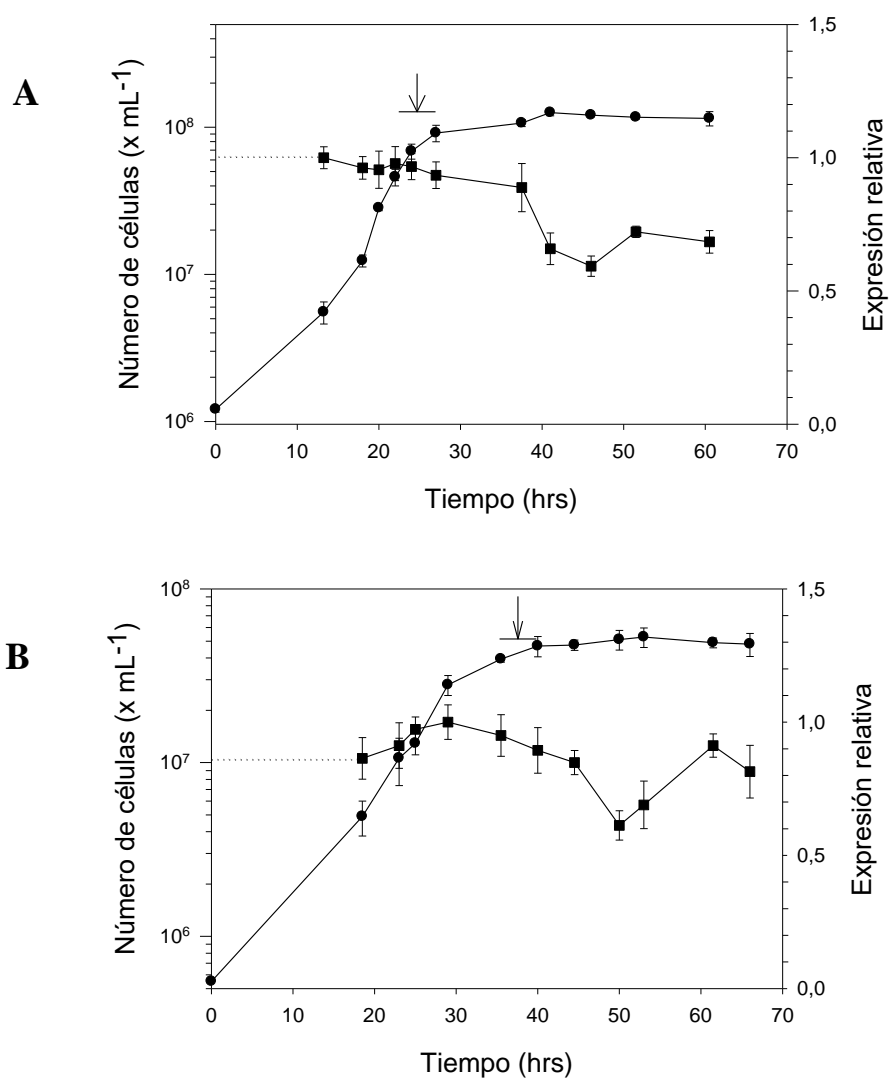


Figura 19. Cinética de la expresión del gen *idi* en la cepa UCD 67-385 (A) y en la cepa atxS2 (B). La flecha indica el período de inducción de la síntesis de carotenoides en ambas cepas. Los niveles de mensajero se normalizaron con el nivel de mensajero de actina en cada punto, y a su vez, estos valores se hicieron relativos al mayor valor de la curva (igual a 1). Símbolos: (●), número de células; (■) nivel de expresión relativa.

A

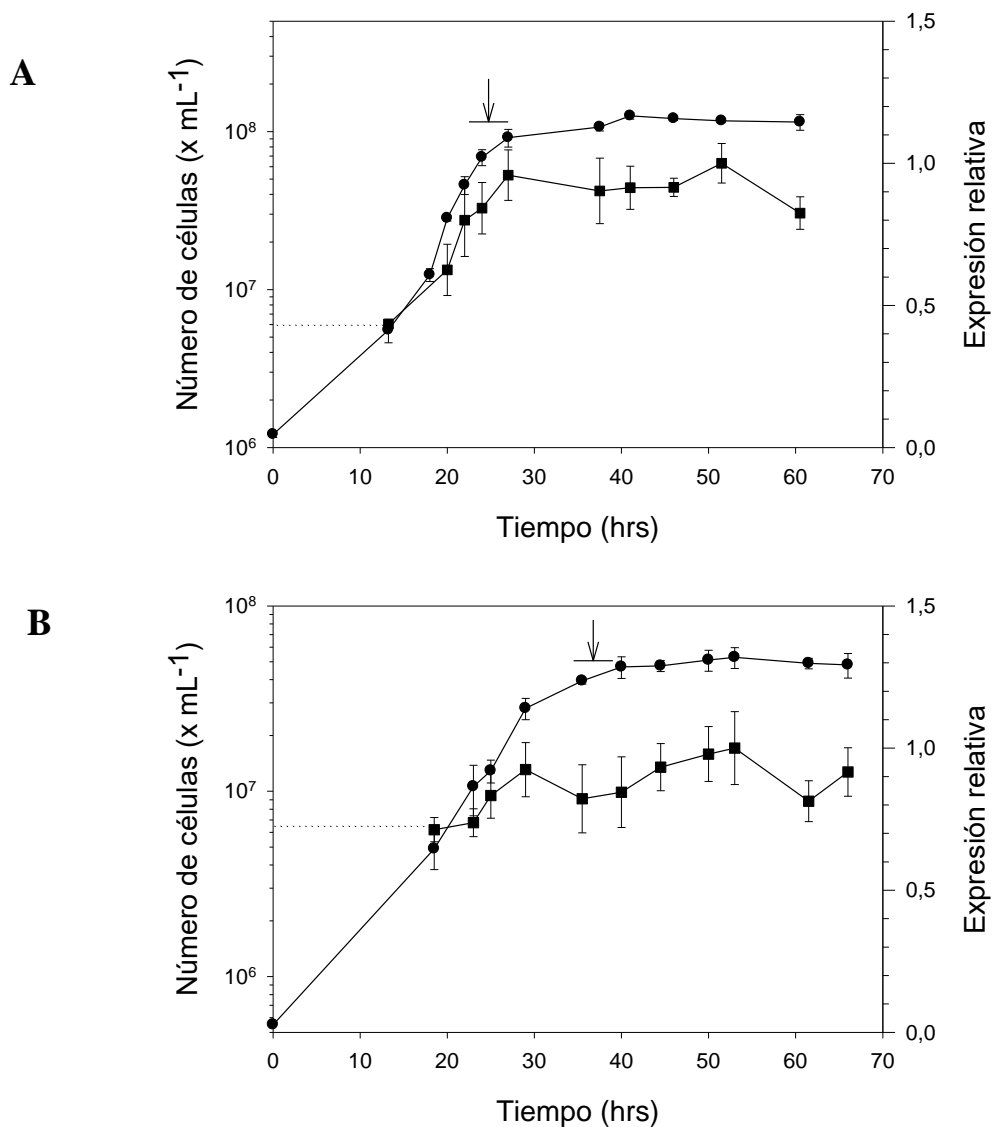


Figura 20. Cinética de la expresión del gen *crtE* en la cepa UCD 67-385 (A) y en la cepa atxS2 (B). La flecha indica el período de inducción de la síntesis de carotenoides en ambas cepas. Los niveles de mensajero se normalizaron con el nivel de mensajero de actina en cada punto, y a su vez, estos valores se hicieron relativos al mayor valor de la curva (igual a 1). Símbolos: (●), número de células; (■) nivel de expresión relativa.

Con respecto a la cepa atxS2, el nivel de expresión de este gen se mantiene aproximadamente constante a lo largo del ciclo de crecimiento (Figura 20B).

Por otra parte, se comparó el nivel de expresión del mensajero *crtE* en relación al nivel de expresión del mensajero de actina, entre la cepa silvestre y la cepa mutante, en puntos relevantes del ciclo de crecimiento. La relación mRNA *crtE*/mRNA *act* (0,58) a las 18,5 hrs de cultivo de la cepa atxS2 es 1,9 veces la relación que se encuentra a las 13,25 hrs de cultivo de la cepa silvestre (0,31). En los tiempos mencionados de la curva de crecimiento, el número de células es del mismo orden de magnitud en la cepa atxS2 y en la cepa silvestre ($4,9 \times 10^6$ y $5,5 \times 10^6$, respectivamente). Es decir, el nivel del mensajero en la cepa atxS2 es levemente más elevado que en la cepa silvestre en tiempos tempranos del ciclo de crecimiento. Durante la fase estacionaria, el nivel de expresión de este gen es similar en ambas cepas. Por ejemplo, a las 66 hrs de cultivo de la cepa atxS2, la relación mRNA *crtE*/mRNA *act* es 0,75, mientras que la misma relación en la cepa silvestre a las 51 hrs de cultivo es 0,72 y a las 60 hrs de cultivo es 0,594.

3.3.2.2.3. Gen *crtYB* (fitoeno- β -caroteno sintasa)

El nivel de expresión del mmRNA en la cepa silvestre y en la mutante es máximo durante la fase exponencial (Figura 21A y C), mientras que sus niveles decaen rápidamente durante la fase estacionaria. Con respecto al amRNA, sus niveles son también más elevados durante la fase exponencial (Figura 21B y D).

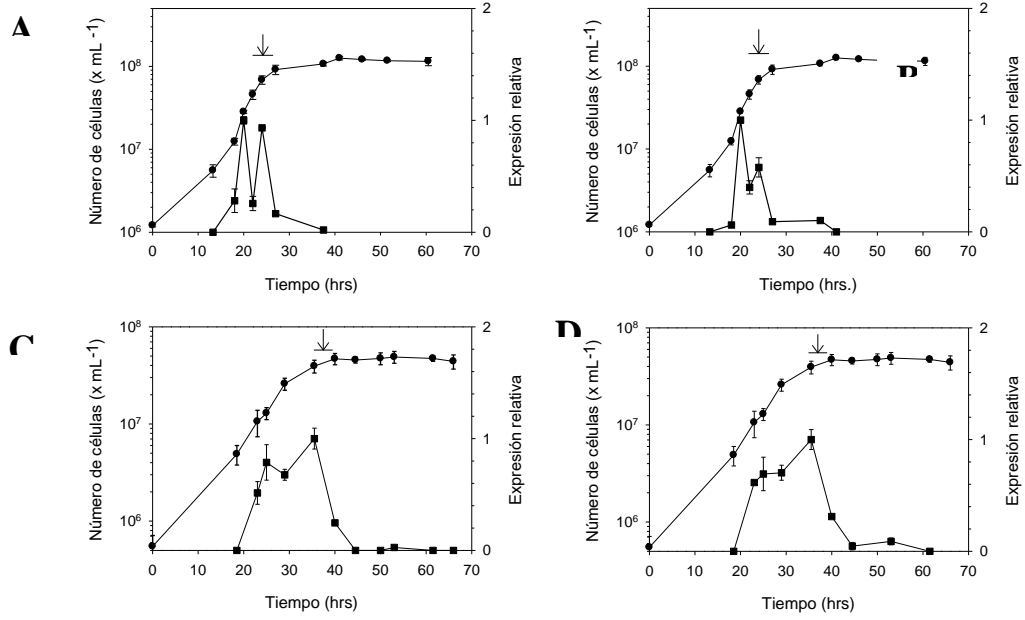


Figura 21. Cinética de la expresión del gen *crtYB* en la cepa UCD 67-385 (A, B) y en la cepa atxS2 (C, D). La flecha indica el período de inducción de la síntesis de carotenoides en ambas cepas. A, C) Nivel de expresión del mRNA maduro. B, D) Nivel de expresión del mRNA alternativo. Los niveles de mensajero se normalizaron con el nivel de mensajero de actina en cada punto, y a su vez, estos valores se hicieron relativos al mayor valor de la curva (igual a 1). Símbolos: (●), número de células; (■) nivel de expresión relativa.

Por otra parte, la relación mmRNA/mRNA *act* a las 35 hrs de cultivo en la cepa atxS2 (0,864) es 2,8 veces la relación mmRNA/mRNA *act* a las 20 hrs de cultivo de la cepa silvestre (0,305). Con respecto a la relación amRNA/mRNA *act* en la cepa atxS2 (0,27), la misma es 4,2 veces la relación amRNA/mRNA *act* (0,064) en la cepa silvestre en los tiempos de cultivo anteriormente mencionados.

Por consiguiente, debería determinarse si en la cepa atxS2 hay una concentración celular mayor de proteína CRTYB puesto que si bien parece haber una mayor concentración de mensajero maduro que en la cepa silvestre, también hay una mayor concentración de mensajero procesado en una forma no productiva.

3.3.2.2.4. Gen *crtI* (fitoeno desaturasa)

El nivel de expresión del mmRNA *crtI* en la cepa silvestre aumenta en la fase exponencial, alcanzado su nivel máximo antes del período de inducción de la síntesis de carotenoides (Figura 22A). A diferencia de lo que se observa con la expresión del gen *crtE*, el nivel del mensajero maduro decae en el tiempo aunque la concentración celular de carotenoides aumenta.

Con respecto al amRNA (Figura 22B), se observa que su nivel también aumenta durante la fase exponencial. Sin embargo, si bien este mensajero es detectable a las 13,25 horas, su nivel es bajo como para ser cuantificado, mientras que el nivel del mensajero maduro sí puede cuantificarse. Por consiguiente, en tiempos tempranos del ciclo de crecimiento la proporción de mensajero maduro es mayor que la de mensajero alternativo en tiempos posteriores.

