

UCH-FC
DOC-Microb.
M 321
C. 2

**“Regulación transcripcional de la ruta de biosíntesis de
astaxantina de *Xanthophyllomyces dendrorhous*”**

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

Andrés Esteban Marcoleta Caldera

junio, 2011

Director de Tesis Dr: Víctor Cifuentes



Facultad de Ciencias

Universidad de Chile

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

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

Andrés Esteban Marcoleta Caldera

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 27 de abril del 2011.

Director de Tesis:

Dr. Víctor Cifuentes G.

Comisión de Evaluación de la Tesis

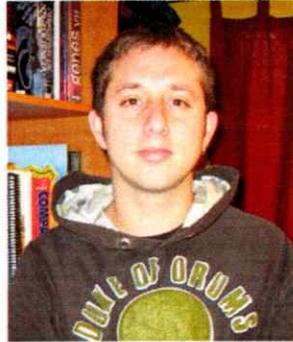
Dr. Davor Cotoras
(presidente)

Dr. Claudio Martínez

Dr. Roberto Vidal

A mis padres, a mis otros padres, a mis hermanos y a mis otros hermanos.

Autobiografía



Nací curioso el 26 de mayo de 1983, con la suerte de tener unos padres ejemplares. Gracias a su constante esfuerzo fui instruido en distintos colegios de Santiago. Fuera del colegio, en mis tiempos libres, fui aprendiendo cosas cada vez más importantes, las cuales harían crecer aún más mi curiosidad por “el mundo” en el sentido más amplio de la palabra. Lo científico, lo social, lo artístico y sobretodo lo profano. El año 2001 me matriculé en la Facultad de Ciencias de Universidad de Chile, pasando a ser ciudadano de Juan Gómez Millas. Jamás, pero jamás olvidaré todo, pero todo lo vivido allí. A pesar de diversos sinsabores degustados durante el pregrado, pero con la satisfacción de haber sido tiernamente acogido en el laboratorio de Genética, el año 2006 me matriculé en el programa de Doctorado en Ciencias de mi ya conocida Facultad de Ciencias. Sin el cariño y el apoyo de la gente del “lab” los disgustos experimentales hubiesen sido francamente insoportables. Después de largos seis años que tampoco nunca olvidaré, finalmente llega el momento de terminar esta etapa... como siempre con muchas satisfacciones bien merecidas y las infaltables decepciones que me mantienen siempre alerta, buscando avanzar. No podría hablarles de mi si no les hablara de mis cercanos, mis compañeros, mis amigos y mis hermanos. Sin duda la vida me ha dado la oportunidad de rodearme de gente maravillosa, son ellos parte de mis ideas, mi trabajo y mi creación diaria.

Quien quisiera saber más de mí ha de preguntarme en persona. Si la reunión vale la pena, sabrá donde encontrarme.

Agradecimientos

Con el tiempo la lista de personas a quien debería agradecerle cosas se hace interminable. Solo una página de agradecimientos significaría dejar fuera a muchos, y mencionar a unos pocos sería faltarle el respeto a la mayoría. Por lo anterior no me centraré en dar nombres, realmente no hace falta.

En primer lugar quisiera agradecer a quienes estuvieron directamente implicados en este trabajo, especialmente al Dr. Víctor Cifuentes quien siempre ha creído en mí y me ha apoyado desde el principio. Igualmente quiero agradecer cariñosamente a mis compañeros del laboratorio de genética en sus distintas configuraciones. Me alegra mucho haber aprendido a conocer a cada uno de ellos en mayor o menor medida y siempre haber recibido algo provechoso a cambio. Fueron siempre de verdad, en los momentos malos, que fueron varios, y en los momentos increíbles, que fueron tantos más. A menudo recuerdo y recordaré todas nuestras aventuras.

Quiero agradecer además a los profesores miembros de la comisión, quienes han realizado una gran labor corrigiendo y discutiendo conmigo este trabajo, y así ayudando a que resulte de la mejor manera posible.

Quiero agradecer también a la fundación María Ghilardi Venegas por otorgarme financiamiento en este último año de tesis. En cumplimiento del contrato sostenido con Conicyt, debo agradecer también a dicha institución por la beca de doctorado otorgada. El desarrollo experimental de esta tesis fue financiado por los proyectos Fondecyt 1100324 e Innova-Corfo 07CNI3PZT-17.

Por supuesto quiero agradecer también a mi familia, cada día más importante y más cercana. Son ellos mi ejemplo constante, mi apoyo y mi cobijo; no solo para este trabajo sino para todo.

Quiero agradecer también a mis amigos, los de todos lados y de todas mis actividades, siempre son un incentivo a continuar hacia delante, a pensarme constantemente y a ser consecuente con mis principios. Finalmente quiero agradecer a la Maca, mi amor, quien sabe lo que es lidiar a diario con mi dispersión mental y mi vida extremadamente llena de actividades, pero también con mi amor por la vida, por la naturaleza y por la infinidad de cosas que nos gusta hacer juntos.

Tabla de contenidos

Dedicatoria.....	ii
Autobiografía.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Tabla de contenidos.....	v
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tablas.....	xi
Lista de abreviaturas.....	xii
Resumen.....	xiii
Abstract.....	xv
1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes generales.....	1
1.2 Carotenoides: generalidades.....	3
1.3 Astaxantina, un carotenoide con gran interés comercial.....	6
1.3.1 Propiedades generales.....	6
1.3.2 Astaxantina en la industria de la acuicultura.....	6
1.3.3 Propiedades antioxidantes y beneficiosas sobre la salud humana.....	7
1.4 <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> , una levadura carotenogénica.....	8
1.4.1 Aspectos biológicos generales.....	8
1.4.2 Metabolismo del carbono y biosíntesis de pigmentos.....	10
1.4.3 Biosíntesis de carotenoides en <i>X. dendrorhous</i>	14
1.4.4 Regulación de la ruta de biosíntesis de carotenoides en <i>X. dendrorhous</i>	16
1.5 Hipótesis.....	18

1.6 Objetivo general.....	19
1.7 Objetivos específicos.....	19
2. Materiales y métodos.....	20
2.1 Cepas y condiciones de cultivo.....	20
2.2 Determinación de crecimiento celular y cantidad de biomasa.....	20
2.3 PCR, clonamiento y otros procedimientos rutinarios de biología molecular.....	21
2.4 Extracción de DNA genómico de <i>X. dendrorhous</i>	21
2.5 Extracción de RNA de <i>X. dendrorhous</i> y síntesis de cDNA de hebra simple.....	22
2.6 RT-PCR cuantitativo.....	23
2.7 Ensayos de Northern blot.....	23
2.8 Preparación de sondas para hibridación.....	27
2.9 Secuenciación de DNA.....	28
2.10 Preparación de extractos nucleares de <i>X. dendrorhous</i>	28
2.11 Ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)	29
2.12 Preparación de fragmentos de DNA marcado para ensayos de cambio en la movilidad electroforética.....	30
2.12.1 Preparación y Marcaje de fragmentos de DNA del promotor del gen <i>crtS</i>	30
2.12.2 Preparación y marcaje de oligonucleótidos que forman los sitios Mig1 del promotor del gen <i>crtS</i>	31
2.13 Extracción y Análisis de pigmentos.....	31
2.14 Cuantificación de glucosa en el medio extracelular.....	32
2.15 Predicción de posibles sitios de unión de factores de transcripción en regiones promotoras.....	33
2.16 Predicción de ORFs, búsqueda de genes homólogos y alineamiento múltiple de secuencias.....	33

3. Resultados.....	34
3.1 Estudio de la expresión de los genes de carotenogénesis de <i>X. dendrorhous</i> durante el crecimiento en medio completo suplementado con glucosa.....	34
3.1.1 Estandarización del protocolo de medición de expresión relativa por RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR).....	34
3.1.2 Estudios de expresión en la cepa silvestre UCD 67-385.....	37
3.1.3 Estudios de expresión en cepas mutantes incapaces de producir astaxantina.....	42
3.2 Efecto de la glucosa sobre la expresión génica en <i>X. dendrorhous</i>	46
3.2.1 Obtención y caracterización de genes que puedan ser utilizados como controles de represión e inducción por glucosa.....	46
3.2.1.1 Glucose repressible gene (<i>grg2</i>).....	46
3.2.1.2 Gen que codifica para la enzima Piruvato decarboxilasa (<i>PDC</i>).....	49
3.2.2 Efecto de la glucosa sobre la expresión de genes relacionados con la carotenogénesis en <i>X. dendrorhous</i> : ensayos de northern blot.....	51
3.2.3 Estudio del efecto de la glucosa sobre la expresión de genes de carotenogénesis en <i>X. dendrorhous</i> mediante qRT-PCR.....	57
3.2.3.1 Estudios en la cepa silvestre UCD 67-385.....	57
3.2.3.2 Efecto de glucosa sobre la expresión de los genes de carotenogénesis en cepas mutantes de la ruta de biosíntesis de astaxantina.....	68
3.3 Efecto del etanol sobre la expresión de los genes de carotenogénesis en <i>X. dendrorhous</i>	72
3.4 Efecto de la glucosa y el etanol sobre la síntesis de pigmentos en <i>X. dendrorhous</i>	74
3.5 Caracterización de las regiones promotoras de los genes de carotenogénesis reprimidos por glucosa.....	78
3.5.1. Predicción bioinformática de posibles elementos reguladores.....	78
3.5.2. Estudios de unión DNA-proteína en el promotor del gen <i>crtS</i>	84

3.6 Clonamiento y caracterización de un posible homólogo al gen Mig1 de <i>S. cerevisiae</i> en <i>X. dendrorhous</i>	89
4. Discusión.....	96
4.1 Expresión de los genes de carotenogénesis durante el crecimiento en glucosa en la cepa silvestre y en cepas mutantes de la ruta de biosíntesis de astaxantina.....	96
4.2 Influencia de la fuente de carbono en la regulación transcripcional de la síntesis de carotenoides en <i>X. dendrorhous</i> : efecto de la glucosa y el etanol....	97
4.3 Efecto de la glucosa y el etanol sobre la síntesis de pigmentos.....	103
4.4 Caracterización de las regiones promotoras de los genes de carotenogénesis reprimidos por glucosa.....	105
4.5 Caracterización de un posible homólogo al regulador Mig1 de <i>X. dendrorhous</i> y su potencial rol en la síntesis de pigmentos.....	107
5. Conclusiones.....	110
6. Referencias.....	112

Lista de Figuras

Figura 1. Estructura química de algunos carotenoides.....	4
Figura 2. Metabolismo del carbono y biosíntesis de carotenoides en <i>X. dendrorhous</i>	12
Figura 3. Biosíntesis de astaxantina a partir de IPP en <i>X. dendrorhous</i>	15
Figura 4. Curvas de calibración de los partidores utilizados para la determinación de la expresión relativa de los genes de carotenogénesis mediante qRT-PCR.....	36
Figura 5. Crecimiento de <i>X. dendrorhous</i> (cepa silvestre) en medio completo suplementado con glucosa.....	38
Figura 6. Cinética de expresión de los genes de carotenogénesis y de síntesis de precursores a lo largo del crecimiento de <i>X. dendrorhous</i> (cepa silvestre) en medio completo con glucosa.....	40
Figura 7. Crecimiento de cepas mutantes de <i>X. dendrorhous</i> incapaces de sintetizar astaxantina en medio completo suplementado con glucosa.....	43
Figura 8. Cinética de expresión de los genes de carotenogénesis en cepas de <i>X. dendrorhous</i> incapaces de producir astaxantina.....	44
Figura 9. Caracterización estructural del gen <i>grg2</i> de <i>X. dendrorhous</i> (cepa UCD 67-385).....	48
Figura 10. Caracterización estructural del gen <i>PDC</i> de <i>X. dendrorhous</i>	50
Figura 11. Evaluación por <i>northern blot</i> del efecto de la glucosa sobre la expresión del gen <i>grg2</i>	52
Figura 12. Evaluación por <i>northern blot</i> del efecto de la glucosa sobre la expresión del gen <i>PDC</i>	53
Figura 13. Evaluación por <i>northern blot</i> del efecto de la glucosa sobre la expresión del gen <i>crtS</i>	54
Figura 14. Curvas de calibración de los partidores utilizados para la determinación de la expresión relativa de los genes control mediante qRT-PCR.....	59
Figura 15. Determinación por qRT-PCR del efecto de la glucosa sobre la expresión de los genes <i>grg2</i> y <i>PDC</i>	60

Figura 16. Determinación por qRT-PCR del efecto de la glucosa sobre la expresión de genes relacionados con la carotenogénesis en <i>X. dendrorhous</i>	62
Figura 17. Cuantificación de la glucosa remanente en el medio extracelular en los experimentos de dosis-respuesta a glucosa.....	64
Figura 18. Efecto de la concentración de glucosa sobre la respuesta transcripcional causada por este agente en los genes <i>grg2</i> , <i>PDC</i> , <i>idi</i> y <i>FPS</i>	66
Figura 19. Efecto de la concentración de glucosa sobre la respuesta transcripcional causada por este agente en los genes de carotenogénesis.....	67
Figura 20. Efecto de la glucosa sobre la expresión de los genes <i>grg2</i> , <i>PDC</i> , <i>idi</i> y <i>FPS</i> en cepas de <i>X. dendrorhous</i> incapaces de sintetizar astaxantina.....	70
Figura 21. Efecto de la glucosa sobre la expresión de los genes de carotenogénesis en cepas de <i>X. dendrorhous</i> incapaces de sintetizar astaxantina.....	71
Figura 22. Efecto del etanol sobre la expresión de los genes <i>idi</i> , <i>FPS</i> , <i>crtE</i> , <i>crtYB</i> , <i>crtI</i> y <i>crtS</i> de <i>X. dendrorhous</i>	73
Figura 23. Efecto de la glucosa y el etanol sobre la producción de carotenoides en <i>X. dendrorhous</i>	76
Figura 24. Potenciales sitios de unión al regulador Mig1 presentes en genes reprimidos por glucosa de <i>X. dendrorhous</i>	80
Figura 25. Alineamiento de las regiones promotoras de los genes <i>crtE</i> , <i>crtYB</i> , <i>crtI</i> y <i>crtS</i>	82
Figura 26. Ensayos de unión DNA-proteína en el promotor del gen <i>crtS</i>	86
Figura 27. Caracterización estructural del gen Mig1 de <i>X. dendrorhous</i>	91
Figura 28. Dominios conservados de la proteína Mig1 de <i>X. dendrorhous</i>	94

Lista de Tablas

Tabla I. Partidores usados en este trabajo.....	24
Tabla II. Contenido de GC de las zonas adyacentes a los potenciales sitios Mig1 presentes en promotores de genes regulados por glucosa de <i>X. dendrorhous</i>	83

Lista de Abreviaturas

DO₆₀₀: Densidad óptica a 600 nanómetros

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

pb: Pares de bases

Kb: Kilopares de bases

LB: Luria Bertani

ORF: Marco de lectura abierto

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SSC: Citrato de sodio salino

STM: Sacarosa, Tris, Magnesio

SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida denaturantes

TAE: Tris, acetato, EDTA

Tris: 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol

UFC: Unidades formadoras de colonias

UV: Ultravioleta

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

YM: Extracto de levadura y extracto de malta

RESUMEN

X. dendrorhous es una levadura con la capacidad de sintetizar astaxantina a partir de la metabolización de diversos azúcares. La astaxantina es un compuesto carotenoide que posee un gran interés comercial, debido a que es el ingrediente alimentario de mayor costo en la industria de la salmonicultura, además de poseer múltiples efectos beneficiosos sobre la salud humana. Distintos esfuerzos e investigaciones han procurado aumentar el rendimiento carotenogénico de esta levadura, de modo que constituya una fuente natural de astaxantina económicamente atractiva. Sin embargo, dichos esfuerzos han sido dificultados por los escasos conocimientos que se tienen tanto sobre aspectos biológicos básicos de esta levadura como sobre los mecanismos que subyacen la regulación de la biosíntesis de carotenoides. Al respecto, estudios previos han mostrado una asociación entre la síntesis de pigmentos y la fuente de carbono presente en el medio, aunque no se ha podido establecer la naturaleza molecular de dicho fenómeno.

En este trabajo se estudió el efecto de la fuente de carbono sobre la expresión de los genes involucrados en la síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*. De esta manera se determinó que la glucosa inhibe completamente la síntesis *de novo* de pigmentos, reprimiendo de forma paralela la expresión de los genes *crtE*, *crtYB*, *crtI* y *crtS*, responsables de la síntesis de astaxantina a partir de GGPP. Dicha respuesta resultó ser dependiente de la normal síntesis de pigmentos, dado que no fue observada en cepas mutantes incapaces de sintetizar astaxantina. Adicionalmente, se clonó y caracterizó un homólogo al represor catabólico Mlg1 de *S. cerevisiae*, y se aportaron

evidencias que apoyan la participación de dicho factor en la regulación por glucosa de la síntesis de pigmentos en *X. dendrorhous*. Por otra parte, se determinó que el etanol posee un efecto inductor de la síntesis de pigmentos, el cual se correlaciona con un aumento en los niveles de expresión de los genes *crtYB* y *crtS*. El presente trabajo constituye el primer reporte donde se demuestra la regulación transcripcional de la ruta de biosíntesis de astaxantina en esta levadura, y su asociación con la fuente de carbono presente en el medio.

ABSTRACT

X. dendrorhous is a yeast with the ability to synthesize astaxanthin from the metabolization of several sugars. Astaxanthin is a carotenoid pigment with a strong commercial interest, because it is the most expensive food ingredient in the salmoniculture industry, and has multiple beneficial effects on human health. Several efforts have been made to improve the carotenogenic yield of this yeast, in way to develop an economically attractive source of natural astaxanthin. However, these efforts have been hampered by a poor knowledge of the yeast biology and the regulation of carotenoid biosynthesis. In this regard, previous studies had shown a correlation between the pigment production and the carbon source in the growth medium. Nevertheless, no molecular explanation has been established for such phenomenon.

In this work we studied the effect of the carbon source on the expression of most of the genes involved in the carotenoid biosynthesis in *X. dendrorhous*. Thus, we determined that glucose inhibits *de novo* synthesis of pigments decreasing the mRNA levels of *crtE*, *crtYB*, *crtI* and *crtS* genes, which are responsible of the astaxantin synthesis from GGPP. Such transcriptional response was dependent on the normal pigment synthesis, since it was completely altered in mutant strains unable to produce astaxanthin. Additionally, we cloned and characterized a potential homolog of the Mig1 catabolic repressor described in *S. cerevisiae*, and provided evidence supporting the participation of this factor in the glucose regulation of the carotenoid biosynthesis in *X. dendrorhous*. On the other hand, we showed that ethanol acts inducing the pigment biosynthesis, which correlates with an increase of *crtYB* and *crtS* gene expression. Importantly, this is

the first study that demonstrates the transcriptional regulation of the biosynthetic pathway of astaxanthin in the yeast, and its association with the carbon source in the culture medium.

1. INTRODUCCION

1.1 Antecedentes generales.

Xanthophyllomyces dendrorhous (ex *Phaffia rhodozyma*) es una levadura basidiomicete inicialmente aislada a partir de exudados de árboles caducifolios en regiones montañosas de Japón y Alaska, por Herman Jan Phaff y colaboradores a fines de la década del 60 (Phaff y col. 1972). Esta levadura posee la particular capacidad de producir compuestos carotenoides a partir de la fermentación de diversos azúcares, siendo el principal el pigmento de color rojo-anaranjado denominado astaxantina (Andrewes y Starr 1976). La astaxantina es un carotenoide natural producido por un limitado número de especies de microalgas, bacterias marinas y hongos (Johnson y Schroeder 1996). Este pigmento posee un particular interés comercial dado que es uno de los principales aditivos alimentarios utilizados en la industria de la salmonicultura, además de presentar diversos efectos beneficiosos sobre la salud humana (Palozza y Krinsky 1992; Iwamoto y col. 2000; Guerin y col. 2003; Hussein y col. 2006). Tradicionalmente la producción de astaxantina se ha efectuado por síntesis química. Sin embargo, además de la desventaja de su alto costo, tanto los consumidores como las autoridades sanitarias coinciden en evitar aditivos químicos en alimentos, por lo que se ha incentivado la investigación en el desarrollo de alternativas biológicas para la producción del pigmento. Los organismos que han mostrado un mayor atractivo para la producción industrial de astaxantina son *X. dendrorhous* (Andrewes y Starr 1976; Bjerkeng 2007) y la microalga *Haematococcus pluvialis* (Lorenz y Cysewski 2000; Garcia-Malea y col. 2009), los cuales se encuentran en diferentes etapas de desarrollo comercial.

Las principales limitaciones para la producción industrial de pigmentos a partir de sistemas biológicos suelen ser el bajo rendimiento de cepas silvestres y de la mayoría de sus cepas mutantes, además de costosos métodos de extracción y purificación del metabolito de interés (An y col. 1991; Canizares-Villanueva y col. 1998). A la fecha, se han utilizado variadas aproximaciones para aumentar el rendimiento carotenogénico de *X. dendrorhous*, incluyendo la optimización de metodologías de fermentación (Vazquez y Martin 1998; Flores-Cotera y col. 2001; Lu y col. 2008), mutagénesis y selección de sobre-productores (An y col. 1989; An y col. 1991; Ukibe y col. 2008; Baeza y col. 2009), y elementos de ingeniería metabólica-genética (Misawa y Shimada 1997; Verdoes y col. 2003). Sin embargo, estos esfuerzos se han visto dificultados por el escaso conocimiento que se tenía hasta hace unos años sobre aspectos biológicos y genéticos del microorganismo. Investigaciones relativamente recientes han permitido establecer, entre otras cosas, la composición cromosómica de cepas silvestres y mutantes (Adrio y col. 1995; Cifuentes y col. 1997), la identificación de los genes que participan en la biosíntesis de astaxantina (Verdoes y col. 1999; Verdoes y col. 1999; Alvarez y col. 2006; Alcaino y col. 2008; Niklitschek y col. 2008), el hallazgo de procesamiento alternativo de los mRNAs de al menos dos de estos genes (Lodato y col. 2003), y el desarrollo de sistemas relativamente eficientes de transformación genética y mutación sitio-dirigida para esta levadura (Wery y col. 1997; Martinez y col. 1998; Niklitschek y col. 2008).

A pesar de los avances en el estudio de *X. dendrorhous*, aún siguen siendo insuficientes los conocimientos que se tienen sobre los mecanismos de regulación de la ruta de biosíntesis de astaxantina. El entendimiento de dichos mecanismos resulta indispensable para diseñar estrategias racionales de optimización de la producción de

astaxantina en dicha levadura. El presente trabajo tuvo como objetivo principal aportar nuevos antecedentes respecto a los procesos regulatorios que controlan la biosíntesis de carotenoides en *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

1.2 Carotenoides: generalidades.

Los carotenoides son un grupo de pigmentos ampliamente distribuidos en la naturaleza y que pueden encontrarse casi en todas las formas de vida. Sin embargo, sólo algunos organismos son capaces de sintetizarlos naturalmente, entre los que se encuentran algunas plantas, bacterias, algas, hongos filamentosos y levaduras (Frengova y Beshkova 2009).

La gran mayoría de los carotenoides poseen una estructura de 40 átomos de carbono derivada del isopentenil pirofosfato (IPP), con una larga cadena de dobles enlaces conjugados que le otorgan sus propiedades como cromóforos (Figura 1a). Esta estructura básica puede ser modificada ya sea por la formación de ciclos en uno o ambos extremos, el cambio en el nivel de saturación, o bien por la adición de grupos funcionales oxigenados (Britton 1995). Aquellos carotenoides que poseen uno o más átomos de oxígeno en su estructura se denominan xantófilas.

Debido al isomerismo en torno a los dobles enlaces C=C, los carotenoides pueden existir en distintas configuraciones. Éstas constituyen distintas estructuras moleculares que pueden ser aisladas como compuestos separados. En principio, cada doble enlace de la cadena hidrocarbonada puede existir en dos configuraciones denominadas *cis* o *trans*. Esto da origen a un enorme número teórico de isómeros, aunque en realidad naturalmente se encuentran algunos pocos de ellos. Normalmente la presencia de un doble enlace en configuración *cis* origina un gran impedimento estérico entre átomos

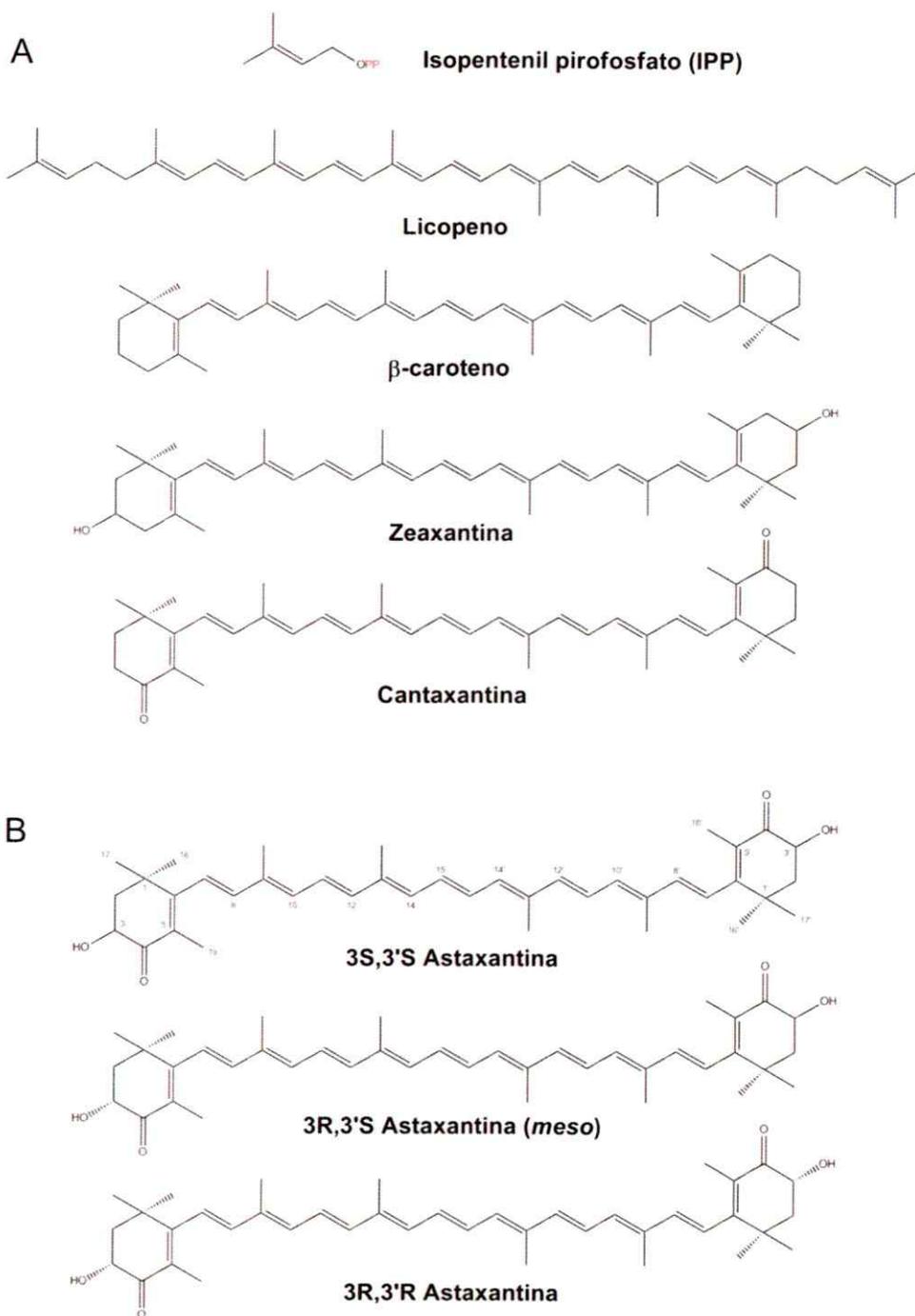


Figura 1. Estructura química de algunos carotenoides. (A) Se presenta la estructura química de distintos carotenoides y del isopentenil pirofosfato (IPP), su unidad estructural básica. (B) Principales isómeros de la astaxantina.

de hidrógeno o grupos metilo adyacentes, por lo que en general los isómeros *cis* son menos estables termodinámicamente que los isómeros *trans*. De esta manera, la mayoría de los carotenoides encontrados en la naturaleza son de la forma *all-trans*, es decir, con todos sus dobles enlaces en configuración *trans*. Debido a su estructura, los carotenoides son moléculas bastante hidrofóbicas con una muy baja o nula solubilidad en agua. Por esto, comúnmente se encuentran en áreas hidrofóbicas de las células como las membranas lipídicas, o bien asociadas a proteínas que permiten su acceso a ambientes acuosos. Evidentemente, la presencia de grupos funcionales polares altera sus propiedades de solubilidad y de interacción con otras moléculas.

Desde el punto de vista funcional, los carotenoides son mucho más que otro grupo de pigmentos naturales. Son de hecho sustancias con propiedades muy especiales que no poseen otros grupos de compuestos, y que son la base de sus diversas funciones en todos los dominios de la vida. Entre estas últimas podemos mencionar, por ejemplo, su rol ancestral como componentes esenciales de organismos fotosintéticos. Sin los carotenoides, la fotosíntesis y toda la vida en la atmósfera de oxígeno sería imposible (Britton 1995; Frengova y Beshkova 2009). Estos pigmentos además poseen diversas propiedades antioxidantes, son precursores de la vitamina A, dan coloración a gran cantidad de organismos y están implicados en la prevención o protección contra enfermedades humanas graves como el cáncer y los trastornos coronarios, entre otras (Rao y Rao 2007; Frengova y Beshkova 2009). Por lo anterior, estas sustancias poseen una gran relevancia biológica.

1.3 Astaxantina, un carotenoide con gran interés comercial.

1.3.1 Propiedades generales.

La astaxantina es un carotenoide que pertenece al grupo de las xantófilas, y posee la denominación semisistemática 3,3'-dihidroxi- β,β' -caroteno-4,4'-diona (Figura 1b). Se encuentra estrechamente relacionada al β -caroteno, la luteína y la zeaxantina, compartiendo con ellos muchas de las funciones metabólicas y fisiológicas atribuidas a los carotenoides. Adicionalmente, su estructura molecular le otorga propiedades químicas únicas. La presencia de grupos hidroxilo (OH) y ceto (C=O) en cada anillo terminal le confieren la capacidad de ser esterificada, una gran actividad antioxidante y una naturaleza más polar que el resto de los carotenoides. En su forma libre es considerablemente inestable y particularmente susceptible a la oxidación. Debido a esto, en la naturaleza se encuentra ya sea conjugada con proteínas (como en el músculo del salmón o en el exoesqueleto de la langosta) o esterificada por una o dos cadenas de ácidos grasos, las cuales estabilizan la molécula (Higuera-Ciapara y col. 2006). Además de la existencia de isómeros geométricos *cis* o *trans*, la astaxantina presenta 3 isómeros configuracionales: dos enantiómeros (3R, 3'R y 3S, 3'S) y una forma meso (3R, 3'S), producto de la existencia de dos centros quirales en los carbonos 3 y 3' (Higuera-Ciapara y col. 2006) (Figura 1b). De todos estos isómeros, el más abundante en la naturaleza es el 3S, 3'S.

1.3.2 Astaxantina en la industria de la acuicultura.

La astaxantina corresponde al principal carotenoide presente en la mayoría de los crustáceos y salmónidos, siendo el responsable de su pigmentación roja-anaranjada característica. Dicha coloración es percibida como un indicativo clave de calidad por

parte de los consumidores, por lo que es un atributo que es materia de preocupación en la producción industrial de este tipo de alimentos marinos. En el ambiente acuático, la astaxantina es sintetizada principalmente por microalgas, la cual es consumida por el zooplancton, insectos o crustáceos, y posteriormente es ingerida por los peces, quienes la acumulan en su musculatura adquiriendo su color natural (Lorenz 1998). Sin embargo, los peces y crustáceos criados en cautiverio no tienen acceso a fuentes naturales de astaxantina, por lo que ésta última debe ser añadida como aditivo en su programa de alimentación. De hecho, la astaxantina constituye uno de los ingredientes alimentarios de mayor costo en la industria de la acuicultura, y actualmente no sólo es usada por sus propiedades como pigmento, sino además como un nutriente necesario para el adecuado crecimiento y reproducción de estas especies de interés económico (Higuera-Ciapara y col. 2006).

1.3.3 Propiedades antioxidantes y beneficiosas sobre la salud humana.

La energía requerida por las células de organismos aeróbicos es generada mediante múltiples reacciones oxidativas, las cuales originan una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS). Dichas especies pueden reaccionar con distintos componentes celulares como proteínas, lípidos, carbohidratos y DNA, causando lo que se conoce como estrés oxidativo (Di Mascio y col. 1991). Dicho estrés ha sido relacionado con una serie de enfermedades tales como retinopatías, carcinogénesis, arteriosclerosis, Alzheimer y enfermedades cardiovasculares (Hussein y col. 2006). Con el objetivo de controlar el daño oxidativo, las células generan sus propios antioxidantes, que pueden ser enzimas como la superóxido dismutasa o la catalasa, o bien otros compuestos de naturaleza no proteica. Un antioxidante es una molécula que

posee la habilidad de remover ROS de un sistema, ya sea reaccionando con ellos dando origen a compuestos inocuos, o bien interfiriendo en las reacciones de oxidación (Britton 1995). Recientemente se ha demostrado que la astaxantina posee una actividad antioxidante hasta 10 veces mayor que otros carotenoides como la zeaxantina, luteína, cantaxantina y β -caroteno; y 100 veces mayor que la del α -tocoferol (Higuera-Ciapara y col. 2006). Diversos estudios han relacionado la gran actividad antioxidante de la astaxantina con variados efectos beneficiosos sobre la salud humana. Estos incluyen un efecto anticancerígeno, propiedades antiinflamatorias e inmunoestimulantes, efectos beneficiosos sobre la salud cardiovascular y propiedades neuroprotectoras, entre otros (Higuera-Ciapara y col. 2006; Hussein y col. 2006; Pashkow y col. 2008). Lo anterior ha provocado un incremento explosivo de la demanda de astaxantina por parte de la industria nutracéutica.

1.4 *Xanthophyllomyces dendrorhous*, una levadura carotenogénica.

1.4.1 Aspectos biológicos generales.

Xanthophyllomyces dendrorhous es una levadura perteneciente al grupo de los basidiomicetes que fue aislada originalmente desde regiones bastante acotadas del hemisferio norte (Johnson 2003). Sin embargo, recientemente se han obtenido aislados procedentes de distintos puntos de la Patagonia argentina (Libkind y col. 2007) y del sur de Chile (Weber y col. 2008). Esta levadura ha sido objeto de un gran interés biotecnológico debido a su capacidad de sintetizar astaxantina, lo que ha motivado el desarrollo de diversas investigaciones sobre su biología y su desarrollo como un microorganismo industrial para la producción del pigmento.

Debido a que el hábitat natural de *X. dendrorhous* suele ser exudados de árboles caducifolios ricos en sustancias antifúngicas y especies reactivas de oxígeno, se cree que la principal función de los pigmentos producidos por esta levadura es otorgarle protección contra dichos agentes. Esta hipótesis es avalada por evidencia experimental que muestra que cepas mutantes incapaces de sintetizar astaxantina presentan un crecimiento menor que las silvestres en medios que contienen ROS (Schroeder y Johnson 1995). Otras evidencias sugieren que los pigmentos podrían compensar la inusualmente baja actividad catalasa medida en *X. dendrorhous*, además de la carencia de algunas clases de superóxido dismutasas presentes en la mayoría de las levaduras (Schroeder y Johnson 1993; Johnson 2003).

El desarrollo de *X. dendrorhous* como fuente natural de astaxantina se ha visto dificultado por el bajo rendimiento carotenogénico de las cepas silvestres. Diversas aproximaciones se han utilizado para mejorar la producción. Una de ellas ha sido la obtención de cepas sobreproductoras por tratamiento con mutágenos químicos o físicos (An y col. 1989; Lewis y col. 1990; An 1997; Retamales y col. 1998). Sin embargo, 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). Otra aproximación ha sido la optimización de las condiciones de cultivo, donde se ha determinado el efecto sobre la producción de pigmentos del pH del cultivo (Johnson y Lewis 1979; Hu y col. 2006), la fuente de carbono y nitrógeno (Johnson y Lewis 1979; Yamane y col. 1997; Flores-Cotera y col. 2001; Hu y col. 2005), aireación y transferencia de oxígeno (Johnson y Lewis 1979; Yamane y col. 1997; Liu y Wu 2006), además del efecto de la luz (Johnson y Lewis

1979; An y Johnson 1990). Si bien estos estudios han sido una gran contribución al entendimiento de la biología de la levadura, no han resultado completamente satisfactorios desde el punto de vista productivo.

La identificación y caracterización de los genes que codifican para las enzimas que participan en la biosíntesis de astaxantina, junto con el desarrollo de métodos de mutación sitio-dirigida (Niklitschek y col. 2008), han permitido el desarrollo de nuevas aproximaciones para la mejora del rendimiento carotenogénico de *X. dendrorhous* basadas en elementos de ingeniería genética y metabólica (Misawa y Shimada 1997; Verdoes y col. 2003). Sin embargo, la falta de estrategias eficientes de expresión génica además del escaso conocimiento sobre los mecanismos regulatorios que controlan la síntesis de pigmentos, han limitado enormemente el éxito de dichas aproximaciones. Por lo anterior, resulta de gran importancia dirigir los esfuerzos a entender los mecanismos regulatorios que subyacen la biosíntesis de pigmentos en esta levadura.

1.4.2 Metabolismo del carbono y biosíntesis de pigmentos.

X. dendrorhous es capaz de crecer en diversas fuentes de carbono, entre las cuales se encuentran glucosa, sacarosa, maltosa, xilosa, almidón, succinato, glicerol y etanol (Vazquez y col. 1997; Neubohn y col. 2000; Johnson 2003; Marin y col. 2006). De hecho, *X. dendrorhous* es la única especie de levaduras carotenogénicas capaz de fermentar azúcares eficientemente. Todo el resto de levaduras carotenogénicas conocidas poseen un metabolismo estrictamente aeróbico. Diversos estudios han mostrado que existe una relación directa entre la fuente de carbono utilizada por la levadura y la biosíntesis de carotenoides. Este efecto se observa tanto en la cantidad

de pigmentos totales como en su composición, es decir, la cantidad relativa de astaxantina y los distintos intermediarios que se producen en la ruta de carotenogénesis (Vazquez y col. 1997; Flores-Cotera y col. 2001; Johnson 2003; Wozniak y col. 2011).

Dependiendo de la fuente de carbono disponible en el medio, *X. dendrorhous* al igual que otras levaduras aerobias, es capaz de llevar a cabo básicamente dos tipos de metabolismos. Una de las alternativas consiste en la oxidación de azúcares como glucosa u otras, que son finalmente convertidas en esta última a través de la vía glicolítica. Como producto de la glicólisis se obtiene principalmente piruvato, el que luego de una reacción de decarboxilación y reducción mediada por NADH, es convertido en etanol (Jones y col. 1992; Gancedo 1998). La producción de etanol permite la síntesis de ATP por medio de fosforilación a nivel de sustrato (de manera independiente de oxígeno) y la regeneración del NAD⁺ convertido en NADH durante la glicólisis. A este conjunto de procesos que comprenden la oxidación glicolítica seguida por fermentación alcohólica se les denomina de manera genérica *metabolismo fermentativo* (Figura 2).

Por otra parte, fuentes de carbono no fermentables tales como succinato y etanol no son sustrato de la vía glicolítica y son incorporadas al metabolismo a nivel del ciclo de Krebs. A pesar que luego de múltiples reacciones el producto final obtenido a partir de este tipo de fuentes de carbono también es piruvato; por mecanismos regulatorios aún en parte desconocidos, este último es destinado mayoritariamente a la formación de acetil CoA y no a la producción de etanol. La acetil CoA producida es luego distribuida entre el ciclo de Krebs (que permite la generación del poder reductor requerido para la

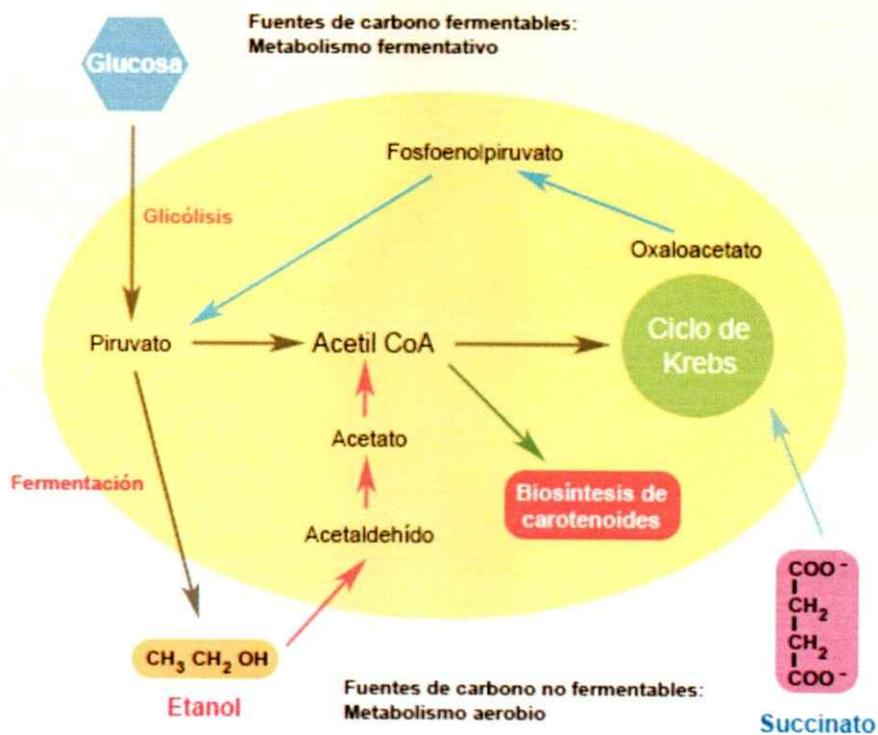


Figura 2. Metabolismo del carbono y biosíntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*. Representación esquemática de la asimilación de distintas fuentes de carbono (fermentables y no fermentables) en la levadura.

síntesis de ATP por fosforilación oxidativa), y las enzimas que sintetizan los precursores necesarios para la carotenogénesis. La asimilación del carbono mediada por los procesos anteriormente descritos recibe el nombre de *metabolismo aerobio o no fermentativo* (Figura 2) (Jones y col. 1992; Gancedo 1998). Cabe destacar que lo anteriormente descrito corresponde a conocimientos obtenidos de estudios en otras levaduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, y son extrapolados a *X. dendrorhous* en base a observaciones experimentales.

Un caso particular ocurre cuando *X. dendrorhous* es crecida en glucosa como única fuente de carbono. En estas condiciones, la levadura comienza a consumir el azúcar por medio de los procesos del metabolismo fermentativo, que culminan con la producción de etanol y su paulatina acumulación en el medio. Una vez que la glucosa se ha agotado, ocurre un cambio metabólico y comienza el consumo del etanol anteriormente producido, dando paso al metabolismo no fermentativo (Lodato y col. 2004). Estudios realizados en nuestro laboratorio indican que el agotamiento de la glucosa y el comienzo del consumo de etanol coinciden con un aumento abrupto en la síntesis de carotenoides (Lodato y col. 2007). Este momento del crecimiento de *X. dendrorhous* en glucosa recibe el nombre de *fase de inducción de la carotenogénesis*, la que coincide con la entrada del cultivo en fase estacionaria. Bastante distinta es la situación observada cuando se utiliza succinato como única fuente de carbono. Bajo dichas condiciones, la biosíntesis de pigmentos es constante a lo largo del tiempo y comienza en etapas tempranas del cultivo, no observándose la fase de inducción (Wozniak y col. 2011). Las evidencias anteriormente mencionadas sugieren la existencia de mecanismos regulatorios de la biosíntesis de carotenoides, de alguna manera relacionados con la transición entre el metabolismo fermentativo y el aerobio.

1.4.3 Biosíntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*.

La biosíntesis de carotenoides requiere, como sustrato principal, isopentenil pirofosfato (IPP), el cual en hongos es sintetizado a partir de acetil-CoA en una serie de pasos denominados *via del mevalonato* (Sandmann 2001). En una etapa intermedia, previa a la ruta de carotenogénesis, el IPP es susceptible de ser convertido en su isómero activo dimetilalil pirofosfato (DMAPP), por la enzima Isopentenil pirofosfato isomerasa, producto del gen *idi* descrito en *X. dendrorhous* (Kajiwara y col. 1997) (Figura 3). Luego, se lleva a cabo la condensación de una molécula de IPP con otra de DMAPP originando geranil pirofosfato, el que luego de la sucesiva adición de dos moléculas de IPP forma geranilgeranil pirofosfato (GGPP). La producción de GGPP a partir de IPP y DMAPP es catalizada por la geranilgeranil pirofosfato sintasa, producto del gen *crtE* de *X. dendrorhous* (Niklitschek y col. 2008), aunque recientemente en nuestro laboratorio fue descrito un gen *FPS* que codifica para una posible farnesil pirofosfato sintasa que podría estar involucrada en este paso (Romero 2010).

En *X. dendrorhous*, la biosíntesis de carotenoides propiamente tal comienza con la condensación de dos moléculas de GGPP para dar origen a una molécula de *cis*-fitoeno; en una reacción catalizada por la actividad fitoeno sintasa de la enzima bifuncional Fitoeno/ β -caroteno sintasa, producto del gen *crtYB* (Verdoes y col. 1999) (Figura 3). El siguiente paso involucra 4 reacciones de desaturación (formación de dobles enlaces C-C) catalizadas por la enzima fitoeno desaturasa (producto del gen *crtI*), las que conducen a la formación de licopeno (Verdoes y col. 1999). El licopeno es posteriormente convertido en β -caroteno por la actividad licopeno ciclasa del producto del gen *crtYB* (Verdoes y col. 1999). Finalmente, luego de dos hidroxilaciones y dos

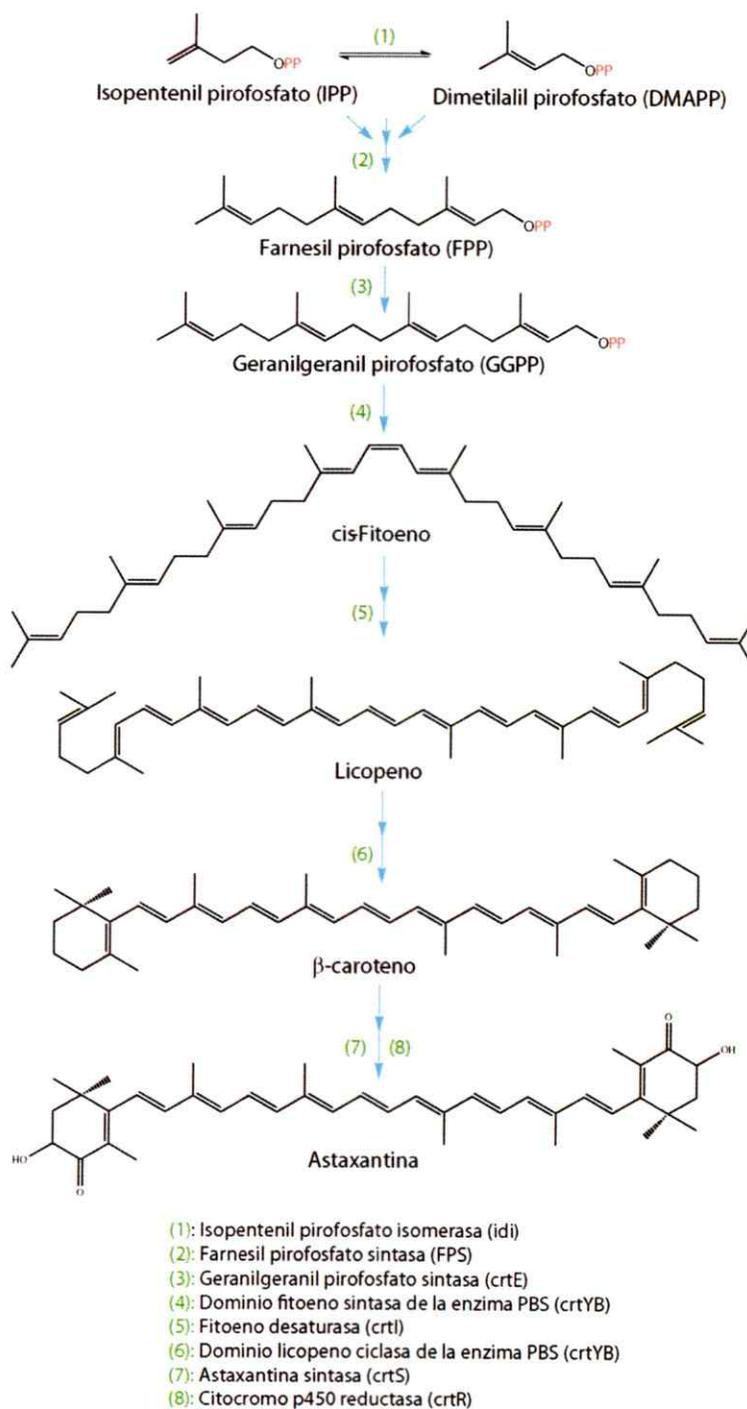


Figura 3. Biosíntesis de astaxantina a partir de IPP en *X. dendrorhous*. La biosíntesis de astaxantina a partir de IPP en *X. dendrorhous* involucra 8 actividades enzimáticas codificadas por 7 genes (mostrados entre paréntesis en la leyenda).

adiciones de grupos ceto, el β -caroteno es transformado en astaxantina por la astaxantina sintasa (producto del gen *crtS*) (Alvarez y col. 2006; Ojima y col. 2006), en una reacción donde además es requerida la actividad auxiliar de una enzima citocromo p450 reductasa, codificada por el gen *crtR* (Alcaino y col. 2008). Resulta interesante notar que con solo 4 genes la levadura produce sobre 15 carotenoides diferentes, cuya composición en la célula depende de las condiciones de crecimiento.

1.4.4 Regulación de la ruta de biosíntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*.

***dendrorhous*.**

Los mecanismos que subyacen la regulación de la biosíntesis de astaxantina en *X. dendrorhous* permanecen en gran medida desconocidos. Diversos estudios han logrado identificar múltiples factores que influyen sobre la cantidad y composición de los carotenoides producidos por la levadura, lo que ha llevado a proponer mecanismos regulatorios relacionados con la fuente de carbono presente en el medio (Gu y col. 1997; Vazquez y col. 1997; Flores-Cotera y col. 2001; Johnson 2003), la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Schroeder y Johnson 1995; Liu y Wu 2007) y la inhibición por producto (Schroeder y Johnson 1995), entre otros. Dichas evidencias sugieren que la regulación podría darse a distintos niveles.

El supuesto rol protector de los carotenoides contra especies reactivas de oxígeno ha llevado a investigar si este tipo de compuestos poseen un efecto regulador sobre la producción de pigmentos. Al respecto, se ha determinado que el singulete de oxígeno (1O_2) aumenta la producción de pigmentos (Schroeder y Johnson 1995), al igual que el tratamiento con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Liu y Wu 2006; Liu y Wu 2007). Aunque no está claro a qué nivel estas especies actuarían induciendo la carotenogénesis, se

ha propuesto que podría ser a mediante mecanismos de regulación transcripcional (Schroeder y Johnson 1995).

Otro posible mecanismo de regulación estaría dado por el hallazgo de procesamiento alternativo de los transcritos primarios de los genes *crtYB* y *crtl*, a partir de los cuales se originan mensajeros con codones de término en los tres marcos de lectura, y que por lo tanto producirían proteínas truncas (Lodato y col. 2003). En dicho estudio se observó que la relación mRNA maduro/mRNA alternativo de los genes *crtYB* y *crtl* no es constante durante el crecimiento, y que se relaciona de alguna manera con el contenido celular de carotenoides.

Por otra parte, se ha observado que los niveles de mRNAs de los genes de carotenogénesis varían según las distintas etapas de crecimiento y la fuente de carbono disponible, lo que sugiere la existencia de mecanismos de regulación transcripcional (Lodato y col. 2004; Lodato y col. 2007). El hallazgo de posibles elementos reguladores en los promotores de los genes *crtYB*, *crtl* y *crtS* apoyarían esta hipótesis (Alvarez y col. 2006; Wozniak y col. 2011). Dentro de estos elementos se encuentran sitios de unión al regulador transcripcional Mig1, el cual media la represión por glucosa de diversos genes en *S. cerevisiae* (Klein y col. 1998; Kuchin y Carlson 2003). Por otra parte, la sobreexpresión de los genes *crtYB* y *crtl* causa la alteración de la cantidad y composición de los pigmentos producidos, lo que demuestra la importancia de la regulación de la ruta de carotenogénesis a este nivel (Visser y col. 2003).

Diversas investigaciones han permitido concluir que la fuente de carbono utilizada influye tanto en la cantidad total de pigmentos producidos como en la cantidad relativa

de los distintos subproductos de la vía. Dentro de las observaciones más relevantes, se estableció que en concentraciones de glucosa mayores a 15 g/l la pigmentación se reducía drásticamente, al igual que el contenido relativo de astaxantina, en comparación a lo registrado en otras fuentes de carbono (Johnson y Lewis 1979; Vazquez y col. 1997; Visser y col. 2003). Por otra parte, se observó que la adición de etanol y de compuestos que son sustrato de la biosíntesis de IPP, tales como el mevalonato, causa un aumento significativo de la producción de pigmentos (Calo y col. 1995; Gu y col. 1997). Finalmente, cuando *X. dendrorhous* es crecida en glucosa como única fuente de carbono, la inducción de la carotenogénesis coincide con el agotamiento del azúcar y la máxima concentración de etanol producido por la fermentación del carbohidrato.

Las evidencias anteriormente presentadas sugieren la existencia de un posible sistema de represión catabólica por glucosa y/o de inducción por etanol de la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de astaxantina de *X. dendrorhous*. De acuerdo a dichos antecedentes se plantea la siguiente hipótesis de trabajo.

1.5 Hipótesis

La glucosa y/o el etanol poseen un efecto regulador sobre la expresión de uno o más genes que codifican a las enzimas que participan en la biosíntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*, y por lo tanto, sobre la producción de pigmentos.

1.6 Objetivo general

Caracterizar el rol que posee el etanol y la glucosa sobre la síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*.

1.7 Objetivos específicos

- 1.- Determinar los niveles de expresión de genes implicados en la carotenogénesis en la cepa silvestre UCD 67-385 y en cepas mutantes incapaces de sintetizar astaxantina, durante el crecimiento en medio completo suplementado con glucosa.
- 2.- Evaluar y caracterizar el efecto de la glucosa sobre la expresión de los genes *idi*, *FPS*, *crtE*, *crtYB*, *crtl* y *crtS*, implicados en la biosíntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*.
- 3.- Determinar el efecto del etanol sobre la expresión de los genes *idi*, *FPS*, *crtE*, *crtYB*, *crtl* y *crtS*.
- 4.- Estudiar el efecto de la glucosa y el etanol sobre la producción de carotenoides en *X. dendrorhous*.
- 5.- Analizar y caracterizar las regiones promotoras de los genes *crtE*, *crtYB*, *crtl* y *crtS*, realizando una búsqueda de posibles elementos reguladores.
- 6.- Clonar y caracterizar un posible homólogo al represor catabólico *Mig1* de *S. cerevisiae* en *X. dendrorhous*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 Cepas y condiciones de cultivo.

Para todos los experimentos presentados en este trabajo se utilizó como cepa silvestre de *X. dendrorhous* la cepa UCD 67-385. A menos que se especifique lo contrario, las células de la levadura fueron crecidas a 22 °C con agitación constante (180 rpm/min), en medio líquido YM (0,3 % extracto de levadura, 0,3 % extracto de malta, 0,5% peptona) suplementado o no con distintas concentraciones de glucosa o etanol según corresponda.

Las cepas incapaces de sintetizar astaxantina empleadas corresponden a los mutantes homocigotos T-YBHH2 (*crtYB/crtYB*), T-I21H1H (*crtI/crtI*) y T-SHH2 (*crtS/crtS*) obtenidas a partir de la cepa parental UCD 67-385, y que fueron descritas en un trabajo previo (Niklitschek y col. 2008).

2.2 Determinación de crecimiento celular y cantidad de biomasa.

La cuantificación del crecimiento celular se realizó midiendo la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) en un espectrofotómetro de doble rayo Shimadzu UV-150-20. Para la determinación de pigmento específico se cuantificó la biomasa mediante la medición de peso seco, a partir de alícuotas de 10 ml de cultivo, en una balanza analítica (Shimadzu).

2.3 PCR, clonamiento y otros procedimientos rutinarios de biología molecular.

Las reacciones de PCR convencional, digestiones con enzimas de restricción, reacciones de ligado y transformación de *E. coli*, fueron realizadas de acuerdo a los protocolos estándar descritos en el manual de clonamiento molecular (Sambrook y Russell 2001). Para el clonamiento y replicación de moléculas de DNA en *E. coli* se utilizó el vector pBluescript SK+ y se seleccionó los transformantes en medio LB suplementado con ampicilina y X-gal. La cuantificación de DNA se realizó comparando de las intensidades de las bandas de cada muestra con estándares de concentración conocida, en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio fotografiados sobre un transiluminador de luz UV.

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

Para extraer DNA genómico se centrifugaron 20 ml de cultivo a 4000 g durante 5 min, eliminando posteriormente el sobrenadante. Luego, las células fueron resuspendidas en 500 µl de tampón de lisis (10 mM Tris-HCl pH=7,5; 20 mM EDTA) y se agregaron 300 µl de perlas de vidrio de 0,5 mm. Posteriormente se agitó la mezcla en vortex a máxima velocidad durante 5 min, y se incubó en hielo durante 2 min, repitiendo luego los pasos de agitación en vórtex y enfriamiento. Después, se adicionaron 400 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó la mezcla en vórtex durante 1 min y se centrifugó a 14000 g durante 5 minutos. La fase acuosa obtenida fue traspasada a un tubo limpio y se repitió la extracción fenólica. Luego, la fase acuosa fue traspasada a un tubo limpio y se le agregaron 400 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó en vórtex durante 30 s y se centrifugó a

14000 g durante 5 min. Posteriormente la fase acuosa fue traspasada a un tubo limpio, se le agregaron 800 μ l de etanol absoluto y se incubó la mezcla a -20 °C durante 2 h, luego de lo cual ésta fue centrifugada a 14000 g durante 10 min. Después de eliminar el sobrenadante, el precipitado fue resuspendido en tampón TE (10 mM Tris pH=8,0; 1mM EDTA).

2.5 Extracción de RNA de *X. dendrorhous* y síntesis de cDNA de hebra simple.

Para extraer RNA a partir de las muestras obtenidas en las distintas condiciones ensayadas se colectaron alícuotas de cultivo, se centrifugaron a 4000 g durante 5 min y se descartaron los sobrenadantes. Los sedimentos celulares fueron congelados en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización. La extracción de RNA total a partir de los sedimentos se realizó por medio de ruptura mecánica de las células, agregando entre 2 y 4 ml de Tri-Reagent (Ambion) y agitando en vórtex con perlas de vidrio de 0,5 mm (BioSpec) durante 10 min. Posteriormente se incubó el lisado durante 10 min a temperatura ambiente, se agregaron 150 μ l de cloroformo por ml de Tri-Reagent usado y se centrifugó la mezcla durante 5 min a 4000 rpm. Luego, se recuperaron las fases acuosas y se transfirieron a tubos limpios libres de RNAsa. Luego de 2 pasos sucesivos de extracción con fenol ácido:cloroformo (1:1) y centrifugación a 4 °C durante 5 min, el RNA fue precipitado agregando 2 volúmenes de isopropanol e incubando a temperatura ambiente durante 10 min. Una vez precipitado, el RNA fue lavado con etanol 75 %, resuspendido en agua libre de RNAsa y cuantificado por medio de la determinación de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro de doble rayo Shimadzu UV-150-20.

La síntesis de cDNA se realizó usando 5 µg de RNA total, 1,25 µM de primer oligo-dT¹⁸, 0,5 µM de dNTPs y 200 U de transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) en un volumen final de 20 µl, de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante de la enzima.

2.6 RT-PCR cuantitativo.

La determinación de los niveles de expresión relativa mediante RT-PCR cuantitativo fue realizada en un termociclador de tiempo real Mx3000P (Stratagene), usando 1 µl de reacción de transcripción reversa, 0,25 µM de cada primer y 10 µl de kit SensiMix SYBR Green I (Quantace) en un volumen final de 20 µl. Los partidores utilizados para la determinación de los niveles relativos de expresión se encuentran detallados en la Tabla I. Todas las parejas de partidores utilizados para la amplificación de cada gen poseen una eficiencia mayor al 95 %, determinadas en curvas estándar con un coeficiente de correlación $R^2 \geq 0,996$.

Los valores de Ct obtenidos en cada condición fueron normalizados por el respectivo valor del gen β -actina de *X. dendrorhous* (*act*), y posteriormente expresados en función de la condición control, usando el algoritmo del $\Delta\Delta Ct$ (Livak y Schmittgen 2001), o bien simplemente en veces con respecto al gen normalizador.

2.7 Ensayos de Northern blot.

Para la determinación de la expresión relativa mediante ensayos de *northern blot*, 10 µg de RNA total de cada muestra fueron mezclados con 2 µl de MOPS 10X (0,2 M MOPS pH=7, 20 mM acetato de sodio, 10 mM EDTA pH=8), 10 µl de formamida, 4 µl

Tabla I. Partidores usados en este trabajo.

Partidor	Gen	Dirección	Secuencia (5' a 3')	Ubicación
mactF-RT	<i>act</i>	D	CCGCCCTCGTGATTGATAAC	Unión exón 2 y 3
mactR-RT		R	TCACCAACGTAGGAGTCCTT	Unión exón 4 y 5
mcrtEF-RT	<i>crtE</i>	D	TGTTGGCATGCTACATACCG	Unión exón 6 y 2
mcrtER-RT		R	GTTGGGCGAAGCTTGAAGAT	Exón 4
mmcrtYBF2-RT	<i>crtYB(m)</i>	D	TCGCATATTACCAGATCCATCTGA	Unión exón 1 y 2
mmcrtYBR2-RT		R	GGATATGTCCATGCGCCATT	Exón 2
amcrtYBF-RT	<i>crtYB(a)</i>	D	GTGTGCATATGTGTTGCAACCA	Unión exón1 e intrón 2
amcrtYBR-RT		R	AGAAGGTGCCTAGTTGCCAAGA	Exón 3
mmcrtIF-RT	<i>crtI(m)</i>	D	CATCGTGGGATGTGGTATCG	Unión exón 1 y 2
mmcrtIR-RT		R	GGCCCTGATCGAATCGATAA	Unión exón 3, 4 y 5
amcrtIF-RT	<i>crtI(a)</i>	D	CGTGGTTTAATCCGTATCAGC	Unión exón 1 e intrón1
amcrtIR2-RT		R	TCTCGAACACCGTGACCT	Exón 2
midif-RT	<i>idi</i>	D	TCCGAACCGAAGGACTCAGTTT	Exón 1
midir-RT		R	GGACATCAAGTGGCAGGTCT	Unión exón 2 y 3
mfpsf2-RT	<i>FPS</i>	D	TGGTACAAAGTTGAGGGAGTGTC	Unión exón 3 y 4
mfpsr2-RT		R	AGCGGTCAACAGATCGATGAG	Exón 5
grg2real FW1	<i>grg2</i>	D	CATCAAGACCTCTGTACCAAC	Unión exón 1 y 2
grg2real RV1		R	TTGGCGTCAGACGAGGACT	Exón 3
grgFW1		D	GGATCCTCTAGACTGTGAGC	Región promotora
grgRV1		R	GGATCCTATTTGCTTCTCTAG	3' UTR
pdcreal FW1	<i>PDC</i>	D	TCAACACTGAGCTGCCCACT	Unión exón 5 y 6
pdcreal RV1		R	ATTCCGAATCGGGAAGCACA	Exón 6
pdcatg		D	ATGCCCTGCCGCTACCCTGA	Codón de inicio
pdstop		R	TTAACTAGAGTTGGCGTTTCGAG	Codón de término
mcrtSF-RT		D	ATGGCTCTGCAGGGTTTGA	Unión exón 6 y 7
mcrtSR-RT		R	TGCTCCATAAGCTCGATCCCAA	Unión exón 8 y 9
pcrtS1FW		D	CATCCATCAGAGGTGCAGCC	
pcrtS1RV		R	CATTCAACCGGTGCAATAGG	
pcrtS2FW	<i>crtS</i>	D	GAAGATGATGCGGCGGCAAC	
pcrtS2RV		R	GATGCATCACCTGCTGCTC	
pcrtS3FW		D	CCAAGCCGAACAATCCTGG	Región promotora
pcrtS3RV		R	GTGGTCCGTAGTATCATCA	
pcrtS4FW		D	CTCTACATTGAATGTTTACCG	
pcrtS4RV	R	TCGTTGCGCCTCGGCGTTC		
pcrtS5FW		D	CGAAAATCAGGGCACCGATC	
pcrtS5 RV		R	ATGGAGAAAGTAGGTGGCAAG	

D: Directo, R: Reverso; (m): transcrito maduro, (a): transcrito alternativo; 3' UTR: Región no traducida río abajo del gen. Continúa en la siguiente página.

Tabla I (continuación)

Partidor	Gen	Dirección	Secuencia (5' a 3')	Ubicación
Mig1crtSema1b		D	CTGGACGAGGTGGGGCCTCAAC	
Mig1crtSema2b	<i>crtS</i>	R	TGGTTGAGGCCCCACCTCGTCC	Región promotora
Mig1crtSema1c		D	GTTCTGGGCTGGGGAACACCC	
Mig1crtSema2c		R	TAGGGTGTTCCCCAGCCCAGA	
Mig1cDNAFW4	Mig1	D	CTTTCTCCCTCGACATTCAC	5' UTR
Mig1cDNARV7		R	TAAATCCTATCAATATGCTGTCA	3' UTR

D: Directo, R: Reverso; (m): transcrito maduro, (a): transcrito alternativo; 3'/5' UTR: Región no traducida río abajo/arriba del gen.

de formaldehído 6,6%, 1 μ l de bromuro de etidio (200 μ g/ml), y H₂O libre de RNasa hasta un volumen final de 19 μ l. Posteriormente las mezclas fueron incubadas a 55 °C durante 10 min y en hielo durante 10 min. Finalmente, se agregaron 2 μ L de tampón formaldehído 10X (50 % glicerol, 10 mM EDTA pH=8, 0,25 % p/v azul de bromofenol, 0,25 % p/v xylene cyanol). Luego, las mezclas fueron cargadas en un gel denaturante de agarosa-formaldehído (1,5 % agarosa, 1X MOPS, 6,7 % formaldehído, H₂O libre de RNasa), el cual fue situado en una cámara de electroforesis con tampón MOPS 1X ajustada para entregar una diferencia de potencial de 5V/cm, mantenida hasta que el azul de bromofenol alcanzó el extremo del gel .

Una vez terminada la electroforesis, el gel fue fotografiado sobre un transiluminador de luz ultravioleta de modo de visualizar las bandas correspondientes a los RNAs ribosomales (utilizados como control de carga). Luego, el gel fue lavado con H₂O libre de RNasa y se mantuvo sumergido en NaOH 0,05 M durante 20 min. Posteriormente, se eliminó la solución de NaOH, se lavó con H₂O libre de RNasa y se incubó en tampón 20X SSC (3 M NaCl, 0,3 M citrato de sodio) durante 40 minutos. Luego, el RNA fue transferido por capilaridad desde el gel a una membrana de nitrocelulosa colocada justo encima de este último, cubriendo la membrana con 2 piezas de papel whatman y sobre éstas una cantidad adecuada de toalla absorbente de papel, de acuerdo al protocolo descrito por Sambrook (Sambrook y Russell 2001). El tampón utilizado para la transferencia fue SSC 10X. Luego de aproximadamente 6 horas de transferencia, la membrana fue lavada con tampón SSC 6X durante 5 min, secada sobre papel whatman y fijada con calor por 30 min a 80 °C y luego por irradiación con luz UV (254 nm) durante 1 min.

Para la hibridación, las membranas fueron incubadas a 68 °C durante 2 horas en solución de pre hibridación (0,5 M Na₂HPO₄ pH=7,2; 7 % SDS). Posteriormente, se agregó la sonda marcada y se incubó durante aproximadamente 16 horas a 68 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la membrana fue lavada dos veces con tampón de lavado 1 (40 mM Na₂HPO₄, 5 % SDS), y dos veces con tampón de lavado 2 (40 mM Na₂HPO₄, 1 % SDS). Luego, la membrana fue secada sobre papel whatman y colocada en un casete para películas de rayos X con pantalla amplificadora, donde se dejó exponiendo a -80 °C entre 24 y 120 horas según fue necesario.

2.8 Preparación de sondas para hibridación.

Para la preparación de las sondas se amplificaron por PCR fragmentos de aproximadamente 1 kb de cada gen a estudiar, a partir de cDNA de la cepa UCD 67-385. Una vez finalizada la reacción de PCR, las mezclas fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa (0,8%) preparado con tampón TAE (40 mM Tris, 40 mM acetato, 1 mM EDTA, pH=8,0), y se purificaron las bandas obtenidas en cada caso usando el kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up (Promega). 25 ng de cada fragmento fueron utilizados como sustrato para la reacción de marcaje por el método de *random primers* con el kit Prime a Gene (Promega), empleando 25 uCi de [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol). Una vez terminado el marcaje, los nucleótidos no incorporados fueron removidos por cromatografía de exclusión molecular utilizando microcolumnas de Sephadex G50 (Illustra MicroSpin G-50, GE Healthcare).



2.9 Secuenciación de DNA.

La secuenciación de DNA se realizó en un secuenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), utilizando el kit de terminadores fluorescentes BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems).