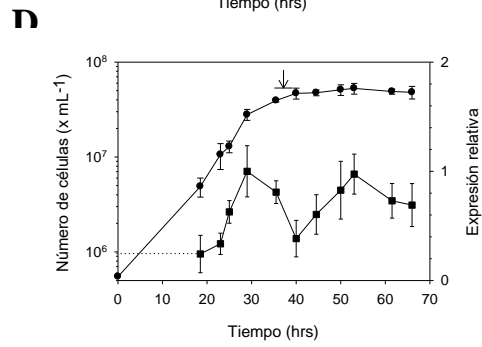
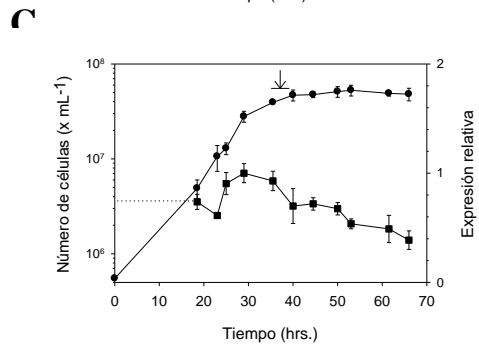
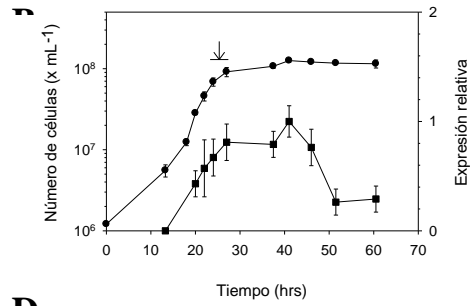
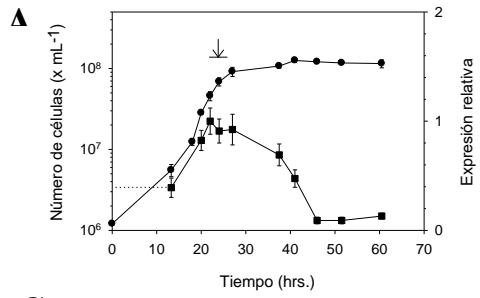


Figura 22. Cinética de la expresión del gen *crtI* en la cepa UCD 67-385 (A, B) y en la cepa atxS2 (C, D). La flecha indica el período de inducción en la síntesis de carotenoides. A, C) Nivel de expresión del mRNA maduro. B, D) Nivel de expresión del mRNA alternativo. Los niveles de mensajero se normalizaron con el nivel de mensajero de actina en cada punto, y a su vez, estos valores se hicieron relativos al mayor valor de la curva (igual a 1). Símbolos: (●), número de células; (■) nivel de expresión relativa

Este hecho queda de manifiesto en la Figura 23A, donde se muestra la cinética del nivel de mensajero maduro en relación al nivel del mensajero alternativo (M/A). En la Figura 23, cada punto de las curvas representa la siguiente relación: $(\text{mmRNA } crtI/\text{mRNA } act)/(\text{amRNA } crtI/\text{mRNA } act)$, y a su vez estos valores se hicieron relativos al mayor valor de la curva (igual a 1). Se observa que la relación M/A disminuye a lo largo del ciclo de crecimiento, recuperándose parcialmente al final de la fase estacionaria. Por consiguiente, en tiempos tempranos de cultivo hay una mayor proporción de RNA del gen *crtI* que es procesado hacia la forma madura y que puede traducirse a la proteína fitoeno desaturasa. Sin embargo, la proporción del mensajero maduro procesado en forma ‘adecuada’ disminuye con la edad del cultivo.

Con respecto a la cepa atxS2 (Figura 22C), el mmRNA alcanza su mayor nivel antes del período de inducción de la síntesis de carotenoides y luego decae paulatinamente. Por otra parte, durante la fase exponencial el mayor valor de la relación mmRNA *crtI*/mRNA *act* en la cepa atxS2 es 0,90, mientras que el mayor valor de esta relación en la cepa silvestre es 0,47. Por lo tanto, la relación en la cepa atxS2 es 1,90 veces la relación en la cepa silvestre.

En el caso del mensajero alternativo en la cepa atxS2 (Figura 22D), su nivel es máximo en dos momentos del ciclo de crecimiento. Cuando se analiza la relación M/A (Figura 23B) se observa que la relación disminuye a lo largo del tiempo. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en la cepa silvestre, la proporción de mensajero maduro experimenta un leve aumento durante el período de inducción de la síntesis de carotenoides.

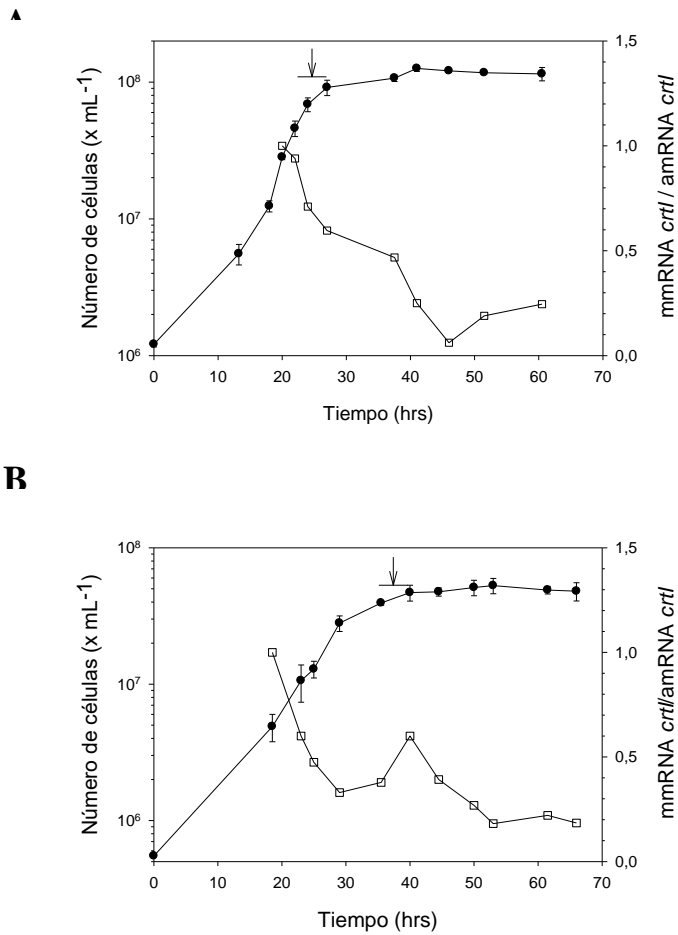


Figura 23. Cinética de la expresión del mensajero maduro del gen *crtI* (mmRNA) y del mensajero alternativo (amRNA) del mismo gen, en las cepas UCD 67-385 (A) y atxS2 (B). Los niveles de mensajero se normalizaron con el nivel de mensajero de actina en cada punto, y a su vez, estos valores se hicieron relativos al mayor valor de la curva (igual a 1). Símbolos: (●), número de células; (□), proporción mmRNA/amRNA

3.3.2.2.5. Gen *ast* (astaxantina sintetasa)

La expresión del gen *ast* en la cepa silvestre aumenta durante la fase exponencial alcanzando su máximo cuando se induce la síntesis de carotenoides (Figura 24A). Sin embargo, el aumento en la expresión es transiente puesto que a partir de las 27 horas de cultivo el nivel baja paulatinamente. Con respecto a la cepa atxS2, el nivel máximo de mensajero se alcanza previamente a la inducción de la síntesis de carotenoides (Figura 24B).

Luego se analizó el nivel de expresión del mensajero *ast* en relación al nivel de expresión del mensajero de actina en distintos momentos del ciclo de crecimiento para ambas cepas. A las 18,5 hrs de cultivo de la cepa atxS2, la relación mRNA *ast*/mRNA *act* (0,442) es 2,3 veces la relación que se encuentra en la cepa silvestre a las 13 hrs de cultivo (0,194). Además, en la fase estacionaria la expresión del gen *ast* es más elevada en la cepa atxS2. Por ejemplo, a las 66 hrs de cultivo de la cepa atxS2, la relación mRNA *ast*/mRNA *act* (0,338) es 2,9 veces la relación que se encuentra en la cepa silvestre a las 60,5 hrs (0,12). Por consiguiente, el nivel del mensajero *ast* en la cepa mutante es más del doble del nivel alcanzado en la cepa silvestre, tanto al inicio como al final del ciclo de crecimiento. Sin embargo, el nivel máximo que se alcanza en la cepa silvestre es similar al nivel máximo de la cepa mutante (mRNA *ast*/mRNA *act*, 0,50 y 0,63, respectivamente).

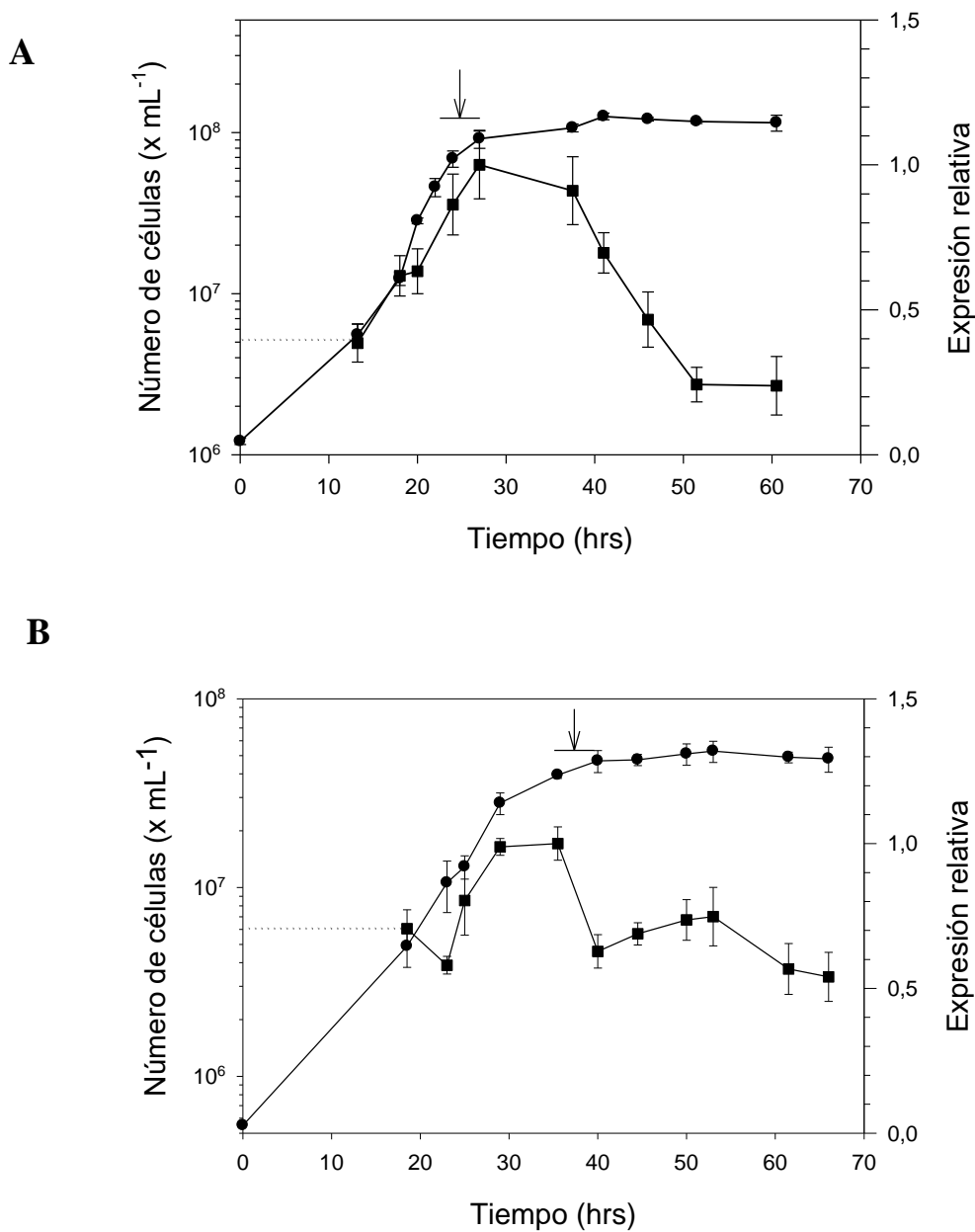


Figura 24. Cinética de la expresión del gen *ast* en la cepa UCD 67-385 (A) y en la cepa atxS2 (B). La flecha indica el período de inducción de la síntesis de carotenoides en ambas cepas. Los niveles de mensajero se normalizaron con el nivel de mensajero de actina en cada punto, y a su vez, estos valores se hicieron relativos al mayor valor de la curva (igual a 1). Símbolos: (●), número de células; (■) nivel de expresión relativa.

4. DISCUSION

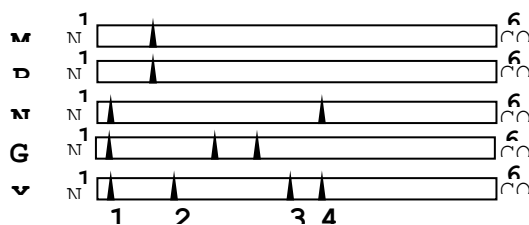
4.1. Análisis de la estructura y origen del primer intrón de los genes *crtYB* y *crtI*

Como se señaló en la Introducción, en los hongos carotenogénicos pertenecientes a los grupos taxonómicos zigomicetes, ascomicetes y basidiomicetes, las actividades fitoeno y β -caroteno sintasa están presentes en una misma proteína. El dominio fitoeno sintasa muestra similitud con las fitoeno sintasas presentes en otros organismos, mientras que el dominio licopeno ciclasa pertenece a una nueva clase de ciclasa descrita en bacterias actinomicetes (Gram +) (Krubasik y Sandmann, 2000b).

El alineamiento de la proteína fitoeno- β -caroteno sintasa de hongos y el análisis de la posición que ocupan los intrones indica que ningún intrón es compartido por los tres grupos taxonómicos, y por lo tanto serían de un origen más reciente que la secuencia codificante (Figura 25A). El único intrón que comparten los hongos *Mucor circinelloides* y *Phycomyces blakesleeanus* pudo haberse adquirido luego de la separación entre zigomicetes y el ancestro común a asco y basidiomicetes (Alexopoulos y cols., 1996). Por otra parte, *Neurospora crassa*, *Gibberella fujikuroi* y *X. dendrorhous* comparten el primer intrón que por consiguiente, se habría adquirido antes de la separación de asco y basidiomicetes.

El origen común del primer intrón de este gen en asco y basidiomicetes no sólo se pone de manifiesto al analizar su posición, sino también cuando se compara su secuencia (Figura 25B).

A



B



Figura 25. Análisis del primer intrón del gen de la fitoeno- β -caroteno sintasa de hongos. (A) Esquema de la proteína fitoeno- β -caroteno sintasa de los hongos *Mucor circinelloides* (Mc), *Phycomyces blakesleeanus* (Pb), *Neurospora crassa* (Nc), *Gibberella fujikuroi* (Gf) y *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Xd). Los triángulos señalan la posición relativa de los intrones en la secuencia nucleotídica. (B) Alineamiento del primer intrón y de las secuencias exónicas vecinas del gen de la fitoeno- β -caroteno sintasa de hongos. El sitio 5' de 'splicing' alternativo dentro del intrón está recuadrado. En amarillo se señalan las bases del intrón que están conservadas entre *X. dendrorhous* y *N. crassa* o *G. fujikuroi*. En azul se señala la traducción del extremo 5' del intrón que muestra similitud con madurasas K y que sólo se conserva en *X. dendrorhous*. En verde se señalan los aminoácidos idénticos entre *X. dendrorhous* y *N. crassa* o *G. fujikuroi* en las secuencias exónicas aledañas.