2.10 Preparación de extractos nucleares de *X. dendrorhous*.

Para la preparación de extractos nucleares, se inocularon 500 ml de medio YM-glucosa (20 g/l) a partir de un cultivo saturado de *X. dendrorhous* (72 h) a una dilución de 1:100, incubando con agitación a 22 °C hasta una DO₆₀₀ entre 3 y 4. Luego, se cosecharon las células por centrifugación a 5000 g durante 5 min, se lavaron con 40 ml de KCl 0,8 M estéril y se resuspendieron en 20 ml de solución de degradación de la pared celular (0,8 M KCl; 15 mg/ml glucanex, Sigma). Luego de incubar con agitación suave a 22 °C durante 16 horas (se comprobó la formación de protoplastos observando una alícuota del cultivo en el microscopio), se centrifugó la mezcla a 4000 g durante 5 min y se resuspendieron las células en 10 ml de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH=7,5; 10 mM MgSO₄, 1 mM EDTA pH=8, 10 mM KCH₃COO, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) pre-enfriado a 4 °C. Manteniéndolas en hielo, las células fueron lisadas suavemente utilizando un homogenizador manual de tubo de vidrio, presionando y jalando el émbolo alrededor de 10 veces. Posteriormente, se centrifugó el homogenizado a 2000 g durante 10 min en frío (4 °C), se colectó el sobrenadante y se centrifugó a 5000 g durante 20 min (4 °C). Luego, el pellet celular fue resuspendido en 5 ml de tampón de extracción nuclear frío (20 mM HEPES pH=7,9; 20 % glicerol, 400 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF) y se incubó en hielo durante 1 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó la mezcla a

8000 g durante 20 min (4 °C), y el sobrenadante fue dialisado en frío contra 50 volúmenes de Tampón D+ (20 mM HEPES-KOH pH=7,9; 20 % glicerol, 0,1 M KCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 1 mM DTT) durante 5 h con agitación. Luego de la diálisis, el extracto fue alicuotado, congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80 °C hasta su utilización.

La cuantificación del extracto nuclear se realizó mediante el método de Bradford, utilizando el kit Pierce 660 nm protein assay (Thermo Scientific). La integridad del extracto fue visualizada mediante SDS-PAGE, en un gel bipartito con una zona concentradora al 5 % (Tris-HCl pH=6,8) y una zona separadora al 12 % (Tris-HCl pH=8,8), sometido a electroforesis en tampón Tris-Glicina, y posteriormente teñido con azul de coomassie.

2.11 Ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA).

Para los ensayos de cambio en la movilidad electroforética se procedió como se describe a continuación. En tubos eppendorf de baja unión (maximum recovery, Axygen), se mezclaron aproximadamente 6 ng de DNA marcado, entre 0 y 20 µg de extracto nuclear, 1 µg del competidor inespecífico poli(dI-dC) y Tampón D+ hasta completar un volumen final de 10 µl. Las mezclas de reacción se incubaron en hielo durante 1 h y luego se cargaron en un gel de poli(acrilamida) TBE 0,5X - glicerol (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA, 1% glicerol) al 4,5 % (para fragmentos de aproximadamente 200 pb) o al 5,5% (para oligonucleótidos), en una cámara fría para mantener la temperatura entre 0 y 4 °C. Una vez cargado el gel, fue sometido a electroforesis a baja temperatura y corriente constante (10 mA), durante aproximadamente 1,5 h. Al finalizar la electroforesis, el gel fue puesto sobre papel whatman y secado al vacío en

un secador de geles a 60 °C durante 2 h, luego de lo cual fue situado en un casete para películas de rayos X con pantalla amplificadora, donde se dejó exponiendo a -80 °C entre 24 y 48 horas según fue necesario.

2.12 Preparación de fragmentos de DNA marcado para ensayos de cambio en la movilidad electroforética.

2.12.1 Preparación y Marcaje de fragmentos de DNA del promotor del gen *crtS*.

Cada fragmento del promotor *crtS* fue amplificado por PCR a partir de un trozo de DNA genómico que contiene el gen *crtS*, y que fue clonado previamente en pBluescript. Para ello se utilizó una pareja de partidores específicos en cada caso, denominados *pcrtS*(1-5) según amplifiquen los fragmentos 1 al 5 (Tabla I). Luego, cada reacción fue sometida a electroforesis en gel TAE-agarosa, y la banda obtenida fue purificada usando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up (Promega). Para la reacción de marcaje se usaron 300 ng de cada fragmento, los cuales fueron mezclados con 10 µl de tampón para transferasa terminal 5X (Roche), 5 µl de CoCl₂ 25 mM (Roche), 25 µCi [α-³²P]dCTP (6000 Ci/mmol), 400 U transferasa terminal recombinante (Roche) y H₂O hasta un volumen final de 50 µl. Cada mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 30 min. Posteriormente se detuvo la reacción agregando 10 µl de EDTA 0,2 M (pH=8) e incubando a 70 °C durante 10 min. Una vez terminado el marcaje, los nucleótidos no incorporados fueron removidos por cromatografía de exclusión molecular utilizando microcolumnas de Sephadex G50 (Illustra MicroSpin G-50, GE Healthcare).

2.12.2 Preparación y marcaje de oligonucleótidos que forman los sitios Mig1 del promotor del gen *crtS*.

Los oligonucleótidos que forman los sitios Mig1 del promotor del gen *crtS* fueron sintetizados por la empresa Alpha DNA, y se denominaron Mig1crtSensa(b-c) según correspondan al sitio Mig1 "b" o al sitio "c" (Tabla I). 2,5 pmol de cada oligonucleótido (directo y reverso) fueron mezclados con 2 μ l de tampón de reacción A (Fermentas), 50 μ Ci [γ - 32 P]ATP (6000 Ci/mmol), 10 U T4 polinucleótido kinasa (Fermentas) y H₂O hasta un volumen final de 20 μ l. Luego, la reacción fue incubada a 37 °C durante 45 min, y fue detenida agregando 1 μ l de EDTA 0,5 M (pH=8) y calentando a 75 °C durante 10 min. Posteriormente, se separaron los oligonucleótidos de los nucleótidos no incorporados por precipitación, agregando 40 μ l de H₂O, 200 μ l de acetato de amonio 5 M y 750 μ l de etanol absoluto frío, e incubando a -20 °C durante 1 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a 14000 g durante 20 min a 4 °C. El sedimento fue lavado con 500 μ l de etanol 80 % y luego fue resuspendido en 50 μ l de tampón TE (pH=7,6).

2.13 Extracción y Análisis de pigmentos.

Para la extracción de pigmentos se colectaron alícuotas de cultivos celulares en las distintas condiciones ensayadas, las cuales fueron centrifugadas a 4000 g, descartando posteriormente el sobrenadante. El sedimento celular fue resuspendido en 2 ml de una mezcla acetona:agua (1:1) y se le agregaron 500 μ l de perlas de vidrio de 0,5 mm. Luego de 10 min de agitación en vórtex la mezcla se centrifugó a 4000 g durante 3 min. Posteriormente el sobrenadante fue transferido a un tubo limpio y al sedimento se le agregaron 2 ml de acetona, se agitó en vórtex por 3 min y se

centrifugó a 4000 g durante 3 min, colectando el sobrenadante y mezclándolo con el obtenido anteriormente. Estos pasos fueron repetidos hasta que el sobrenadante recuperado fuese totalmente incoloro. Luego, a la colección de sobrenadantes se le agregaron 0,25 volúmenes de agua y 0,25 volúmenes de éter de petróleo, se mezcló y se centrifugó por 3 min a 4000 g. Posteriormente se recuperó la fase superior (éter de petróleo) y se determinó su absorbancia a 465 nm para cuantificar los pigmentos extraídos, calculando su concentración usando el promedio entre los coeficientes de extinción molar de astaxantina y β -caroteno, correspondiente a 2346.

La composición de pigmentos fue determinada mediante cromatografía líquida en fase reversa, usando una columna Lichrospher RP18 125-4 (Merck) y como fase móvil una mezcla de acetonitrilo:metanol:isopropanol (85:10:5), con un flujo de 1 ml/min. en condiciones isocráticas. Cada pigmento fue identificado comparando con estándares específicos determinando su tiempo de retención y su espectro de absorción, usando un detector de arreglo de diodos Shimadzu SPD-M10A.

2.14 Cuantificación de glucosa en el medio extracelular

La cuantificación de la glucosa remanente en el medio extracelular se realizó determinando el aumento de la absorbancia a 340 nm, debida a la producción de NADPH como producto de la oxidación de la glucosa presente, usando el kit D-Glucosa/D-fructosa (Megazyme). Se procedió de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

2.15 Predicción de posibles sitios de unión de factores de transcripción en regiones promotoras.

El análisis bioinformático para buscar sitios de unión a factores de transcripción en los promotores de los genes de carotenogénesis se realizó usando la aplicación PROMO 3.0 (http://aliggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3), la cual emplea las matrices de secuencia consenso de los sitios de unión depositadas en la base de datos de factores de transcripción TRANSFAC versión 8.3 (Messeguer y col. 2002; Farre y col. 2003). El código TRANSFAC del factor de transcripción Mig1 es T00509. Adicionalmente se realizó una búsqueda manual utilizando la secuencia consenso establecida para *Aspergillus nidulans* por Cubero y Scazzocchio (Cubero y Scazzocchio 1994), la cual fue definida como (G/C)(C/T)GG(A/G)G.

2.16 Predicción de ORFs, búsqueda de genes homólogos y alineamiento múltiple de secuencias.

Las predicciones de ORFs se realizaron utilizando la aplicación "ORF finder" (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/). Las búsquedas de genes homólogos en bases de datos públicas como GenBank, los cálculos de identidad y la búsqueda de dominios conservados se hicieron utilizando la aplicación BLAST, en sus distintas versiones según fue requerido (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los alineamientos múltiples de secuencias fueron realizados con la aplicación clustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw/), y su edición se realizó usando la aplicación Jalview (Waterhouse y col. 2009), descargable gratuitamente en la web www.jalview.org.

3. RESULTADOS

3.1 Estudio de la expresión de los genes de carotenogénesis de *X. dendrorhous* durante el crecimiento en medio completo suplementado con glucosa.

3.1.1 Estandarización del protocolo de medición de expresión relativa por RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR).

Debido a que la mayoría de las medidas de expresión relativa presentadas en este estudio fueron realizadas mediante qRT-PCR fue necesaria una estandarización previa de la técnica, la cual consistió en el diseño de partidores, elección del método óptimo de cuantificación de RNA, determinación de la cantidad óptima de RNA inicial, elección de transcriptasa reversa, cantidad de cDNA inicial y kit de PCR en tiempo real óptimos, etc.

Para el diseño de partidores se utilizó el software AmplifX (Jullien 2007), el cual analiza la secuencia de DNA que se quiere amplificar buscando la mejor pareja de partidores para ello, considerando parámetros aportados por el usuario como la longitud de los oligonucleótidos y tamaño del amplicón; y parámetros determinados por el programa como el contenido GC y la posibilidad de formación de dímeros de partidores o de horquillas intramoleculares. Adicionalmente, para el diseño de los partidores se establecieron 3 condiciones adicionales. En primer lugar, se fijó el tamaño del amplicón entre 150 y 200 pb según la recomendación del fabricante del equipo de PCR en tiempo real (Stratagene). En segundo lugar, para evitar la amplificación no deseada de DNA genómico que pudiese estar presente en las muestras de RNA, al menos uno de

los partidores para cada gen se diseñó sobre una unión exón-exón. En tercer lugar, dentro de lo posible, todos los partidores fueron diseñados para amplificar una región situada aproximadamente 1000 pb río arriba del codón de término, de modo de minimizar posibles diferencias en la eficiencia de síntesis de cDNA de los distintos genes. Las secuencias y principales características de los partidores usados en este estudio se muestran en la Tabla I.

Una vez diseñados los partidores se procedió a determinar el método óptimo de cuantificación de RNA. Con este propósito se probó la cuantificación en un espectrofotómetro UV, en un espectrofotómetro nanodrop y por medio de medición de fluorescencia usando el kit Ribogreen (Molecular Probes). La técnica que dio mejores resultados fue la cuantificación en espectrofotómetro UV en cubetas de 1 ml. Posteriormente se estandarizaron los factores restantes como tipo de transcriptasa reversa, cantidad de cDNA y variedad de kit de PCR en tiempo real, llegando a las condiciones óptimas detalladas en la sección de materiales y métodos.

Una vez estandarizadas las condiciones de qRT-PCR se procedió a determinar las eficiencias de amplificación de los partidores diseñados para cada gen. Para esto se hicieron diluciones seriadas (1/10) de una muestra de DNA previamente amplificado por PCR con los partidores a los cuales se quiere determinar su eficiencia. Cada una de las diluciones fue usada como DNA blanco para una reacción de PCR en tiempo real, y posteriormente se graficó el logaritmo de la concentración inicial de DNA versus el ciclo en el cual se alcanzó el umbral de amplificación (Ct). A partir de las gráficas se hizo una regresión lineal y se calculó la pendiente (p) y el coeficiente de correlación (R^2). Luego, se calculó la eficiencia de amplificación (E) expresada en porcentaje de acuerdo a la ecuación $E = (10^{-1/p}/2*100)$ (Livak y Schmittgen 2001) (Figura 4). Todas

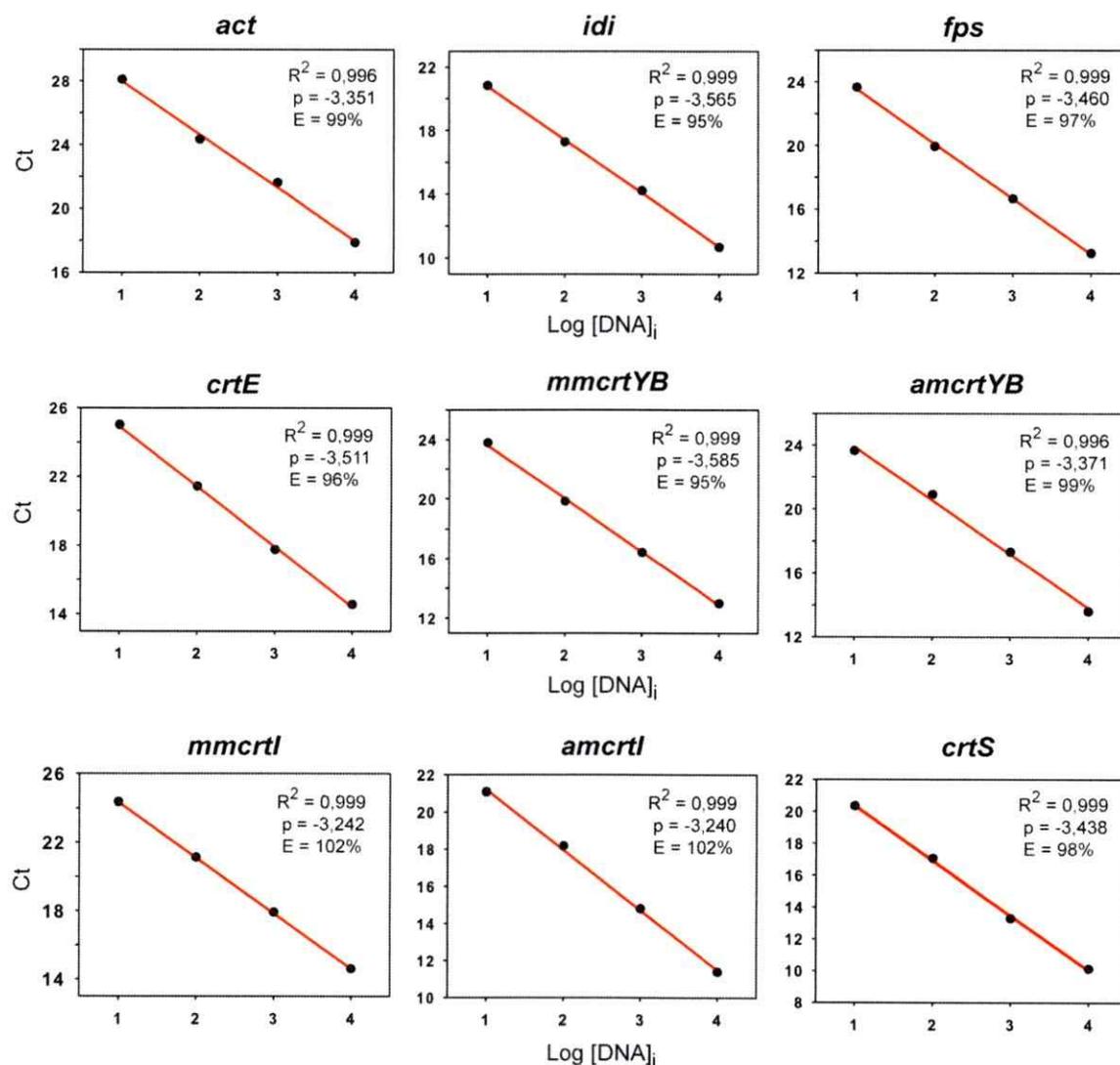


Figura 4. Curvas de calibración de los partidores utilizados para la determinación de la expresión relativa de los genes de carotenogénesis mediante qRT-PCR. Ct: Ciclo al cual se alcanza el umbral de amplificación; [DNA]_i: concentración inicial de DNA blanco; p: pendiente de la recta trazada a partir de la gráfica; R²: coeficiente de correlación; E: eficiencia de amplificación.

las curvas mostraron un buen coeficiente de correlación ($\geq 0,996$), y los valores de eficiencia para cada pareja de partidores fueron en todos los casos superiores al 95%, por lo que cumplen con los requisitos para su uso posterior. Finalmente se comprobó a través de la realización de curvas de melting que ninguna de las parejas de partidores usadas dieran lugar a la formación de dímeros de partidores ni amplicones inespecíficos.

3.1.2 Estudios de expresión en la cepa silvestre UCD 67-385.

Un primer paso en la caracterización de la expresión de los genes de carotenogénesis y su rol en la regulación de la biosíntesis de pigmentos, fue determinar los niveles de mRNA de estos últimos a lo largo de la curva de crecimiento en medio completo suplementado con glucosa. Para esto, células de *X. dendrorhous* fueron crecidas a 22 °C en matraces con medio YM suplementado con 20 g/l glucosa y agitación constante. El aumento de la biomasa fue seguido midiendo la densidad óptica a 600 nm, colectando alícuotas de cultivo en 5 etapas del crecimiento, correspondientes a la fase exponencial temprana, fase exponencial media, fase exponencial tardía, fase estacionaria temprana y fase estacionaria tardía (Figura 5). A partir de dichas alícuotas se extrajo RNA total, el que fue usado posteriormente para determinar la expresión relativa de los genes *idi*, *FPS*, *crtE*, *crtYB* (maduro y alternativo), *crtl* (maduro y alternativo) y *crtS*, mediante RT-PCR cuantitativo. Los valores de expresión fueron calculados en número de veces con respecto al gen que codifica para β -actina (*act*) de *X. dendrorhous*, el cual ha sido previamente validado como gen normalizador en estudios de expresión génica en esta levadura, tanto en nuestro laboratorio como por otros grupos de investigación (Lodato y col. 2003; Lodato y col. 2004; Lodato y col. 2007; Miao y col. 2011).

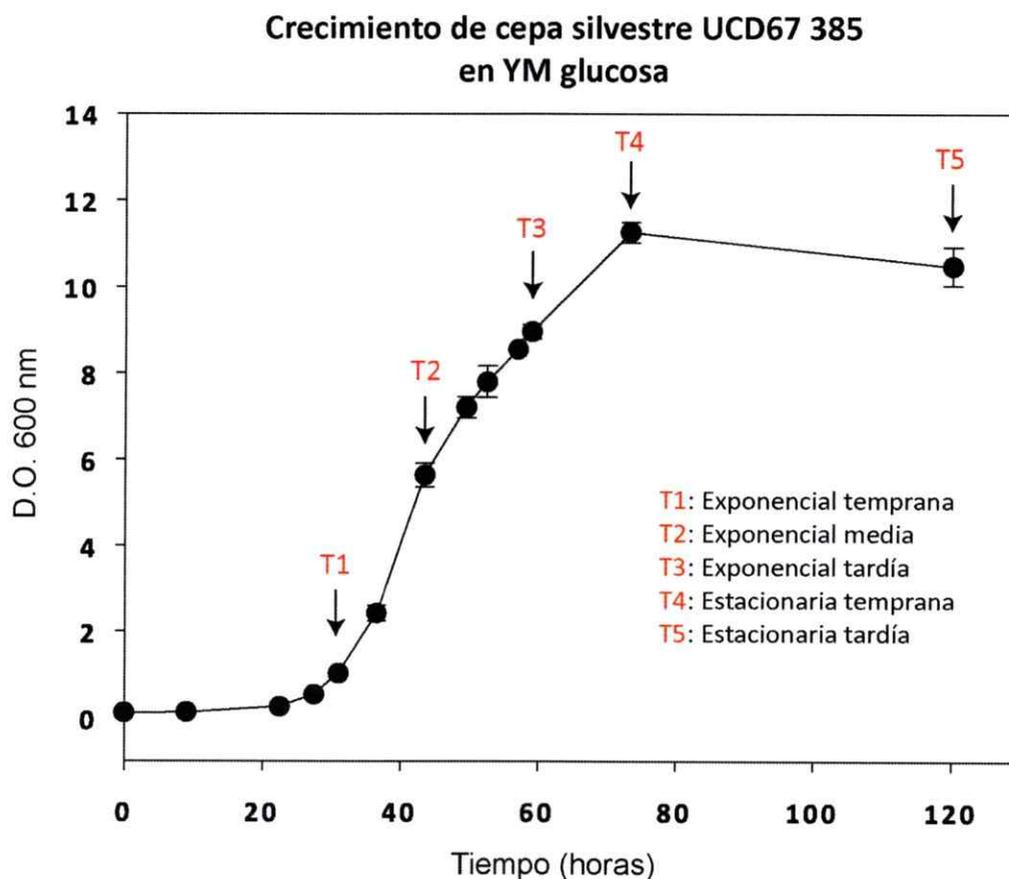


Figura 5. Crecimiento de *X. dendrorhous* (cepa silvestre) en medio completo suplementado con glucosa. Células de *X. dendrorhous* fueron crecidas en medio YM suplementado con glucosa (20 g/l final), registrando el aumento de densidad óptica a 600 nm, con el transcurso del tiempo. En rojo se indican los tiempos en los cuales se colectaron muestras para determinar la expresión relativa de los genes de carotenogénesis. Las barras de error corresponden a la desviación estándar entre experimentos independientes (n=3).

Al analizar los resultados (Figura 6) se puede ver que la expresión del gen *idi* es prácticamente constante a lo largo de todo el crecimiento, dado que los valores de expresión se encuentran acotados entre 15 y 28 moléculas de mRNA de *idi* por cada 1000 moléculas de mRNA de actina (variación máxima menor a 2 veces). Una situación similar ocurre en el caso del gen *FPS*, cuyos valores de expresión se encuentran acotados entre 110 y 150 moléculas de mRNA de dicho gen por cada 1000 moléculas de actina. La expresión constitutiva de ambos genes es esperable considerando que participarían tanto en la generación de moléculas esenciales para el crecimiento y la generación de biomasa, como en la síntesis de precursores de metabolitos secundarios tales como los carotenoides.

Con respecto al gen *crtE*, éste presenta una expresión constante durante las primeras 4 fases de crecimiento (en torno a 10 moléculas de mRNA por cada 1000 moléculas de actina), registrando un ligero aumento de aproximadamente 3 veces en fase estacionaria tardía. Dicho incremento al final del crecimiento resulta inesperado si se tiene en cuenta que la actividad del gen *crtE* es requerida al comienzo de la síntesis de pigmentos, la cual ocurre entre la fase exponencial tardía y la fase estacionaria temprana (Figura 6).

En el caso del gen *crtYB* existe una cinética de expresión diferencial para las versiones madura y alternativa. En el primer caso se registró un aumento gradual de los niveles de mRNA con el paso del tiempo, alcanzando un máximo en fase estacionaria temprana (3 veces superior a los niveles iniciales), retornando posteriormente a su condición basal. A diferencia de lo visto con el gen *crtE*, el máximo de expresión de la versión madura de este gen coincide con la etapa de inducción de la carotenogénesis. En el caso de la versión alternativa, ésta presenta una expresión relativamente

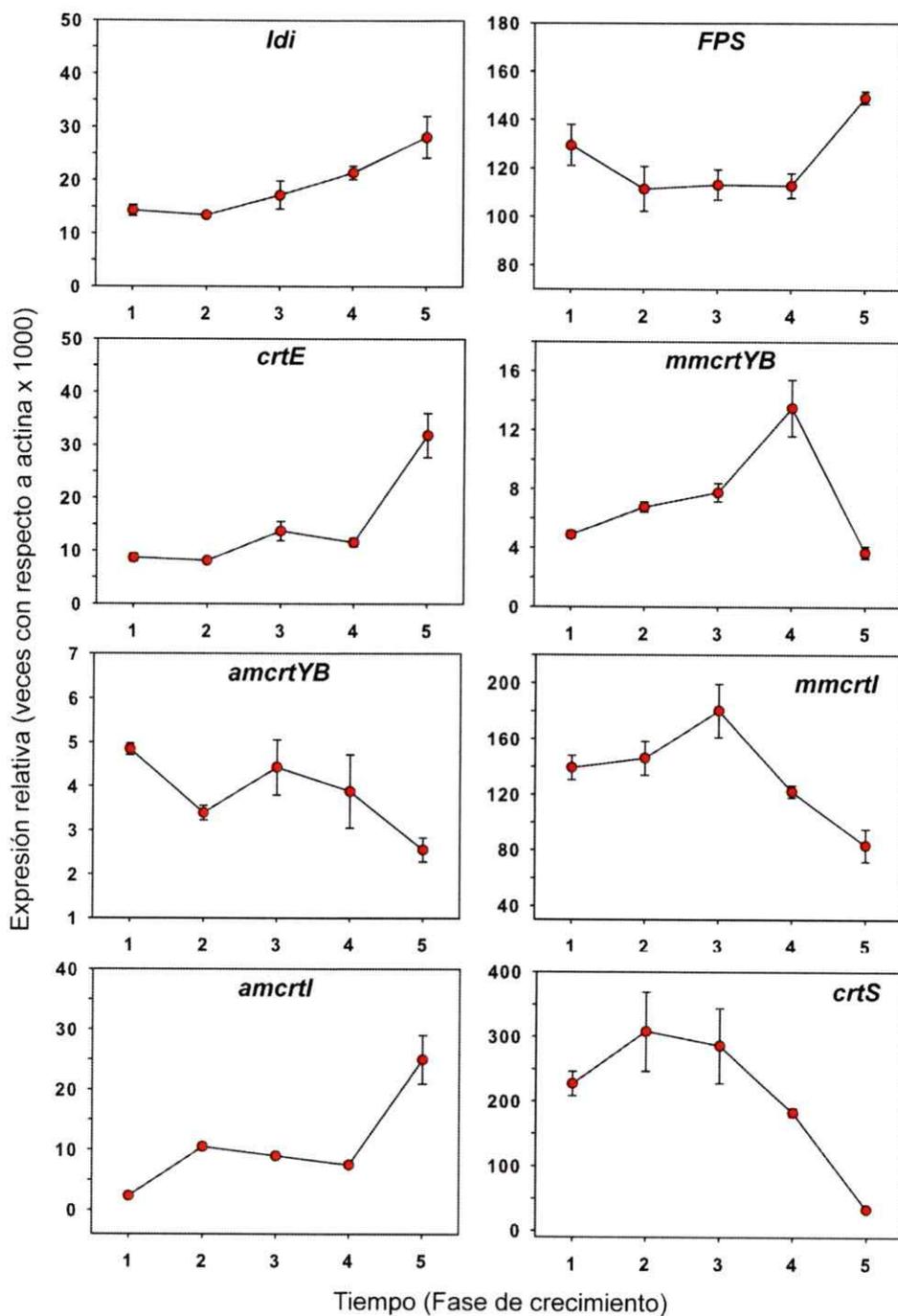


Figura 6. Cinética de expresión de los genes de carotenogénesis y de síntesis de precursores a lo largo del crecimiento de *X. dendrorhous* (cepa silvestre) en medio completo con glucosa. La expresión relativa fue determinada en distintas fases del crecimiento: exponencial temprana (1), exponencial media (2), exponencial tardía (3), estacionaria temprana (4) y estacionaria tardía (5). *mm*: mensajero maduro, *am*: mensajero alternativo. Las barras de error corresponden a la desviación estándar entre experimentos independientes (n=3).

constante a lo largo del crecimiento, registrando una variación menor a 2 veces en todo el intervalo temporal analizado. A partir de los datos obtenidos se pudo constatar que ambas versiones del transcrito presentan niveles de expresión situados en un rango similar (entre 5 y 14 moléculas por cada mil moléculas de actina en el caso de *mmcrtYB*, y entre 3 y 5 moléculas por cada mil moléculas de actina en el caso de *amcrtYB*) (Figura 6).

Al estudiar la expresión del gen *crtI*, se pudo determinar que los niveles de transcrito maduro presentan un ligero aumento en la fase exponencial tardía, disminuyendo posteriormente. Por otra parte, los niveles de transcrito alternativo aumentan al final de la fase estacionaria, llegando a ser 5 veces mayor que al inicio del crecimiento. A diferencia del gen *crtYB*, la versión alternativa del gen *crtI* se expresa bastante menos que la versión madura en todas las fases de crecimiento. Importantly, se observó una disminución de la proporción de mensajero maduro respecto al alternativo a medida que el cultivo envejecía, fenómeno que ha sido reportado previamente y que podría tener algún tipo de implicancia en la regulación de la ruta (Lodato y col. 2003). En el caso del gen *crtS*, su expresión resultó ser relativamente constante durante las cuatro primeras fases de crecimiento, presentando una disminución de hasta 5 veces al final de la fase estacionaria (Figura 6).

En general, los resultados indican que los niveles de expresión de los genes analizados presentan una variación relativamente acotada en las distintas fases de crecimiento. Adicionalmente, salvo en el caso de la versión madura del gen *crtYB*, los máximos niveles de expresión de los genes de carotenogénesis no coinciden en el tiempo con la fase de inducción de la síntesis de pigmentos. Considerando lo anterior,

no fue posible establecer una relación directa entre los niveles de expresión de dichos genes y la cantidad de pigmentos sintetizados, al menos en esta escala temporal.

3.1.3 Estudios de expresión en cepas mutantes incapaces de producir astaxantina.

Una vez caracterizado el patrón de expresión a lo largo del crecimiento de la cepa silvestre en medio YM-glucosa, se quiso comparar lo observado con lo que ocurre en cepas mutantes de la ruta de carotenogénesis que son incapaces de sintetizar astaxantina, de modo de determinar si la falta de expresión de alguno de los genes, o el cambio en la composición de pigmentos, tienen un efecto observable sobre el patrón general de expresión del resto de los genes estudiados. Para esto, se utilizó una estrategia idéntica a la usada con la cepa silvestre, pero ahora creciendo las cepas mutantes homocigotas *crtYB/crtYB*, *crtl/crtl* y *crtS/crtS*, colectando alícuotas del cultivo en las distintas fases de crecimiento (Figura 7). A cada alícuota se le extrajo RNA, a partir del cual se determinaron los niveles de expresión relativa a actina de los genes *idi*, *FPS*, *crtE*, *crtYB*, *crtl* y *crtS*, mediante qRT-PCR (Figura 8). El análisis general de los resultados indica que en la mayoría de los genes estudiados, el patrón de expresión a lo largo del crecimiento en las cepas mutantes es similar al observado en la cepa silvestre, aunque existen diferencias puntuales en determinadas fases de crecimiento. En el caso del gen *idi* (Figura 8a), sus niveles de expresión en las cepas mutantes es ligeramente mayor que en la cepa silvestre en las primeras dos fases de crecimiento. Durante la fase exponencial tardía la expresión de dicho gen resultó ser similar en todas las cepas. Un fenómeno similar se registró en la fase estacionaria temprana, excepto por la mutante del gen *crtS*, en la que se registró un nivel de expresión cerca de dos veces mayor al resto. Durante la fase estacionaria tardía, la

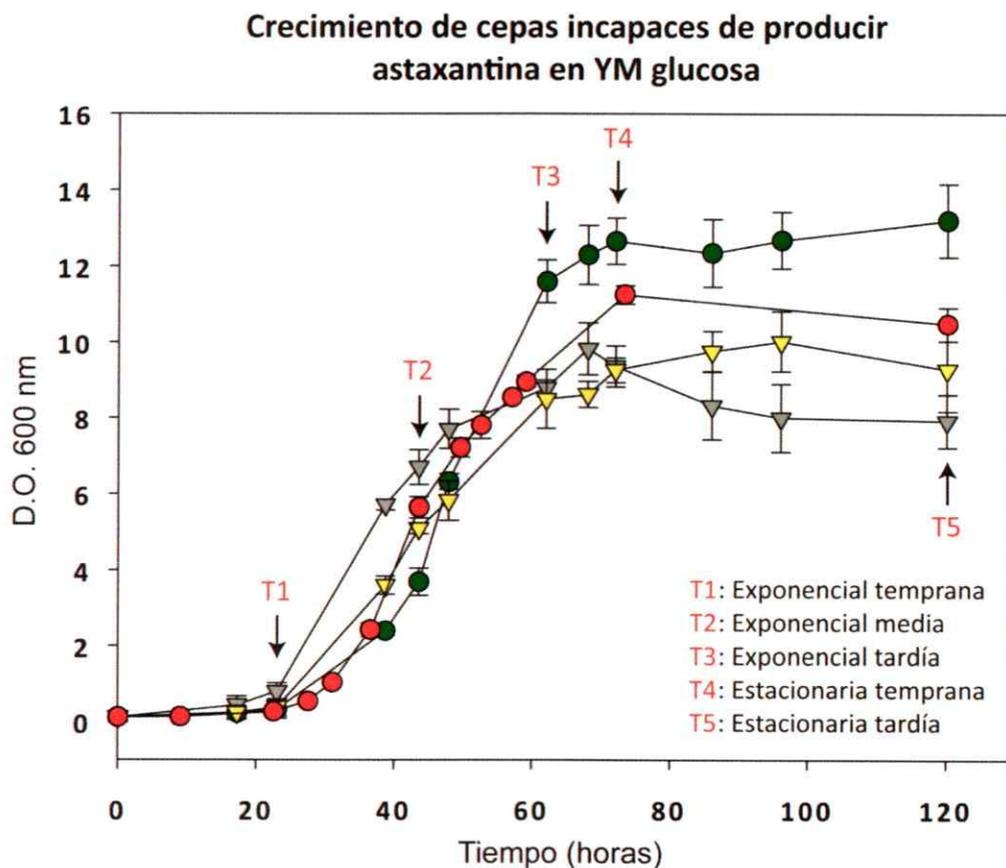


Figura 7. Crecimiento de cepas mutantes de *X. dendrorhous* incapaces de sintetizar astaxantina en medio completo suplementado con glucosa. Cepas mutantes de la ruta de biosíntesis de astaxantina de *X. dendrorhous* fueron crecidas en medio YM suplementado con glucosa (20 g/l final), registrando el aumento de densidad óptica a 600 nm, con el transcurso del tiempo. Las mutantes utilizadas fueron: *crtYB/crtYB* (●), *crtI/crtI* (▼) y *crtS/crtS* (▼). Adicionalmente se presenta como referencia el crecimiento de la cepa silvestre (●). En rojo se indican los tiempos en los cuales se colectaron muestras para determinar la expresión relativa de los genes de carotenogénesis. Las barras de error corresponden a la desviación estándar entre experimentos independientes (n=3).

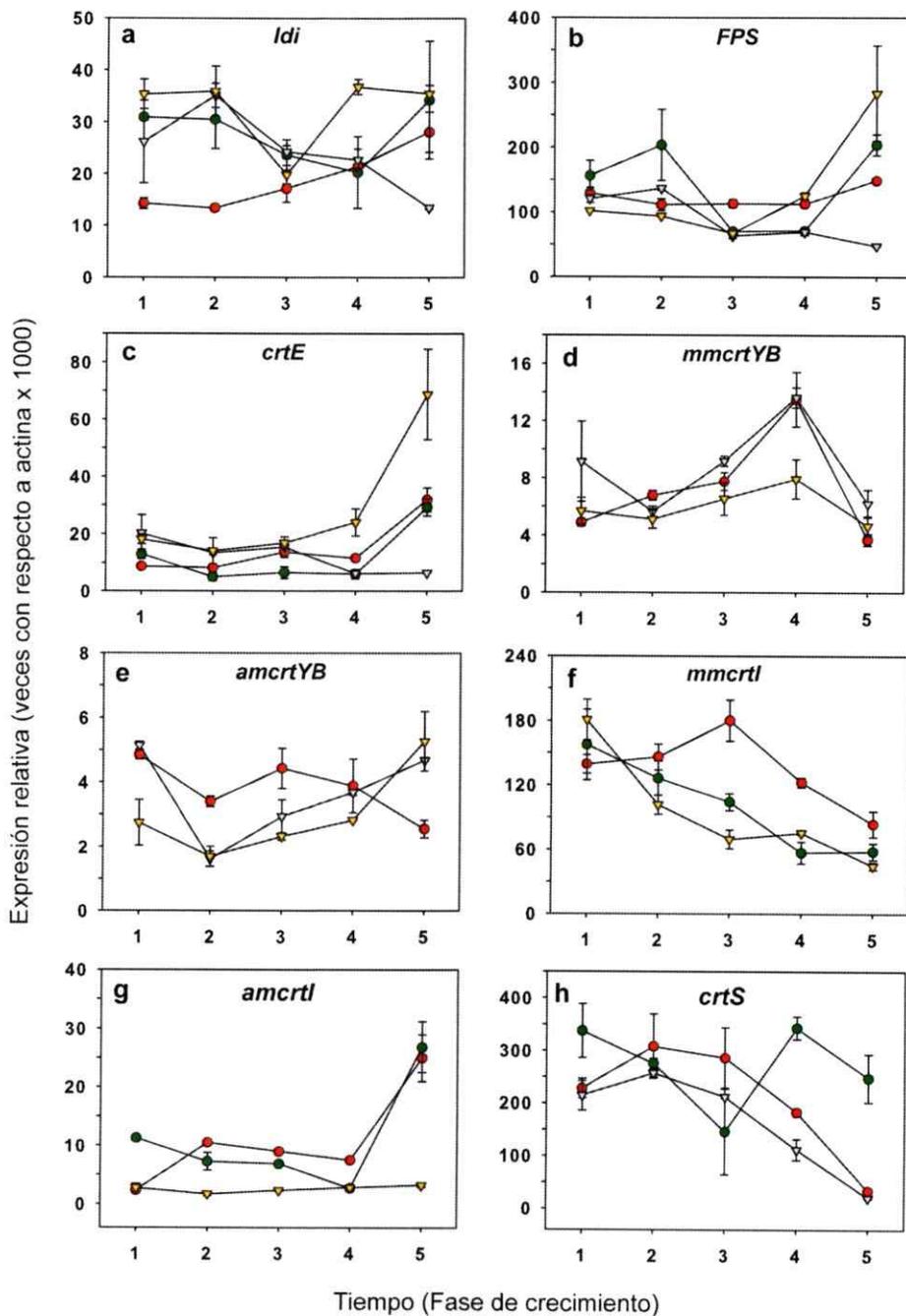


Figura 8. Cinética de expresión de los genes de carotenogénesis en cepas de *X. dendrorhous* incapaces de producir astaxantina. Se determinó la expresión relativa en distintas fases del crecimiento: exponencial temprana (1), exponencial media (2), exponencial tardía (3), estacionaria temprana (4) y estacionaria tardía (5), para las cepas mutantes *crtYB*^{-/-} (●), *crtI*^{-/-} (▼) y *crtS*^{-/-} (▼). *mm*: mensajero maduro, *am*: mensajero alternativo. Los valores de la cepa silvestre (●) fueron tomados de la Figura 6, e incluidos como referencia. Las barras de error corresponden a la desviación estándar entre experimentos independientes (n=3).

única cepa que mostró diferencias fue la mutante del gen *crtI*, en la cual los niveles de expresión del gen *idi* fueron cerca de dos veces menores que en el resto de los casos. Para el gen *FPS* (Figura 8b), los niveles de expresión resultaron ser similares en todas las cepas, durante las primeras cuatro fases de crecimiento. Sin embargo en la fase estacionaria tardía se registró una gran variación entre las distintas cepas. Lo anterior también es válido para el gen *crtE* (Figura 8c), donde sólo en la última fase se aprecian mayores variaciones, siendo la mutante del gen *crtI* la que presentó menores niveles de expresión. Cabe destacar que tanto el gen *fps* como el *crtE* mostraron un nivel anormalmente alto en la mutante del gen *crtS*, en la fase estacionaria tardía. Lo anterior sugiere que la acumulación de beta caroteno podría ser una señal que active la expresión de dichos genes. Una situación distinta ocurre con el gen *crtYB* (Figura 8d), donde el aumento en los niveles de expresión de la versión madura en la fase estacionaria temprana resultó ser menor en la mutante del gen *crtS*. Lo anterior constituye una evidencia adicional al posible rol regulador del β -caroteno, el que en este caso actuaría ejerciendo un feedback negativo sobre la expresión del gen que cataliza su síntesis. Por otra parte, el mensajero alternativo del gen *crtYB* (Figura 8e) y el mensajero maduro del gen *crtI* (Figura 8f) presentaron un nivel ligeramente menor en las mutantes incapaces de sintetizar astaxantina, durante las primeras 4 fases de crecimiento. En el caso del mensajero alternativo del gen *crtI* (Figura 8g) sólo se observaron diferencias mayores en la fase estacionaria tardía, donde presentó un nivel cerca de 7 veces menor en la mutante que acumula β -caroteno. Finalmente, en el caso del gen *crtS* (Figura 8h), su expresión fue similar en todas las cepas durante las primeras 4 fases de crecimiento. Sin embargo, durante la fase estacionaria éste presentó un nivel de expresión entre 5 y 10 veces mayor en la mutante del gen *crtYB*. En resumen, se observaron diferencias en la expresión de los genes estudiados entre

las distintas cepas analizadas, lo que sugiere que la capacidad de sintetizar astaxantina, o bien la proporción de intermediarios de la ruta presentes en la célula, influyen sobre dicha expresión. Si bien las diferencias encontradas son difíciles de interpretar, en general parece ser que la acumulación de β -caroteno causa una disminución en los niveles de expresión de los genes *crtYB* y *crtI*, y un ligero aumento en los niveles de expresión de los genes *FPS* y *crtE*, principalmente en fase estacionaria.

3.2 Efecto de la glucosa sobre la expresión génica en *X. dendrorhous*.

3.2.1 Obtención y caracterización de genes que puedan ser utilizados como controles de represión e inducción por glucosa.

Hasta la elaboración de este trabajo nunca se ha estudiado el efecto de glucosa sobre la expresión de ningún gen de *X. dendrorhous*, por lo que no se han reportado genes de esta levadura que sean inducidos o reprimidos por glucosa, que puedan ser usados como control para validar el diseño experimental a utilizar. Por este motivo decidimos buscar genes cuyos ortólogos de especies filogenéticamente relacionadas sean normalmente regulados por glucosa.

3.2.1.1 Glucose repressible gene (*grg2*)

En una primera instancia, la búsqueda en la base de datos de genes identificados de *X. dendrorhous* permitió hallar una secuencia anotada como *glucose repressible gene 2* (*grg2*, número de acceso AJ291824), obtenido a partir de la cepa silvestre CBS 6938. Al traducir el marco abierto de lectura (ORF) y analizarlo mediante BLASTp pudimos constatar que presenta homología con proteínas codificadas por genes reprimidos por

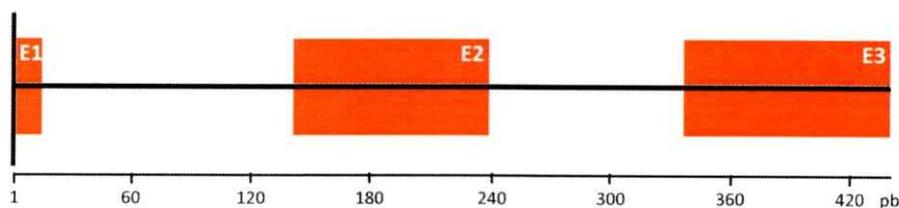
glucosa de diversos hongos. Además, el análisis de su región promotora reveló la presencia de sitios de unión al represor Mig1 similares a los encontrados en el promotor del gen *crtS*. De esta manera, el gen *grg2* resultó ser un buen candidato para comprobar si su expresión efectivamente es reprimida por glucosa. Considerando lo anterior, decidimos clonar, secuenciar y caracterizar el gen *grg2* de la cepa UCD 67-385. Para ello se diseñaron partidores utilizando la secuencia de *grg2* disponible en la base de datos (*grgFW1* y *grgRV1*, Tabla I), de modo de amplificar dicho gen por PCR a partir de DNA genómico de la cepa UCD 67-385. Luego de amplificar por PCR, la banda correspondiente fue purificada, clonada en el vector pBluescript y posteriormente secuenciada. La secuencia obtenida (Figura 9a) fue depositada en la base de datos GenBank (número de acceso JN043364). La reciente secuenciación del genoma de *X. dendrorhous* impulsada por nuestro laboratorio permitió posteriormente ampliar la región de secuencia conocida donde se sitúa este gen.

El análisis de secuencia reveló que el gen *grg2* de la cepa UCD 67-385 es idéntico a su contraparte de la cepa CBS 6938 y posee una región codificante de 222 pb, la cual a su vez sería traducida en una proteína de 73 aminoácidos. Adicionalmente, al analizar la región promotora se comprobó que los potenciales sitios de unión al regulador Mig1 presentes en la cepa CBS 6938 también están presentes en la cepa UCD 67-385 (Figura 9a). Al analizar la estructura exón-intrón se determinó que el gen *grg2* consta de 3 exones y 2 intrones (Figura 9b). Finalmente, al traducir la región codificante y compararla con la base de datos mediante la aplicación Blastp, se pudo constatar que presenta una alta identidad con proteínas codificadas por genes reprimidos por glucosa de diversos organismos (Figura 9c).

a. Secuencia DNA genómico

AGGGAAGCGCCTCGTATGCGGGTGTGTGTACGTGTACCTGTACGCGTATGTACGTGAGCGGAGCGCGCTCGAG
 GTATATGCGTTCCGCGAACTGCGGAGATGTGACGTACATCTCGTCACAGCTCATCACATGACGTGCGTCCAA
 CTTAGATGAGCGATCGATATGATGACGGCTGTGTGCTTGTGCCTTGTTCCTGACCGGGCTCGACTGTGCA
 ACGAGCGGACAGAGATGCCGGCGAGATGGGCTGAGCTGTGACGACACGGTGGGACACGTTGAAGATTGACA
 GGGGTTTTTTCCTCCTTCGTCTGTATATAAGAAGGCCGGCTGGATGACATTGGGATTGCTTCTTCTTCCC
 TCTCACACACAAAGCAATTCTCACTTCTCACTCTCACTCTCAACCAACCAACCACCCAAACAAACACCAAT
 CTTTCACAATGGAGTCCATCAAGGTTCTTCTTCTCCTATCTCATTTCGTTGGATCCCTTCTTCATC
 CACCCACCTATCCATCCTTTCAGCCTCCTGTGTAGGTTGGTGTGCTTACCTTTTATCTACTCTCTTTC
 TATAGACCTCTGTACCAACGCCCAACTACGTCGCCGAGACCGTCAACTCTGCCACCGCCACCATTCCA
 AGGAGGCCAACAAAGGAGTTGCCAAGGACTCGTAAGTATCTTTTTTCCCATCTCCACCAGCACAGCTCCGTT
 CTATATACACGCGAACGTCCTTCTGACTCTTCTGTTCACTTTTTCTCATTATTAGTAACGCCGGAGTTGG
 AACCCGAATCAATGCCGGTATTGACGCCCTTGGAGACAAGGCCGACGAGTCTCGTCTGACGCCAAGGCCCT
 TGCTCACAAGCAGGCCATCTAAGCCTCTTCTGCTAGCTCTCACATTGTGTATGAATCTGAATTGTAGTCT
 ATATCTATATGACAATACCTTGAATCATTTTCGTGCCAACGTTCCGCATGCCTAAAACACATTACACAAA

b. Estructura Exón-Intrón



c. Búsqueda de genes ortólogos mediante blastX (región codificante)

Nombre de la secuencia	Score	Identidad	E-value
Grg2 protein [<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>]	104	100%	3e-21
Grg1 protein [<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>]	95.5	87%	2e-18
Grg1 protein [<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>]	72.4	74%	2e-11
Glucose-repressible gene protein [<i>Verticillium albo-atrum</i>]	70.9	72%	6e-11
Glucose-repressible gene-1 protein [<i>Sordaria macrospora</i>]	67.4	68%	6e-10
Glucose-repressible gene protein [<i>Botryotinia fuckeliana</i>]	67.4	68%	6e-10

Figura 9. Caracterización estructural del gen *grg2* de *X. dendrorhous* (cepa UCD 67-385).

A: Secuencia de la región promotora y la región codificante del gen *grg2* (los exones se encuentran subrayados). El codón de inicio (ATG) se presenta en rojo, mientras que los sitios Mig1 predichos se muestran encuadrados. B: Estructura exón-intrón determinada al comparar las secuencias de DNA genómico y cDNA. C: Genes ortólogos con mayor identidad al gen *grg2* de *X. dendrorhous* presentes en la base de datos no redundante, encontrados usando la aplicación BlastX.

3.2.1.2 Gen que codifica para la enzima Piruvato decarboxilasa (PDC).

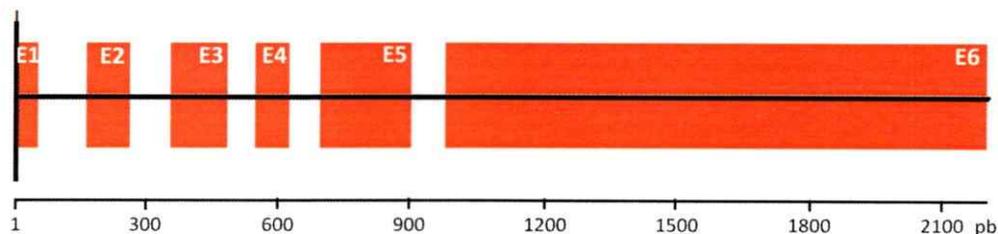
Además de un control de represión por glucosa, quisimos contar con un control de inducción por el mencionado carbohidrato. La búsqueda en la base de datos de genes publicados de *X. dendrorhous* no permitió encontrar ningún gen con estas características. Sin embargo, previamente en nuestro laboratorio se construyó una genoteca de cDNA de la levadura crecida en glucosa como única fuente de carbono, a partir de la cual se identificaron cerca de 50 genes no descritos hasta ese entonces (Marcoleta 2007). Entre ellos, se encontró el gen *PDC* que codifica para la enzima glicolítica piruvato decarboxilasa, la cual participa en el proceso fermentativo de producción de etanol a partir de piruvato. Diversos estudios han demostrado que la expresión de dicho gen es inducida por glucosa en distintos hongos filamentosos y levaduras (Kellermann y Hollenberg 1988; Pronk y col. 1996; Skory 2003; Fredlund y col. 2006), por lo que decidimos caracterizar el gen *PDC* de *X. dendrorhous* para su utilización como control en el estudio del efecto de la glucosa sobre la expresión génica. Para ello, se usó la secuencia de cDNA obtenida anteriormente para diseñar partidores que permitieran amplificar el gen *PDC* a partir de DNA genómico de la cepa UCD 67-385 (PDCatg y PDCstop, Tabla I). Luego de la amplificación por PCR se obtuvo una banda de 2,2 kb, la cual fue clonada en el vector pBluescript y posteriormente secuenciada. Luego, cuando la secuencia del genoma estuvo disponible, se amplió la región de secuencia conocida donde se sitúa este gen y se publicó en la base de datos GenBank (número de acceso HQ694557). El análisis de la secuencia de DNA genómico y la comparación con la secuencia de cDNA permitieron determinar que el gen *PDC* posee una región codificante de 1,8 kb (Figura 10a), consta

a. Secuencia región codificante (nº acceso Genbank [HQ694557](#))

ATGCCTGCCGCTACCTGATCAGATCTCCATCTCCGAGTACTTGCTCGCCGACTCAACCAGCTCAAGGTCAAGACCATCTTCGGTG
 TCCCCGGAGATTTCAACCTCGAGTTCCTGGACTACATCGAGGCTTCCCCGATTTACCTGGGCCGGAAACGCCAATGAGTTGAACGC
 CTCTTAGCCGCCGATGGTTACGCTCGAGTCTCCAAGGGACTTGCCTCGTCCACCCTTCGGTGTCCGAGAGCTCAGTGTCTC
 TGTGGAGTCCGCCGAATGATGTCCGAGCGACTTCCCCTTCTCCATATGTCCGAGTTCCCAACAACAAGCTCCAGTCCCAGAAGGCTC
 TTCTTACCACACCCTTGGTGACGGAGGATTCAACGAGTTCGAGGACATGAGCGCCAAGATCTCTGCTCACACCCGGCAAGCTTACTCG
 AGCCGAGAACGCCGGTTCAGATCATCGACGATCTCATCAAGGTTGCCCTTCGAGAGTGGCCGACCTGTTTACTTGAACCTTCCCCACCGAT
 CTCTTCCACGTCAAGATCTCCTCTGCGGCTCTCAACACTGAGCTGCCACTCCTCTCTCCGCTCCCTTCGTTGCCCCCTTGGACA
 CGATCAAGACCACCCCGGCTGTCCGAGGATGTCTCAACAAGGTCGTCAGATGTACAAGGACAGTGTGATCCCATCGTCTCTGTCGA
 CGCCTGTGCTTCCCGATTCCGAATGGAGCGCGCGTTCAGGAGCTTGTGAGAAGACCGACATGACCTTCTACGAGACTCCCATGGGT
 AAGGCCACTATGGATGAGACCCACCCTAACCTACGGAGGATGCTACATCGGAGCCAACTCCCTTCCCTCCGTTCCGACAGCTCGTCGAGA
 AGGCCGATCTCGTCTCTCCATGGGTGCTTTGCTCAGTGACTTCAACACCGGATCGTTCTCCTACTCTTTGGACTCCAGCCGAGTCGT
 CGAGCTTCACTCTGACCACGTCAAGATCGGATACGCTACCTACCCTGGAACTCTTTCCGAGACGTGCTCCACACTTGATCGAGAAG
 CTCGGACAGTTCCTGCAAGAAGGGATCTGACGCTGCCAACAAGGCTGAGGGTGAGGCTGCTGAGCAGAGGAAGGAGGCCGTCGAGG
 TGCCCAACACACCGAGATAGCGAGGACGACAAGAGGTTGGCAAGACTACCATCACCCAGAAAGCCTCTGGCCCGACTCGGAAA
 GTTCTCCAGAGTACGATGTGATGCTGAGACCGGTACTTCCGCTTCGTTGATTTCCCTACCCTAAGAAGCCCGCTC
 GCCTCGCCAGGTCCTTTGGGGAGCTATCGGATGGTCTGTTGGAGCCACCTTGGGAGCCGCGCTGCCGCTCGAGAGTCGGCCAGC
 CTGACCGACGAACGATCCTCTTGGGATGGATCCCTTCAGTTGACGATCCAGGAGATTGGTACCATGCTCCGACGAGGACTTTC
 TCCCTACATCTTTTCCTCAACAACGACGGATACGAAATCGAGCGACAGATCCACGGTGTCAAGGCTGTCTACAACGACATCCAGCCC
 TACAACCATCGCTCATCTCGACCTTTCGCTGGACCTCCCAAGGAGGGACAGGCTCTCAAGCACAAGTTCCACAAGGTCGCCACTC
 GAGATGAGCTCGATGCCTTGTGAAACAACAAGGAGTTCAGTCAGGAAACGCTTTGAACCTTGATCGAGGTATGATGCCCGAGATGA
 CGCCCCGAGCTCTCTCACACAGGCGAGCTTACCTCGAACCCAACTCTAGTTAA

Tamaño: 1,8 kb

b. Estructura Exón-Intrón



c. Búsqueda de genes ortólogos mediante blastX (región codificante)

Nombre de la secuencia	Score	Identidad	E-value
Pyruvate decarboxylase [<i>Cryptococcus neoformans</i>]	564	49%	2e-158
Pyruvate decarboxylase isozyme [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]	511	47%	1e-142
Pyruvate decarboxylase [<i>Candida glabrata</i>]	506	46%	4e-141
Pyruvate decarboxylase [<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>]	504	46%	2e-140
Pyruvate decarboxylase [<i>Pichia jadinii</i>]	501	46%	1e-139
Pyruvate decarboxylase 2 [<i>Scheffersomyces stipitis</i>]	497	45%	2e-138

Figura 10. Caracterización estructural del gen *PDC* de *X. dendrorhous*. A: Secuencia de la región codificante del gen *PDC*. B: Estructura exón-intrón determinada al comparar las secuencias de DNA genómico y cDNA. C: Genes ortólogos con mayor identidad al gen *PDC* de *X. dendrorhous* presentes en la base de datos no redundante, encontrados usando la aplicación BlastX.

de 5 intrones y 6 exones de tamaño variable, siendo el último particularmente extenso (Figura 10b). La traducción de la región codificante y la subsecuente comparación de la proteína deducida con la base de datos (mediante la aplicación Blastp) indicaron que posee hasta un 49% de identidad con enzimas piruvato decarboxilasas provenientes de organismos filogenéticamente relacionados (Figura 10c), además de compartir los dominios característicos de este tipo de enzimas como son el dominio de unión a pirimidinas y el dominio de unión al cofactor tiamina pirofosfato (TPP).

3.2.2 Efecto de la glucosa sobre la expresión de genes relacionados con la carotenogénesis en *X. dendrorhous*: ensayos de northern blot.

Inicialmente, cuando se decidió comenzar los estudios del efecto de la glucosa sobre la expresión de los genes de carotenogénesis, no se contaba con un equipo de PCR en tiempo real, por lo que la técnica elegida para llevar a cabo dichas investigaciones fue la de *northern blot*. Debido a lo laboriosa que resultó ser esa metodología, en un comienzo se planeó estudiar solo el caso del gen *crtS*, por ser el que codifica para la enzima que cataliza uno de los pasos más importantes de la ruta de biosíntesis de carotenoides. De esta manera, se diseñó una estrategia experimental para evaluar el efecto de la glucosa sobre la expresión de los genes *crtS*, *grg2* y *PDC* de *X dendrorhous*. Para esto, células de la cepa silvestre UCD 67-385 fueron crecidas en medio líquido YM sin glucosa, de modo que no exista producción de etanol, dado que este último podría influir sobre el fenómeno que se quiere estudiar. Una vez que el cultivo alcanzó la fase estacionaria fue dividido en dos, y a una de las mitades se le agregó glucosa hasta una concentración final de 20 g/l, mientras que la otra mitad no recibió tratamiento (control) (Figuras 11a, 12a y 13a). Una variación de esta estrategia

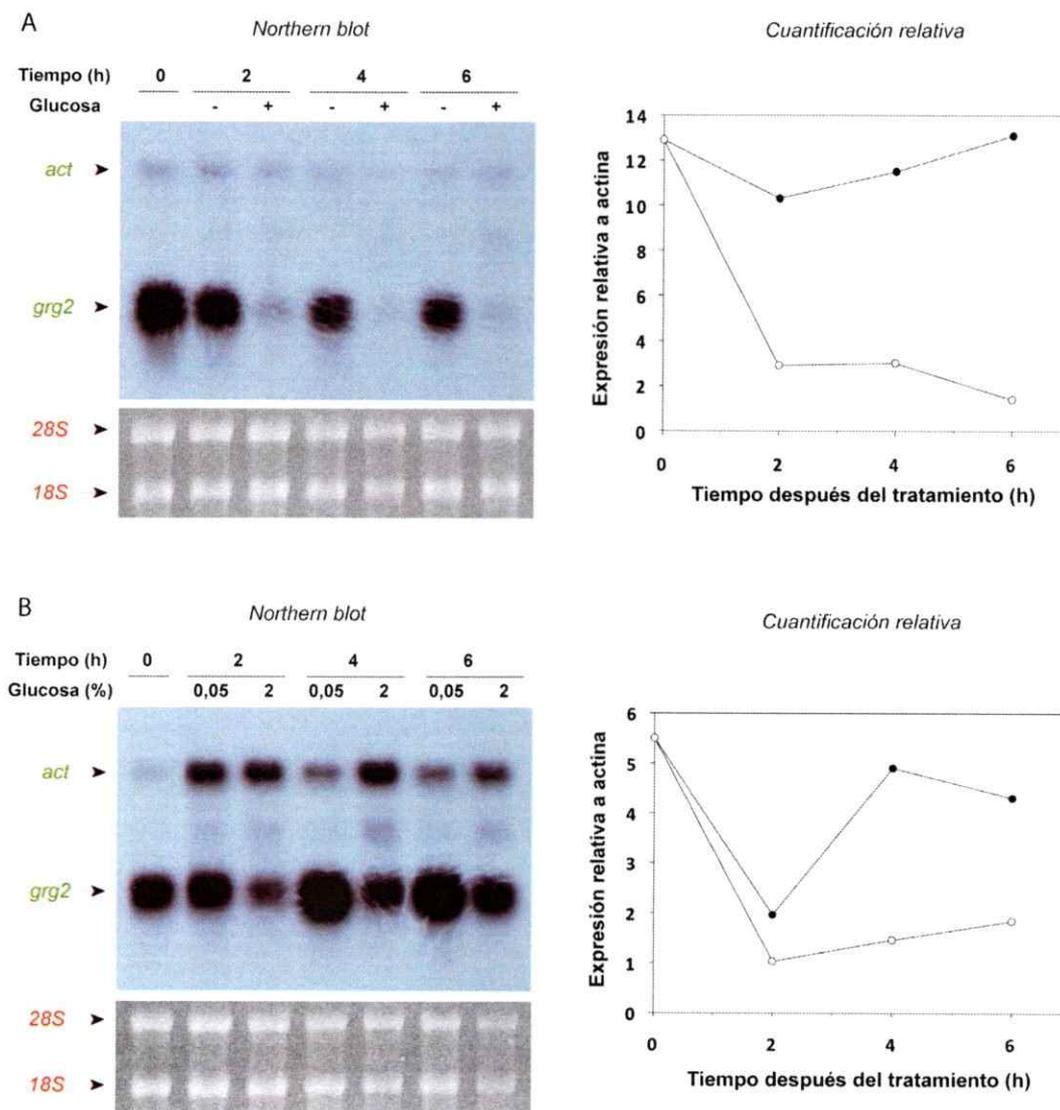


Figura 11. Evaluación por *northern blot* del efecto de la glucosa sobre la expresión del gen *grg2*. (A) Cultivos de *X. dendrorhous* (cepa silvestre) fueron crecidos en YM sin glucosa hasta fase estacionaria y posteriormente divididos en dos. A una mitad se le agregó glucosa (20 g/l final, ○) y la otra no recibió tratamiento (control, ●). (B) Cultivos de *X. dendrorhous* fueron crecidos en medio mínimo suplementado con 20 g/l glucosa hasta fase estacionaria. Posteriormente las células fueron cosechadas, lavadas y resuspendidas en medio fresco con 20 g/l (○) o 0,5 g/l (●) de glucosa. En ambos casos se colectaron alícuotas de células en cada condición a lo largo del tiempo, determinando la expresión relativa a actina mediante *northern blot*. Como control de carga se muestran las bandas de los rRNAs teñidas con bromuro de etidio.

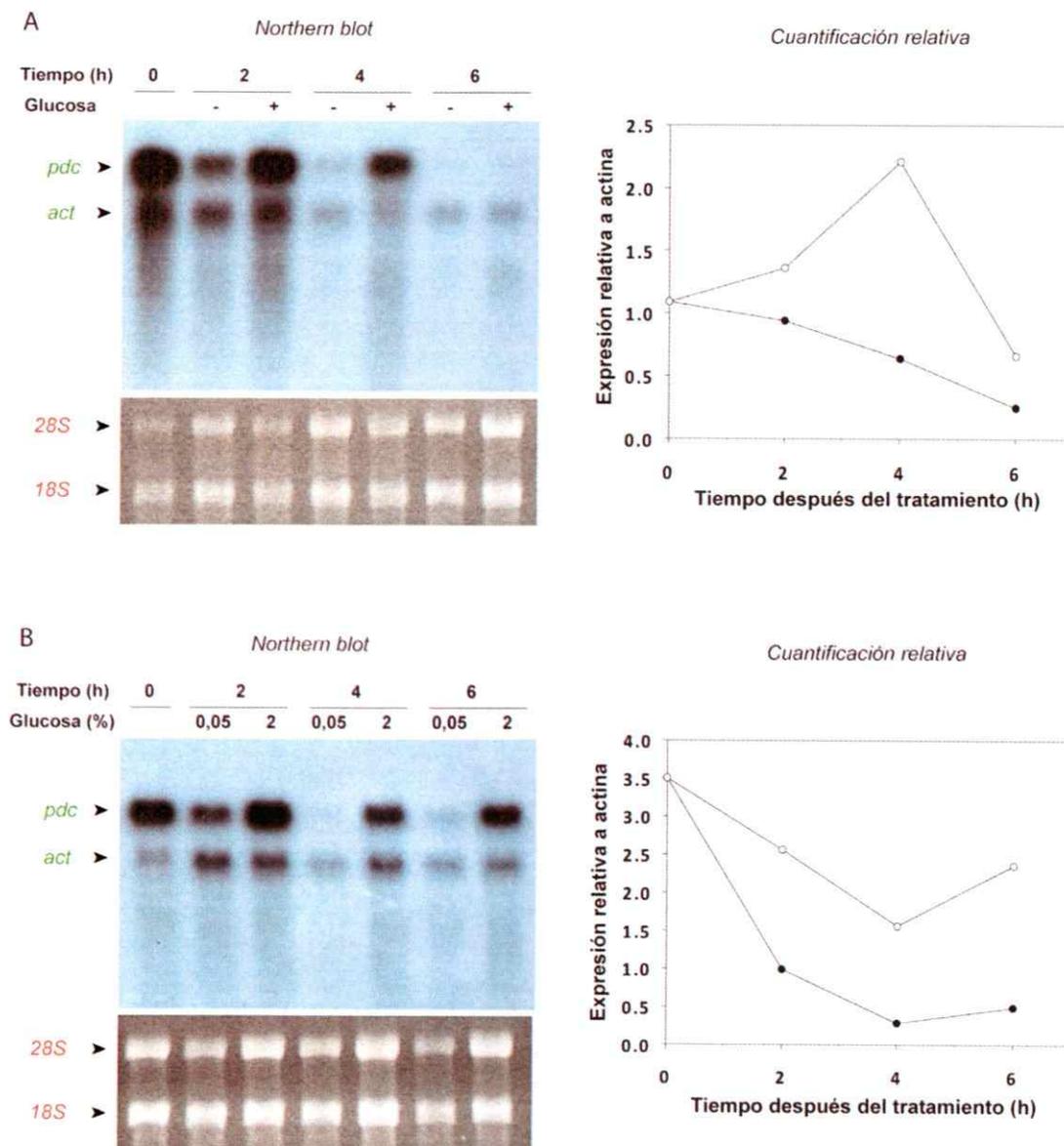


Figura 12. Evaluación por *northern blot* del efecto de la glucosa sobre la expresión del gen *PDC*. (A) Cultivos de *X. dendrorhous* (cepa silvestre) fueron crecidos en YM sin glucosa hasta fase estacionaria y posteriormente divididos en dos. A una mitad se le agregó glucosa (20 g/l final, ○) y la otra no recibió tratamiento (control, ●). (B) Cultivos de *X. dendrorhous* fueron crecidos en medio mínimo suplementado con 20 g/l glucosa hasta fase estacionaria. Posteriormente las células fueron cosechadas, lavadas y resuspendidas en medio fresco con 20 g/l (○) o 0,5 g/l (●) de glucosa. En ambos casos se colectaron alícuotas de células en cada condición a lo largo del tiempo, determinando la expresión relativa a actina mediante *northern blot*. Como control de carga se muestran las bandas de los rRNAs teñidas con bromuro de etidio.

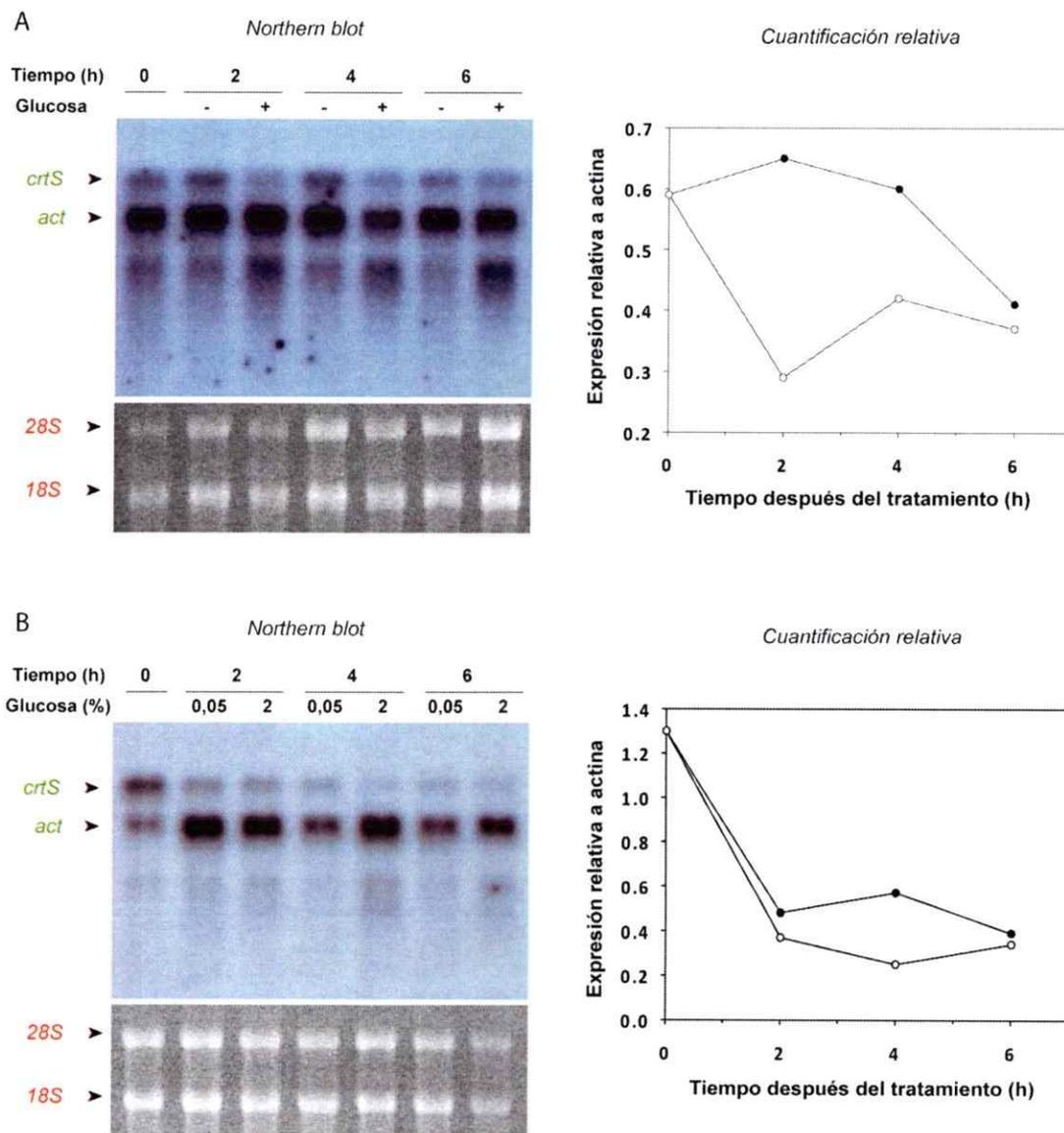


Figura 13. Evaluación por *northern blot* del efecto de la glucosa sobre la expresión del gen *crtS*. (A) Cultivos de *X. dendrorhous* (cepa silvestre) fueron crecidos en YM sin glucosa hasta fase estacionaria y posteriormente divididos en dos. A una mitad se le agregó glucosa (20 g/l final, ○) y la otra no recibió tratamiento (control, ●). (B) Cultivos de *X. dendrorhous* fueron crecidos en medio mínimo suplementado con 20 g/l glucosa hasta fase estacionaria. Posteriormente las células fueron cosechadas, lavadas y resuspendidas en medio fresco con 20 g/l (○) o 0,5 g/l (●) de glucosa. En ambos casos se colectaron alícuotas de células en cada condición a lo largo del tiempo, determinando la expresión relativa a actina mediante *northern blot*. Como control de carga se muestran las bandas de los rRNAs teñidas con bromuro de etidio.

consistió en crecer la levadura en medio mínimo suplementado con 20 g/l de glucosa hasta fase estacionaria, luego de lo cual las células fueron cosechadas, lavadas y posteriormente resuspendidas en medio mínimo fresco suplementado con 0,5 g/l o 20 g/l de glucosa (Figuras 11b, 12b y 13b). Posteriormente, ambas condiciones fueron incubadas a 22 °C con agitación constante, tomando muestras de células luego de 0, 2, 4 y 6 horas después de realizado el tratamiento. A partir de dichas muestras se extrajo RNA total, evaluando posteriormente la expresión relativa a actina mediante *northern blot*, usando sondas específicas para cada gen estudiado. Como control de carga se utilizaron las bandas correspondientes a los RNAs ribosomales 18 y 28 S.