X. dendrorhous comparte con *N. crassa* y, en menor grado, con *G. fujikuroi* un fragmento del intrón 1. Sin embargo, el intrón de *X. dendrorhous* es más largo que en ascomicetes, lo cual indica que en *N. crassa* y, en mayor grado en *G. fujikuroi*, ha sido deletada una porción más grande de secuencia intrónica. Igualmente interesante, resulta el hecho que en los ascomicetes no se encuentra el sitio de procesamiento alternativo 5' (GT) que se ha descrito en este trabajo para *X. dendrorhous*, por lo cual no presentarían esta forma de procesamiento.

Por otra parte, la traducción del primer intrón de *X. dendrorhous* en uno de sus marcos de lectura (Figura 25B) dio un pequeño péptido de 14 aminoácidos que muestra similitud con el extremo amino-terminal de madurasas K, proteínas que están codificadas en el genoma de cloroplastos de plantas. Las madurasas participan en el 'splicing' de intrones tipo II y están codificadas en dichos intrones, ya sea en el extremo 5' o en una región denominada dominio IV (Vogel y cols., 1997; Mohr y cols., 1993). Se ha postulado que los intrones tipo II, clasificados como retroelementos dado que codifican además para una actividad de transcriptasa reversa y una endonucleasa, serían los ancestros de los intrones nucleares (Michel y Ferat, 1995). Los intrones tipo II, dada su capacidad de integración en sitios homólogos o ectópicos, se encuentran distribuidos en genes que codifican para rRNA, tRNA o mRNAs en organelos de hongos, plantas y protistas. Además se han encontrado en bacterias, asociados a plásmidos o transposones, y recientemente, a un integrón que confiere multiresistencia a antibióticos, hecho que remarca su movilidad (Bonen y Vogel, 2001; Centrón y Roy, 2002).

El alineamiento de distintas madurasas K con el péptido codificado por el intrón (Figura 26) muestra que la similitud se encuentra en una sub-región conservada dentro del extremo amino-terminal cuya función es desconocida hasta el momento.

Dados los antecedentes y resultados mencionados, puede decirse que *X. dendrorhous* conserva en el extremo 5' del primer intrón del gen *crtYB*, una secuencia que sería una huella del posible origen de dicho intrón en uno del tipo II. Llamativamente, esta secuencia se ha perdido en ascomicetes, sería entonces interesante conocer la secuencia del gen homólogo en otros basidiomicetes carotenogénicos. Esta información permitiría establecer si se conserva el extremo 5' del intrón junto con el sitio de procesamiento alternativo en otros basidiomicetes o si por el contrario, es una característica de *X. dendrorhous*.

El análisis de la estructura del primer intrón del gen *crtI* muestra resultados similares a los que se obtuvieron con el gen *crtYB*. La posición del intrón (Figura 27A) indica que se adquirió luego de la separación de los zigomicetes y antes de la separación de asco y basidiomicetes. Además, el alineamiento de este intrón (Figura 27B) muestra que *X. dendrorhous* conserva una secuencia en el extremo 5' que no está en ascomicetes quienes tampoco conservan el sitio de procesamiento alternativo 3' (AG). La traducción del intrón en uno de sus marcos de lectura da un pequeño fragmento (13 aminoácidos) en el extremo 5' con similitud a un putativo retroelemento de *Oryza sativa*. Similarmente, como se estableció con el gen *crtYB*, sería interesante conocer la estructura del intrón en otros basidiomicetes.

** *** *****

Intrón 1

SPYLFFVLHTTHVC

Z.l. YECHNWDLSLITSNSKKASSSF SKRNPRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIYFYGKMEHLAEVFARAFQANLWLF

A.j. HEYHNRDLSLITSNSKKASSSF SKRNHRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIYFYGKIEHLAEVFTTRAFQANLWLF

A.ch. HEYHNRDLSLITSNSKKASSSF SKRNHRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIYFYGKIEHLAEVFTTRAFQANLWLF

A.k. HEYHNWDLSLITSNSKKASSSF SKRNHRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIYFYGKIEHLAEVFTTRAFQANLWLF

T.s. FLH- YCNW-SLITPKRSISLFSKR-QRLFFFLYS SHVCECESI-VFLRKQSSHLRSTSSGALLERTHFYGKIEHLVVFVFRNYFQAILWLF

C.e. HECHNWDLSLITSNSKKAGSSF SKRNHRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIYFYGKMEHLAEVFARAFQANLWLF

A.c. HEYHNWDLSLITSNSKKASASF SKRNHRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIYFYGKIEHLAEVFTTRAFQANLWLF

A.o. CHNWDLSLITSNSKKASSFSN SKRNHRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIYFYGKIEHLAEVFARAFQANLWLF

T.s. HEYHNWDLSLITSNSKKASSYF SKRNHRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIDFYGKIEHLAEVFNRAFQANLWLF

E.s. YECQNWDSLITSNSKKASSSF SKRNHRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIHFYGKIEHLAEVFARAFQANLWSF

C.b. YECHNWDLSLITSNSKKASSSF SKRNTRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIYFYGKTEHLREV FARAFQANLWLF

X.i. HE-HNWDLSLITSNSKNKASSFF SKRNHRLFFFLYTSHVCEYEGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIYFYGKMELLAEVFAMAFQANLWLF

C.l. HEYHNWDLSLITSNSKKASSSF SKRNHRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERICFYGKIEHLAEVFTTRAFQINLWLF

S.m. YECHNWDLSLITSNSKKASSSF SKRN-RLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIYFYGKMEHLAEVFARASQANLWLF

J.c. HECHNWDLSLITSNSKKASSSF SKRNHRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIYFYGKLEHLAEVFARAFQANLWLF

A.c. YECHNWDLSLITSNSKKASSSF SKRNHRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIYFYGKMEHLAEVFARAFQANLWLF

A.p. YECHNWDLSLITSNSKKASSSF SKRNHRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIYFYGKMEHLAEVFARAFQANLWLF

C.d. YECHNWDLSLITSNSKKASSSF SKRNHRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIYFYGKMEHLAKVFVRAFQANLWLF

C.c. YECHNWDLSLITSNSKKASSSF SKRNNRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIYFYGKMEHLAEVFARASQANLWLF

C.o. YECHNWDLSLITSNSKKASSSF SKRNHRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIYFYGKMEHLAKAFARAFQANLWLF

Ch.m. YECHNWDLSLITSNSKKASSSF SKRNHRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIYFYGKMEHLAEVFARAFQANLWLF

C.p. YECHNWDLSLITSNSKKASSSF SKRNHRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIYFYGKMEHLAEVFARASQANLWLF

F.b. YECHNWDLSLITSNSKKANSSF SKRNHRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIYFYGKMEHLAKVFVRAFQANLWLF

G.k. HECHNWDLSLITSNSKKASSSF SKRNHRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSRALLERIYFYGKIEHLAEVFARAFQANLWLF

O.l. HECHNWDLSLITSNSKKASSSF SKRNHRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIYFYGKMEHLAKVFARAFQANLWLF

O.c. HECHNWDLSLITSNSKKASSSF SKRNHRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIYFYGKMEHLAEVFARAFQANLWLF

P.a. YECHNWDLSLITSNSKKASSSF SKRNNRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIYFYGKMEHLAEVFARASQANLWLF

P.a. HECHNWNLSLITSNSKKASSSF SKRNHRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIYFYGKMEHLAEVFARASQANLWLF

S.c. YECHNWDLSLITSNSKKACSSF SKRNHRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIYFYGKMEHLAEVFARAFQANLWLF

S.m. YECHNWDLSLITSNSKKASSSF SKRN-RLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIYFYGKMEHLAEVFARASQANLWLF

St.c. YECHNWDLSLITSNSKKASSSF SKRNHRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIYFYGKMEHLAEVFARAFQANLWLF

T.l. YECHNWDLSLITSNSKKASSSF SKRNNRLFFFLYTSHVCEYESGFIFLRNQSSHLRSTSSGALLERIYFYGKMEHLAEVFARASQANLWLF

4354343342323333253421112611111121111121222421121111111112211111241121412133215332232221

Figura 26. Alineamiento parcial de madurasas K. En amarillo se señalan los aminoácidos perfectamente conservados en las secuencias analizadas y en la última fila se indica el número de aminoácidos variables en cada posición. En la primera fila se muestra la traducción parcial del primer intrón del gen de la fitoeno- β -caroteno de *X. dendrorhous* y con asteriscos se indican los aminoácidos idénticos o similares a los de madurasas K. Z.l., *Zoegea leptaura*, A.j., *Atractylodes japonica*, A.ch., *Atractylodes chinensis*, A.k., *Atractylodes koreana*, T.s., *Tetracentron sinense*, C.e., *Cousinia esfandiarii*, A.c., *Atractylis cancellata*, A.o., *Acantholepis orientalis*, T.s., *Thevenotia scabra*, E.s., *Echinops spinosissimus*, C.b., *Centaurea behen*, X.i., *Xeranthemum inapertum*, C.l., *Carlina lanata*, S.m., *Silybum marianum*, J.c., *Jurinea cyanooides*, A.c., *Aegialophila cretica*, A.p., *Aetheopappus pulcherrimus*, C.d., *Carduncellus duvauxii*, C.c., *Carduus carlinoides*, C.o., *Carthamus oxyacanthus*, Ch.m., *Cheirolophus mauritanicus*, C.p., *Cirsium palustre*, F.b., *Femeniasia balearica*, G.k., *Gerbera kunzeana*, O.l., *Onopordum leptolepis*, O. c., *Outreya carduiformis*, P.a. *Picnomon acarna*, P.a., *Ptilostemon afer*, S.c., *Serratula coronata*, S.m., *Silybum marianum*, St.c., *Stizolophus coronopifolius*, T.l., *Tyrimnus leucographus*

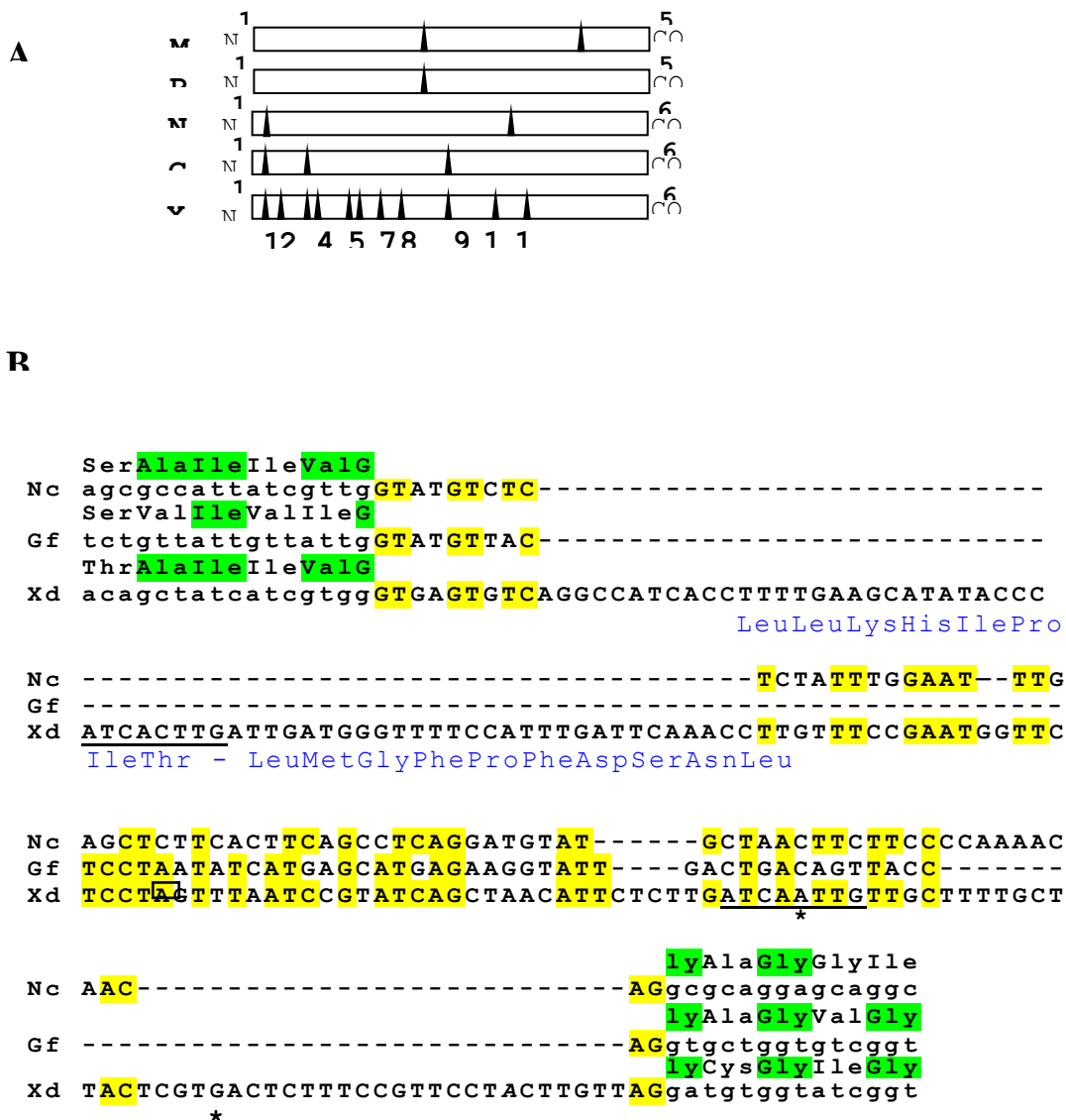


Figura 27 Análisis del primer intrón del gen de la fitoeno desaturasa de hongos. (A) Esquema de la proteína fitoeno desaturasa de los hongos *Mucor circinelloides* (Mc), *Phycomyces blakesleeenanus* (Pb), *Neurospora crassa* (Nc), *Gibberella fujikuroi* (Gf) y *Xanthophyllomyces dendrorhous* UCD 67-385 (Xd). Los triángulos señalan la posición relativa de los intrones en la secuencia nucleotídica. (B) Alineamiento del primer intrón y de las secuencias exónicas vecinas del gen de la fitoeno desaturasa de hongos. El sitio 3' de 'splicing' alternativo dentro del intrón está recuadrado. En amarillo se señalan las bases del intrón que están conservadas entre *X. dendrorhous* y *N. crassa* o *G. fujikuroi*. Los asteriscos indican las mutaciones C→A, T→G en la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* en relación con la secuencia de la cepa CBS 6938 (GenBank, número de acceso Y15007). La secuencia subrayada está duplicada en la cepa CBS 6938 mientras que en la cepa UCD 67-385 una de las secuencias tiene la mutación C→A. En azul se señala la traducción del extremo 5' del intrón que muestra similitud con una transposasa putativa de *Oryza sativa* (GenBank, número de acceso AC0844748).