En el caso del gen *grg2*, se pudo comprobar que la adición de glucosa causa una disminución de sus niveles de expresión en relación a actina, la cual fue estimada en cerca de 4 veces (Figura 11a). Un fenómeno similar se observa cuando *X. dendrorhous* es crecida en presencia de glucosa y luego se realiza un cambio de medio. En este caso, en la fracción de células incubadas en medio con baja concentración de glucosa (0,5 g/l), la expresión del gen *grg2* fue mayor que en la condición con alta concentración de glucosa (20 g/l), alcanzando una diferencia máxima de cerca de 5 veces luego de 4 horas de realizado el cambio de medio (Figura 12b).

El gen *PDC*, tal como se esperaba, mostró un aumento en sus niveles de expresión al agregar glucosa al medio. Dicho incremento alcanzó un máximo estimado en 3 veces luego de 4 horas después de agregado el azúcar (Figura 12a). Similarmente, al lavar e incubar las células en medio fresco, se observó que los niveles de expresión eran cerca de 4 veces mayores en alta concentración de glucosa (Figura 12b).

Finalmente, en el caso del gen *crtS* pudimos constatar que la adición de glucosa (20 g/l final) causa una disminución de cerca de 3 veces de su expresión relativa, alcanzando la máxima diferencia luego de 2 horas de agregado el azúcar (Figura 13a). De manera similar, al realizar el cambio de medio se observó que en altas concentraciones de glucosa la expresión del gen *crtS* era cerca de 3 veces menor que en bajas concentraciones de glucosa (Figura 13b).

Aunque las dos aproximaciones experimentales usadas para evaluar los efectos de la glucosa entregan resultados cualitativamente similares, hay algunas particularidades. Una de ellas es la gran diferencia en los niveles de expresión registradas entre el tiempo 0 y el tiempo 2 en los experimentos de cambio de medio. Esto podría deberse a que en este diseño experimental, el lavado de las células y la posterior resuspensión en medio fresco supone una gran cantidad de estímulos no controlados para las levaduras. De esta manera, con esta aproximación se están introduciendo variables no deseadas a la medición, y por lo tanto consideramos que no es la mejor forma de evaluar el efecto de la glucosa. Adicionalmente, al crecer las células en medio mínimo con glucosa hay producción de etanol, la cual puede tener un efecto propio sobre la expresión de los genes evaluados. Por lo anterior, para el resto de los experimentos decidimos usar exclusivamente la primera aproximación experimental, ésta es crecer las células hasta fase estacionaria en medio YM sin glucosa y posteriormente agregar el carbohidrato.

Si bien estos experimentos sirvieron como una primera evidencia para demostrar el efecto represor (para *grg2* y *crtS*) e inductor (en el caso de *PDC*) de la glucosa, por varios motivos estos resultados no fueron suficientemente concluyentes. En primer lugar, debido a las limitaciones de la técnica no seríamos capaces de detectar con

precisión pequeñas diferencias en los niveles de expresión, como las observadas en el caso del gen *crtS*. En segundo lugar, diferencias tan grandes en las manchas observadas al revelar las membranas de *northern* como las registradas en el caso del gen *grg2* (Figura 11a), dieron lugar a pequeñas diferencias en la cuantificación por densitometría. Este fenómeno acota aún más el rango de diferencias en los niveles de expresión que es posible resolver con esta técnica. En tercer lugar, dado que la adición de glucosa solo tuvo un efecto moderado sobre la expresión del gen *crtS*, consideramos que sería conveniente evaluar el efecto del azúcar sobre la expresión de otros genes de la ruta de carotenogénesis, y por lo tanto se requiere una técnica que permita realizar un mayor número de ensayos con alta precisión. Por los motivos anteriormente planteados decidimos complementar los resultados obtenidos por *northern blot* con mediciones usando RT-PCR cuantitativo.

3.2.3 Estudio del efecto de la glucosa sobre la expresión de genes de carotenogénesis en *X. dendrorhous* mediante qRT-PCR.

3.2.3.1 Estudios en la cepa silvestre UCD 67-385.

La posibilidad de utilizar ensayos de qRT-PCR permitió la realización de un estudio mucho más completo sobre la regulación de la ruta de carotenogénesis a nivel de la expresión génica. La rapidez de las mediciones realizadas con esta técnica permitió no solo analizar la expresión de muchos más genes, sino además ensayar un mayor número de variables y condiciones. Considerando lo anterior, decidimos incluir la medición de los niveles de expresión luego de 24 horas después de realizado el tratamiento, de modo de contar con información sobre qué sucede con la respuesta a más largo plazo.

Antes de realizar las mediciones fue necesario diseñar partidores para amplificar los genes control (*grg2* y *PDC*). Para ello se utilizó la misma estrategia que para el resto de los partidores empleados en los ensayos de qRT-PCR. Sus principales características se encuentran resumidas en la Tabla I (*grgreal*, *PDCreal*). Luego, se realizaron las curvas estándar de amplificación para determinar la eficiencia de cada pareja de partidores (Figura 14) y se comprobó la no formación de dímeros de partidores analizando las curvas de melting. Tanto los partidores para *grg2* como los para *PDC* resultaron tener una buena eficiencia de amplificación (93% y 95%, respectivamente), y en ninguno de los dos casos se observó formación de dímeros.

Una vez caracterizados los oligonucleótidos para amplificar los genes control, se procedió a determinar el efecto de la glucosa sobre sus niveles de mRNA. Para ello se utilizó una estrategia similar a la empleada en los ensayos de *northern blot*. Así, cultivos de *X. dendrorhous* (cepa silvestre) fueron crecidos en medio YM sin glucosa hasta fase estacionaria, y posteriormente divididos en dos. A una de las fracciones se le agregó glucosa (20 g/l final) y la otra no recibió tratamiento (control). Luego de eso, las células fueron incubadas con agitación constante a 22 °C, colectando alícuotas luego de 2, 4, 6 y 24 horas después de efectuado el tratamiento. A partir de estas alícuotas se extrajo RNA y se determinó la expresión relativa al control (normalizada por la expresión de actina) mediante qRT-PCR, usando el algoritmo del $\Delta\Delta Ct$ (Livak y Schmittgen 2001). Al evaluar de esta manera la expresión de los posibles controles comprobamos que glucosa causa una disminución de ~130 veces en los niveles de mRNA de *grg2* con respecto a la situación control, luego de 4 horas después de agregado el azúcar (Figura 15). Una vez transcurridas 24 horas post tratamiento, el efecto represor no fue observado. Por otra parte, de acuerdo a lo esperado, la adición

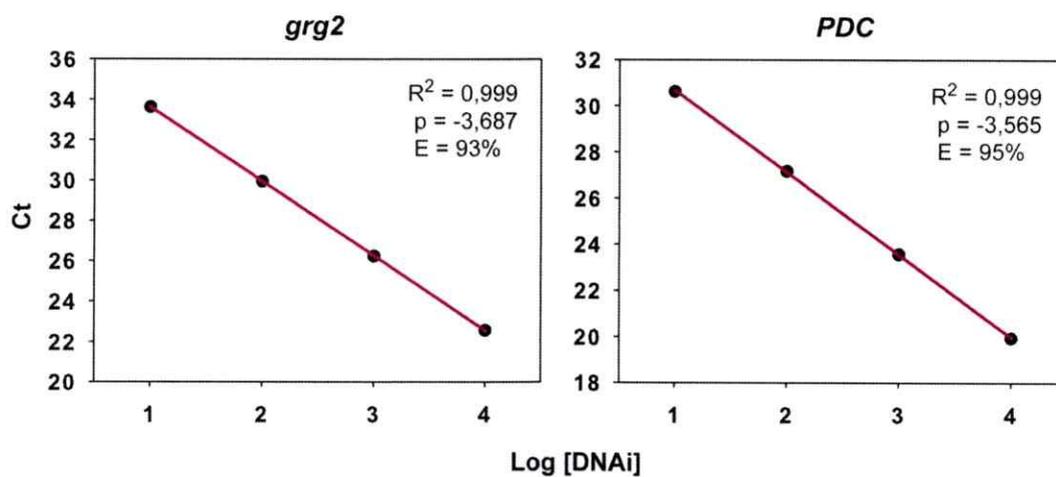


Figura 14. Curvas de calibración de los partidores utilizados para la determinación de la expresión relativa de los genes control mediante qRT-PCR. Ct: Ciclo al cual se alcanza el umbral de amplificación; [DNA]_i: concentración inicial de DNA blanco; p: pendiente de la recta trazada a partir de la gráfica; R^2 : coeficiente de correlación; E: eficiencia de amplificación.

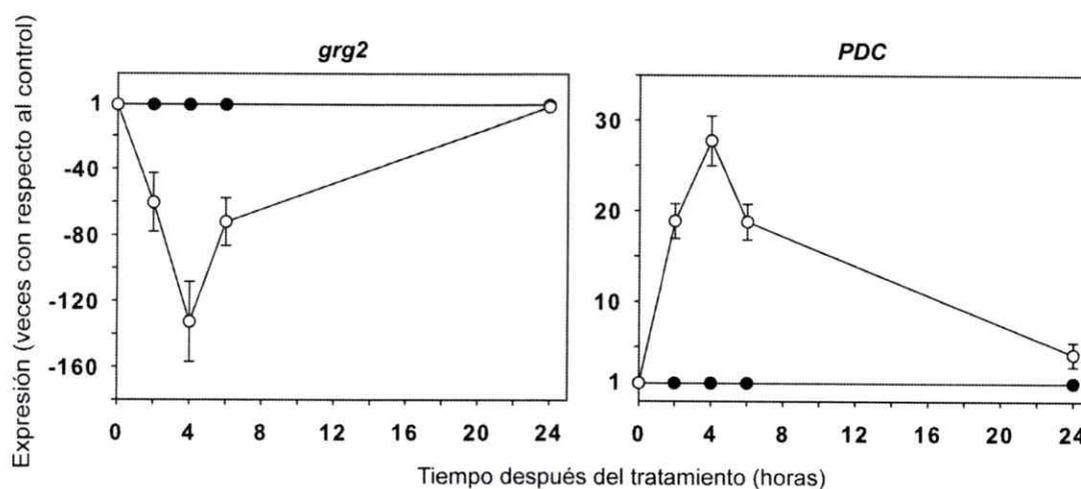


Figura 15. Determinación por qRT-PCR del efecto de la glucosa sobre la expresión de los genes *grg2* y *PDC*. Cultivos de *X. dendrorhous* (silvestre) fueron crecidos hasta fase estacionaria y posteriormente divididos en dos. A una parte se le agregó glucosa (20 g/l final, ○) y la otra no recibió tratamiento (control, ●). Se determinaron los niveles de mRNA en glucosa con respecto al control de los genes *grg2* y *PDC*. Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=3). Los valores negativos en el eje de las ordenadas denotan una disminución con respecto al control.

de glucosa causó un aumento de ~30 veces de los niveles de mRNA de *PDC*, alcanzando un máximo de inducción luego de 4 horas de agregado el azúcar (Figura 15). De esta manera demostramos que la expresión de *grg2* es reprimida por glucosa, mientras que la expresión de *PDC* es inducida en respuesta a la adición del azúcar al medio.

Una vez que se caracterizó la expresión de genes que puedan ser usados como controles, determinamos el efecto de la adición de glucosa sobre la expresión de los genes de carotenogénesis *crtE*, *crtYB* (alternativo y maduro), *crtl* (alternativo y maduro) y *crtS*; y de biosíntesis de precursores de carotenoides *idi* y *FPS*. Para esto se utilizó una estrategia idéntica a la usada para los genes control.

Al determinar la expresión relativa al control mediante qRT-PCR, pudimos constatar que los niveles de mRNA de los cuatro genes de carotenogénesis analizados disminuyen significativamente al agregar glucosa al medio (Figura 16). En el caso del gen *crtE*, la disminución en los niveles de mRNA es de cerca de 10 veces, luego de 2 horas de tratamiento (Figura 16c). La represión cesa lentamente y es observada aún después de 24 h, aunque con menor intensidad. Con respecto al gen *crtYB*, tanto para el transcrito maduro como para el alternativo, el efecto represor es máximo luego de 4 horas de agregado el azúcar, y desaparece dentro de las 24 horas posteriores, mostrando incluso un ligero aumento (Figura 16d). Curiosamente, el efecto de la glucosa es significativamente mayor sobre el mensajero alternativo (~18 veces) que sobre el mensajero maduro (~6 veces), lo cual resulta interesante considerando que ambos mensajeros son transcritos a partir del mismo promotor. Una situación similar ocurre en el caso del gen *crtl*, donde la disminución en los niveles de mRNA de la versión alternativa (~40 veces) es muy superior a la observada en el caso de la versión

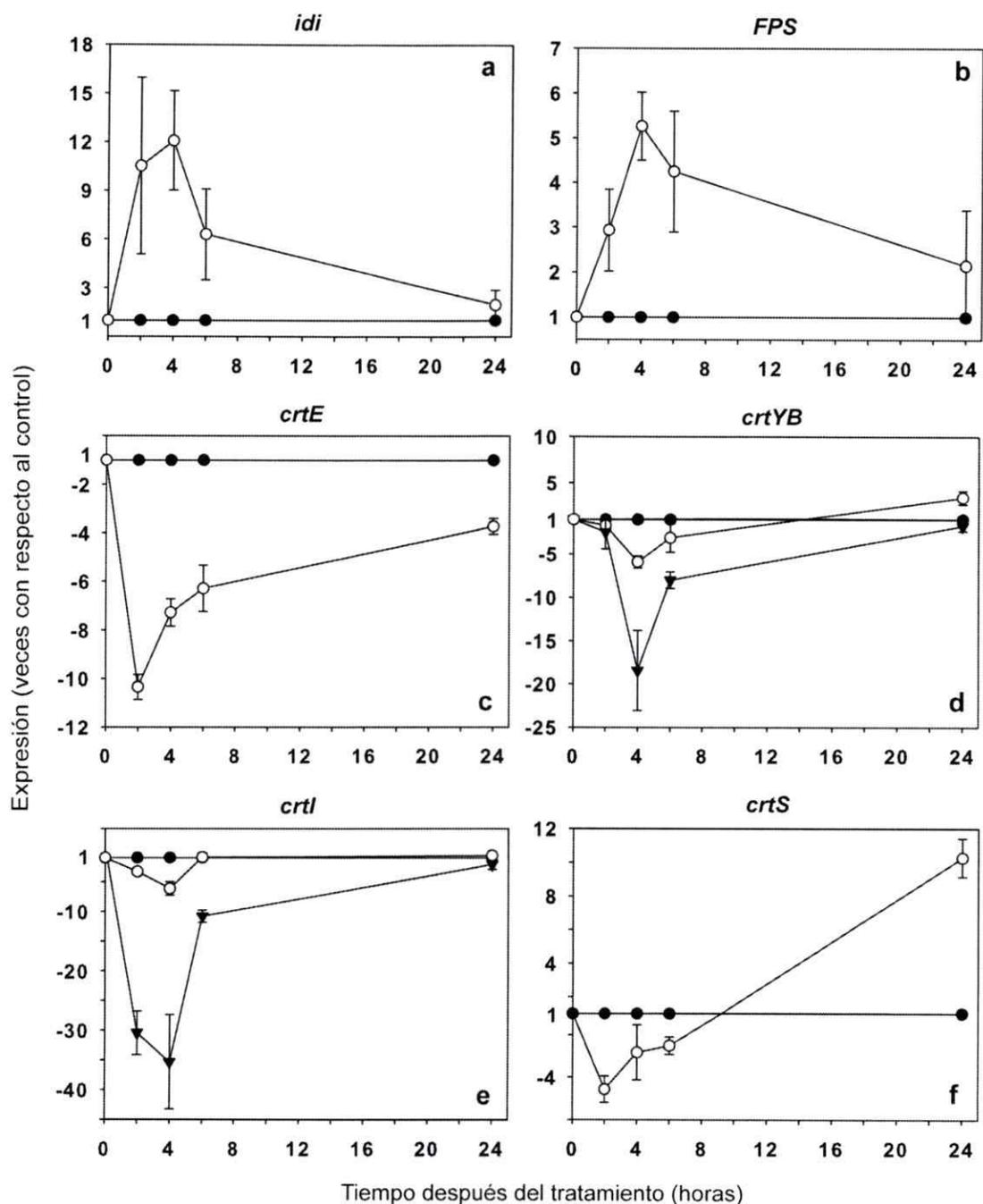


Figura 16. Determinación por qRT-PCR del efecto de la glucosa sobre la expresión de genes relacionados con la carotenogénesis en *X. dendrorhous*. Cultivos de *X. dendrorhous* (silvestre) fueron crecidos hasta fase estacionaria y posteriormente divididos en dos. A una parte se le agregó glucosa (20 g/l final, ○) y la otra no recibió tratamiento (control, ●). Se determinaron los niveles de mRNA en glucosa con respecto al control de los genes de carotenogénesis *crtE* (c), *crtYB* (d, mensajero alternativo: ▼; mensajero maduro: ○), *crtI* (e, alternativo: ▼; maduro: ○) y *crtS* (f), y de los genes de biosíntesis de precursores de carotenoides *idi* (a), y *FPS* (b). Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=3). Los valores negativos en el eje de las ordenadas denotan una disminución con respecto al control.

madura (~6 veces) (Figura 16e). Para ambos transcritos el efecto represor desaparece rápidamente, y no es detectable luego de 24 horas de la adición del azúcar. En el caso del gen *crtS*, el efecto de la glucosa es menor, alcanzando una disminución de los niveles de mRNA de ~4 veces luego de 2 horas después del tratamiento (Figura 16f). Interesantemente luego de 24 horas de agregado el azúcar la expresión del gen *crtS* aumenta significativamente (~10 veces).

Al analizar el efecto de la glucosa sobre los genes de síntesis de precursores de carotenoides pudimos constatar que, a diferencia de lo visto con los genes de carotenogénesis, tanto el gen *idi* como el *FPS* son inducidos por glucosa (~12 y ~5 veces, respectivamente), recuperando sus niveles de mRNA normales luego de 24 horas (Figuras 16a y 16b), lo cual es esperable considerando que la expresión de ambos genes sería requerida para el metabolismo primario y la generación de biomasa.

Un fenómeno común en todos los casos estudiados es el rápido retorno de los niveles de mRNA a su condición basal. Dicha observación podría ser explicada por el agotamiento de la glucosa agregada al medio y la consecuente disminución del efecto represor causado por dicho agente. Para evaluar esta posibilidad, se determinó la cantidad de azúcar remanente a lo largo del tiempo en el experimento anterior (Figura 17, ■). Los resultados indican que el consumo de glucosa muestra una cinética mucho más lenta que el retorno de los niveles de mRNA a su condición basal. En la mayoría de los genes estudiados, se observa que la respuesta a la adición de glucosa (20 g/l final) transcurre principalmente dentro de las 6 primeras horas después del tratamiento, lapso en el cual se ha consumido solo una quinta parte de ésta, quedando aún en el medio de cultivo aproximadamente 16 g/l de glucosa. Considerando lo anterior,

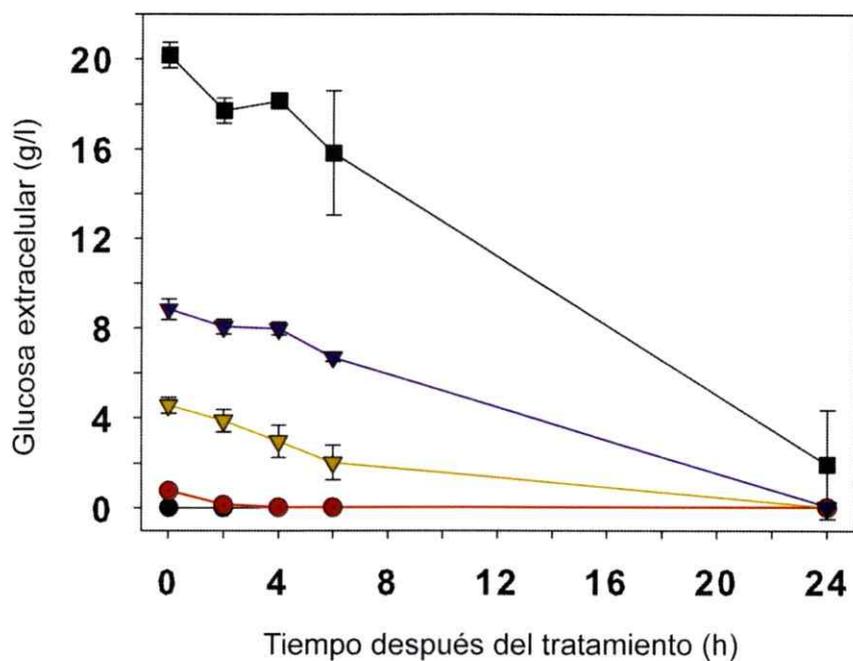


Figura 17. Cuantificación de la glucosa remanente en el medio extracelular en los experimentos de dosis-respuesta a glucosa. Se cuantificó la glucosa remanente en el medio extracelular en los experimentos de dosis-respuesta a glucosa (Figura 19) luego de dar un pulso de glucosa de 20 (■), 10 (▼), 5 (▼) y 1 g/l (●), además de la situación control (●) que no recibió tratamiento. Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=3).

evaluamos si concentraciones menores de glucosa eran capaces de generar una respuesta de represión. Para esto, se determinó la expresión relativa de los genes de carotenogénesis luego de adicionar glucosa hasta una concentración final de 10, 5 y 1 g/l, comparado con la situación control. En el caso de los genes control (Figura 18a), la respuesta de represión fue observable incluso al agregar glucosa a una concentración de 1 g/l final, aunque ésta resultó ser de una magnitud inferior a la registrada con mayores concentraciones del azúcar. En el caso de los genes *idi* y *FPS* (Figura 18b), se observó que la respuesta de inducción es apenas detectable a la concentración de glucosa mínima ensayada (1 g/l). Mientras que para el gen *idi* se observó que la magnitud máxima de represión es proporcional a la concentración de glucosa, para el gen *FPS* todas las concentraciones sobre 1 g/l mostraron un efecto de magnitud similar.

Al estudiar este fenómeno sobre los genes de carotenogénesis (Figura 19), se observó una clara proporcionalidad entre la concentración de azúcar y la magnitud máxima del efecto represor. Sin embargo, para todas las concentraciones de glucosa analizadas, la cinética de la respuesta se mantuvo prácticamente invariable, al igual que en el caso de los genes control y de los genes de síntesis de precursores de carotenoides (Figura 18). Por otra parte, al usar una concentración de 1 g/l de glucosa, la expresión de los genes de carotenogénesis no varió en comparación a la situación control, a diferencia de lo observado con la inducción del gen *PDC* y la represión del gen *grg2* (Figura 18a). De este modo, fue posible establecer que la concentración umbral de glucosa para que el efecto represor de dicho agente sobre los genes de carotenogénesis sea observable se encuentra en torno a 1 g/l.

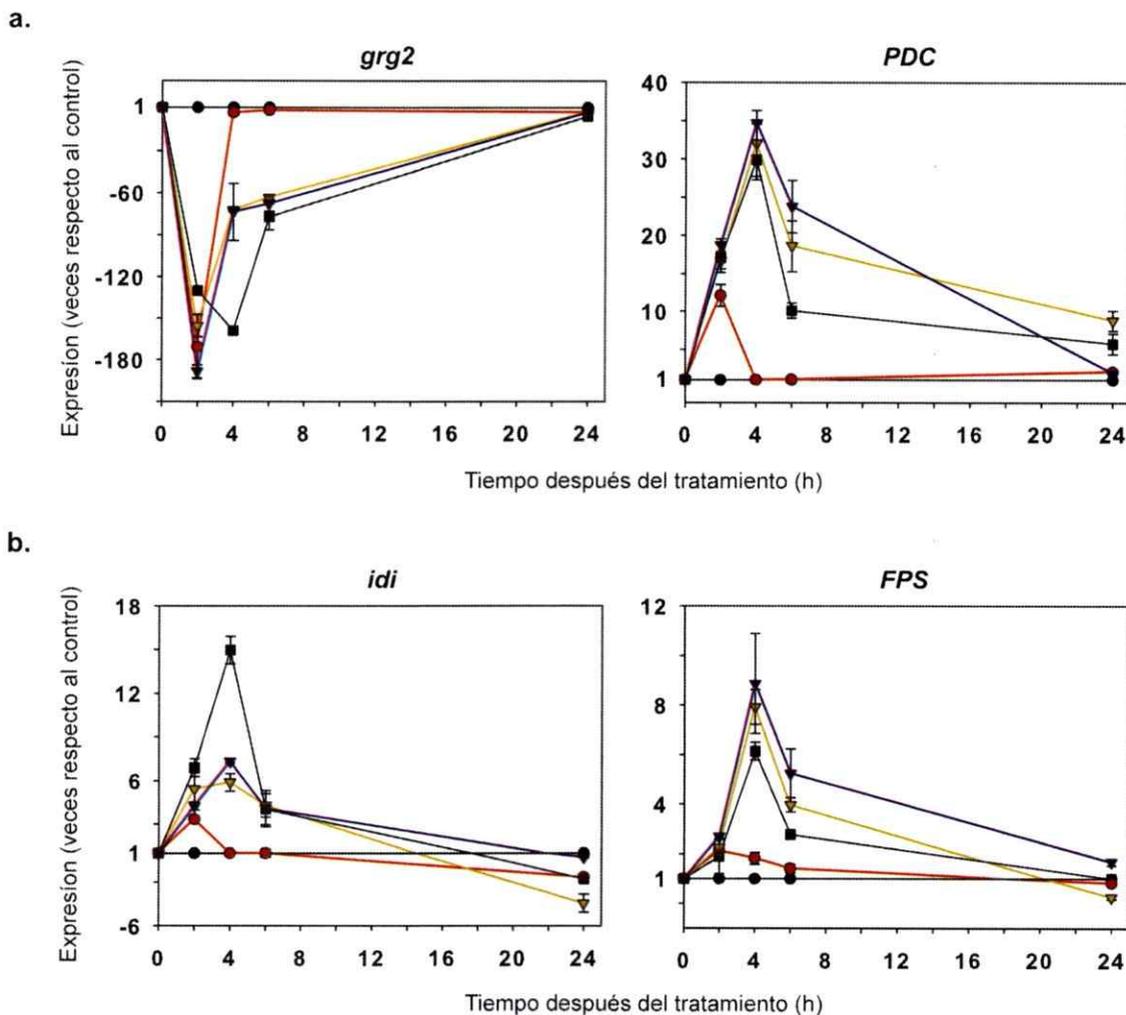


Figura 18. Efecto de la concentración de glucosa sobre la respuesta transcripcional causada por este agente en los genes *grg2*, *PDC*, *idi* y *FPS*. Cultivos en matraces de la cepa UCD 67-385 fueron crecidos hasta fase estacionaria y posteriormente divididos en cinco. A cada alícuota se le agregó glucosa hasta una concentración final de 20 (■), 10 (▼), 5 (▼) y 1 g/l (●), además de la condición control que no recibió tratamiento (●). Posteriormente se determinó la expresión relativa de los genes control *grg2* y *PDC* (a), y de los genes de síntesis de precursores de carotenoides *idi* y *FPS* (b), luego de 2, 4, 6 y 24 h después del tratamiento. Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=3). Los valores negativos en el eje de las ordenadas denotan una disminución con respecto al control.

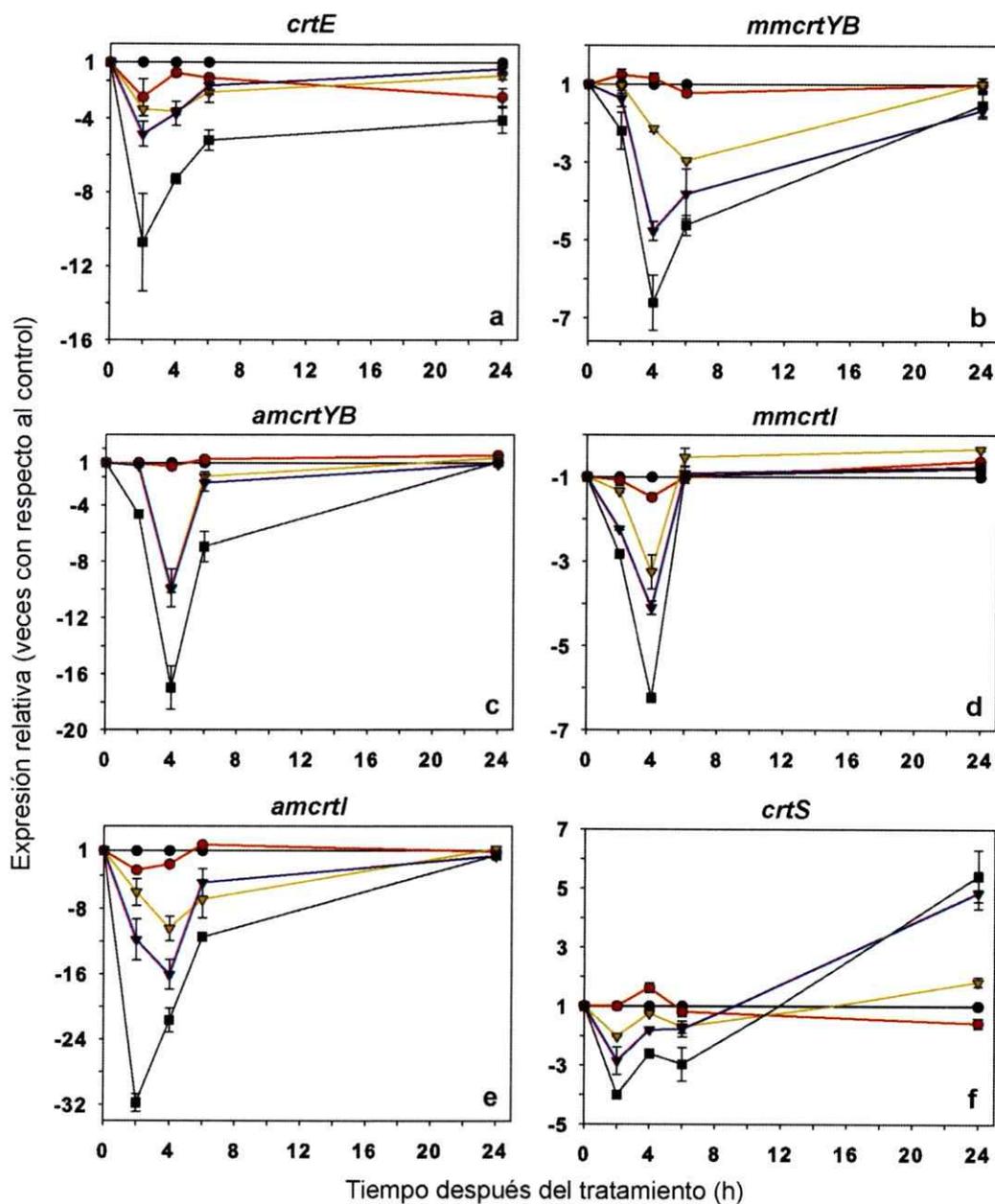


Figura 19. Efecto de la concentración de glucosa sobre la respuesta transcripcional causada por este agente en los genes de carotenogénesis. Cultivos en matraces de la cepa UCD 67-385 fueron crecidos hasta fase estacionaria y posteriormente divididos en cinco. A cada alícuota se le agregó glucosa hasta una concentración final de 20 (■), 10 (▼), 5 (▼) y 1 g/l (●), además de la condición control que no recibió tratamiento (●). Posteriormente se determinó la expresión relativa de los genes *crtE* (a), *crtYB* (b,c), *crtl* (d,e) y *crtS* (f), luego de 2, 4, 6 y 24 h después del tratamiento. Las barras de error corresponden a la desviación estándar ($n=3$). Los valores negativos en el eje de las ordenadas denotan una disminución con respecto al control.

El hecho de que la cinética de la respuesta transcripcional de todos los genes no varíe al cambiar la concentración de glucosa adicionada inicialmente, sugiere que el retorno a la condición basal de expresión es independiente de la cantidad de azúcar remanente en el medio de cultivo. Para indagar más al respecto se determinó la concentración de glucosa extracelular a distintos tiempos en todas las concentraciones iniciales del azúcar estudiadas (Figura 17). De esta manera observamos que luego de 6 horas después del tratamiento aún queda más del 60% de la glucosa agregada en todos los casos. Así, una vez que la glucosa ha causado la disminución de los niveles de mRNA, el retorno a los niveles iniciales de expresión no depende completamente de la cantidad de glucosa remanente en el medio de cultivo.

3.2.3.2 Efecto de glucosa sobre la expresión de los genes de carotenogénesis en cepas mutantes de la ruta de biosíntesis de astaxantina.