Por otra parte, la cepa UCD 67-385 presenta dos diferencias en la secuencia nucleotídica de la segunda mitad del intrón del gen *crtI*, en relación con la secuencia publicada de la cepa CBS 6938 (Figura 27B). Estas mutaciones están presentes en el cDNA de los clones 41 y 43. Además, se encuentran en el gen genómico de esta cepa (León, 2000). Puede especularse que los cambios $C \rightarrow A$ y/o $T \rightarrow G$ podrían afectar el ‘splicing’ en la cepa UCD 67-385. La A subrayada en la secuencia ATCAC*TTG de la segunda mitad del intrón, podría ser un sitio de ‘branching’ en el sitio AG adecuado de ‘splicing’. Sin embargo, la mutación en la C señalada con un asterisco pudo haber empeorado la selección de esa A como sitio ‘branching’ en la cepa UCD 67-385. Por otra parte, la secuencia ATCACTTG se encuentra repetida en la primera mitad del intrón (Figura 14B), este hecho y la presencia de la mutación, pueden haber ocasionado la selección del sitio de procesamiento AG alternativo. Inclusive, en la cepa UCD 67-385 se podría haber generado un nuevo sitio de ‘branching’ en la A subrayada de la secuencia CTCGTG*AC para el procesamiento en el sitio AG adecuado, debido a la mutación $T \rightarrow G$ (señalada con un asterisco). Verdoes y cols. (1997) analizaron la estructura del gen *gpd* y concluyeron que las secuencias consenso de ‘splicing’ en *X. dendrorhous* están poco conservadas y se parecen a las secuencias degeneradas descritas en hongos (NPuCTPuAC). La comparación de la secuencia del primer intrón del gen que codifica para la fitoeno desaturasa de hongos (Figura 27B) sugiere que *X. dendrorhous* podría haber acumulado mutaciones en la secuencia ATCAAT puesto que *N. crassa* y *G. fujikuroi* en la posición equivalente tienen una secuencia que se ajusta al consenso (NPuCTPuAC). De esta forma, la mutación $C \rightarrow A$ en la cepa UCD 67-385

sería la más reciente. Se ha establecido que las secuencias de ‘branching’ pueden diferir del consenso en grados variables y que deben existir otras señales además de la secuencia que permitan la selección del sitio adecuado de ‘branching’ (Harris y Senapathy, 1990). Davis y cols. (2000), examinaron en forma experimental las predicciones de sitios de ‘splicing’ de 87 intrones de proteínas no-ribosomales de *Saccharomyces cerevisiae*. Estos autores encontraron que las predicciones eran correctas en menos del 80 % de los casos, a pesar que las señales de ‘splicing’ en *S. cerevisiae* están conservadas.

En resumen, la selección de un nuevo sitio de ‘branching’ en la cepa UCD 67-385 daría cuenta de la alta proporción de mensajero alternativo encontrado en una muestra de RNA de fase estacionaria.

4.2. Análisis de los mensajeros procesados en forma alternativa

Como se ha señalado en Resultados, la traducción de los dos mensajeros procesados en forma alternativa genera codones de término de la traducción en toda la secuencia. Sin embargo, en ambos casos se restaura el marco de lectura a partir de un codón de inicio de la traducción río abajo del sitio de inicio correcto. Se podría sintetizar entonces, a partir del mensajero alternativo del gen *crtI*, una proteína trunca sin 81 aminoácidos del extremo amino-terminal (Figura 28). En el caso del mensajero alternativo del gen *crtYB*, el marco de lectura se reestablece a partir de un codón AUG que conduciría a la síntesis de una proteína que carece de 153 aminoácidos del extremo amino-terminal (Figura 29). En relación con este aspecto, en el hongo *Neurospora*

Mc -----MSKKHIVII **GAGVGGTATAARLAR** **EGFKVTVVEK**NDFGG GRCSLIHHQG-HRFD
Pb -----MAPPKHVIII **GAGAGGTATAARLAR** **EGIKVTVVEK**NNFGG GRCSLINHNG-HRFD
Gf ----MSDIKKSIVI **GAGVGGVSTAARLAK** **AGFKVTILEK**NDFTG GRCSLIHNDG-HRFD
Nc --MAETQRPRSAIIV **GAGAGGIAVAARLAK** **AGVDVTVLEK**NDFTG GRCSLIHTKAGYRFD
Xd MGKEQDQDKPTAIIV **GC****GIGGIATAARLAK** **EGFQVTVFEK**NDYSG GRCSLIERDG-YRFD
↑ ↑ ↑ ↑

Mc QGPSLYLMPKYFEDA FADLDERIQD-HLEL LRCDNKYKVHFDDGE SIQLSSDLTRMKAEL
Pb QGPSLYLMPKLFEEA FEALDEKIED-HVEL LRCHNNYKVHFDDGD KIQLSSDLSRMKPEM
Gf QGPSLLLLPRFFHEI FQDLGTSLSLTAEGVEL LKCEPNYNIWFGDGS SFEMSTDLTKMKKAI
Nc QGPSLLLLPGLFRET FEDLGTTLQEDVEL LQCFPNYNIWFS DGK RFSPTT DNATMKVEI
Xd QGPSLLLLPDLFKQT FEDLGEKMED-WVDL IKCEPNYVCHF HDEE TFTFST DMALLKREV
↑ ↑ * ↑ ↑

Mc DRVEGPLGFRFLDF MKETHIHYESGTLIA LKKNFESIWDLIRI- KYAPEIFRLHLFGKI
Pb ERIEGPDGFLRFLDF MKESHTHYEGGVEMA IKQNFETIWKILRL- QYVPALFRLHIFDFV
Gf EAVEGIDGFERYLGF LQESHRYEVSVESV LRRNFPSILSLARP- EVLFNLFNIHPLESI
Nc EKWEGPDGFRRYLSW LAEGHQHYETSLRHV LHRNFKSILELADPR LVVTLLMALHPFESI
Xd ERFEGKDGFRFLSF IQEAHRHYELAVVHV LQKNFPGFAAFLRL- QFIGQILALHPFESI
↑ ↑ ↑

Mc YDRASKYFKTKKMRM AFTFQTM YMGMSPYD APAVY SLLQYTEFAE GIWYPRGGFN MVVQK
Pb YSRAAKYFKTKKMRM AFTFQSM YMGMSPYD SPAVYNLLQYTEFAE GIWYPKGGFN TVIQK
Gf WTRASKYFWTERLRR VFTFGSM YMGMSPFD APGTYSLLQYTELAE GILYPRGGFHKV VEA
Nc WHRAGRYFKTDRMQR VFTFATM YMGMSPFD APATYSLLQYSELAE GIWYPRGGFHKV LDA
Xd WTRVCRYFKTDRLRR VFSFAVM YMGQSPYS APGTYSLLQYTELTE GIWYPRGGFWQ VPNT
↑ ↑ ↑ ↑

Mc LEAIAKQKYD-AEFI YNAPVAKINTDDATK --QVTGVTLENGHII DADAVVCNADLVYAY
Pb LENIATEKFG-ARFI YEAPVAKINTDDKKG --KVTGVTLQSGEVI EADAVVCNADLVYAY
Gf LVNVGQRLGVEYRLS TGVSISISIDQATG-- --KANGVVLSDGTHL PSDIVISNADLVYTY
Nc LVKIGERMVGYRLN TGVSQVLT DGGKNGK KPKATGVQLENGEVL NADLVVVNADLVYTY
Xd LLQIVKRNPNPSAKFN FNAPVSQVLLSPAKD --RATGVRLES GEEH HADVIVNADLVYAS

Mc HNLLPPCR----- -----WTQNTLASK KLTS--SSISFYWSM STKVPQLDVHNI FLA
Pb HNLLPPCR----- -----WTTNTLAEK KLTS--SSISFYWSL KRVVPELDVHNI FLA
Gf NNLLPKTS----- -----YADSLS KRETSCSSISFYWSA SKIVPELNAHNI FLA
Nc NNLLPKEIGG----- -----IKKYANKLN NRKASCSSISFYWSL SGMMAKELETHNI FLA
Xd EHLIPDDARNKIGQL GEVKRSWWADLVGGK KLKGS CSSLSFYWSM DRIVDGLGGHNI FLA
↑

Mc EAYQESFDEIFKDFG LPSEASFYVNVPSRI DPSAAPDGKDSVIVL VPIGHMKSKTGD---
Pb EAFKESFDEIFTDHK MPSELSFYVNLPSRI DPTAAPPKGKDSMIVL VPIGHMKSKT-----
Gf DEYQESFDSIFKEHL IPSEPSFYVNVPSRI DPSAAPEGKDSIVVL VPVGHLLSDSEGTHR
Nc EEYKESFDAIFERQA LPDDPSFYIHVPSRV DPSAAPPDRDAVIAL VPGHLLQNGQ----
Xd EDFKGSFDTIFEELG LPADPSFYVNVPSRI DPSAAPEGKDAIVIL VPCGHIDASN-----
↑

Mc -----ASTEN YPAMVDKARKMVLAV IERRLGMSNFADLIE
Pb -----NEAED YTMIVKRARKMVLEV LERRLGLTNFIDLVE
Gf GLSKSGNSGGLET-- -----SQD WDKMISLARDTVIAT MRARIGVD-LAPLIE
Nc -----PELD WPTLVSKARAGVLAT IQARTGLS-LSPLIT
Xd -----PQD YNKLVARARKFVIQT LSAKGLPDFEKMIV

```

Mc HEQVNDPAVWQSKFN LWRGSILGLSHDVLQ VLWFRPSTKDSTG-- -----
Pb HEEVNDPSIWQKKFN LWRGSILGLSHDVLQ VLWFRPSTQDSTG-- -----
Gf NEIINTPFTWQEKFN LDKGAILGLSHSIMN VLAFRPGTQHS---- -----
Nc EEIVNTPYTWETKFN LSKGAILGLAHDFFN VLAFRPRTKAQG--- -----
Xd AEKVHDAPSWEKEFN LKDGSILGLAHNFMQ VLGFRPSTRHP---- -----

Mc -----RYD NLFVVGASTHPGTGV PIVLAGSKLTSQVV KSFQKTPKPRKIEME
Pb -----RYK NLFVVGASTHPGTGV PIVLAGSKLTSQVC DHFGVKVRPSAITSS
Gf -----KYK NLYFAGASTHPGTGV PVCIAAGSKIVAEQIL KDSGFKNNQIPWAQD
Nc -----MD NAYFVGASTHPGTGV PIVLAGAKITAEQIL EETFPKNTKVPWTTN
Xd -----KYD KLFVVGASTHPGTGV PIVLAGAKLTANQVL ESFDRSPAPDPNMSL

Mc NTQAPLEEPDA---- -----ESTFPVW FWLRAAFWVMFMFFY FFPQS--NGQTPASF
Pb KRTYAPEDSKS---- -----FIWDIIW FLLIALFAATLVLFV AFPQYSEVNQTAASY
Gf TTKSP----- -----KGGLDKM SDSSLTRVPKGFLLGG SGCGFCWLIILSL
Nc EERNSEMRKEMDEK ITEEGIIMRSNSSKP GRRGSDAFEGAMEVV NLLSQRAFPLLVALM
Xd SVPYGGKPLKSN---- -----GTGIDSQ VQLKFMDLERWVYLL VLLIG-----AVI

Mc INNLLPEVFRVHNSN
Pb INNLLPAAFRVPVAN
Gf RISEHWLVD-----
Nc GVLYFLLFVR-----
Xd ARSVGVLAF-----

```

Figura 28. Alineamiento de las secuencias de la proteína fitoeno desaturasa de los hongos *Mucor circinelloides* (Mc), *Phycomyces blakesleeanus* (Pb), *Gibberella fujikuroi* (Gf), *Neurospora crassa* (Nc) y *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Xd). Las flechas señalan la posición de los intrones en la secuencia nucleotídica para cada género. La secuencia resaltada corresponde al dominio de unión a nucleótido. En rojo se destacan los aminoácidos idénticos en las cuatro proteínas. El asterisco indica la posición en la cual se restaura el marco de lectura en el mensajero procesado alternativamente en *X. dendrorhous*.

```

Mc  -MLLTYMEVHLYYTL  PVLGVLSWLSRPYYT  ATDALKFKFLTLVAF  -----
Pb  --MLTYMEVHLYFTL  PVLALLAFLYKPFFT  TKDRFKYIFLCTVAF  -----
Nc  --MYDYAFVHLKFTV  PAAVLLTAIAPILN  RIHLIQTGFLVVVAF  -----
Gf  -MGWEYAQVHLKYTI  PFGVVLAAVRPLMS  RLDVFKLVFLITVSF  FWVVKGLEANSCRLL
Xd  MTALAYQIHLIYTL  PILGLLGLLTSPILT  KFDIYKISILVFIAF  -----
                                         ↑

Mc  -----  --TTASAWDNYIVYH  KAWSYCP----TCVT  AVIGYVPLEEYMFFI
Pb  -----  --ATASPWDNYIVYH  KAWSYCP----ECVT  AVIGYVPLEEYMFFI
Nc  -----  --TAALPWDAYLIKH  KVWSYP---PEAIVG  PRLLGIPFEELFFFV
Gf  LFLPCMLILRGVLLR  LTNADSPWDSYLIKN  RIWTYP---PGVVVG  LTAWDIPAEELFFFV
Xd  -----  --SATTPWDSWIIRN  GAWTYPSAESGQGVF  GTFLDVPYEEYAFFV
                                         ↑

Mc  IMTLLTVAFTNLVMR  WHLHSFFIRPETP-V  MQSVLVRLVPITALL  ITAYKAWHLAVP--G
Pb  IMTLITVTFTSLTMR  WTLPSFFIRPETP-V  FQSVCVRYIPIVGFL  TIAAKAWASSIP--D
Nc  IQTYITALVYILFNK  PVLHALHLNNQQNPP  AWMRVVKVTGQVVLV  ALSVWGWNAAQ--VH
Gf  IQTFNTSLLYMILSK  PTFHPIYLSKKTG--  -WG---KIAGQILFA  SAIIFGLVSVS--SG
Xd  IQTVITGLVYVLATR  HLLPSLALPKTRSSA  LSLALKALIPLPIY  LFTAHPSPSPDPLVT

Mc  KPLFYGSCILWYACP  VLALLWFGAGEYMMR  RP----LAVLVSIAL  PTLFLCWDVVAIGA
Pb  SHPFYGACILWYVCP  VLALLWIGSGEYMLR  RW----KAVLFSIAV  PTIFLCWDQYAIAR
Nc  QETSYLGLILVWACP  FLLAIWTLAGRFILS  LP---WYATVLPMFL  PTFYLWAVDEFALHR
Gf  GEGMYMGLILIWACP  FLLFLWSISYQFIVN  LP---WTNTALPIAL  PTLYLWVDTFALRR
Xd  DHYFYMRALSLLITP  PTMLLAALSGEYAFD  WKSGRAKSTIAAIMI  PTVYLIWDYVAVGQ
                                         *

Mc  GTWDISLATSTGKFV  VPHLPVEEFMFFALI  NTVLVFGTCAIDRTM  AILHLFKNKSPYQRP
Pb  GTWDISRRTSTGIMV  LPSLPLEEFLFFLLI  DTVLVFASCATDRAH  AIVHIYITPMNHN--
Nc  GTWSIGSGTKLDFCL  FGKLDIEEATFFLVT  NMLIVGGMAFDQYL  AVIYAFPTLFPKVN-
Gf  GTWSITSGTKYGVVL  WDGLEIEEAVFFLLT  NTLIVFGLIACDNNL  AILDTFPEHFPRTK-
Xd  DSWSINDEKIVGWRL  GGVLPIEEAMFFLLT  NLMIVLGLSACDHTQ  ALYLLHGRTIYGNK-
                                         ↑

Mc  YQHSKSFLHQILEMT  WAFCLPDQVLHSDTF  HDLSVSWDILRKASK  SFYTASAVFPGDVRQ
Pb  --KVSTWYMDFFYLC  WAFLQTDQALSGETL  SDLDATWRILREASA  SFYTASSVFSFEARQ
Nc  --RYPTHMLLQ---  -SRLINTSRYDLERI  EGLREAVERLRLKSR  SFYLANSLFSGRLRI
Gf  --GVPSLLTIIR---  -TLILPKEKYDEERI  QGLVSAVALLRKKSR  SFYLASGTFEGRLRI
Xd  --KMPSSFPLITPPV  LSLFFSSRPYSSQPK  RDLELAVKLLEKKSR  SFFVASAGFPSEVRE

Mc  ELGVLYAFCRATDDL  CDNEQVPVQTRKEQL  ILTHQFVSDLFG---  -----
Pb  DLGVLYGFCRATDDL  ADNNDVSVPDRKKQL  ELVRGFVRQMFD---  -----
Nc  DLILIYSFCRLADDL  VDDAKS-RREVLSWT  AKLNHFLDLHYKDAD  AT-----
Gf  DLIRLYAFCRAADDL  VDEAPS-VDDSRASI  EKLRKFLDLAYE---  -----
Xd  RLVGLYAFCRVTDDL  IDSPEV-SSNPHATI  DMVSDFLTLLFGPPL  HPSQPDKILSSPLLP

Mc  -----Q  KTSAPTAIDWDFYND  QLPASCISAFKSFTR  LRHVLEAGAIKELLD
Pb  -----S  KHGHP-DIDWTQYSG  SIPDSFIAAFRSFTR  LRDVLEIKAVELLD
Nc  -----E  DPKKKAERIDAYIKT  AFPPCAYQALHLLP-  -THILPPKPLYDLIK
Gf  -----E  NQEEPSQRLREYVTS  SIPEMFHMALLQLP-  -TYYLPKQPLDDLLK
Xd  PSHPSRPTGMYPLPP  PPSLSPAELVQFLTE  RVPVQYHFAFRLLAK  LQGLIPRYPLDELLR

```



```

Mc  GYKWDLER-----  -----RSIRDQEDLR  YYSACVASSVGEMCT  RIILAHADKPPASRQQ
Pb  GYTFDLEQ-----  -----REVKNEDDLV  YYSACVASSVGEMCT  RVLMASEPG-GNRTM
Nc  GFEMDSQFTFHGTS  STDLQYPIADDDKLE  NYAIYVAGTVGELCI  ALIIYHCLPDMSDTQ
Gf  GFDTDLLF-----D  RKSGAFPIETTEDLD  IYGSRVAGTVAELCN  HLILYHTPEAVPEDI
Xd  GYTTDLIFPLS-TEA  VQARKTPIETTADLL  DYGLCVAGSVAELLV  YVSWASAPSQVPATI
      .           .           . . . .

Mc  --TQWIIQRAREMGL  VLQYTNIARDIVTDS  EELGRCYLPQDWLTE  K-----
Pb  --LKWTVERARDMGL  ALQLTNIARDIVTDS  KQLGRSYVPRDWLTS  Q-----
Nc  --KRELETAACRMGI  ALQYVNIARDIVDA  R-IGRVYLPTTWLKK  E-----
Gf  --QREVVASGQEMGI  ALQYVNIARDIKTDA  E-IDRVYLPLSWLKE  A-----
Xd  EEREAVLVASREMG  ALQLVNIARDIKGDA  T-EGRFYLPLSFFGL  RDESKLAIPTDWTEP
      . . . . . . . . . . . . . . . .

Mc  -----EVA  LIQGGGLAREIGEERL  LSLSHRLIYQADELM  VVANKGIDKLPSHCQ
Pb  -----ESA  LLKAGKARELGDERL  RQIALKMVYTADDLN  LMASRAIDYLPPSSR
Nc  -----GLTHKM  VLENPEGPE----VI  ERMRRRLLENAFELY  GGARPEMQRIPSEAR
Gf  -----QLTPED  VIQQPHGP-----TI  EALRHKLLDRAFEKY  NMAKGAIDKLPSEGK
Xd  RPQDFDKLLSLSPSS  TLPSSNASESFRFEW  KTYSLPLVAYAEDLA  KHSYKGIDRLPTEVQ

Mc  GGVRAACNVYASIGT  KLKSYK-HHYPS---  -RAHVGNSKRVEIAL  LSVYNLYTAPIATSS
Pb  CGVRAACNVYTAIGV  SLHKAN-G-YPD---  -RAHLTKLERMKVTF  RCVYGFRRKQ--HQG-
Nc  GPMIGAVENYMAIGR  VLRRERKEGTVFVRME  GRATVPKRRRLSTLL  RALYEQ-----
Gf  GPIRVAVESYMEIGR  VLREK--GPTMK--K  GRATVPKMRRIRVAW  SALNK-----
Xd  AGMRAACASYLLIGR  EIKVVWKGDVGE---  -RRTVAGWRRVRKVL  SVVMSGWEGQ-----

Mc  TTHCRQGKMRNLNTI
Pb  -VQGDRGKSQAFTVI
Nc  -----
Gf  -----
Xd  -----

```

Figura 29. Alineamiento de las secuencias de la proteína fitoeno- β -caroteno sintasa de los hongos *Mucor circinelloides* (Mc), *Phycomyces blakesleeanus* (Pb), *Gibberella fujikuroi* (Gf), *Neurospora crassa* (Nc) y *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Xd). Las flechas señalan la posición de los intrones en la secuencia nucleotídica para cada género. En rojo se destacan los aminoácidos idénticos en las cuatro proteínas. La secuencia en negrita corresponde a dos dominios conservados en fitoeno sintasas de diversos organismos y los puntos indican los aminoácidos presentes la escualeno sintasa humana y de *S. cerevisiae*. El asterisco indica la posición en la cual se restaura el marco de lectura en el mensajero procesado alternativamente en *X. dendrorhous*.

crassa se ha descrito la síntesis de la proteína GGPP sintasa a partir de dos codones AUG internos (Vittorioso y col., 1994). Estas versiones truncas de la enzima GGPP sintasa de *N. crassa* son aún activas puesto que retienen las regiones conservadas con otras preniltransferasas que definirían los dominios funcionalmente importantes. Sin embargo, el análisis de la estructura de la fitoeno desaturasa y de la fitoeno- β -caroeno sintasa indicaría que estos casos no son similares. El análisis de la secuencia del gen *crtI* muestra un motivo de unión a dinucleótido (FAD o NAD(P)) en el extremo 5', región muy conservada en fitoeno desaturasas de bacterias, cianobacterias, algas, plantas y hongos (Figura 28) (Verdoes y col., 1999; Armstrong, 1994; Hirschberg, 1998). Además, se ha demostrado experimentalmente, la necesidad de cofactores en las reacciones de desaturación (Fraser y col., 1992; Britton, 1998). Por otra parte, esta enzima está asociada a membranas (Cunningham y Gantt, 1998). En la fitoeno desaturasa de *X. dendrorhous* se han definido al menos 7 regiones hidrofóbicas, dos de las cuales se encuentran en la porción amino-terminal (León, 2000).

Dada la naturaleza hidrofóbica del sustrato (fitoeno) y producto (licopeno) de esta enzima es razonable suponer que la forma activa está unida a membrana. En concordancia con estos resultados, en cromoplastos de *Narcissus pseudonarcissus* se encuentra una forma soluble e inactiva de la enzima fitoeno desaturasa, mientras que la forma activa se encuentra fuertemente asociada a membrana y uniendo FAD (Al-Babili y col., 1996). Estos autores demostraron además que la proteína puede unirse a membrana en ausencia de FAD, pero este proceso es improductivo dado que en estas condiciones la proteína unida a membrana resulta inactiva. Por consiguiente, según los

antecedentes mencionados sería poco probable que a partir del mensajero alternativo del gen *crtI* se genere una forma trunca y activa de la proteína.

Con respecto a la enzima fitoeno-caroteno sintasa, una proteína trunca sin 153 aminoácidos del extremo amino-terminal no tendría actividad licopeno ciclasa (Verdoes y col., 1999). En cuanto a la función fitoeno sintasa, los dominios importantes se encuentran en el extremo carboxilo-terminal (Figura 29). Estos dominios están conservados incluso en escualeno sintasas que catalizan una reacción similar, como es la condensación de farnesildifosfato (C_{15}) a escualeno (C_{30}) (Summers y col., 1993; Hirschberg, 1998). Por consiguiente, una proteína trunca en su extremo amino-terminal podría tener actividad fitoeno sintasa. Sin embargo, Verdoes y cols. (1999) construyeron una forma trunca de la proteína en su extremo 5' a partir de un cDNA con una delección hasta el nucleótido de la posición 514, esta versión trunca sólo conserva un 30 % de la actividad fitoeno sintasa, en un sistema de *E. coli*. Por otra parte, en *X. dendrorhous* nunca se han obtenido mutantes que acumulen licopeno. Ambos resultados indican por lo tanto que la proteína tiene regiones comunes importantes para ambas actividades. En conclusión, los antecedentes mencionados indican que también es poco probable que se produzca una forma trunca y activa de la fitoeno- β -caroteno sintasa a partir del mensajero alternativo. Otra evidencia experimental que avala esta conclusión, consiste en los resultados presentados por Verdoes y col. (1999a y 1999b). Estos autores transformaron con una biblioteca de cDNA de *X. dendrorhous*, una cepa de *E. coli* que portaba los genes de la vía metabólica menos aquellos que deseaban clonar. Los transformantes, que se distinguen porque forman colonias coloreadas debido a la síntesis

de carotenoides, tenían cDNAs que corresponden a mRNAs procesados en la forma correcta. En resumen, los mensajeros alternativos de los genes *crtI* y *crtYB* no serían traducidos a variantes truncas de las proteínas CRTI y CRTYB, hecho que sin embargo, habría que demostrar experimentalmente.

Según se ha descrito en la literatura, el ‘splicing’ alternativo de un transcripto primario ocurre en sitios 5’ o 3’ alternativos generando un transcripto maduro que conserva o deletiona exones internos, lo cual conduce a distintas variantes de una proteína. Este proceso está regulado de forma tal que cierta vía de ‘splicing’ ocurre sólo en condiciones particulares, por ejemplo el ‘splicing’ alternativo de mensajeros que codifican para proteínas que determinan el sexo en *Drosophila melanogaster* (Lewin, 2000). Sin embargo, los mensajeros procesados en forma alternativa descritos en este trabajo presentan codones de término de la traducción prematuros. Estos mensajeros aberrantes que podrían resultar en proteínas truncas, son rápidamente degradados en levaduras, mamíferos y en *C. elegans* (Czaplinski y cols., 1999). En contraste, los mensajeros alternativos *crtI* y *crtYB* se detectaron en distintos momentos del ciclo de crecimiento de la levadura y en altos niveles, en el caso del gen *crtI*, de un total de 28 clones de cDNA analizados, 16 clones tenían el cDNA alternativo. Puede especularse que dichos mensajeros son simplemente errores del proceso de ‘splicing’, sin embargo dadas las diferencias anteriormente mencionadas con otros sistemas, la síntesis de estos mensajeros podría tener una función regulatoria. En el caso del gen *crtI*, se determinó que la proporción de mensajero alternativo aumenta con la edad del cultivo de la levadura. Con respecto al gen *crtYB*, durante la fase exponencial de crecimiento la cinética de expresión del mensajero maduro y del mensajero alternativo es similar,

aunque durante la fase diauxia-estacionaria sus niveles bajaron mucho como para poder ser cuantificados por el método empleado. La proporción mensajero maduro/alternativo de los genes *crtI* y *crtYB* podría variar dependiendo de condiciones ambientales o fisiológicas tales como la fase de crecimiento del cultivo, como ha sido establecido para el caso del gen *crtI*. Al respecto, en el nematodo *Caenorhabditis elegans* el ‘splicing’ del RNA de la proteína ribosomal RPL-12 es un proceso regulado conduciendo a transcriptos productivos y no productivos (Mitrovich y Anderson, 2000). En este caso, la proteína RPL-12 parece autoregular el ‘splicing’ de su propio RNA a una forma no productiva dependiendo de la concentración celular de la proteína. Los resultados obtenidos en este trabajo, indicarían que durante la fase de crecimiento es cuando se arman los complejos multienzimáticos que sintetizan astaxantina. El ‘splicing’ hacia formas no productivas de mensajeros podría ser un mecanismo para bajar la síntesis de las enzimas de carotenogénesis. Puede especularse que si los mensajeros alternativos son transportados desde el núcleo al citoplasma, podrían competir con los mensajeros maduros por la unión con los ribosomas, de forma tal de reducir la probabilidad de los ribosomas de unirse a los mensajeros maduros.

Sería relevante determinar si otras cepas, especialmente la cepa CBS 6938 cuyos genes de carotenogénesis están secuenciados, presentan esta forma de procesamiento en los genes *crtYB* y *crtI*, y cuál sería la proporción de mensajero maduro/alternativo en fase exponencial y estacionaria. Por otra parte, sería interesante estudiar si la forma de procesamiento descrita en este trabajo se encuentra en otros hongos basidiomicetes carotenogénicos.

4.3. Análisis de la producción de carotenoides y otras variables a lo largo del ciclo de vida

La producción de carotenoides por unidad de biomasa a lo largo del ciclo de crecimiento de la cepa silvestre, se indujo cuando la glucosa se agotó en el medio de cultivo, y cuando comenzó a utilizarse el etanol que se sintetizó durante la fase exponencial de crecimiento. Además, la síntesis de carotenoides fue baja e incluso, tendió a disminuir durante la fase exponencial (Figura 18A). Según Johnson y Lewis (1979), la concentración celular de carotenoides y astaxantina, se incrementa junto con la producción de biomasa a lo largo del ciclo de crecimiento, aunque los autores señalan que sus resultados contrastan con los obtenidos con otros hongos carotenogénicos, en los cuales la producción de carotenoides ocurre cuando el crecimiento se detiene. Por otra parte, según Johnson y Schroeder (1995) la síntesis de astaxantina en *X. dendrorhous* se incrementa después del crecimiento activo de la levadura. Por consiguiente, existe una discrepancia entre estos resultados, lo cual podría deberse a que dichos autores utilizaron en sus experimentos la cepa silvestre UCD 67-210 y en esta tesis se utilizó la cepa silvestre UCD 67-385. Además, las diferentes condiciones de cultivo empleadas, especialmente en lo referente a fuente de carbono, nitrógeno, y nivel de oxigenación de los cultivos, también podrían explicar las diferencias encontradas. Por otra parte, en experimentos anteriores de nuestro laboratorio se ha observado que la producción de carotenoides aumenta con la edad de los cultivos, resultados que coinciden con los obtenidos en este trabajo. En coincidencia con estas observaciones, Fang y Cheng (1993) cultivaron la cepa CBS-6938 en medio YM a 22 °C y encontraron que la

producción de astaxantina se incrementa con menores velocidades de crecimiento, es decir la producción de astaxantina no está asociada al crecimiento.