Los resultados anteriormente descritos muestran que la completa inhibición de la síntesis *de novo* de pigmentos causada por una alta concentración de glucosa, coincide temporalmente con la disminución en los niveles de expresión de todos los genes que participan en la carotenogénesis. Por otra parte, reportes previos indican que la carotenogénesis podría estar regulada por algún tipo de mecanismo de *feedback* donde la proporción relativa de astaxantina modularía la cantidad total de carotenoides sintetizados (Schroeder y Johnson 1995). Considerando ambas observaciones, es posible entonces que este mecanismo de *feedback* de la astaxantina sobre la ruta de biosíntesis de carotenoides involucre también mecanismos de regulación a nivel transcripcional. Por este motivo, quisimos determinar si la presencia y composición de pigmentos afecta la respuesta transcripcional

desencadenada por la adición de glucosa al medio. Para esto se realizaron ensayos de adición de glucosa similares a los mostrados anteriormente, utilizando las cepas mutantes *crtYB/crtYB*⁻, *crtI/crtI*⁻ y *crtS/crtS*⁻ que acumulan distintos intermediarios de la vía. Los resultados obtenidos indican que la respuesta a glucosa de la expresión de los genes *grg2* y *PDC* es similar a la silvestre en todas las cepas estudiadas, y por lo tanto no depende de la síntesis de pigmentos (Figura 20a). Un fenómeno similar se observó al estudiar el efecto de la glucosa sobre la expresión de los genes de biosíntesis de precursores de carotenoides *idi* y *FPS* en las cepas incapaces de sintetizar astaxantina, donde la respuesta de represión es también bastante similar a la observada en la cepa silvestre (Figura 20b). Sin embargo, una situación bastante distinta ocurre con 3 de los genes de la ruta de carotenogénesis. En el caso del gen *crtYB*, la represión de aproximadamente 6 veces del mensajero maduro observada en la cepa silvestre desaparece completamente, siendo reemplazada por una ligera inducción, tanto en la mutante que acumula fitoeno (*crtI/crtI*⁻) como en la que acumula β-caroteno (*crtS/crtS*⁻) (Figura 21b). Por otra parte, los niveles de transcrito alternativo en ambas cepas mutantes presentan una disminución mediada por glucosa bastante menor a la observada en la cepa silvestre (Figura 21c). Un fenómeno similar se observó para el gen *crtI* donde, tanto en la mutante incapaz de sintetizar carotenoides (*crtYB/crtYB*⁻) como en la que acumula β-caroteno (*crtS/crtS*⁻), se observó la completa desaparición de la represión por glucosa del transcrito maduro (Figura 21d), y una respuesta muy disminuida de los niveles de transcrito alternativo (Figura 21e). Finalmente en el caso del gen *crtS*, la ligera represión por glucosa observada en la cepa silvestre es reemplazada por una ligera inducción en las mutantes *crtYB/crtYB*⁻ y *crtI/crtI*⁻ (Figura 21f). Curiosamente, en este caso el gen *crtE* tuvo un comportamiento distinto al resto de los genes de carotenogénesis, en cuanto a que la respuesta a

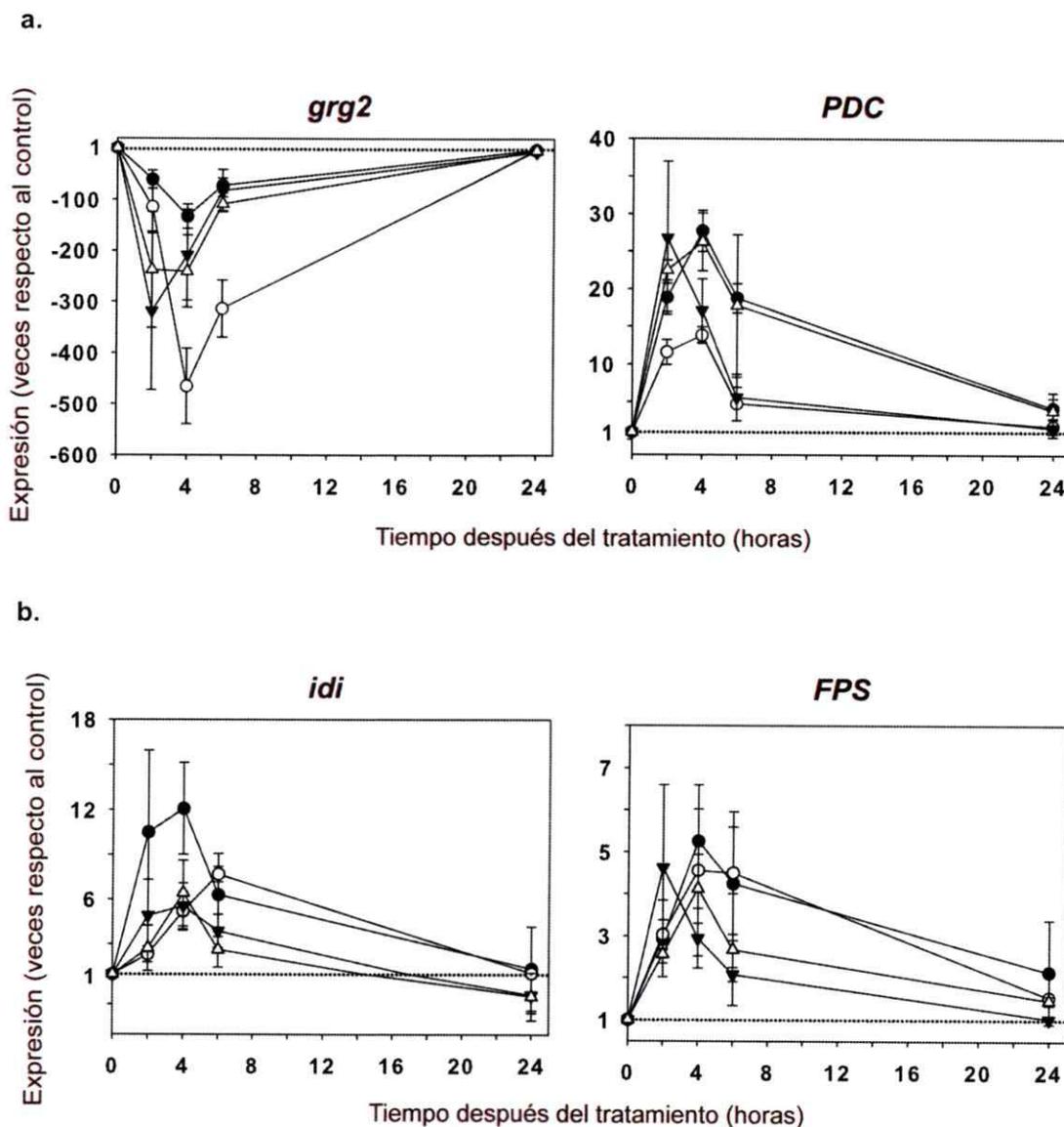


Figura 20. Efecto de la glucosa sobre la expresión de los genes *grg2*, *PDC*, *idi* y *FPS* en cepas de *X. dendrorhous* incapaces de sintetizar astaxantina. Se determinó la expresión relativa de los genes control *grg2* y *PDC* (A) y de los genes de biosíntesis de precursores de carotenoides *idi* y *FPS* (B), luego de agregar glucosa hasta una concentración final de 20 g/l. El ensayo fue realizado utilizando cepas mutantes incapaces de sintetizar astaxantina: *crtYB*-/- (○), *crtI*-/- (▼) y *crtS*-/- (△) y la cepa silvestre UCD 67-385 (●). Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=3). La línea punteada corresponde al valor control de expresión (=1). Los valores negativos en el eje de las ordenadas denotan una disminución con respecto al control.

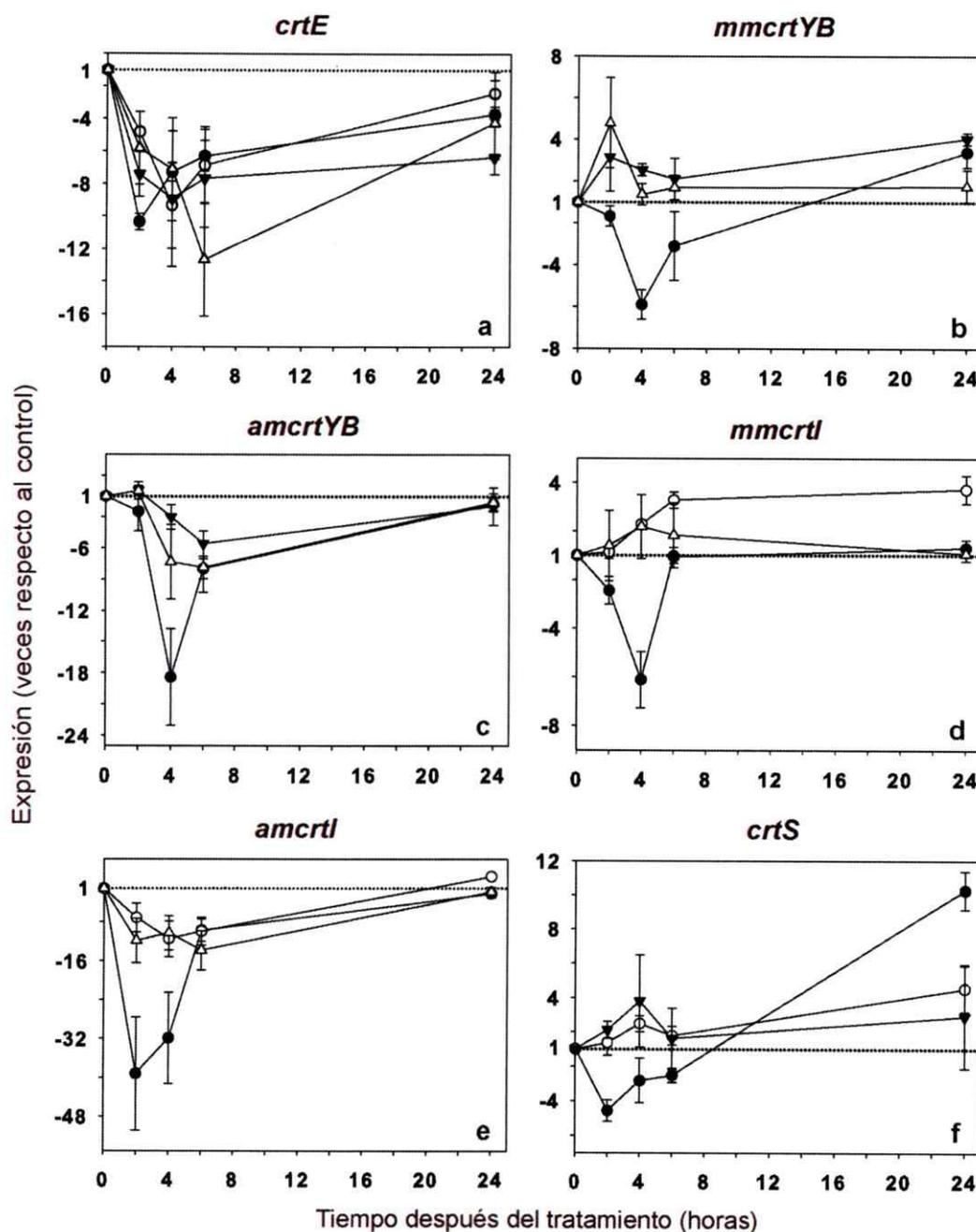


Figura 21. Efecto de la glucosa sobre la expresión de los genes de carotenogénesis en cepas de *X. dendrorhous* incapaces de sintetizar astaxantina. Se determinó la expresión relativa de los genes *crtE* (a), *crtYB* (b,c), *crtI* (d,e) y *crtS* (f), luego de agregar glucosa hasta una concentración final de 20 g/l. El ensayo fue realizado utilizando cepas mutantes incapaces de sintetizar astaxantina: *crtYB*-/- (○), *crtI*-/- (▼) y *crtS*-/- (△) y la cepa silvestre UCD 67-385 (●). Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=3). La línea punteada corresponde al valor control de expresión (=1). Los valores negativos en el eje de las ordenadas denotan una disminución con respecto al control. mm: mensajero maduro, am: mensajero alternativo.

glucosa observada en la cepa silvestre no se vió alterada en las mutantes. Los resultados anteriores indican que la respuesta a la adición de glucosa de la expresión de los genes *crtYB*, *crtI* y *crtS* depende, al menos en parte, de la normal biosíntesis de astaxantina o de la presencia de este compuesto en la célula. Visto de otro modo, la ausencia de astaxantina liberaría parcialmente la ruta de carotenogénesis de la represión catabólica por glucosa en las condiciones ensayadas.

3.3 Efecto del etanol sobre la expresión de los genes de carotenogénesis en *X. dendrorhous*.

Tal como se indicó en un comienzo, reportes previos indican que la adición de etanol al medio de cultivo provoca un aumento en la biosíntesis de pigmentos en *X. dendrorhous*. Adicionalmente se sabe que cuando la levadura es crecida en glucosa como única fuente de carbono, la inducción de la carotenogénesis coincide en el tiempo con la máxima concentración de etanol (~2 g/l) producido a partir de la fermentación del azúcar (Lodato y col. 2007). Considerando lo anterior quisimos evaluar si el etanol posee un efecto a nivel de la expresión de los genes de carotenogénesis. Para esto se utilizó un diseño experimental similar al utilizado en el caso de la glucosa, pero ahora agregando al medio de cultivo etanol hasta una concentración final de 2 g/l y midiendo la expresión relativa de los genes de carotenogénesis dentro de las 24 horas posteriores a la adición del alcohol. Los resultados indican que al agregar etanol, la expresión del gen *idi* presenta una ligera variación que resultó ser menor a 2 veces en el intervalo estudiado (Figura 22a). De manera similar, la adición de etanol no causó una variación significativa de los niveles de mRNA del gen *FPS* (Figura 22b). Curiosamente en el caso del gen *crtE*, la adición de etanol causa una ligera disminución de sus niveles de mRNA, llegando a ser cerca

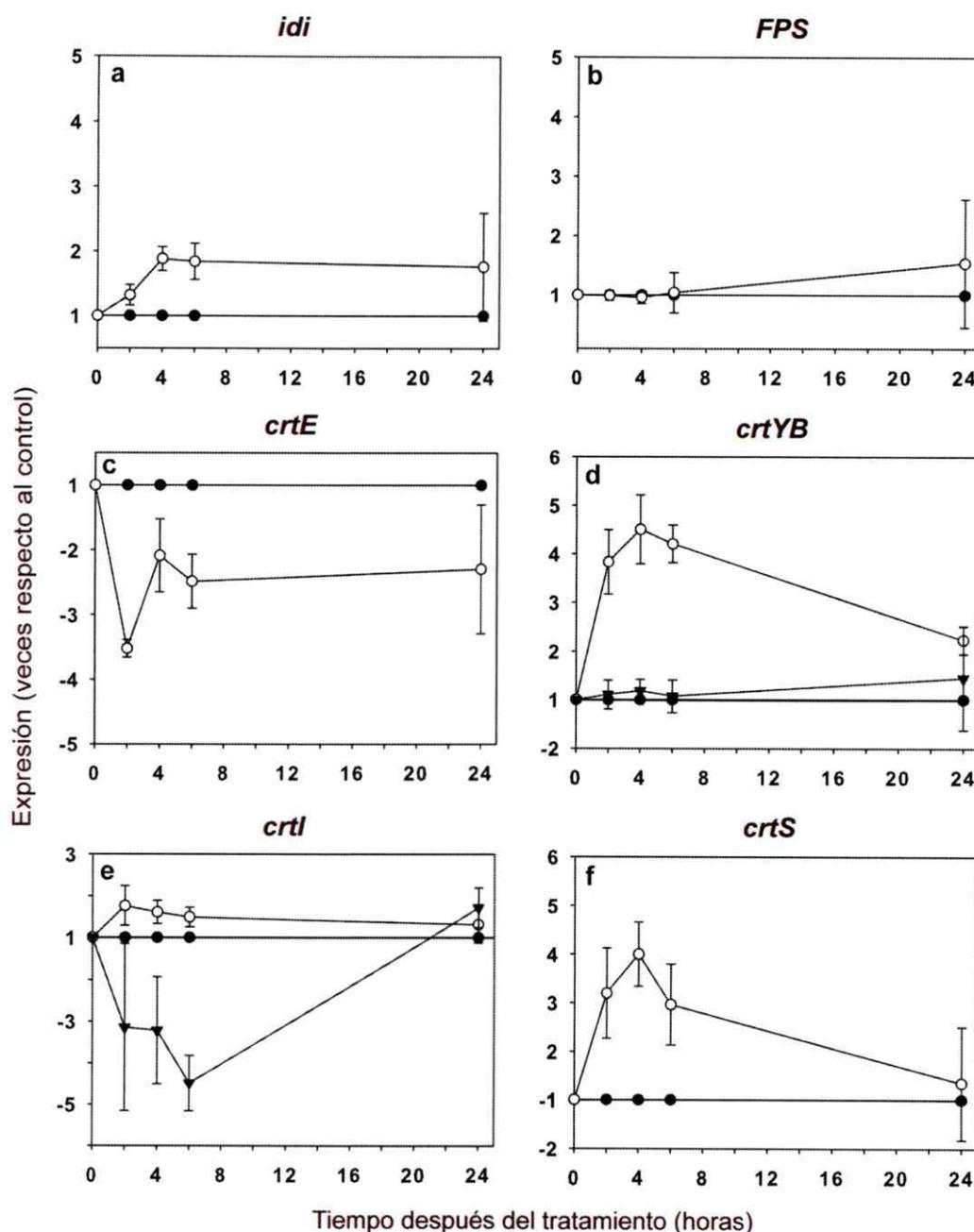


Figura 22. Efecto del etanol sobre la expresión de los genes *idi*, *FPS*, *crtE*, *crtYB*, *crtI* y *crtS* de *X. dendrorhous*. Cultivos de *X. dendrorhous* (silvestre) fueron crecidos hasta fase estacionaria y posteriormente divididos en dos. A una parte se le agregó etanol (2 g/l final, ○) y la otra no recibió tratamiento (control, ●). Se determinaron los niveles de mRNA en etanol con respecto al control de los genes de carotenogénesis *crtE*, *crtYB* (mensajero alternativo: ▼; mensajero maduro: ○), *crtI* (alternativo: ▼; maduro: ○) y *crtS*, y de los genes de biosíntesis de precursores de carotenoides *idi*, y *FPS*. Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=3). Los valores negativos en el eje de las ordenadas denotan una disminución con respecto al control.

de 3,5 veces menor que el control luego de 2 horas, y manteniéndose en torno a 2 veces menos dentro de las 24 horas posteriores al tratamiento (Figura 22c). Interesantemente, la adición del alcohol causa un aumento de aproximadamente 5,5 veces en los niveles de mRNA del mensajero maduro del gen *crtYB*, y no posee efecto significativo sobre la expresión del mensajero alternativo de dicho gen (Figura 22d). En el caso del gen *crtI*, el etanol no posee efecto significativo sobre la expresión del mensajero maduro, y causa una disminución de hasta 5 veces de su mensajero alternativo, retornando a los niveles basales luego de 24 horas (Figura 22e). Finalmente, la adición de etanol causa un aumento de hasta 4 veces en los niveles de mRNA del gen *crtS*, el cual alcanza su máximo de inducción luego de 4 horas de realizado el tratamiento (Figura 22f). En resumen, la adición de etanol causa la inducción de dos de los genes clave de la ruta de biosíntesis de astaxantina, fenómeno que podría contribuir al aumento en la síntesis de pigmentos causado por esta fuente de carbono.

3.4 Efecto de la glucosa y el etanol sobre la síntesis de pigmentos en *X. dendrorhous*.

Una vez determinado el efecto de la glucosa y el etanol sobre la expresión de los genes de carotenogénesis, evaluamos como influían dichos agentes en la producción de pigmentos. Para ello se crecieron células de *X. dendrorhous* en medio YM sin glucosa hasta 24 horas después de alcanzada la fase estacionaria, momento en el cual los cultivos fueron divididos en tres. A una de las partes se le agregó glucosa hasta una concentración final de 20 g/l, a otra parte se le agregó etanol hasta una concentración final de 2 g/l, y la parte restante no recibió tratamiento (control). Posteriormente se colectaron alícuotas de los cultivos luego de 2, 4, 6 y 24 horas después de realizado el

tratamiento, a partir de las cuales se determinó la producción de biomasa y la cantidad y composición de carotenoides presentes en cada muestra. De esta manera se encontró que la adición de glucosa causó un importante incremento en la biomasa, el cual fue notablemente mayor que el observado al agregar etanol luego de 24 horas después de realizado el tratamiento (Figura 23a). Sin embargo, al analizar la cantidad total de carotenoides por volumen de cultivo (Figura 23b), se observó que en la situación donde se agregó glucosa, no se registró producción de pigmentos incluso luego de 24 horas después de realizado el tratamiento. Por el contrario, la adición de etanol causó un aumento de aproximadamente 1,8 veces en la cantidad de pigmentos con respecto al control, 24 horas después del tratamiento (Figura 23b). En este caso, a pesar de que también se observó un incremento en la biomasa, dicho aumento estuvo acompañado de la producción de pigmentos.

Al analizar la cantidad específica de carotenoides, se observó que la adición de glucosa causó una disminución progresiva de la cantidad de pigmentos producida por unidad de biomasa (Figura 23c), la cual fue detectable incluso 2 horas después de la adición del azúcar, alcanzando un nivel 3 veces menor que el control después de 24 h. Esta disminución estaría explicada principalmente por incremento en la biomasa y la ausencia de síntesis de pigmentos. Por otra parte, luego de la adición de etanol, la cantidad de pigmentos por unidad de biomasa se mantuvo relativamente constante durante el intervalo de tiempo estudiado, debido al aumento conjunto de la biomasa y la cantidad de carotenoides (Figura 23c).

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio indican que a medida que cultivos de *X. dendrorhous* envejecen, la proporción de intermediarios de la ruta de carotenogénesis presentes en las células disminuyen. Lo anterior va acompañado por

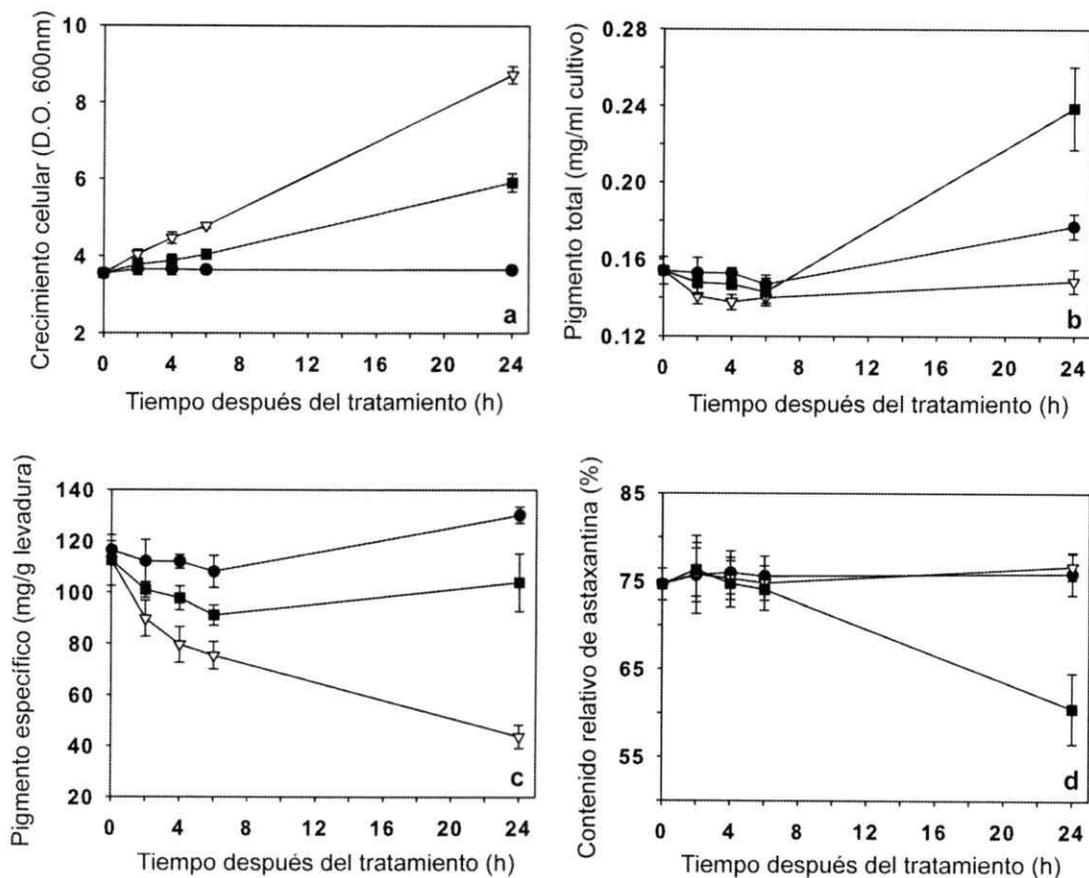


Figura 23. Efecto de la glucosa y el etanol sobre la producción de carotenoides en *X. dendrorhous*. Cultivos de *X. dendrorhous* fueron crecidos hasta fase estacionaria y posteriormente divididos en tres alícuotas. A una de ellas se le agregó glucosa (20 g/l final, ▽), a otra se le agregó etanol (2 g/l final, ■) y la otra no recibió tratamiento (control, ●). Se determinó el crecimiento celular (a), la cantidad total de carotenoides por volumen de cultivo (b), la cantidad de pigmento por unidad de biomasa (c) y el contenido relativo de astaxantina con respecto al total de carotenoides detectados por cromatografía líquida en fase reversa (d). Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=3).

un aumento en la cantidad relativa de astaxantina, explicado por el cese de la síntesis *de novo* de pigmentos y la conversión de todos los intermediarios en el producto final de la ruta. En base a esto, una forma de evaluar si hay síntesis *de novo* de pigmentos es determinar la proporción de intermediarios versus la cantidad de producto final (astaxantina) a lo largo del tiempo. Según lo anterior, analizamos mediante cromatografía líquida en fase reversa la composición de carotenoides presentes en las muestras estudiadas previamente y se determinó el contenido relativo de astaxantina con respecto al total de pigmentos detectados en cada muestra (Figura 23d). Así, se encontró que en la situación control el contenido de astaxantina se mantuvo invariable en torno al 75% dentro de las 24 horas analizadas, indicando que no hubo generación de intermediarios. Una situación muy similar se observó al agregar glucosa, donde la proporción de astaxantina se mantuvo igual al control en todos los tiempos analizados. Un fenómeno totalmente distinto se observó al agregar etanol al medio. En este caso, luego de 24 horas después de la adición de la fuente de carbono, se registró una disminución significativa de la cantidad relativa de astaxantina, producto de la generación de intermediarios de la ruta de biosíntesis. Junto con la determinación de la cantidad de pigmentos totales, estos resultados indican que la adición de etanol causa un incremento en la cantidad de carotenoides promoviendo la síntesis *de novo* de pigmentos, dentro de las 24 horas posteriores al tratamiento. Por el contrario, cuando se agrega glucosa al medio se produce una inhibición de la síntesis de pigmentos, que se mantiene durante todo el intervalo temporal analizado.

3.5 Caracterización de las regiones promotoras de los genes de carotenogénesis reprimidos por glucosa.

3.5.1. Predicción bioinformática de posibles elementos reguladores.

Los resultados presentados anteriormente indican que la expresión de los cuatro genes involucrados en la síntesis de astaxantina a partir de geranylgeranyl pirofosfato es reprimida en respuesta a la adición de glucosa. Sin embargo, los mecanismos y posibles factores que intervienen en este proceso permanecen desconocidos. Al respecto, un antecedente relevante es el hallazgo de posibles sitios de unión al regulador Mig1 en la región promotora del gen *crtS* (Alvarez y col. 2006). Dicho regulador es un factor transcripcional que media la represión catabólica por glucosa de diversos genes en *S. cerevisiae* y otras levaduras y hongos. La presencia de potenciales sitios Mig1 en la región promotora sugiere que la represión por glucosa del gen *crtS* podría estar mediada por este factor. Considerando lo anterior, se realizó un análisis de las regiones promotoras del resto de los genes de carotenogénesis, con el fin de determinar si también poseen sitios de unión al regulador Mig1. Para esto se utilizaron dos aproximaciones. En primer lugar, se usó el software PROMO (versión 3.0), el cual realiza una predicción de sitios de unión a factores de transcripción, basada en matrices de secuencias consenso almacenadas en la base de datos TRANSFAC. En este caso se empleó la matriz correspondiente al regulador Mig1 (código TRANSFAC: T00509). Una segunda aproximación consistió en la búsqueda manual de sitios Mig1 según la secuencia consenso establecida por Cubero y Scazzocchio en el hongo *Aspergillus nidulans*, definida como (G/C)(C/T)GG(A/G)G, y que correspondería al sitio mínimo de unión (Cubero y Scazzocchio 1994). Esta última aproximación fue la usada para encontrar los sitios Mig1 del gen *crtS* (Alvarez y col.

2006). Con ambas aproximaciones, se analizaron las regiones promotoras (definidas arbitrariamente como 1000 pb río arriba del codón de inicio de la traducción) de los genes *crtE*, *crtYB*, *crtl* y *crtS*, además de la región promotora del gen *grg2*. De esta manera, se encontró que todos los genes de carotenogénesis poseen al menos un sitio Mig1 en su región promotora, identificado ya sea por una o ambas aproximaciones (Figura 24). El análisis con PROMO reveló la existencia de un posible sitio 94 pb río arriba del codón de inicio del gen *crtE*, el cual sin embargo no se ajusta a la secuencia consenso definida en *Aspergillus*. Importantemente, en los promotores de los genes *crtYB* y *crtl* se encontró un sitio cuya ubicación es bastante similar (774 y 777 pb río arriba del codón de inicio, respectivamente). Estos sitios tampoco se ajustan a la secuencia consenso definida en *Aspergillus*. En el caso del promotor del gen *crtS*, el análisis usando PROMO permitió identificar dos sitios ubicados a 749 y 609 pb río arriba del codón de inicio. Cabe notar que el primero de estos sitios se encuentra en una posición bastante similar a los encontrados en los genes *crtYB* y *crtl*. Estos sitios sí se ajustan a la secuencia consenso de *Aspergillus*, y coinciden con dos de los cuatro sitios encontrados por Alvarez y cols. (Alvarez y col. 2006). Usando dicha secuencia consenso no se encontraron sitios adicionales a los hallados utilizando PROMO en los promotores de los genes *crtE*, *crtYB* y *crtl*. En el caso del gen *grg2*, en cambio, se encontraron dos sitios que se ajustan a la secuencia consenso pero que no habían sido detectados con PROMO (342 y 214 pb río arriba del codón de inicio) (Figura 24).

El hallazgo de sitios Mig1 en las regiones promotoras de los genes de carotenogénesis, y la conservación de la ubicación en algunos de ellos, plantea la posibilidad de que existan otros elementos de secuencia comunes. Para evaluar esta

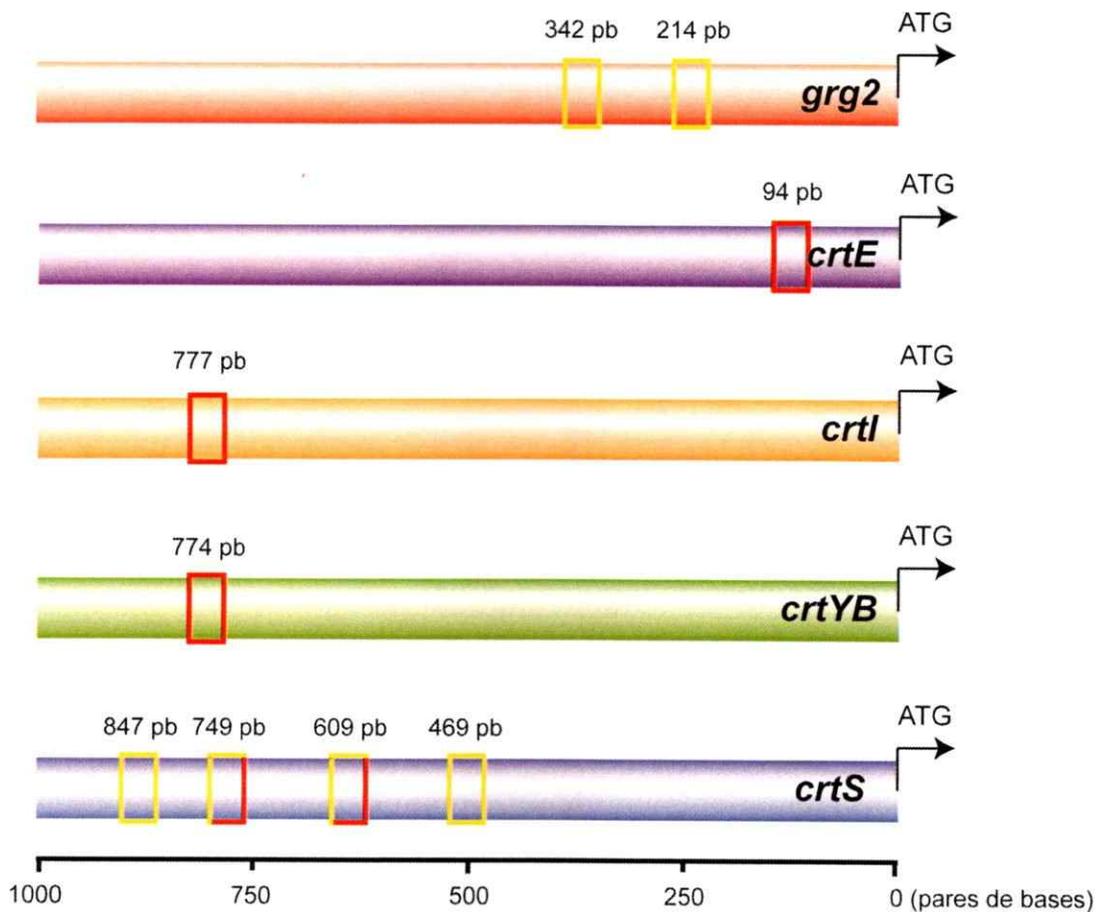


Figura 24. Potenciales sitios de unión al regulador Mig1 presentes en genes reprimidos por glucosa de *X. dendrorhous*. Se realizó un análisis bioinformático de las regiones promotoras de los genes reprimidos por glucosa de *X. dendrorhous* con la aplicación PROMO 3.0 (ver referencias) usando la base de datos TransFac v8.3, encontrando posibles sitios de unión al regulador Mig1 (recuadros rojos). Adicionalmente se muestran los sitios Mig1 predichos usando la secuencia consenso establecida por Cubero y Scazzocchio, 1994 (recuadros amarillos). Los recuadros bicolors representan aquellos sitios predichos por ambas aproximaciones.

hipótesis se realizó un alineamiento de las regiones promotoras de los genes *crtE*, *crtYB*, *crtI* y *crtS*. Al realizar la comparación base a base de las secuencias no fue posible encontrar elementos ni regiones conservadas, ni tampoco patrones evidentes que sean comunes a 2 o más genes (Figura 25). Al realizar un alineamiento múltiple que permita la introducción de *gaps* y el acomodamiento de la posición de una secuencia con respecto a las otras (usando *clustalW*), tampoco fue posible identificar elementos conservados.

Estudios previos sugieren que el contenido GC de las regiones adyacentes a los sitios Mig1 podría ser importante para la funcionalidad de dichos elementos. Estudios en *A. nidulans* (Cubero y Scazzocchio 1994) y en *S. cerevisiae* (Griggs y Johnston 1991; Nehlin y col. 1991) han reportado que frecuentemente los sitios Mig1 funcionales son precedidos por zonas ricas en AT. Para determinar si las regiones previas adyacentes de los potenciales sitios Mig1 de los promotores de los genes estudiados presentan un patrón de este tipo, se determinó el contenido GC de 10 pb río arriba de cada sitio, además del contenido GC total de las regiones promotoras. Al comparar el contenido GC de la región previa adyacente a los posibles sitios Mig1, se pudo constatar que éste es menor que el contenido total sólo en los casos de los genes *crtE* y *crtI* (Tabla II). Además, no se observó un patrón evidente comparando las zonas adyacentes a los sitios Mig1 de las distintas regiones promotoras, ni tampoco comparando los distintos sitios Mig1 predichos para el promotor del gen *crtS*. Con respecto a este último, se observa un contenido GC particularmente alto en las regiones adyacentes de los sitios B y D (80%/70% y 90%/80%, respectivamente), contribuyendo al relativamente alto contenido GC de esta región promotora,

Tabla II. Contenido de GC de las zonas adyacentes a los potenciales sitios Mig1 presentes en promotores de genes regulados por glucosa de *X. dendrorhous*.