Yamane y cols. (1997), establecieron que durante la fase exponencial temprana la tasa de producción de astaxantina ($\mu\text{g/g/h}$) tiene una relación lineal inversa con la producción de etanol. Es decir, bajo un metabolismo fermentativo disminuye la concentración celular de astaxantina. Aunque estos autores no realizaron una cinética de la producción de carotenoides y etanol, nuestros resultados también indicarían que un metabolismo totalmente respiratorio, en este caso cuando se utiliza como fuente de carbono etanol, favorece un aumento de la concentración celular de carotenoides. En nuestros experimentos, el consumo de etanol está asociado con la entrada a una fase diauxia-estacionaria de crecimiento, y por lo tanto son necesarios otros experimentos para clarificar este punto. En particular, sería interesante estudiar cuál es la concentración celular de carotenoides en fase exponencial y en fase estacionaria utilizando fuentes de carbono no-fermentables como succinato.

Johnson y Lewis (1979) también sostienen que un metabolismo aerobio favorece la producción de astaxantina, dado que fuentes de carbono como succinato que sólo son utilizadas en forma aeróbica, permitieron una alta producción de astaxantina. Sin embargo, la adición de 0,2 % de etanol en cultivos de medio YM de la cepa silvestre UCD 67-385, no incrementó la concentración celular de carotenoides, aunque sí lo hizo en cepas mutantes (Gu y cols., 1997). Probablemente, la discrepancia con nuestros resultados radique en que Gu y cols. agregaron etanol junto con glucosa, y la levadura utilizaría preferentemente glucosa como fuente de carbono y no etanol. Además, dichos

autores no determinaron etanol residual en el medio de cultivo, y por consiguiente no se puede determinar cuanto se consumió efectivamente

En cuanto a la cepa atxS2, puede decirse que la producción de carotenoides está desregulada con respecto a la cepa silvestre puesto que desde el inicio del ciclo de crecimiento, la concentración celular de carotenoides es mayor, especialmente durante la fase exponencial (Tabla 3). Por otra parte, el número de células del cultivo de la cepa atxS2 fue un 42 % del número de células del cultivo de la cepa silvestre. Posiblemente, el hecho de que la síntesis de carotenoides esté desregulada tenga como consecuencia la producción de un menor número de células, puesto que la síntesis de carotenoides demanda recursos celulares que no están disponibles para otras vías metabólicas. Miura y cols. (1998) introdujeron los genes de carotenogénesis de *Erwinia uredovora* necesarios para la síntesis de licopeno en *Candida utilis*, la cual es una levadura que no sintetiza carotenoides. La cepa de *C. utilis* modificada genéticamente produjo licopeno, aunque con una menor síntesis de ergosterol, posiblemente porque el flujo de farnesil pirofosfato fue hacia la vía de síntesis de carotenoides. Además, la velocidad de crecimiento de esta cepa fue la mitad de la velocidad de crecimiento de la cepa control.

4.4. Análisis de la expresión de los genes de carotenogénesis

El análisis de la expresión de los genes de carotenogénesis en la cepa UCD 67-385 permite establecer que los niveles de los mensajeros son máximos durante el período de inducción de la síntesis de carotenoides, sin embargo este aumento es transitorio puesto que sus niveles disminuyen posteriormente, excepto en el caso del gen *crtE*. A partir de

la fase exponencial tardía, la concentración celular de carotenoides aumenta aunque los niveles de casi todos los mRNA de los genes de carotenogénesis disminuyen.

Con respecto a la cepa atxS2, los niveles de mensajeros de los genes *crtE*, *crtI* y *ast* son aproximadamente el doble de los niveles que se determinaron en la cepa silvestre durante la fase exponencial temprana. Estas diferencias en el nivel de expresión podrían explicar al menos en parte, que la producción de carotenoides en la cepa atxS2 esté desregulada desde el inicio del ciclo de crecimiento. Durante la fase estacionaria, el nivel del mensajero *ast* en la cepa atxS2 es casi 3 veces el nivel que se encuentra en la cepa silvestre y además, su nivel permanece elevado durante más tiempo en la mutante (Figura 24).

Por otra parte, los resultados obtenidos sugieren que los genes *crtE*, *crtI* y *ast* podrían estar sujetos a represión por glucosa. Al respecto, la producción de carotenoides por unidad de biomasa en la cepa UCD 67-385 fue mayor cuando se utilizó como fuente de carbono celobiosa o etanol que cuando se utilizó glucosa (An y cols., 1989). Además, según Johnson y Lewis (1979), la levadura produjo más astaxantina por unidad de biomasa cuando se utilizaron fuentes de carbono distintas a glucosa.

Los estudios realizados en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* indican que en presencia de glucosa, y puesto que la glicólisis es la vía principal para obtener energía, disminuyen los niveles de mensajeros tanto de las enzimas que metabolizan otras fuentes de carbono, como de la mayoría de las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, de la gluconeogénesis, de la cadena respiratoria, de la β -oxidación peroxisomal y alcohol deshidrogenasa II (Entian y Schüller, 1997; Gancedo, 1998). Aunque en algunos casos

los niveles de los mensajeros de los genes sujetos a represión catabólica se regulan a nivel de su estabilidad, la forma de regulación predominante es a nivel transcripcional (Gancedo, 1998). En presencia de fuentes de carbono no-fermentables, la forma de obtención de energía es a través de las mitocondrias, y por consiguiente, los genes que codifican para citocromos (cadena respiratoria) y enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos están desreprimidos (Entian y Schüller, 1997; Kal y cols., 1999).

Considerando lo que se sabe sobre metabolismo del carbono en *S. cerevisiae*, los genes *crtE*, *crtI* y *ast* de *X. dendrorhous* podrían estar regulados a nivel transcripcional por glucosa. Es interesante el hecho que la concentración celular de carotenoides aumenta cuando la glucosa se ha agotado en el medio de cultivo, y se utiliza etanol como fuente de carbono (no-fermentable) (Figura 18A y B). Puede especularse que en esta levadura los niveles de los mensajeros de enzimas mitocondriales también podrían estar sujetos a represión catabólica.

Por otra parte, en *X. dendrorhous* se ha observado que un aumento en la oxigenación de los cultivos evita la síntesis de etanol e induce una mayor concentración celular de carotenoides (Yamane y cols., 1997). Es decir, bajo condiciones de oxigenación no limitantes, el nivel de expresión de los genes de carotenogénesis podría responder a la concentración de oxígeno en el medio de cultivo. Al respecto, en *S. cerevisiae* la presencia de oxígeno induce a nivel transcripcional los genes que codifican para enzimas mitocondriales y enzimas involucradas en protección contra estrés oxidativo (catalasas y superóxido dismutasas) (Kwast y cols., 1998). Muchos de estos genes en *S. cerevisiae* están regulados por un activador transcripcional, el complejo Hap2/3/4/5p, que responde a la presencia de oxígeno y a fuentes de carbono no

fermentables en el medio de cultivo. Dada la estrecha relación entre metabolismo del carbono, carotenogénesis y nivel de oxigenación en *X. dendrorhous*, puede especularse que los genes de carotenogénesis (a excepción del gen *idi*) y los genes de las enzimas mitocondriales podrían responder a un regulador transcripcional global de carbono y oxígeno.

El hecho que la carotenogénesis en *X. dendrorhous* se induzca bajo un metabolismo aeróbico podría relacionarse con las propiedades antioxidantes de los carotenoides, especialmente de la astaxantina. Se ha establecido que los radicales libres del oxígeno son un sub-producto del metabolismo aerobio y que las mitocondrias son la fuente principal de oxidantes puesto que consumen aproximadamente el 85 % del oxígeno utilizado por las células (Shigenaga y cols., 1994; Bailey y Cunningham, 2001). Schroeder y Johnson (1993) sostienen que *X. dendrorhous* no posee la forma citosólica de la superóxido dismutasa y los carotenoides podrían compensar esta ausencia. Por otra parte, tal como se mencionó en la introducción, la síntesis de carotenoides podría ser un mecanismo de defensa en *X. dendrorhous* frente a compuestos oxidantes sintetizados en las plantas donde son simbioses.

Con respecto a la expresión del gen *crtYB*, se observó que presentaría una cinética bifásica tanto en la cepa silvestre como en la mutante atxS2. Este resultado habría que confirmarlo con un nuevo experimento donde se analicen muestras de fase exponencial en períodos de tiempo más cortos. En *Mucor circinelloides*, la expresión del gen *carRP*, que es el homólogo del gen *crtYB* de *X. dendrorhous*, responde a la iluminación con luz azul. La exposición del micelio a un pulso de luz azul de 10 seg ($0,1 \text{ Wm}^2$ o 4 Wm^2) o de 4 min (4 Wm^2) y posteriormente, la exposición durante distintos tiempos en

oscuridad, produjo una cinética bifásica del nivel del mensajero *carRP* (Velayos y cols., 2000). En este caso, los autores no aportan ninguna interpretación a cerca de la cinética bifásica de expresión. En *Neurospora crassa*, si bien hay un aumento del nivel de mRNA del gen de la fitoeno- β -caroteno sintasa como respuesta a la luz azul, la cinética no es bifásica (Schmidhauser y cols., 1994). Sin embargo, en este caso las condiciones experimentales empleadas fueron distintas, puesto que se analizó la exposición a la luz en forma continua. Adicionalmente, en el hongo *Phycomyces blakesleeanus* cuya carotenogénesis también responde a la luz, no hay información con respecto a la expresión del gen de la fitoeno- β -caroteno sintasa.

Por otra parte, debe determinarse aún si las diferencias encontradas en el nivel de los mensajeros, tanto a lo largo del ciclo de crecimiento como entre la cepa silvestre y la mutante, se correlacionan con diferencias en la concentración celular de las proteínas de carotenogénesis. Al respecto, la mayor parte de los estudios en los cuales se analizó la regulación de la carotenogénesis han sido a nivel de los mensajeros, puesto que las enzimas de carotenogénesis están en baja concentración celular y muchas de ellas están fuertemente asociadas a membranas, perdiendo su actividad cuando se las solubiliza con detergentes (Cunningham y Gantt, 1998). En relación con los hongos, tal como se mencionó en la introducción, la producción de carotenoides y el nivel de los mensajeros de carotenogénesis se han estudiado como una respuesta a la luz. Sin embargo, no existe aún información sobre ensayos Western blot que determinen el nivel de las proteínas de carotenogénesis en distintas condiciones fisiológicas, quizás debido a la dificultad para obtener anticuerpos de proteínas hidrofóbicas. Una posible estrategia para la producción

de anticuerpos contra proteínas hidrofóbicas es emplear oligopéptidos derivados de dicha proteína, tal como ha sido descrito en experimentos de inmunolocalización y Western blot para la proteína altamente hidrofóbica β -caroteno oxigenasa de *H. pluvialis* (Grünewald y cols., 2001).

4. 5. Modelo de la síntesis de carotenoides

En la figura 30 se presenta un modelo de la síntesis de carotenoides. Los resultados obtenidos en este trabajo, permiten dividir a la regulación de la síntesis de carotenoides en dos etapas. En la primera etapa durante la fase exponencial, con disponibilidad de recursos en el medio de cultivo en lo que se refiere a fuentes de carbono y nitrógeno, se armarían los complejos enzimáticos involucrados en la síntesis de carotenoides. Durante esta etapa, los recursos celulares tales como energía, cofactores e intermediarios (acetil coenzima A, IPP) se emplean en rutas metabólicas de síntesis que llevan a un aumento en la biomasa. Posteriormente, cuando la velocidad de crecimiento disminuye se produce la inducción de la síntesis de carotenoides puesto que los intermediarios metabólicos fluyen hacia la síntesis de carotenoides en los complejos previamente formados.

Un aspecto interesante, es el hecho que al finalizar la fase exponencial, el nivel de expresión relativa del gen *crtE* se mantiene aproximadamente constante a diferencia del resto de los genes de carotenogénesis. Es decir, un nivel elevado de GGPP sintasa permitiría un flujo elevado de precursores de isoprenoides hacia la vía de carotenogénesis y hacia otras vías relacionadas que incluyen síntesis de ergosterol,

proteínas farnesiladas y geraniladas, quinonas, etc. (Stryer, 1999). En plantas, se ha determinado que la desaturación del fitoeno está acoplada a una cadena de transporte de electrones, con O₂ como último aceptor de electrones y quinonas como intermediarios (Mayer y cols., 1990; Nivelstein y cols., 1995). Es probable que la fitoeno desaturasa de bacterias y hongos tengan un mecanismo de reacción similar, aunque con distintas quinonas y cadena de transporte de electrones (Britton, 1998). La necesidad de aportar precursores para la síntesis de quinonas involucradas en la desaturación del fitoeno y en cadena respiratoria, podría ser una de las causas que determina que el nivel del mensajero *crtE* permanezca elevado durante la fase estacionaria de crecimiento.

Con respecto a las causas que determinan que *X. dendrorhous* sintetice astaxantina como principal carotenoide, ya se ha mencionado la protección contra estrés oxidativo que brindaría este pigmento. Sin embargo, la astaxantina podría ser además moduladora de la fluidez de la membrana plasmática. La inducción de la síntesis de carotenoides hacia el final de la fase exponencial podría estar relacionada con esta función. Si bien no existe aún una demostración concluyente de la localización celular de la astaxantina en *X. dendrorhous*, Johnson y Schroeder (1995) por medio de microscopía confocal láser de fluorescencia, observaron que células de la cepa silvestre UCD 67-385 presentaban una débil fluorescencia en la periferia de las células, posiblemente asociada a la membrana plasmática. Por otra parte, se estableció que la proporción astaxantina/pigmento total se incrementa significativamente a bajas concentraciones de amonio en el medio de cultivo, mientras que el contenido celular de proteína aumenta con la concentración de amonio (Flores-Cotera y cols., 2001)

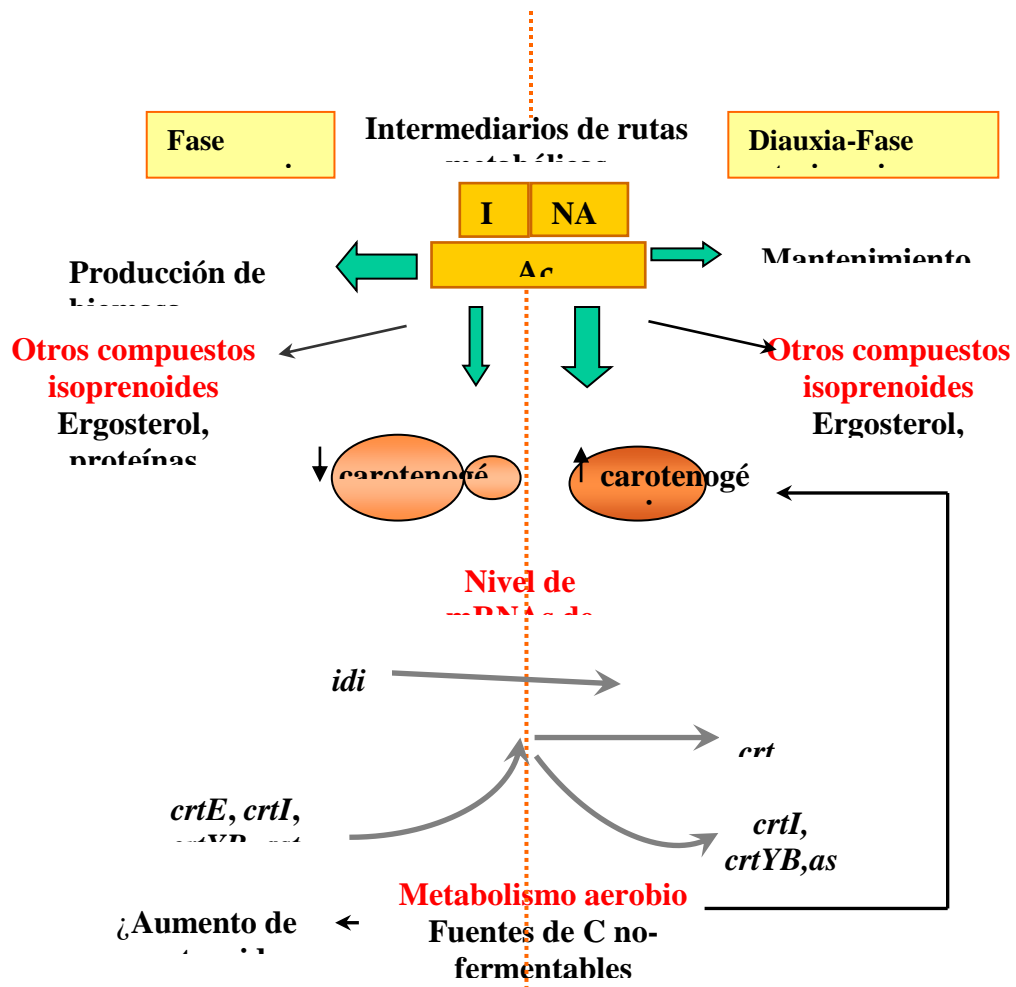


Figura 30. Modelo de la síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*

Además, la concentración celular de astaxantina se incrementó con relaciones C/N crecientes en el medio de cultivo (Yamane y cols., 1997). Estos resultados sugieren que una reducción en la síntesis de proteínas podría estimular la biosíntesis de carotenoides. El aumento en la concentración celular de carotenoides al finalizar la fase exponencial de crecimiento, podría producirse como resultado de una disminución en la síntesis de proteínas. Al respecto, en *S. cerevisiae*, la tasa de síntesis de proteínas en células en fase estacionaria es un 10 % de la tasa de síntesis en células en fase exponencial (Boucherie, 1985). Si bien en *X. dendrorhous* no se ha determinado como varía la concentración celular de proteínas a lo largo del ciclo de crecimiento, una disminución en el contenido celular de proteínas, aunque no fuera tan dramático como en el caso de *S. cerevisiae*, podría tener un efecto profundo en la permeabilidad de la membrana plasmática. Al respecto, la cianobacteria *Anacystis nidulans* presentó una disminución significativa de la proporción proteínas/lípidos de membrana plasmática, en función del tiempo de exposición en un medio carente de nitrato (Gombos y cols., 1987). Sin embargo, en esas condiciones experimentales, la fluidez de la membrana se mantuvo constante. Se determinó que una mayor fluidez en la membrana debido a la disminución en la proporción proteínas/lípidos, fue compensada por una disminución en el nivel de insaturación de los lípidos de membrana y un aumento en la proporción xantófilas/ β -caroteno (Gombos y cols., 1987; Gombos y Vigh, 1986). Tal como se describió en la introducción, las xantófilas que presentan una mayor restricción en su ubicación dentro de la membranas biológicas que los carotenos, le confieren a la misma una mayor rigidez. Por consiguiente, el aumento en la síntesis de carotenoides al finalizar la fase

exponencial, y astaxantina en particular por ser el más abundante, podría deberse a una función reguladora de la fluidez de las membranas. Es interesante que esta posibilidad aún no haya sido considerada, puesto que el rol de la astaxantina como molécula antioxidante ha enmascarado otras posibles funciones que pudiera tener en *X. dendrorhous*.

Finalmente, puede concluirse que la síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous* es un proceso complejo y regulado en múltiples niveles, que involucran la concentración de los mensajeros de las enzimas de carotenogénesis, el ‘splicing’ de al menos dos de dichos mensajeros, el flujo de intermediarios metabólicos entre distintas vías de síntesis y seguramente, el nivel de las proteínas de carotenogénesis y sus actividades enzimáticas. El estudio de la fisiología y biología molecular de la biosíntesis de astaxantina es la mejor aproximación, para llegar a superar los escollos que hasta el presente han impedido la obtención de cepas sobreproductoras mediante técnicas genéticas clásicas como mutagénesis al azar.

5. CONCLUSIONES

- Se observó procesamiento alternativo de los transcritos de los genes *crtI* y *crtYB*. El transcripto alternativo del gen *crtI* podría seguir una vía de ‘splicing’ alternativo en un sitio 3’ (AG) dentro del primer intrón de forma tal que conserva 80 bases de dicho intrón. Por otra parte, el transcripto alternativo del gen *crtYB* podría seguir una vía de ‘splicing’ alternativo en un sitio 5’ (GT) dentro del primer intrón y en un sitio 3’ dentro del segundo exón de forma tal que conserva 55 bases del primer intrón y pierde 111 bases del segundo exón. La traducción de los mRNAs alternativos genera codones de término de la traducción a lo largo de toda la secuencia y por lo tanto no serían traducidos a enzimas de carotenogénesis activas.
- Los mRNAs maduro y alternativo de cada gen se detectan con niveles variables en distintas fases del ciclo de crecimiento de la levadura, tanto en una cepa silvestre (UCD 67-385) como en una mutante desregulada en la síntesis de astaxantina (*atxS2*). La proporción mensajero maduro/alternativo del gen *crtI*, disminuye a lo largo del ciclo de crecimiento.
- La secuencia del primer intrón del gen *crtI* en la cepa silvestre UCD 67-385 tiene dos mutaciones en relación con la secuencia de la cepa CBS 6938 que podrían ser responsables de la selección de un nuevo sitio de ‘splicing’. En el caso del gen *crtYB*, la secuencia del primer intrón en ambas cepas no presenta diferencias.
- El alineamiento del primer intrón del gen *crtI* y de su homólogo en hongos ascomicetes, sugiere que la forma de procesamiento descrita en este trabajo no

ocurriría en el gen de ascomicetes. Un análisis similar realizado con el gen *crtYB* permite obtener la misma conclusión.

- La síntesis de carotenoides en la cepa silvestre y la cepa atxS2 no está asociada al crecimiento. En ambas cepas la síntesis de carotenoides se induce cuando la velocidad de crecimiento disminuye. Este período coincide con el consumo de etanol que se produjo previamente durante la fase exponencial de crecimiento. En la cepa atxS2 la producción de carotenoides está desregulada desde el inicio del ciclo de crecimiento, este hecho podría dar cuenta del menor número de células que produjo dicha cepa.
- El nivel de expresión de los genes *crtYB*, *crtE*, *crtI* y *ast* aumenta durante la fase exponencial y son máximos al finalizar la fase exponencial cuando se induce la carotenogénesis. Sin embargo, sus niveles decaen durante la diauxia-fase estacionaria, excepto en el caso del gen *crtE* cuyos niveles permanecen elevados. Estos resultados sugieren que los complejos enzimáticos de carotenogénesis se armarían durante la fase exponencial, luego a partir de la fase exponencial tardía. La proteína GGPP sintasa aseguraría el flujo de IPP hacia la vía de carotenogénesis y posiblemente, hacia otras vías metabólicas. Por otra parte, los intermediarios metabólicos que durante la fase exponencial se utilizan en vías metabólicas relacionadas con la producción de biomasa, al finalizar dicha fase se utilizarían en la síntesis de carotenoides.
- En la cepa atxS2, los niveles de expresión de los genes *crtE*, *crtI* y *ast* son más elevados que en la cepa silvestre al inicio del ciclo de crecimiento, mientras que

también es más elevado el nivel del gen *ast* en fase estacionaria. Estas diferencias podrían dar cuenta al menos en parte del carácter sobreproductor de la cepa atxS2.

6. BIBLIGRAFÍA

- Al-Babili, S., J. V. Lintig, H. Haubruck, y P. Beyer.** 1996. A novel, soluble form of phytoene desaturase from *Narcissus pseudonarcissus* chromoplasts is Hsp70-complexed and competent for flavinylation, membrane association and enzymatic activation. *Plant J.* **9**: 601-612.
- Alcaíno, J.** 2002. Organización estructural del gen de la fitoeno sintasa en el genoma de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex *Phaffia rhodozyma*). Tesis para optar al grado de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile.
- Alexopoulos, C. J., C. W. Mims, y M. Blackwell.** 1996. Fungal systematics. *En* Introductory Mycology. pp 61-83. John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.
- An, G-H., D. B. Schuman, y E. Johnson.** 1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 116-124.
- An, G-H. y E. A. Johnson.** 1990. Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek.* **57**: 191-203.
- An, G-H.** 1997. Photosensitization of the yeast *Phaffia rhodozyma* at a low temperature for screening carotenoid hyperproducing mutants. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **66**: 263-268.
- Andrewes, A., J. Phaff, y M. Starr.** 1976. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*. A red-pigmented fermenting yeast. *Phytochem.***15**:1003-1007.
- Armstrong, G. A.** 1994. Eubacteria show their true colors: Genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *J. Bacteriol.* **176**: 4795-4802.
- Armstrong, G. A.** 1997. Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: A colorful tale. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**: 629-659.
- Arrach, N., R. Fernández-Martín, E. Cerdá-Olmedo, y J. Avalos.** 2001. A single gene for lycopene cyclase, phytoene synthase, and regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 1687-1692.

- Arrach, N., T. J. Schmidhauser, y J. Avalos.** 2002. Mutants of the carotene cyclase domain of *al-2* from *Neurospora crassa*. *Mol. Genet. Genomics*. **266**: 914-921.
- Bailey, S. M. y C. C. Cunningham.** 2001. Contribution of mitochondria to oxidative stress associated with alcoholic liver disease. *Free Radic. Biol. Med.* **32**: 11-16.
- Ballario, P., P. Vittorioso, A. Magrelli, C. Talora, A. Cabibbo, y G. Macino.** 1996. White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *EMBO J.* **15**: 1650-1657.
- Barros, M. P., E. Pinto, P. Colepicolo, y M. Pedersén.** 2001. Astaxanthin and peridinin inhibit oxidative damage in Fe²⁺-loaded liposomes: scavenging oxyradicals or changing membrane permeability?. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **288**: 225-232.
- Bartley, G. y P. Scolnik.** 1993. cDNA cloning, expression during development, and genome mapping of *PSY2*, a second tomato gene encoding phytoene synthase. *J. Biol. Chem.* **268**: 25718-25721.
- Bartley, G. E., P. V. Viitanen, K. O. Bacot, y P. A. Scolnik.** 1992. A tomato gene expressed during fruit ripening encodes an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.* **267**: 5036-5039.
- Bertram, J. S.** 1999. Carotenoids and gene regulation. *Nutrition Rev.* **57**: 182-191.
- Bon, J. A., T. D. Leathers, y R. K. Jayaswal.** 1997. Isolation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Lett.* **19**: 109-112.
- Bonen, L., y J. Vogel.** 2001. The ins and outs of group II introns. *TIG.* **17**: 322-331.
- Boucherie, H.** 1985. Protein synthesis during transition and stationary phases under glucose limitation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **161**: 385-392.
- Boyle, J. S. y A. M. Lew.** 1995. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *TIG.* **11**: 8.
- Britton, G.** 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* **9**: 1351-1358.
- Britton, G.** 1998. Overview of carotenoid biosynthesis. *En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.), Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism.* pp 13-147. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlín.

- Calo, P. y T. González.** 1995. The yeast *Phaffia rhodozyma* as an industrial source of astaxanthin. *Microbiología Sem.* **11**: 386-388.
- Canfield, L. M., J. W. Forage, y J. Valenzuela.** 1992. Carotenoids as cellular antioxidants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **2000**: 248-254.
- Carattoli, A., N. Romano, P. Ballario, G. Morelli, y G. Macino.** 1991. The *Neurospora crassa* carotenoid biosynthetic gene (Albino 3) reveals highly conserved regions among prenyltransferases. *J. Biol. Chem.* **266**: 5854-5859.
- Centrón, D. y P. H. Roy.** 2002. Presence of a group II intron in a multiresistant *Serratia marcescens* strain that harbors three integrons and a novel gene fusion. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 1402-1409.
- Chomczynski, P. y N. Sacchi.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.
- Cifuentes, V., G. Hermosilla, C. Martínez, R. León, G. Pincheira, y A. Jiménez.** 1997. Genetics and electrophoretic karyotyping of wild-type and astaxanthin mutant strains of *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek.* **72**: 111-117.
- Corona, V., B. Aracri, G. Kosturkova, G. E. Bartley, L. Pitto, L. Giorgetti, P. Scolnik, y G. Giuliano.** 1996. Regulation of a carotenoid biosynthesis gene promoter during plant development. *Plant J.* **9**: 505-512.
- Cunningham, F. X. y E. Gantt.** 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 557-583.
- Czaplinski, K., M. J. Ruiz-Echevarria, C. I. González, y S. T. Peltz.** 1999. Should we kill the messenger?. The role of the surveillance complex in translation termination and mRNA turnover. *BioEssays.* **21**: 685-696.
- Davis, C. A., L. Grate, M. Spingola y M. Ares Jr.** 2000. Test of intron predictions reveals novel splice sites, alternatively spliced mRNAs and new introns in meiotically regulated genes of yeast. *Nucleic Acids Res.* **28**: 1700-1706
- Edge, R. y T. G. Truscott.** 1999. Carotenoid radicals and the interaction of carotenoids with active oxygen species. *En H. A. Frank, A. J. Young, G. Britton y R. G.*

Cogdell (eds.), The photochemistry of carotenoids. pp. 223-234. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.