Promotor	Región	Sitio A	Sitio B	Sitio C	Sitio D	Total promotor
<i>grg2</i>	Previa	60%	50%	-	-	46,8%
	Posterior	50%	60%	-	-	
<i>crtE</i>	Previa	40%	-	-	-	47,3%
	Posterior	40%	-	-	-	
<i>crtYB</i>	Previa	60%	-	-	-	45%
	Posterior	30%	-	-	-	
<i>crtI</i>	Previa	40%	-	-	-	49%
	Posterior	50%	-	-	-	
<i>crtS</i>	Previa	60%	80%	50%	90%	56,3%
	Posterior	60%	70%	40%	80%	

El porcentaje mostrado equivale a la cantidad de guaninas y citosinas presentes en una zona de 10 pb río arriba (previa) o río abajo (posterior) de los sitios Mig1.

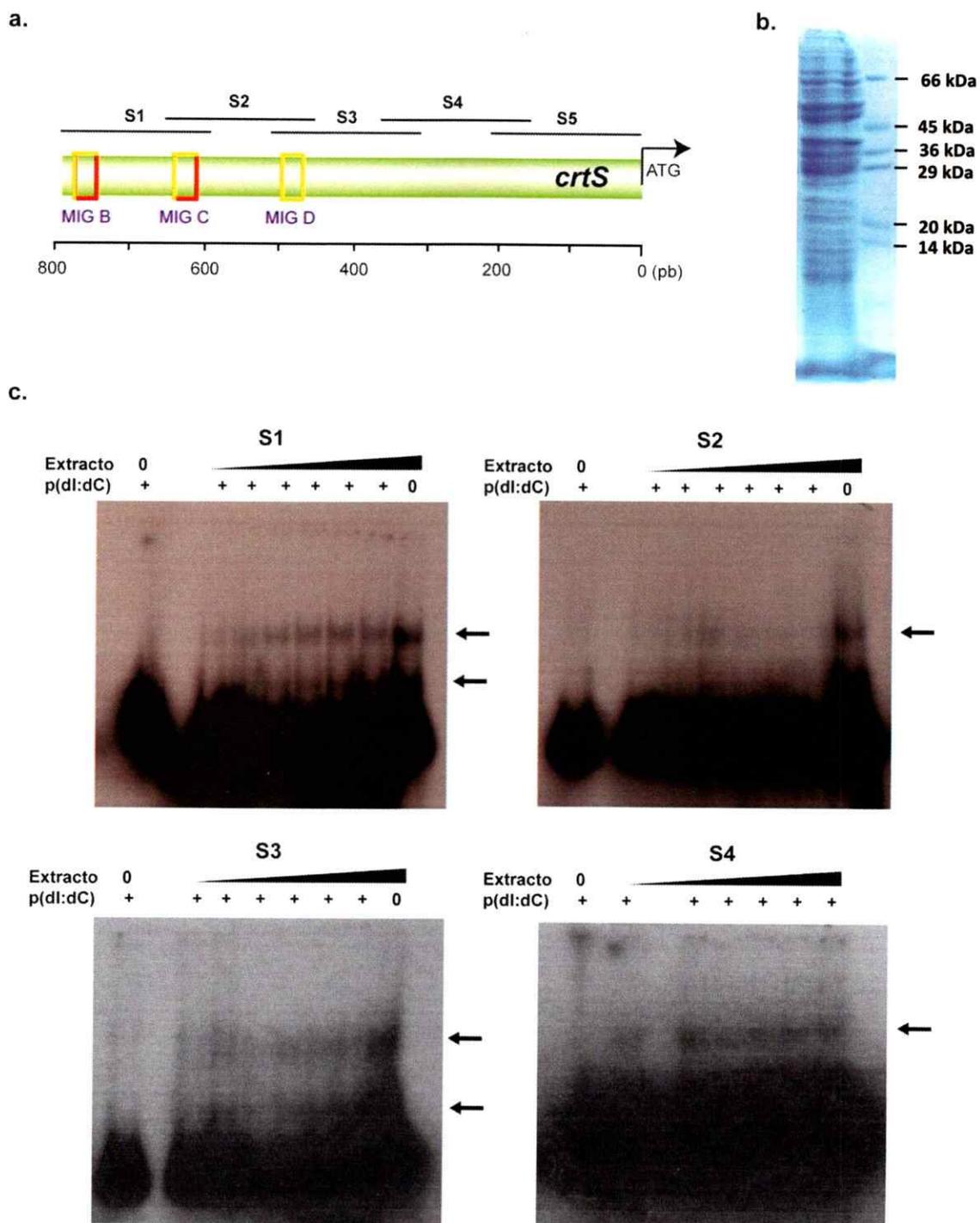
comparado con el contenido GC total de los promotores del resto de los genes estudiados.

3.5.2. Estudios de unión DNA-proteína en el promotor del gen *crtS*.

Si bien la presencia de los potenciales sitios Mig1 en las regiones promotoras de los genes de carotenogénesis sugiere la participación de un posible homólogo al factor Mig1 en la regulación de su expresión, es necesario recopilar más datos sobre la funcionalidad de dichos elementos. Se sabe que la acción del regulador Mig1 requiere de la unión directa de este factor a los sitios diana presentes en la región promotora en todos los organismos donde ha sido estudiado. Considerando lo anterior, una forma de evaluar la funcionalidad de los sitios es estudiar si son capaces de unir la correspondiente proteína. Lamentablemente a la fecha no se cuenta con la proteína Mig1 purificada, de hecho hasta las últimas etapas de la realización de esta tesis ni siquiera se conocía si en *X. dendrorhous* existe un homólogo de dicho factor. Debido a esto, no es posible evaluar directamente si los sitios Mig1 de *X. dendrorhous* unen la mencionada proteína. Sin embargo, como una aproximación alternativa, se utilizaron extractos de proteínas nucleares para estudiar si existía unión entre distintos segmentos de la región promotora y alguna proteína presente en el extracto, evaluando la formación de complejos DNA-proteína que presenten una migración electroforética retardada con respecto al DNA libre. Se tomó como modelo la región promotora del gen *crtS* dado que posee varios sitios Mig1, dos de los cuales (sitios B y C) fueron predichos tanto por el análisis PROMO como por el uso de la secuencia consenso de *Aspergillus*. Como primer paso fue necesario estandarizar un protocolo de preparación de extractos nucleares de *X. dendrorhous*, dado que es la primera vez que se hace este tipo de ensayos en dicha levadura. La intención original era conseguir extractos en

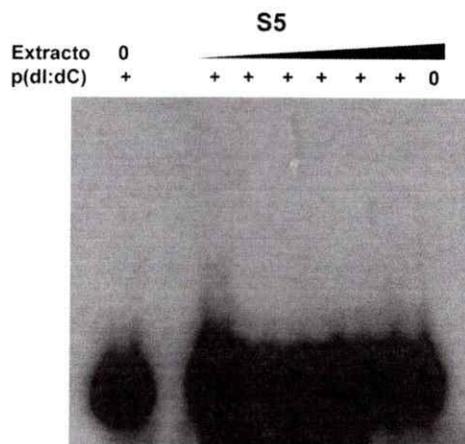
dos condiciones distintas, específicamente en presencia y ausencia de glucosa, de modo de comparar la unión detectada en ambas condiciones. Sin embargo, la preparación de extractos nucleares requiere una lisis controlada y suave de las células, la cual, debido a la dureza de la pared celular de *X. dendrorhous*, sólo puede conseguirse habiendo primero formado protoplastos, los cuales además son bastante lábiles. Actualmente no existen cócteles enzimáticos comerciales que degraden eficientemente la pared celular de este organismo, por lo que la formación de protoplastos requiere la incubación durante aproximadamente 16 horas. El largo periodo de incubación hizo poco controlables las condiciones en que las células se encontraban al momento de la realización de la extracción, por lo que finalmente sólo fue posible la preparación de un extracto único. Para esto se crecieron células de *X. dendrorhous* en medio YM-glucosa (20 g/l) hasta fase exponencial ($DO_{600}=3-4$), las cuales fueron posteriormente transformadas en protoplastos, a partir de los cuales se prepararon los extractos de acuerdo a lo descrito en la sección de materiales y métodos. Una vez finalizada la preparación, los extractos fueron cuantificados y visualizados por SDS-PAGE de modo de verificar la ausencia de degradación (Figura 26b).

Los fragmentos de DNA usados fueron de dos tipos. En primer lugar, con el objetivo de realizar un análisis global de la región promotora del gen *crtS*, ésta fue subdividida en 5 fragmentos de aproximadamente 200 pb (denominados S1 al S5, Figura 26a), los cuales fueron amplificados por separado mediante PCR, purificados y marcados radioactivamente. En segundo lugar, se sintetizaron oligonucleótidos de hebra simple complementarios que al hibridar forman un segmento de DNA de doble hebra de aproximadamente 25 pb que contiene, ya sea el sitio Mig1 B o el



(continúa en la página siguiente)

c. (continuación)



d.

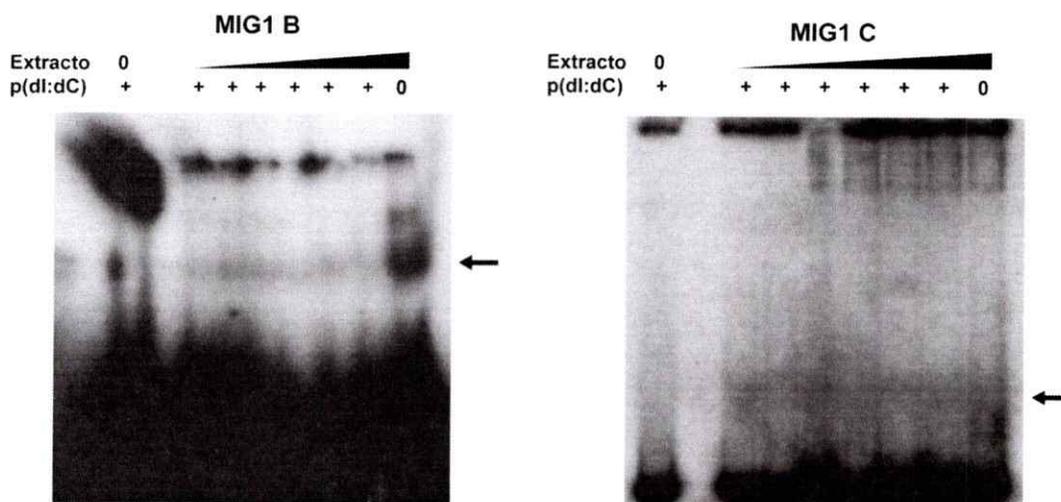


Figura 26. Ensayos de unión DNA-proteína en el promotor del gen *crtS*. Se dividió el promotor del gen *crtS* en distintos fragmentos (a), los cuales fueron marcados e incubados con cantidades crecientes de extracto nuclear de *X. dendrorhous* en presencia, y luego separados por electroforesis en geles TBE-acrilamida (geles de retardo), de modo de evaluar su capacidad de unir posibles proteínas reguladoras. (b) SDS-PAGE representativo de los extractos nucleares utilizados. (c) Geles de retardo con los fragmentos S1-S5 del promotor *crtS*. (d) Geles de retardo con los oligonucleótidos de aproximadamente 20 pb que contienen los sitios Mig1 B o Mig1C. Las flechas indican las bandas retardadas correspondientes a complejos DNA-proteína.

sitio Mig1 C (Mig1crtSemsB/C, Tabla I). Los oligonucleótidos fueron diseñados de manera que al hibridar queden extremos 5' de simple hebra que favorezcan el marcaje con [γ - 32 P]ATP usando la enzima polinucleótido kinasa. Una vez obtenidos los fragmentos marcados, estos fueron incubados con cantidades crecientes de extracto nuclear, en presencia o en ausencia del competidor no específico poly(dI:dC), el cual es un polímero sintético de DNA que ayuda a disminuir la unión inespecífica entre DNA y proteínas. Luego de la incubación, las muestras fueron separadas en geles de TBE-poliacrilamida, los cuales fueron luego secados sobre papel y usados para exponer una película de rayos X. Al analizar los distintos fragmentos del promotor del gen *crtS* se observó la formación de complejos DNA-proteína con 4 de las 5 secciones (Figura 26c). En el caso del fragmento S1, que contiene los sitios Mig1 B y Mig1 C, se observaron dos bandas retardadas, las cuales corresponderían a dos complejos de diferente peso molecular, los cuales aumentan en proporción al DNA libre a medida que se incrementa la cantidad de extracto nuclear usado (Figura 26c). En el caso del fragmento S2 que incluye los sitios C y D, se detectó la formación de un complejo retardado representado por una banda bastante tenue. Una situación similar se observó con el fragmento S3, aunque en este caso se detectó además una segunda banda de menor peso molecular. Al analizar el fragmento S4 se observó que éste también es capaz de formar complejos DNA-proteína en presencia del extracto nuclear, aunque dicho fragmento no incluye ningún sitio Mig1. Posiblemente la formación de complejos DNA-proteína con este fragmento se deba a la presencia de otro tipo de regiones reguladoras tales como la caja TATA. A diferencia del resto del promotor analizado, la zona incluida en el fragmento S5 no mostró formación de complejos DNA-proteína (Figura 26c), sugiriendo que en ese segmento no se unen proteínas reguladoras, al menos en las condiciones ensayadas.

Al realizar los ensayos de retardo con los oligonucleótidos que contienen los sitios Mig1, se observó claramente la formación de complejos DNA-proteína con el oligonucleótido Mig1 B (Figura 26d). En el caso del oligonucleótido Mig1 C, se observó una banda muy tenue, la cual no podría ser interpretada con seguridad como un complejo retardado. Cabe destacar que por razones desconocidas este oligonucleótido quedó con una marca radioactiva mucho menor que el resto de los fragmentos de DNA utilizado, lo que podría dar cuenta de lo tenue de la supuesta banda retardada.

Aunque los resultados presentados anteriormente sugieren que los sitios Mig1 son capaces de unir algún tipo de proteína presente en el extracto nuclear, la prueba definitiva para asociar estos elementos a la regulación por glucosa requiere de la realización de este tipo de ensayos utilizando la proteína Mig1 purificada. Con esa perspectiva en mente, y si bien queda mucho para llegar a ese objetivo, este trabajo contribuye con el clonamiento y la caracterización del potencial homólogo a Mig1 de *X. dendrorhous*, tal como se describirá a continuación.

3.6 Clonamiento y caracterización de un posible homólogo al gen Mig1 de *S. cerevisiae* en *X. dendrorhous*.

A lo largo de este trabajo se han discutido diversos indicios que sugieren que un homólogo del gen Mig1 podría estar implicado en la represión transcripcional de los genes de carotenogénesis mediada por glucosa en *X. dendrorhous*. Sin duda un paso clave en la comprobación de dicha hipótesis es determinar si existe un homólogo de dicho gen en esta levadura. Para responder esa interrogante, se probaron diversas estrategias para conseguir aislar un posible gen Mig1 de *X. dendrorhous*, entre las cuales estuvieron el diseño de partidores degenerados a partir de alineamientos

múltiples de secuencias aminoacídicas de proteínas Mig1 de organismos filogenéticamente relacionados, y su posterior utilización para intentar amplificar por PCR a partir de DNA genómico; para buscar en distintas genotecas de cDNA y DNA genómico, etc. Lamentablemente ninguna de estas estrategias fue fructífera, y no fue hasta la secuenciación del genoma de *X. dendrorhous*, impulsada por nuestro laboratorio, que finalmente se logró encontrar el gen buscado. Una vez que la secuencia del genoma estuvo disponible, se inició el proceso de anotación por medio de la comparación con la base de datos, y la búsqueda de diversos genes de interés para nuestro grupo, entre ellos el posible homólogo a Mig1. Así, en la región central de un segmento de aproximadamente 13 kb se identificaron zonas que al ser traducidas presentaban homología con proteínas Mig1 de otros hongos. Luego de realizar comparaciones segmento a segmento con la base de datos mediante Blast, fue posible acotar el gen, determinar el posible sitio de inicio de la traducción y tener una aproximación de las posibles regiones exónicas. Con esta información se diseñaron partidores que permitieran amplificar este gen a partir de cDNA de la cepa UCD 67-385, y así, luego de secuenciar las bandas obtenidas, poder determinar con exactitud la región codificante. En total se utilizaron cerca de 12 partidores distintos para obtener la secuencia completa, siendo los partidores Mig1cDNA FW4 y Mig1cDNA RV7 (Tabla I), ubicados en las regiones 5' y 3' UTR, respectivamente, los que delimitan la región de mayor tamaño que se logró amplificar a partir de cDNA. El análisis de la secuencia de cDNA reveló la presencia de un marco abierto de lectura de 2592 pb, el cual fue traducido virtualmente originando una proteína de 863 aminoácidos, con un peso molecular calculado de 92,24 kDa (Figura 27a). Al comparar la secuencia de cDNA con la de DNA genómico se identificaron tres intrones, ubicados hacia el extremo 5' de la región codificante, siendo el último exón más de un tercio del ORF (Figura 27b). Al


```

691 V G G G G R S G G G G A P S G D G R H L A P P V G S A F P G
2071 GTTGGCGGTGGTGGTTCGGTTCGGTGGAGGAGTGCACCATCAGGGGACGGTCGACACCTCGCTCCCCCTGTTGGATCTGCCTTCCAGGT

721 Y P T S A S A S T Q N S P G T S *R *A *S *S P T G T K P K S G P
2161 TATCCGACTTCGGCTTCGGCTTCCACTCAAAACTCACCGGTTACTAGCAGAGCGTCATCTCTACGGGAACGAAACCTAAGTCAGGACCG

751 G D H L T A Q Q N S Q L A R S V Q A A F G I G S E G N S S L
2251 GGTGATCATTTGACGGCTCAGCAGAACTCACAGCTTCCAGATCTGTTCAAGCCGCATTTGGGATGGCTCAGAAGGAAATTCCTCGTGA

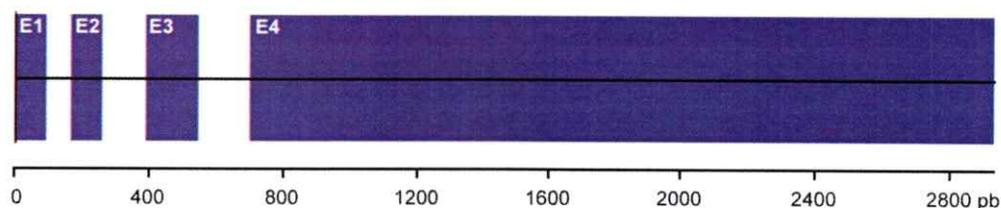
781 A N S I E G S P *R *L *Q *S S R Q Q Q Q Q Q Q Q T V T Q T Q G Q
2341 GCAAATTCGATAGAAGGCAGTCCACGACTTCAATCGAGCAGGCAGCAACAACAGCAGCAGCAACAACTGTAACCCAAACTCAGGGTCAG

811 V Q T Q G Q S E S P Q K Y P S N G S G G N G E N S M V N E D
2431 GTTCAGACACAAGGACAATCGGAAAGCCCGCAAAGTATCCCTCGAATGGCTCGGGCGGTAATGGAGAGAACTCGATGGTCAATGAAGAT

841 G S S N E *R *S *R *S G Q T E A G A G S D A M V S -
2521 GGATCGTCCAATGAACGATCCAGGTTCGGCCAGACAGAAGCCGGAGCGGGTTCAGACGCAATGGTTAGCTAA

```

b. Estructura Exón-Intrón



c. Búsqueda de genes ortólogos mediante blastX (región codificante)

Nombre de la secuencia	Cobertura	Identidad	E-value
DNA binding protein Cre-1 [<i>Cryptococcus neoformans</i>]	33%	52%	9e-71
Mig2 protein [<i>Puccinia graminis</i>]	11%	61%	3e-28
DNA binding protein Cre-1 [<i>Neurospora crassa</i>]	10%	67%	3e-26
DNA binding protein CreA [<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>]	8%	74%	5e-26
Catabolite repressor CreA [<i>Ajellomyces dermatitidis</i>]	6%	86%	1e-25
Putative Mig1p [<i>Pichia angusta</i>]	9%	64%	2e-25
C2H2 transcription factor (Crea) [<i>Trichophyton verrucosum</i>]	10%	61%	4e-25

Figura 27. Caracterización estructural del gen Mig1 de *X. dendrorhous*. (a) Secuencia nucleotídica de la región codificante y de la estructura primaria de la respectiva proteína deducida mediante traducción *in silico*. El codón de inicio y el codón de término se encuentran coloreados en rojo. Los dedos de zinc del dominio de unión a DNA (N-terminal) y el dominio efector se muestran subrayados. Los potenciales sitios de fosforilación por la proteína Snf1 (motivos RXXS) se muestran coloreados en verde y marcados con asteriscos. (b) Estructura exón-intrón del gen Mig1 de *X. dendrorhous*. E: exón. (c) Genes ortólogos con mayor identidad al gen Mig1 de *X. dendrorhous* presentes en la base de datos no redundante, encontrados usando la aplicación BlastX.

comparar la secuencia de la proteína deducida con la base de datos no redundante mediante BLAST, se comprobó que posee identidad con proteínas Mig1 de especies filogenéticamente relacionadas, principalmente en su extremo N-terminal (Figura 27c). El alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos con otras proteínas Mig1 de especies relacionadas mostró diferentes regiones con alta identidad de secuencia, las cuales han sido identificadas en otros organismos como relevantes para su función (Figura 28). Entre ellas se encuentran dos dedos de zinc tipo C_2H_2 , entre las posiciones 46 y 100 (Figura 28a), los cuales constituyen el dominio de unión a DNA típico de los factores Mig1 y otras proteínas de la familia del factor de transcripción IIIA (requerido para la transcripción de genes de rRNA 5S) (Nehlin y Ronne 1990). La potencial proteína Mig1 posee además 8 motivos RXXS (Figura 27a), los cuales son sitios de fosforilación por la kinasa Snf1p en *S. cerevisiae*, la cual actúa regulando la ubicación subcelular de Mig1. Cabe destacar que el tercero de estos sitios se encuentra en el potencial dominio efector, y está conservado en basidiomicetes (Figura 28d). Otra región conservada corresponde a una zona rica en aminoácidos básicos, ubicada justo al lado de los dedos de zinc (Figura 28b). Entre los residuos 280 y 299 hay otra región conservada entre basidiomicetes, la cual posee función desconocida (Figura 28c). Una cuarta región conservada fue localizada entre los residuos 428 y 444 (Figura 28d), la cual correspondería al dominio efector descrito originalmente en *S. cerevisiae*. En dicha levadura, tanto este dominio como los dedos de zinc son necesarios y suficientes para mediar la represión (Ostling y col. 1996). Es importante notar que en *X. dendrorhous* y otros basidiomicetes se encontró un segmento conservado previo al dominio efector descrito en otras levaduras (Figura 28d, residuos 428-434), lo que sugiere que este dominio podría ser ligeramente distinto al presente en ascomicetes.

En resumen, el análisis de la secuencia de la potencial proteína Mig1 de *X. dendrorhous* permitió identificar todas las secuencias habitualmente conservadas entre este tipo de proteínas provenientes de organismos relacionados, y que son relevantes para la función propia de este regulador.

Actualmente nuestro laboratorio se encuentra trabajando en demostrar la funcionalidad de la proteína Mig1 de *X. dendrorhous*, resultados que formarán parte de futuros estudios.

4. DISCUSION

4.1 Expresión de los genes de carotenogénesis durante el crecimiento en glucosa en la cepa silvestre y en cepas mutantes de la ruta de biosíntesis de astaxantina.

Al analizar la expresión de los genes de carotenogénesis durante el crecimiento en medio suplementado con glucosa se observaron variaciones acotadas entre las distintas fases. En concordancia con lo reportado previamente mediante ensayos de RT-PCR semicuantitativo, la expresión de los genes *idi* y *crtE* se mantiene relativamente constante durante el crecimiento (Lodato y col. 2007). De manera similar, también hay concordancia con la expresión de la versión madura del gen *crtYB*, la cual alcanza un máximo al principio de la fase estacionaria (Lodato y col. 2007), aunque no se observa el mismo fenómeno para la versión alternativa. Por otra parte, la expresión registrada para el gen *crtl* confirma el aumento de la proporción de mRNA alternativo/maduro a medida que el cultivo envejece reportada previamente (Lodato y col. 2003), aunque este efecto es menos evidente en la mutante *crtS*^{-/-}.

En general se pudo observar que los patrones de expresión de los genes de carotenogénesis en la cepa silvestre son bastante similares a los determinados en cepas mutantes incapaces de sintetizar astaxantina.

Considerando el acotado rango de variación de los niveles de expresión de los genes durante el crecimiento, no fué posible establecer una correlación directa entre el patrón de expresión y la cinética de síntesis de pigmentos comúnmente observada al crecer la levadura en glucosa.

4.2 Influencia de la fuente de carbono en la regulación transcripcional de la síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*: efecto de la glucosa y el etanol.

La carotenogénesis en *X. dendrorhous* es un proceso complejo, cuyos mecanismos regulatorios no han sido dilucidados completamente. Sin duda, un aspecto clave en la producción de pigmentos es el papel que juega la fuente de carbono en el cultivo de la levadura. Así, diversos estudios han reportado que la cantidad y composición de carotenoides se ve ampliamente modificada dependiendo de la fuente de carbono utilizada por *X. dendrorhous* (Johnson y Lewis 1979; Gu y col. 1997; Vazquez y col. 1997; Flores-Cotera y col. 2001; Johnson 2003). Una observación común en estos estudios es que la síntesis de pigmentos es particularmente baja en presencia de glucosa a concentraciones mayores a 15 g/l (Johnson y Lewis 1979; Vazquez y col. 1997; Visser y col. 2003). Sin embargo, hasta el presente estudio no se contaba con ningún dato respecto a de qué manera la glucosa podría ejercer su efecto represor sobre la carotenogénesis.

Los resultados obtenidos en este trabajo, tanto mediante los ensayos de *northern blot* como los de qRT-PCR, muestran que en *X. dendrorhous*, al igual que en otras levaduras, la glucosa posee un efecto represor o inductor de la expresión de diversos genes. Así, se demostró que los niveles de mRNA del gen *grg2* disminuyen drásticamente al agregar glucosa al cultivo. Complementariamente, se comprobó que el gen *PDC* es inducido por glucosa, al igual como ocurre en la mayoría de los organismos filogenéticamente relacionados (Kellermann y Hollenberg 1988; Pronk y col. 1996; Skory 2003; Fredlund y col. 2006). Los resultados anteriores permitieron

validar el modelo experimental utilizado y contar con un control para el resto de los ensayos de expresión relativa realizados.

Al estudiar el efecto de la glucosa sobre los genes de síntesis de precursores de carotenoides se observó que tanto el gen *idi* como *FPS* son inducidos al agregar dicho agente. Estudios en *E. coli* que portan distintos clusters carotenogénicos, indican que el aumento en la expresión de dichos genes y otros implicados en la biosíntesis de precursores de la ruta, se correlaciona con un incremento en la cantidad de carotenoides sintetizados (Albrecht y col. 1999; Sedkova y col. 2005; Yoon y col. 2006). En este caso, si bien se observó un aumento en la expresión de dichos genes mediada por glucosa, esta no se correlacionó con un aumento en la síntesis de pigmentos, probablemente debido a la represión de los genes de carotenogénesis y a la inhibición global del metabolismo aerobio observada normalmente en aerobios facultativos crecidos en presencia de altas concentraciones de glucosa (efecto *crabtree*). Lo anterior concuerda con el rol dual de estos genes, donde los compuestos que sintetizan no sólo son precursores para la carotenogénesis, sino que además son utilizados para la síntesis de componentes celulares esenciales como ergosterol, dolicoles (implicados en la modificación postraduccional de proteínas), quinonas (componentes de la cadena respiratoria mitocondrial) y otros terpenoides necesarios para la generación de biomasa y el metabolismo primario en general (Sacchettini y Poulter 1997). Considerando el importante aumento en la biomasa observado al agregar glucosa, resulta razonable que estos genes sean inducidos en presencia del carbohidrato.

Al estudiar el efecto de la glucosa sobre la expresión de los genes de carotenogénesis, se demostró que la adición de ésta causa una disminución de los niveles de mRNA de

todos los genes implicados en la síntesis de astaxantina a partir de farnesil pirofosfato. En la mayoría de estos, el efecto de la glucosa resultó ser máximo entre 2 y 4 horas después del tratamiento, restableciéndose los niveles normales luego de 24 horas. La magnitud de la represión además resultó ser dosis dependiente, teniendo un umbral de respuesta a concentraciones de glucosa entre 1 y 5 g/l. El retorno a los niveles basales de expresión resultó ser mucho más rápido que el consumo de la glucosa. De hecho, luego de 6 horas de agregar glucosa hasta una concentración final de 10 g/l, los niveles de mRNA de los genes *crtE*, *amcrtYB*, *mmcrtI* y *crtS* ya habían retornado al valor basal (Figura 19a,c,d,f), quedando aún en el medio de cultivo cerca de 7 g/l de glucosa (Figura 20, ▼). Sin embargo, una concentración de 5 g/l final resultó ser suficiente para desencadenar una respuesta represora de una magnitud máxima ligeramente menor a la registrada con 10 g/l. Lo anterior indica que si bien la magnitud máxima de represión es dependiente de la concentración de glucosa agregada inicialmente, el retorno a los niveles normales de expresión no depende totalmente de la cantidad del carbohidrato remanente en el medio. Lamentablemente en la mayoría de los estudios publicados a la fecha sobre efecto de la fuente de carbono en la expresión génica, no se analiza la cinética de la respuesta ni tampoco el curso temporal del consumo de la fuente de carbono agregada, y generalmente sólo se mide la expresión luego de un tiempo determinado (entre 2 y 6 horas después del tratamiento). Debido a esto, los factores y mecanismos implidados en el retorno a los niveles basales de expresión permanecen desconocidos. De todos modos, hay algunos trabajos donde, al igual que en este estudio, se ha reportado que la represión o inducción génica mediada por glucosa es una respuesta transiente (desarrollada principalmente dentro de las 4 a 6 horas posteriores al pulso de glucosa) (McNally y Free 1988; Fredlund y col. 2006).

Interesantemente, el efecto represor que tiene la glucosa sobre los genes *crtYB* y *crtl* se manifiesta de manera diferencial sobre las versiones madura y alternativa de estos. Si consideramos que ambas versiones de cada gen provienen de una única unidad transcripcional, entonces su expresión diferencial sugiere la participación de mecanismos post-transcripcionales de regulación. Así, el efecto diferencial podría deberse a la modificación de los factores que controlan el procesamiento alternativo de estos genes. Lo anterior se suma a observaciones previas que indican que la cantidad de mRNA maduro y alternativo de ambos genes varía durante el crecimiento de la levadura, dependiendo de la fuente de carbono utilizada, la edad del cultivo y del contenido de carotenoides (Lodato y col. 2003). Alternativamente, puede ser que la glucosa actúe aumentando la degradación de los mRNAs, modificando su vida media (que puede ser distinta para cada versión), tal como se ha observado en múltiples casos de represión por glucosa en *S. cerevisiae* (Lombardo y col. 1992). Esta hipótesis concuerda con la rápida disminución de los niveles de mRNA observada en respuesta a la adición del carbohidrato. Futuros estudios permitirán indagar más acerca de la naturaleza e importancia de este fenómeno.

Un hecho importante que observamos es que la represión mediada por glucosa de los genes *crtYB*, *crtl* y *crtS* se ve seriamente comprometida en cepas mutantes incapaces de sintetizar astaxantina. Esto concuerda con observaciones previas donde la disminución de la cantidad de astaxantina causa un aumento en la cantidad total de carotenoides y que sugieren que dicho compuesto podría tener un efecto de *feedback* negativo sobre la síntesis de pigmentos (Schroeder y Johnson 1995). Nuestros resultados indican que la incapacidad de sintetizar astaxantina causaría una desregulación de la expresión de gran parte de los genes que participan en etapas

tardías de la ruta, liberándola de la represión por glucosa e incluso aumentando la disponibilidad de los mensajeros necesarios para la síntesis de pigmentos.

Al estudiar el efecto del etanol sobre la síntesis de pigmentos se pudo constatar que la adición al medio de cultivo de dicho agente causa la inducción de los genes *crtYB* y *crtS*, dos genes claves de la ruta. En el caso del primer gen, la inducción sólo se observó para el mensajero maduro, mientras que los niveles de mensajero alternativo no variaron. De esta manera, nuevamente se observó un efecto diferencial sobre ambos tipos de mensajeros, cuyo significado es difícil de interpretar con la información disponible actualmente. El rol fisiológico de las versiones alternativas de los genes *crtYB* y *crtI* aún se desconoce, aunque se sabe que dichas versiones poseen codones de término prematuros en todos los marcos, y que por lo tanto no originarían proteínas activas (Lodato y col. 2003). De acuerdo a esto, el aumento en los niveles de mRNA del mensajero maduro del gen *crtYB* sería suficiente para obtener una mayor cantidad de proteína *crtYB* activa. Un reporte previo indica que la sobreexpresión del gen *crtYB* causa un aumento en la cantidad de pigmentos producidos y la acumulación de β -caroteno y equinenona (Visser y col. 2003). Lo anterior sugiere que la inducción del gen *crtYB* mediada por etanol podría tener un efecto significativo sobre el incremento de la síntesis de pigmentos observado al agregar esta fuente de carbono. Por otra parte, la acumulación de carotenoides no oxigenados observada al sobreexpresar el gen *crtYB*, sugiere que las reacciones de oxidación catalizadas por la enzima astaxantina sintasa (*crtS*) constituyen un paso limitante en la síntesis de este carotenoide (Visser y col. 2003). De acuerdo a esto, el aumento en los niveles de mRNA del gen *crtS* observada al agregar etanol podría tener una especial relevancia en la inducción de la carotenogénesis. Inesperadamente y a diferencia de lo observado

con los genes *crtYB* y *crtS*, la adición de etanol causó una ligera disminución de los niveles de mRNA del gen *crtE*. El significado de dicho hallazgo requiere un mayor estudio para poder ser interpretado.

Finalmente, es importante destacar que la regulación por fuente de carbono de la síntesis de carotenoides es algo poco usual entre otros hongos capaces de sintetizar este tipo de compuestos. Los estudios sobre carotenogénesis en hongos han sido desarrollados principalmente en los organismos *Neurospora crassa*, *Fusarium fujikuroi*, *Mucor circinelloides* y *Phycomyces blakesleeanus* (los dos primeros pertenecientes a la división ascomicetes y los 2 restantes a la división zigomicete), siendo *X. dendrorhous* la única levadura basidiomicete descrita capaz de sintetizar carotenoides. En dichos organismos también se ha correlacionado la variación de los niveles de expresión de los genes de carotenogénesis con la cantidad de pigmentos producidos, pero los estímulos que generan dichas variaciones son completamente diferentes y en general no guardan relación con la fuente de carbono utilizada. Específicamente, los principales factores que influirían sobre la regulación de la biosíntesis de carotenoides en los 4 organismos mencionados son la exposición a luz azul y la actividad sexual ligada a la producción de feromonas (Navarro y col. 2001; Youssar y col. 2005; Almeida y Cerda-Olmedo 2008; Rodríguez-Ortiz y col. 2009).