- Entian, K-D y H-J. Schüller.** 1997. Glucose repression (carbon catabolite repression) in yeast. *En* F. K. Zimmermann y K.-D. Entian (eds.), Yeast sugar metabolism: Biochemistry, genetics, biotechnology, and applications. pp 409-434. Technomic Publishing Company, Inc., USA.
- Fang, T. J. y Y-S. Chen.** 1993. Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. *J. Ferment. Bioeng.* **75**: 446-469.
- Flores-Cotera, L. B., R. Martín, y S. Sánchez.** 2001. Citrate a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**: 341-347.
- Fraser, P. D., N. Misawa, H. Linden, S. Yamano, K. Kobayashi, y G. Sandmann.** 1992. Expression in *Escherichia coli*, purification and reactivation of the recombinant *Erwinia uredovora* phytoene desaturase. *J. Biol. Chem.* **267**: 19891-19895.
- Fraser, P. D., W. Schuch, W., y P. M. Bramley.** 2000. Phytoene synthase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) chloroplasts-partial purification and biochemical properties. *Planta.* **211**: 361-369.
- Gancedo, J.** 1998. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 334-361.
- Giuliano, G., G. E. Bartley, y P. A. Scolnik.** 1993. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *Plant Cell.* **5**: 379-387.
- Gombos, Z. y L. Vigh.** 1986. Primary role of the cytoplasmic membrane in thermal acclimation evidenced in nitrate-starved cells of the blue-green alga, *Anacystis nidulans*. *Plant Physiol.* **80**: 415-419.
- Gombos, Z., M. Kis, T. Páli, y L. Vigh.** 1987. Nitrate starvation induces homeoviscous regulation of lipids in the cell envelope of the blue-green alga, *Anacystis nidulans*. *Eur. J. Biochem.* **165**: 461-465.

- Götz, T., U. Windhövel, P. Böger, y G. Sandmann.** 1999. Protection of photosynthesis against ultraviolet-B radiation by carotenoids in transformants of cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Plant Physiol.* **120**: 599-604.
- Grünewald, K., M. Eckert, J. Hirschberg, y C. Hagen.** 2000. Phytoene desaturase is localized exclusively in the chloroplast and up-regulated at the mRNA level during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyceae). *Plant Physiol.* **122**: 1261-1268.
- Grünewald, K., J. Hirschberg, y C. Hagen.** 2001. Ketocarotenoid biosynthesis outside of plastids in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *J. Biol. Chem.* **276**: 6023-6029.
- Gruszecki, W. I.** 1999. Carotenoids in membranes. *En* H. A. Frank, A. J. Young, G. Britton y R. G. Cogdell (eds.), *The photochemistry of carotenoids*. pp 363-379. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Gu, W-L, G-H. An, y E. A. Johnson.** 1997. Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*. 1997. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 114-117.
- Harris, N. L. y P. Senapathy.** 1990. Distribution and consensus of branch point signals in eukaryotic genes: a computerized statistical analysis. *Nucl. Acids Res.* **18**: 3015-3019.
- Hausmann, A. y G. Sandmann.** 2000. A single five-step desaturase is involved in the carotenoid biosynthesis pathway to β -carotene and torulene in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* **30**: 147-153.
- Hirschberg, J.** 1998. Molecular biology of carotenoid biosynthesis. *En* G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.), *Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism*. pp 149-194. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlín.
- Hughes, D. A.** 2001. Dietary carotenoids and human immune function. *Nutrition.* **17**: 823-827.
- Johnson, E. A y M. Lewis.** 1979. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* **115**: 173-183.
- Johnson, E. A.** 1977. The yeast *Phaffia rhodozyma* as a dietary pigment source for salmonids and crustaceans. *J. Fish. Res. Board Can.* **34**: 2417-2421.

- Johnson, E. A. y W. Schroeder.** 1995. Astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Stud. Mycol.* **38**: 81-90.
- Josse, E.-M., A. J. Simkin, J. Gaffé, A.-M. Labouré, M. Kuntz, y P. Carol.** 2000. A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. *Plant Physiol.* **123**: 1427-1436.
- Jyonouchi, H., S. Sun, K. Iijima, y M. D. Gross.** 2000. Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action. *Nutr. Cancer.* **36**: 59-65.
- Kajiwara, P., P. D. Fraser, K. Kondo, y N. Misawa.** 1997. Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **324**: 421-426.
- Kal, A. J., A. J. van Zonneveld, V. Benes, M. van den Berg, M. Groot Koerkamp, K. Albermann, N. Strack, J. M. Ruijter, A. Richter, B. Dujon, W. Ansorge, y H. F. Tabak.** 1999. Dynamics of gene expression revealed by comparison of serial analysis of gene expression transcript profiles from yeast grown on two different carbon sources. *Mol. Biol. Cell.* **10**: 1859-1872.
- Krubasik, P., y G. Sandmann.** 2000a. A carotenogenic gene cluster from *Brevibacterium linens* with novel lycopene cyclase genes involved in the synthesis of aromatic carotenoids. *Mol. Gen. Genet.* **263**: 423-432.
- Krubasik, P., y G. Sandmann.** 2000b. Molecular evolution of lycopene cyclases involved in the formation of carotenoids with ionone end groups. *Biochem. Soc. Trans.* **28**: 806-810.
- Kwast, K. E., P. Burke, y R. O. Poyton.** 1998. Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen-responsive genes in yeast. *J. Exp. Biol.* **201**: 1177-1195.
- León, R.** 2000. Caracterización de determinantes genéticos de la síntesis de astaxantina en *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex *Phaffia rhodozyma*). Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias c/m en Biología. Universidad de Chile.
- Lewin, B.** 2000. Nuclear splicing. *En Genes VII.* pp. 685-711. Oxford University Press, Oxford, New York.

- Lewis, M. J., N. Ragot, M. C. Berlant, y M. Miranda.** 1990. Selection of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma* with β -ionone. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2944-2945.
- Liaaen-Jensen, S.** 1998. Carotenoids in chemosystematics. *En* G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.), *Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism*. pp 217-247. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlín.
- Linden, H. y G. Macino.** 1997. White collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. *EMBO J.* **16**: 98-109.
- Linden, H.** 1999. Carotenoid hydroxylase from *Haematococcus pluvialis*: cDNA sequence, regulation and functional complementation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1446**: 203-212.
- Lobos Camus, S., D. Seelenfreund, G. Corsini, y A. Manubens.** 1998. Técnicas experimentales en genética molecular: Manual de laboratorio, 4° ed., Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Chile.
- Lorenz, R. T. y G. R. Cysewski.** 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *TIBTECH.* **18**: 160-167.
- Mayer, M. P., P. Beyer, y H. Kleinig.** 1990. Quinone compounds are able to replace molecular oxygen as terminal electron acceptor in phytoene desaturation in chromoplasts of *Narcissus pseudonarcissus* L. *Eur. J. Biochem.* **191**: 359-363.
- Meyer, P. S. y J. C. Du Preez.** 1993. Effect of acetic acid on astaxanthin production. *Biotechnol. Lett.* **15**: 919-924.
- Meyer, P. S. y J. C. Du Preez.** 1994. Effect of culture conditions on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma* in batch and chemostat culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 780-785.
- Michel, F. y J. L. Ferat.** 1995. Structure and activities of group II introns. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 435-461.
- Miller, M. W., M. Yoneyama, y M. Soneda.** 1976. *Phaffia*, a new yeast genus in the Deuteromycotina (Blastomycetes). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**: 286-291.

- Misawa, N. y H. Shimada.** 1998. Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. *J. Biotechnol.* **59**: 169-181.
- Mitrovich, Q. M., y P. Anderson.** 2000. Unproductively spliced ribosomal protein mRNAs are natural targets of mRNA surveillance in *C. elegans*. *Genes & Dev.* **14**: 2173-2184.
- Miura, Y., K. Kondo, T. Saito, H. Shimada, P. D. Fraser, y N. Misawa.** 1998. Production of the carotenoids lycopene, β -carotene y astaxanthin in the food yeast *Candida utilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1226-1229.
- Mohr, G., P. S. Perlman, y A. M. Lambowitz.** 1993. Evolutionary relationships among group II intron-encoded proteins and identification of a conserved domain that may be related to maturase function. *Nucleic Acids Res.* **21**: 4991-4997.
- Navarro, E., V. L. Ruiz-Pérez, y S. Torres-Martínez.** 2000. Overexpression of the *crgA* gene abolishes light requirement for carotenoid biosynthesis in *Mucor circinelloides*. *Eur. J. Biochem.* **267**: 800-807.
- Ngiam, C., D. J. Jeenes, P. J. Punt, C. A. M. J. J. Van Den Hondel, y D. B. Archer.** 2000. Characterization of a foldase, protein disulfide isomerase A, in the protein secretory pathway of *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 775-782.
- Nievelstein, V., J. Vandekerckhove, M. H. Tadros, J. V. Lintig, W. Nitschke, y P. Beyer.** 1995. Carotene desaturation is linked to a respiratory redox pathway in *Narcissus pseudonarcissus* chromoplast membranes: Involvement of a 23-kDa oxygen-evolving-complex-like protein. *Eur. J. Biochem.* **233**: 864-872.
- Okada, K., T. Saito, T. Nakagawa, M. Kwamukai, y Y. Kamiya.** 2000. Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **122**: 1045-1056.
- Ouchane, S., M. Picaud, C. Vernotte, y C. Astier.** 1997. Photooxidative stress stimulates illegitimate recombination and mutability in carotenoid-less mutants of *Rubrivivax gelatinosus*. *EMBO J.* **16**: 4777-87.
- Palozza, P. y N. Krinsky.** 1992. Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Arch. Biochem. Biophys.* **297**: 291-295.

- Rabbani, S., P. Beyer, J. V. Lintig, P. Hugueney, y H. Kleinig.** 1998. Induced β -carotene synthesis driven by triacylglycerol deposition in the unicellular alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* **116**: 1239-1248.
- Retamales, P., G. Hermosilla, R. León, C. Martínez, A. Jiménez, y V. Cifuentes.** 2002. Development of the sexual reproductive cycle of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *J. Microbiol. Methods.* **48**: 87-93.
- Retamales, P., R. León, C. Martínez, G. Hermosilla, G. Pincheira, y V. Cifuentes.** 1998. Complementation analysis with new genetics markers in *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**: 229-236.
- Rock, C. D. y J. D. Zeevaart.** 1991. The *aba* mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 7496-7499.
- Ruiz-Hidalgo, M. J., E. P. Benito, G. Sandmann y A. P. Eslava.** 1997. The phytoene dehydrogenase gene of *Phycomyces*: regulation of its expression by blue light and vitamin A. *Mol. Gen. Genet.* **253**: 734-744.
- Sambroock, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sandmann, G., S. Kuhn, y P. Böger.** 1998. Evaluation of structurally different carotenoids in *Escherichia coli* transformants as protectants against UV-B radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1972-1974.
- Schmidhauser, T. J., F. R. Lauter, V. E. A. Russo, y C. Yanofsky.** 1990. Cloning, sequence, and photoregulation of *al-1*, a carotenoid biosynthetic gene of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 5064-5070.
- Schmidhauser, T. J., F. R. Lauter, M. Schumacher, W. Zhou, V. E. A. Russo y C. Yanofsky.** 1994. Characterization of *al-2*, the phytoene synthase gene of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **269**: 12060-12066.
- Schroeder, W. A. y E. A. Johnson.** 1993. Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 907-912.
- Schroeder, W. A. y E. A. Johnson.** 1995a. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *J. Biol. Chem.* **270**: 18374-18379.

- Schroeder, W. A. y E. A. Johnson.** 1995b. Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage. *J. Ind. Microbiol.* **14**: 502-517.
- Shigenaga, M. K., T. M. Hagen, y B. N. Ames.** 1994. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 10771-10778.
- Steinbrenner, J. y H. Linden.** 2001. Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Physiol.* **125**: 810-817.
- Stryer, L.** 1999. *Biochemistry.* W. H. Freeman and Company, NY.
- Summers, C., F. Karst, y A. D. Charles.** 1993. Cloning, expression and characterisation of the cDNA encoding human hepatic squalene synthase, and its relationship to phytoene synthase. *Gene.* **136**: 185-192.
- Sun, Z., F. X. Cunningham, y E. Gantt.** 1998. Differential expression of two isopentenyl pyrophosphate isomerases and enhanced carotenoid accumulation in a unicellular chlorophyte. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **95**: 11482-11488.
- Tanaka, T., T. Morishita, M. Suzui, T. Kojima, T. Okumura, y H. Mori.** 1994. Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by the naturally occurring carotenoid astaxanthin. *Carcinogenesis.* **15**: 15-19.
- van den Brink, H. J. M., R. F. M. van Gorcom, C. A. M. J. J. van den Hondel, y P. J. Punt.** 1998. Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genet. Biol.* **23**: 1-17.
- Velayos, A., A. P. Eslava, y E. A. Iturriaga.** 2000. A bifunctional enzyme with lycopene cyclase and phytoene synthase activities is encoded by the *carRP* gene of *Mucor circinelloides*. *Eur. J. Biochem.* **267**: 5509-5519.
- Verdoes, J. C., J. Wery, T. Boekhout, y A. J. J. Van Ooyen.** 1997. Molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Phaffia rhodozyma*. *Yeast.* **13**: 1231-1242.
- Verdoes, J. C., P. Krubasik, G. Sandmann, y A. J. J. van Ooyen.** 1999a. Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Mol. Gen. Genet.* **262**: 453-461.

- Verdoes, J. C., N. Misawa, y A. J. J. van Ooyen.** 1999b. Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnol. Bioeng.* **63**: 750-755.
- Vittorioso, P., A. Carattoli, P. Londei, y G. Macino.** 1994. Internal translational initiation in the mRNA from the *Neurospora crassa* albino-3 gene. *J. Biol. Chem.* **269**: 26650-26654.
- Vogel, J., T. Hübschmann, T. Börner, y W. R. Hess.** 1997. Splicing and intron-internal RNA editing of trnK-matK transcripts in barley plastids: support for matK as an essential splice factor. *J. Mol. Biol.* **270**: 179-187.
- Wery, J., M. J. M. Dalderup, J. Ter Linde, T. Boekhout, y A. J. J. Van Ooyen.** 1996. Structural and phylogenetic analysis of the actin gene from the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Yeast.* **12**: 641-651.
- Yamane, Y-I., K. Higashida, Y. Nakashimada, T. Kakizono, y N. Nishio.** 1997. Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4471-4478.
- Young, A. J. y G. M. Lowe.** 2001. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.* **385**: 20-27.