4.3 Efecto de la glucosa y el etanol sobre la síntesis de pigmentos.

Al estudiar los efectos sobre la pigmentación en nuestro modelo experimental, demostramos que la adición de glucosa a un cultivo en fase estacionaria promueve una importante generación de biomasa, la cual sin embargo está acompañada de una nula producción de pigmentos dentro de las 24 horas posteriores al tratamiento. En dicho

lapso de tiempo las células han consumido cerca del 70% del azúcar agregado, y el análisis de los pigmentos producidos indica la ausencia de carotenoides sintetizados *de novo*. La inhibición de la síntesis de pigmentos se correlaciona, al menos temporalmente, con la disminución en los niveles de expresión de los genes de carotenogénesis estudiados. Tal como se ha discutido anteriormente, diversas evidencias indican que existe una relación directa entre los niveles de expresión génica y la síntesis de pigmentos. Sin embargo, no es posible establecer *a priori* si la inhibición de la síntesis de pigmentos a causa de la adición de glucosa se debe únicamente a la disminución de la expresión de los genes de carotenogénesis. Es bien sabido que la glucosa posee un efecto global sobre el metabolismo celular, causando la inducción de genes relacionados con la glicólisis y en general con metabolismo fermentativo, y reprimiendo muchos de los genes que participan en el metabolismo secundario y en la utilización de fuentes de carbono alternativas (Gancedo 1998). La inducción del gen *PDC* y la represión del gen *inv* (Linde y col. 2009), que codifica para la enzima invertasa (datos no publicados), en respuesta a la adición de glucosa, son un indicio que esta situación también está ocurriendo en *X. dendrorhous*. De este modo, la inhibición de la síntesis de pigmentos en glucosa podría ser consecuencia también de una inhibición de componentes del metabolismo respiratorio, que controlan la disponibilidad de los sustratos de la ruta de carotenogénesis.

Por otra parte, a diferencia de lo que ocurre con glucosa, las fuentes de carbono no fermentables en general causan un aumento en la síntesis de pigmentos en *X. dendrorhous* (Johnson y Lewis 1979; Vazquez y col. 1997). Así, los resultados obtenidos indican que la adición de etanol causa un aumento en la cantidad total de carotenoides luego de 24 horas después del tratamiento. Aún cuando se registra un

aumento en la biomasa, el etanol induce la síntesis *de novo* de pigmentos, evidenciado por un aumento en la cantidad relativa de los carotenoides intermediarios de la vía. Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente por Gu y cols. donde la adición de etanol en diferentes etapas del crecimiento causa un aumento de la cantidad total de carotenoides (Gu y col. 1997). En dicho trabajo se proponen 2 mecanismos por los cuales el etanol induciría la biosíntesis de pigmentos. En primer lugar el etanol y su posterior conversión en acetato por la acción de la enzima aldehído oxidasa produciría radicales superóxido y estos a su vez serían los causantes de la inducción, lo que concuerda con el efecto inductor de algunas especies reactivas de oxígeno sobre la carotenogénesis (Schroeder y Johnson 1993; Schroeder y Johnson 1995; Liu y Wu 2006). Una segunda alternativa es que el acetato prosiga su metabolismo hacia la generación de acetil coenzima A y ésta sirva de sustrato para la posterior síntesis de isoprenoides a través de la vía del mevalonato, lo cual concuerda con las evidencias que indican que la adición de mevalonato causa un aumento en la pigmentación en *X. dendrorhous* (Calo y col. 1995), y que la adición de etanol causa un aumento en la actividad hidroximetil glutaril CoA reductasa (Gu y col. 1997). Este mecanismo está apoyado además por las observaciones de que no solo el etanol, sino varias otras fuentes de carbono no fermentables causan un aumento en la pigmentación (referencias aníala) (Johnson y Lewis 1979; Flores-Cotera y col. 2001), probablemente a causa de su conversión en precursores de isoprenoides. Nuestros resultados sugieren que existiría un tercer mecanismo posible consistente en el aumento en la expresión de los genes *crtYB* y *crtS* causada por la adición del alcohol. Probablemente el aumento en la síntesis de pigmentos mediada por etanol se deba a la contribución de estos y quizá más factores aún no descritos.

4.4 Caracterización de las regiones promotoras de los genes de carotenogénesis reprimidos por glucosa.

La respuesta global de los genes de la ruta ante el efecto de la glucosa puede correlacionarse, al menos en parte, con el hallazgo de sitios de unión al regulador Mig1 en las regiones promotoras de los genes *crtE*, *crtYB*, *crtI* y *crtS*. Dichos sitios resultaron estar presentes también en la región promotora del gen *grg2*, y sugieren que la glucosa podría estar actuando por medio de la acción del mencionado represor. Un primer punto a discutir al respecto tiene que ver con la cantidad de sitios encontrados en cada región promotora. De acuerdo a los resultados obtenidos, la cantidad de sitios presentes no sería proporcional a la magnitud de la represión observada. Esto se ve claramente al comparar la represión observada en el caso del gen *grg2* (aproximadamente 130 veces, Figura 16) versus la registrada para el gen *crtS* (aproximadamente 5 veces, Figura 17f), considerando que en el primer caso se predijeron 2 sitios y en el segundo 4 (Figura 25). Esto concuerda con lo descrito en *S. cerevisiae* donde se ha visto en los distintos genes regulados por Mig1, la magnitud del efecto represor estaría más bien relacionado con la secuencia del o los sitios presentes más que con la cantidad de estos últimos (Nehlin y col. 1991; Wu y Trumbly 1998). Un hecho curioso es la coincidencia en la ubicación de los sitios Mig1 encontrados en los genes *crtYB*, *crtI* y *crtS* (sitio B), aunque su significancia fisiológica es cuestionada por la muy disímil ubicación de los sitios encontrados en los genes *crtE* y *grg2*. Adicionalmente, al analizar diversos casos de genes regulados por este represor, se puede constatar que la ubicación de los sitios de unión es altamente variable y parece no tener una relación estrecha con su funcionalidad (Nehlin y col. 1991; Hu y col. 1995; Klein y col. 1998).

Reportes previos indican que además del sitio consenso, la unión productiva del factor Mig1 requiere de la presencia de una región rica en AT de entre 8 y 10 pb (Lundin y col. 1994). Sin embargo, el análisis del contenido GC de las secuencias aledañas a los sitios Mig1 predichos en los promotores de los genes de carotenogénesis y del gen *grg2*, indicó que sólo en el caso del gen *crtE* se cumple esta condición (Tabla II). Adicionalmente el estudio de la región promotora del gen *inv* que codifica para la invertasa de *X. dendrorhous*, un ejemplo clásico de represión mediada por Mig1 en otras levaduras (Lutfiyya y Johnston 1996; Klein y col. 1998), reveló la presencia de 2 sitios de unión al regulador, los cuales tampoco están precedidos por una región rica en AT (datos no publicados). Esto sugiere que, o bien los sitios predichos no son funcionales, o el potencial regulador Mig1 de *X. dendrorhous* se une a sitios ligeramente distintos a los descritos en ascomicetes. Dado que al comparar las secuencias de los promotores de los genes de carotenogénesis no se encontró ningún otro elemento ni patrón común (Figura 26), si los sitios Mig1 no son funcionales no habría otra similitud evidente que permitiera explicar la respuesta global de represión de los genes que participan en la ruta.

El estudio de la funcionalidad de los sitios Mig1 se ve enormemente dificultado por no contar con el factor purificado, de modo de realizar ensayos de unión DNA-proteína o footprinting que permitan determinar con exactitud si el mencionado represor se une o no a los promotores de los genes de carotenogénesis y dónde (sobre todo considerando las posibles diferencias de los sitios de *X. dendrorhous* con los consensos establecidos en ascomicetes). Sin embargo, como una primera aproximación se determinó la capacidad de distintos fragmentos del promotor del gen *crtS* para unir proteínas presentes en un extracto nuclear de células crecidas en

glucosa. Los resultados obtenidos indicaron que los 4 primeros fragmentos (de 5' a 3') unen una o más proteínas presentes en el extracto nuclear, al igual que el oligonucleótido que contiene el sitio Mig1 B, y posiblemente el que contiene el sitio Mig1 C. Aunque esto constituye un indicio de que los sitios Mig1 o sus secuencias aledañas son capaces de unir proteínas, lamentablemente no es posible saber cuál o cuáles factores son los que se están uniendo. Por otra parte, debido a limitaciones técnicas en la preparación de los extractos nucleares, no fue posible comparar la unión registrada en condiciones distintas (presencia y ausencia de glucosa), lo que probablemente hubiese brindado mayor información. Otra aproximación para demostrar la funcionalidad de los sitios que se intentó originalmente consistió en la mutación puntual de estos, y la posterior evaluación de la respuesta transcripcional a glucosa, usando como modelo el gen *crtS* y su promotor o bien dicho promotor fusionado a un gen reportero. Sin embargo, las limitadas herramientas de transformación genética y selección de transformantes desarrolladas a la fecha para *X. dendrorhous*, además de la falta de genes reporteros cuya expresión sea fácilmente cuantificable hicieron esta estrategia inviable. Probablemente el camino más directo para solucionar este dilema es el clonamiento del gen que codifica para el potencial Mig1 y la posterior expresión y purificación de la proteína correspondiente.

4.5 Caracterización de un posible homólogo al regulador Mig1 de *X. dendrorhous* y su potencial rol en la síntesis de pigmentos.

Los resultados presentados y discutidos en este trabajo sugieren que la represión por glucosa de los genes de carotenogénesis podría estar mediada por el regulador Mig1, motivo por el cual se realizaron diversos intentos por encontrar un homólogo a dicho factor en *X. dendrorhous*. El candidato hallado resultó ser una proteína de 863

aminoácidos, que presentó una alta identidad con proteínas Mig1 de diversos hongos (Figura 28), principalmente en el dominio de unión a DNA (formado por 2 dedos de zinc, Figura 29a). Fuera de ese dominio se observó una baja conservación, tal como se ha descrito para este tipo de proteínas (Nehlin y Ronne 1990). Sin embargo, se encontraron otras regiones conservadas además de los dedos de zinc, las cuales serían importantes para su funcionalidad. En primer lugar, se encontraron diversos motivos RXXS (Figura 28a), los cuales serían sitios de fosforilación por un homólogo a la kinasa *Snf1* descrita en *S. cerevisiae*. Dicha kinasa es un complejo proteico que es inhibido en presencia de glucosa (Westholm y col. 2008). Cuando hay bajas concentraciones del carbohidrato, el complejo *Snf1* fosforila a Mig1, lo que causa la exclusión nuclear de este último (De Vit y col. 1997), previniendo de esta manera que Mig1 reclute al complejo co-represor remodelador de cromatina Cyc8-Tup1 (Papamichos-Chronakis y col. 2004), causando la desrepresión de los genes reprimidos por glucosa. Adicionalmente, se encontró un posible dominio efector, el cual junto al dominio de unión DNA sería suficiente para obtener un represor funcional (Ostling y col. 1996). Dicho dominio mostró ser ligeramente diferente a los reportados en ascomicetes, y posee una región previa conservada en basidiomicetes que no está presente en los primeros (Figura 29d). La diferencia mencionada anteriormente se suma a otras particularidades de las potenciales Mig1p de basidiomicetes, como lo son el tamaño total de la proteína (alrededor de 500 aminoácidos en ascomicetes versus cerca de 800 en basidiomicetes), la ubicación relativa del dominio efector (C-terminal en ascomicetes, central en basidiomicetes) y la existencia de una región conservada que no está presente en ascomicetes (Figura 29c). Lamentablemente a la fecha se han descrito muy pocas proteínas Mig1 de basidiomicetes, por lo que es necesario contar

con un mayor número de secuencias para establecer la generalidad de estas diferencias.

Si bien la presencia de regiones conservadas de importancia funcional son un indicio de que el potencial homólogo a Mig1 de *X. dendrorhous* cumple un rol fisiológico análogo a dicho represor, aún es necesaria la demostración de esta hipótesis. Lo anterior puede abordarse mediante ensayos de complementación heteróloga en cepas mutantes Mig1⁻ de *S. cerevisiae*, tal como se ha hecho con proteínas Mig1 de otras levaduras (Delfin y col. 2001; Carmona y col. 2002). Un antecedente adicional que apoya la existencia del sistema de represión general por glucosa mediado por Mig1 es el reciente aislamiento en nuestro laboratorio de homólogos a las proteínas Cyc8 y Tup1.

5. CONCLUSIONES

- La expresión de los genes de carotenogénesis y de síntesis de precursores de carotenoides presenta una variación acotada durante el crecimiento en medio completo suplementado con glucosa en la cepa silvestre. Dicho patrón de expresión no se ve mayormente alterado en cepas incapaces de sintetizar astaxantina.
- La glucosa posee un efecto represor global sobre los genes de biosíntesis de carotenoides, cuya magnitud máxima es dependiente de la concentración del carbohidrato, y es detectable en concentraciones sobre 1 g/l.
- La respuesta de represión por glucosa de los genes *crtI*, *crtYB* y *crtS* requiere de la síntesis normal de astaxantina o de la presencia de este compuesto, sugiriendo que el pigmento puede tener un efecto de feedback sobre la expresión de dichos genes.
- La glucosa posee un efecto inhibitorio de la síntesis de pigmentos observable incluso hasta 24 horas después de su adición al medio y coincide temporalmente con la represión de los genes de carotenogénesis.
- El etanol posee un efecto inductor de la síntesis de pigmentos, el cual está acompañado de un aumento en la expresión de los genes *crtYB* y *crtS*, considerados como críticos para la ruta.
- Se han aportado indicios de que la represión global de los genes de carotenogénesis puede ser asociada a la presencia de sitios de unión al regulador Mig1 en sus regiones promotoras, y por lo tanto que se expresión estaría controlada por este factor.

- Se clonó y caracterizó un potencial homólogo al regulador Mig1 de *X. dendrorhous*, el cual posee todos los dominios y regiones conservadas entre organismos filogenéticamente relacionados y consideradas funcionalmente importantes.

6. REFERENCIAS

- Adrio, J. L., Lopez, M., Casqueiro, J., Fernandez, C. y Veiga, M. (1995). "Electrophoretic karyotype of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*." *Curr Genet* 27(5): 447-50.
- Albrecht, M., Misawa, N. y Sandmann, G. (1999). "Metabolic engineering of the terpenoid biosynthetic pathway of *Escherichia coli* for production of the carotenoids B-carotene and zeaxanthin." *Biotechnology Letters* 21(9): 791-795.
- Alcaino, J., Barahona, S., Carmona, M., Lozano, C., Marcoleta, A., Niklitschek, M., Sepulveda, D., Baeza, M. y Cifuentes, V. (2008). "Cloning of the cytochrome p450 reductase (*crtR*) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *BMC Microbiol* 8: 169.
- Almeida, E. R. y Cerda-Olmedo, E. (2008). "Gene expression in the regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*." *Curr Genet* 53(3): 129-137.
- Alvarez, V., Rodriguez-Saiz, M., de la Fuente, J. L., Gudina, E. J., Godio, R. P., Martin, J. F. y Barredo, J. L. (2006). "The *crtS* gene of *Xanthophyllomyces dendrorhous* encodes a novel cytochrome-P450 hydroxylase involved in the conversion of beta-carotene into astaxanthin and other xanthophylls." *Fungal Genet Biol* 43(4): 261-272.
- An, G. H. (1997). "Photosensitization of the yeast *Phaffia rhodozyma* at a low temperature for screening carotenoid hyperproducing mutants." *Appl Biochem Biotechnol* 66(3): 263-8.
- An, G. H., Bielich, J., Auerbach, R. y Johnson, E. A. (1991). "Isolation and characterization of carotenoid hyperproducing mutants of yeast by flow cytometry and cell sorting." *Biotechnology (N Y)* 9(1): 70-73.
- An, G. H. y Johnson, E. A. (1990). "Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*." *Antonie Van Leeuwenhoek* 57(4): 191-203.
- An, G. H., Schuman, D. B. y Johnson, E. A. (1989). "Isolation of *Phaffia rhodozyma* Mutants with Increased Astaxanthin Content." *Appl Environ Microbiol* 55(1): 116-124.
- Andrewes, A. G. y Starr, M. P. (1976). "(3R,3'R)-Astaxanthin from the yeast *Phaffia Rhodozyma*." *Phytochemistry* 15: 1009-1011.
- Baeza, M., Retamales, P., Sepulveda, D., Lodato, P., Jimenez, A. y Cifuentes, V. (2009). "Isolation, characterization and long term preservation of mutant strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *J Basic Microbiol* 49(2): 135-141.
- Bjerkeng, B., Peisker, M., Von Schwanzenberg, K., Ytrestøl, T. and Åsgård, T. (2007). "Digestibility and muscle retention of astaxanthin in Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed diets with the red yeast *Phaffia rhodozyma* in comparison with synthetic formulated astaxanthin." *Aquaculture* 269(1-4): 476-489.
- Britton, G. (1995). "Structure and properties of carotenoids in relation to function." *FASEB J* 9(15): 1551-1558.
- Calo, P., De Miguel, T., Velázquez, J. B. y Villa, T. G. (1995). "Mevalonic acid increases *trans*-astaxanthin and carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*." *Biotechnology Letters* 17(6): 575-578.
- Canizares-Villanueva, R. O., Rios-Leal, E., Olvera Ramirez, R., Ponce Noyola, T. y Marquez Rocha, F. (1998). "[Microbial sources of pigments]." *Rev Latinoam Microbiol* 40(1-2): 87-107.

- Carmona, T. A., Barrado, P., Jimenez, A. y Fernandez Lobato, M. (2002). "Molecular and functional analysis of a MIG1 homologue from the yeast *Schwanniomyces occidentalis*." *Yeast* 19(5): 459-465.
- Cifuentes, V., Hermosilla, G., Martinez, C., Leon, R., Pincheira, G. y Jimenez, A. (1997). "Genetics and electrophoretic karyotyping of wild-type and astaxanthin mutant strains of *Phaffia rhodozyma*." *Antonie Van Leeuwenhoek* 72(2): 111-117.
- Cubero, B. y Scazzocchio, C. (1994). "Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CREA-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*." *EMBO J* 13(2): 407-415.
- De Vit, M. J., Waddle, J. A. y Johnston, M. (1997). "Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor." *Mol Biol Cell* 8(8): 1603-1618.
- Delfin, J., Perdomo, W., Garcia, B. y Menendez, J. (2001). "Isolation and sequence of the MIG1 homologue from the yeast *Candida utilis*." *Yeast* 18(7): 597-603.
- Di Mascio, P., Murphy, M. E. y Sies, H. (1991). "Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols." *Am J Clin Nutr* 53(1 Suppl): 194S-200S.
- Farre, D., Roset, R., Huerta, M., Adsuara, J. E., Rosello, L., Alba, M. M. y Messeguer, X. (2003). "Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN." *Nucleic Acids Res* 31(13): 3651-3.
- Flores-Cotera, L. B., Martin, R. y Sanchez, S. (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(3): 341-347.
- Fredlund, E., Beerlage, C., Melin, P., Schnurer, J. y Passoth, V. (2006). "Oxygen and carbon source-regulated expression of PDC and ADH genes in the respiratory yeast *Pichia anomala*." *Yeast* 23(16): 1137-1149.
- Frengova, G. I. y Beshkova, D. M. (2009). "Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance." *J Ind Microbiol Biotechnol* 36(2): 163-180.
- Gancedo, J. M. (1998). "Yeast carbon catabolite repression." *Microbiol Mol Biol Rev* 62(2): 334-361.
- Garcia-Malea, M. C., Acien, F. G., Del Rio, E., Fernandez, J. M., Ceron, M. C., Guerrero, M. G. y Molina-Grima, E. (2009). "Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis*: taking the one-step system outdoors." *Biotechnol Bioeng* 102(2): 651-657.
- Griggs, D. W. y Johnston, M. (1991). "Regulated expression of the GAL4 activator gene in yeast provides a sensitive genetic switch for glucose repression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(19): 8597-8601.
- Gu, W. L., An, G. H. y Johnson, E. A. (1997). "Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*." *J Ind Microbiol Biotechnol* 19(2): 114-117.
- Guerin, M., Huntley, M. E. y Olaizola, M. (2003). "*Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition." *Trends Biotechnol* 21(5): 210-216.
- Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L. y Goycoolea, F. M. (2006). "Astaxanthin: a review of its chemistry and applications." *Crit Rev Food Sci Nutr* 46(2): 185-196.
- Hu, Z., Nehlin, J. O., Ronne, H. y Michels, C. A. (1995). "MIG1-dependent and MIG1-independent glucose regulation of MAL gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*." *Curr Genet* 28(3): 258-266.
- Hu, Z., Zheng, Y. G., Wang, Z. y Shen, Y. C. (2005). "Effect of sugar-feeding strategies on astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21: 771-775.

- Hu, Z., Zheng, Y. G., Wang, Z. y Shen, Y. C. (2006). "pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous* " *Enzyme and Microbial Technology* 39: 586-590.
- Hussein, G., Sankawa, U., Goto, H., Matsumoto, K. y Watanabe, H. (2006). "Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition." *J Nat Prod* 69(3): 443-449.
- Iwamoto, T., Hosoda, K., Hirano, R., Kurata, H., Matsumoto, A., Miki, W., Kamiyama, M., Itakura, H., Yamamoto, S. y Kondo, K. (2000). "Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by astaxanthin." *J Atheroscler Thromb* 7(4): 216-222.
- Johnson, E. A. (2003). "Phaffia rhodozyma: colorful odyssey." *Int Microbiol* 6(3): 169-74.
- Johnson, E. A. y Lewis, M. J. (1979). "Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*." *Journal of General Microbiology* 115: 173-183.
- Johnson, E. A. y Schroeder, W. A. (1995). "Astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*." *Stud. Mycol.* 38: 81-90.
- Johnson, E. A. y Schroeder, W. A. (1996). "Microbial carotenoids." *Adv Biochem Eng Biotechnol* 53: 119-178.
- Jones, E. W., Pringle, J. R. y Broach, J. R. (1992). Regulation of carbon and phosphate utilization. *The Molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*. M. Johnston y M. Carlson, Cold Spring Harbor Press. 2.
- Jullien, N. (2007). "AmplifX version 1.44 <http://ifjr.nord.univ-mrs.fr/AmplifX-Home-page>."
- Kajiwara, S., Fraser, P. D., Kondo, K. y Misawa, N. (1997). "Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*." *Biochem J* 324 (Pt 2): 421-426.
- Kellermann, E. y Hollenberg, C. P. (1988). "The glucose-and ethanol-dependent regulation of PDC1 from *Saccharomyces cerevisiae* are controlled by two distinct promoter regions." *Curr Genet* 14(4): 337-344.
- Klein, C. J., Olsson, L. y Nielsen, J. (1998). "Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of Mig1 in metabolic functions." *Microbiology* 144 (Pt 1): 13-24.
- Kuchin, S. y Carlson, M. (2003). "Analysis of transcriptional repression by Mig1 in *Saccharomyces cerevisiae* using a reporter assay." *Methods Enzymol* 371: 602-614.
- Lewis, M. J., Ragot, N., Berlant, M. C. y Miranda, M. (1990). "Selection of Astaxanthin-Overproducing Mutants of *Phaffia rhodozyma* with beta-Ionone." *Appl Environ Microbiol* 56(9): 2944-2945.
- Libkind, D., Ruffini, A., van Broock, M., Alves, L. y Sampaio, J. P. (2007). "Biogeography, host specificity, and molecular phylogeny of the basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma* and its sexual form, *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *Appl Environ Microbiol* 73(4): 1120-1125.
- Linde, D., Macias, I., Fernandez-Arrojo, L., Plou, F. J., Jimenez, A. y Fernandez-Lobato, M. (2009). "Molecular and biochemical characterization of a beta-fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *Appl Environ Microbiol* 75(4): 1065-1073.
- Liu, Y. S. y Wu, J. Y. (2006). "Hydrogen peroxide-induced astaxanthin biosynthesis and catalase activity in *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *Appl Microbiol Biotechnol* 73(3): 663-668.
- Liu, Y. S. y Wu, J. Y. (2006). "Use of n-hexadecane as an oxygen vector to improve *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures." *J Appl Microbiol* 101(5): 1033-1038.

- Liu, Y. S. y Wu, J. Y. (2007). "Perfusion culture process plus H₂O₂ stimulation for efficient astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *Biotechnol Bioeng* 97(3): 568-573.
- Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method." *Methods* 25(4): 402-408.
- Lodato, P., Alcaino, J., Barahona, S., Niklitschek, M., Carmona, M., Wozniak, A., Baeza, M., Jimenez, A. y Cifuentes, V. (2007). "Expression of the carotenoid biosynthesis genes in *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *Biol Res* 40(1): 73-84.
- Lodato, P., Alcaino, J., Barahona, S., Retamales, P. y Cifuentes, V. (2003). "Alternative splicing of transcripts from crtI and crtYB genes of *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *Appl Environ Microbiol* 69(8): 4676-4682.
- Lodato, P., Alcaino, J., Barahona, S., Retamales, P., Jimenez, A. y Cifuentes, V. (2004). "Study of the expression of carotenoid biosynthesis genes in wild-type and deregulated strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Ex.: *Phaffia rhodozyma*)." *Biol Res* 37(1): 83-93.
- Lombardo, A., Cereghino, G. P. y Scheffler, I. E. (1992). "Control of mRNA turnover as a mechanism of glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* 12(7): 2941-2948.
- Lorenz, R. T. (1998) "A Review of the Carotenoid, Astaxanthin, as a Pigment and vitamin Source for Cultured *Penaeus* Prawn." *NatuRose Technical Bulletin* #051.
- Lorenz, R. T. y Cysewski, G. R. (2000). "Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin." *Trends Biotechnol* 18(4): 160-167.
- Lu, M., Ji, L., Liu, Y., Zhou, P. y Yu, L. (2008). "[Kinetic model for optimal feeding strategy in astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*]." *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 24(11): 1937-1942.
- Lundin, M., Nehlin, J. O. y Ronne, H. (1994). "Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the GC box-binding zinc finger protein MIG1." *Mol Cell Biol* 14(3): 1979-85.
- Lutfiyaya, L. L. y Johnston, M. (1996). "Two zinc-finger-containing repressors are responsible for glucose repression of SUC2 expression." *Mol Cell Biol* 16(9): 4790-7.
- Marcoleta, A. (2007). Identificación y caracterización de genes que se expresan en el metabolismo fermentativo de *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Tesis de Ingeniero en Biotecnología Molecular.
- Marin, D., Linde, D. y Fernandez Lobato, M. (2006). "Purification and biochemical characterization of an alpha-glucosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *Yeast* 23(2): 117-25.
- Martinez, C., Hermosilla, G., Leon, R., Pincheira, G. y Cifuentes, V. (1998). "Genetic transformation of astaxanthin mutants of *Phaffia rhodozyma*." *Antonie Van Leeuwenhoek* 73(2): 147-53.
- McNally, M. T. y Free, S. J. (1988). "Isolation and characterization of a *Neurospora* glucose-repressible gene." *Curr Genet* 14(6): 545-51.
- Messeguer, X., Escudero, R., Farre, D., Nunez, O., Martinez, J. y Alba, M. M. (2002). "PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches." *Bioinformatics* 18(2): 333-4.
- Miao, L., Chi, S., Tang, Y., Su, Z., Yin, T., Guan, G. y Li, Y. (2011). "Astaxanthin biosynthesis is enhanced by high carotenogenic gene expression and decrease of fatty acids and ergosterol in a *Phaffia rhodozyma* mutant strain." *FEMS Yeast Res*.

- Misawa, N. y Shimada, H. (1997). "Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts." *J Biotechnol* 59(3): 169-81.
- Navarro, E., Lorca-Pascual, J. M., Quiles-Rosillo, M. D., Nicolas, F. E., Garre, V., Torres-Martinez, S. y Ruiz-Vazquez, R. M. (2001). "A negative regulator of light-inducible carotenogenesis in *Mucor circinelloides*." *Mol Genet Genomics* 266(3): 463-470.
- Nehlin, J. O., Carlberg, M. y Ronne, H. (1991). "Control of yeast GAL genes by MIG1 repressor: a transcriptional cascade in the glucose response." *EMBO J* 10(11): 3373-3377.
- Nehlin, J. O. y Ronne, H. (1990). "Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins." *EMBO J* 9(9): 2891-2898.
- Neubohn, B., Gubatz, S., Wobus, U. y Weber, H. (2000). "Sugar levels altered by ectopic expression of a yeast-derived invertase affect cellular differentiation of developing cotyledons of *Vicia narbonensis* L." *Planta* 211(3): 325-334.
- Niklitschek, M., Alcaino, J., Barahona, S., Sepulveda, D., Lozano, C., Carmona, M., Marcoleta, A., Martinez, C., Lodato, P., Baeza, M. y Cifuentes, V. (2008). "Genomic organization of the structural genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *Biol Res* 41(1): 93-108.
- Ojima, K., Breitenbach, J., Visser, H., Setoguchi, Y., Tabata, K., Hoshino, T., van den Berg, J. y Sandmann, G. (2006). "Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a beta-carotene 3-hydroxylase/4-ketolase." *Mol Genet Genomics* 275(2): 148-158.
- Ostling, J., Carlberg, M. y Ronne, H. (1996). "Functional domains in the Mig1 repressor." *Mol Cell Biol* 16(3): 753-761.
- Palozza, P. y Krinsky, N. I. (1992). "Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model." *Arch Biochem Biophys* 297(2): 291-295.
- Papamichos-Chronakis, M., Gligoris, T. y Tzamarias, D. (2004). "The Snf1 kinase controls glucose repression in yeast by modulating interactions between the Mig1 repressor and the Cyc8-Tup1 co-repressor." *EMBO Rep* 5(4): 368-372.
- Pashkow, F. J., Watumull, D. G. y Campbell, C. L. (2008). "Astaxanthin: a novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease." *Am J Cardiol* 101(10A): 58D-68D.
- Phaff, H. J., Miller, M. W., Yoneyama, M. y Soneda, M. (1972). "A comparative study of the yeast flora associated with trees on the Japanese Island and on the West Coast of North America." *Fermentation Technology Today: Proceedings IV IFS*, (Ed.): G. Terui: 759-774.
- Pronk, J. T., Yde Steensma, H. y Van Dijken, J. P. (1996). "Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* 12(16): 1607-33.
- Rao, A. V. y Rao, L. G. (2007). "Carotenoids and human health." *Pharmacol Res* 55(3): 207-16.
- Retamales, P., Leon, R., Martinez, C., Hermosilla, G., Pincheira, G. y Cifuentes, V. (1998). "Complementation analysis with new genetic markers in *Phaffia rhodozyma*." *Antonie Van Leeuwenhoek* 73(3): 229-36.
- Rodriguez-Ortiz, R., Limon, M. C. y Avalos, J. (2009). "Regulation of carotenogenesis and secondary metabolism by nitrogen in wild-type *Fusarium fujikuroi* and carotenoid-overproducing mutants." *Appl Environ Microbiol* 75(2): 405-13.
- Romero, I. (2010). Participación del gen farnesil pirofosfato sintasa (FPS) en la biosíntesis de astaxantina en *Xanthophyllomyces dendrorhous*, Tesis de magíster en ciencias biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

- Sacchetti, J. C. y Poulter, C. D. (1997). "Creating isoprenoid diversity." *Science* 277(5333): 1788-9.
- Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandmann, G. (2001). "Carotenoid biosynthesis and biotechnological application." *Arch Biochem Biophys* 385(1): 4-12.
- Schroeder, W. A. y Johnson, E. A. (1993). "Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia Rhodozyma*." *Journal of General Microbiology* 139: 907-912.
- Schroeder, W. A. y Johnson, E. A. (1995). "Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*." *J Biol Chem* 270(31): 18374-18379.
- Sedkova, N., Tao, L., Rouviere, P. E. y Cheng, Q. (2005). "Diversity of carotenoid synthesis gene clusters from environmental *Enterobacteriaceae* strains." *Appl Environ Microbiol* 71(12): 8141-8146.
- Skory, C. D. (2003). "Induction of *Rhizopus oryzae* pyruvate decarboxylase genes." *Curr Microbiol* 47(1): 59-64.
- Ukibe, K., Katsuragi, T., Tani, Y. y Takagi, H. (2008). "Efficient screening for astaxanthin-overproducing mutants of the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* by flow cytometry." *FEMS Microbiol Lett* 286(2): 241-248.
- Vazquez, M. y Martin, A. M. (1998). "Optimization of *Phaffia rhodozyma* continuous culture through response surface methodology." *Biotechnol Bioeng* 57(3): 314-20.
- Vazquez, M., Santos, V. y Parajo, J. C. (1997). "Effect of the carbon source on the carotenoid profiles of *Phaffia rhodozyma* strains." *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 19(4): 263-268.
- Verdoes, J. C., Krubasik, K. P., Sandmann, G. y van Ooyen, A. J. (1999). "Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *Mol Gen Genet* 262(3): 453-461.
- Verdoes, J. C., Misawa, N. y van Ooyen, A. J. (1999). "Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *Biotechnol Bioeng* 63(6): 750-755.
- Verdoes, J. C., Sandmann, G., Visser, H., Diaz, M., van Mossel, M. y van Ooyen, A. J. (2003). "Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*)." *Appl Environ Microbiol* 69(7): 3728-3738.
- Visser, H., van Ooyen, A. J. y Verdoes, J. C. (2003). "Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *FEMS Yeast Res* 4(3): 221-231.
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M. y Barton, G. J. (2009). "Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench." *Bioinformatics* 25(9): 1189-1191.
- Weber, R. W., Becerra, J., Silva, M. J. y Davoli, P. (2008). "An unusual *Xanthophyllomyces* strain from leaves of *Eucalyptus globulus* in Chile." *Mycol Res* 112(Pt 7): 861-867.
- Wery, J., Gutker, D., Renniers, A. C., Verdoes, J. C. y van Ooyen, A. J. (1997). "High copy number integration into the ribosomal DNA of the yeast *Phaffia rhodozyma*." *Gene* 184(1): 89-97.

- Westholm, J. O., Nordberg, N., Muren, E., Ameer, A., Komorowski, J. y Ronne, H. (2008). "Combinatorial control of gene expression by the three yeast repressors Mig1, Mig2 and Mig3." *BMC Genomics* 9: 601.
- Wozniak, A., Lozano, C., Barahona, S., Niklitschek, M., Marcoleta, A., Alcaïno, J., Sepulveda, D., Baeza, M. y Cifuentes, V. (2011). "Differential carotenoid production and gene expression in *Xanthophyllomyces dendrorhous* grown in a non-fermentable carbon source." *FEMS Yeast Res* 11(3): 252-262.
- Wu, J. y Trumbly, R. J. (1998). "Multiple regulatory proteins mediate repression and activation by interaction with the yeast Mig1 binding site." *Yeast* 14(11): 985-1000.
- Yamane, Y., Higashida, K., Nakashimada, Y., Kakizono, T. y Nishio, N. (1997). "Influence of Oxygen and Glucose on Primary Metabolism and Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma* in Batch and Fed-Batch Cultures: Kinetic and Stoichiometric Analysis." *Appl Environ Microbiol* 63(11): 4471-4478.
- Yoon, S. H., Lee, Y. M., Kim, J. E., Lee, S. H., Lee, J. H., Kim, J. Y., Jung, K. H., Shin, Y. C., Keasling, J. D. y Kim, S. W. (2006). "Enhanced lycopene production in *Escherichia coli* engineered to synthesize isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate from mevalonate." *Biotechnol Bioeng* 94(6): 1025-32.
- Youssar, L., Schmidhauser, T. J. y Avalos, J. (2005). "The *Neurospora crassa* gene responsible for the cut and ovc phenotypes encodes a protein of the haloacid dehalogenase family." *Mol Microbiol* 55(3): 828-38.