



REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES
DE CAROTENOGÉNESIS 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

Mauricio Alejandro Niklitschek Oyarzún
Enero, 2011.

Director de Tesis Dr.:
Victor Hugo Cifuentes Guzmán

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

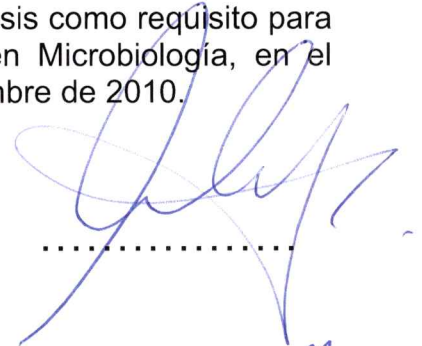
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

MAURICIO ALEJANDRO NIKLITSCHKE OYARZÚN

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 de Tesis rendido el día 17 de Diciembre de 2010.

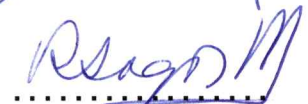
Director de Tesis:

Dr. Víctor Cifuentes G.

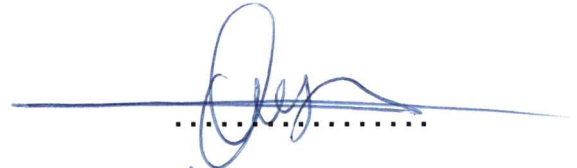


Comisión de Evaluación de la Tesis

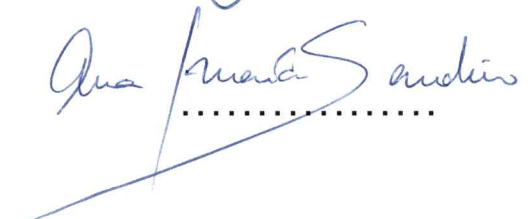
Dra. Rosa Alba Lagos



Dr. Omar Orellana



Dra. Ana María Sandino



Cuando niños, mis papás nos contaron a mí y a mi hermana que íbamos a tener un hermanito. De allí en adelante, siempre que nos subimos al auto dejamos un espacio libre que él llenaría cuando naciese.

Hermana, ahora que tú no estás con nosotros te tenemos reservado un espacio en nuestro corazón.

AGRADECIMIENTOS

Ahora que escribo estas palabras de agradecimiento, me es difícil separar la alegría que siento con la gran pena que me acompaña. Sin embargo, ha llegado el tiempo de detener por unos instantes esta ajetreada vida en la que estamos inmersos y mirar el camino que he recorrido para lograrlo. Allí, aparecen las penas y las alegrías, los éxitos y los fracasos y lo más importante, las personas que han estado conmigo para acompañarme y apoyarme en cada uno de estos momentos. Soy un agradecido de tenerlos a mi alrededor ya que intentan hacer de mí un mejor hombre.

Primero que todo, agradezco a mi mamá María Antonieta y a mi papá Ubald por todo lo que me han dado. Soy un privilegiado de tenerlos. También agradezco a mis hermanos Karinne y Oscar, y a mis sobrinos Joseph y Camila por su cariño y apoyo a la distancia. Gracias a toda mi familia por estar siempre conmigo.

Agradezco a todos mis compañeros de laboratorio, los "old school" Salvador, Andrés, Carla, Dony, Jenny, Marcelo, Oriana, Pilar y Rafael, y a la nueva (y no tan nueva) generación, Natty, Ignacio, JuanMi, miniMario, Iris, Pamela, Gabriela, Nicole y Pablo, por su amistad, apoyo y colaboración tanto dentro como fuera del laboratorio.

Debo dar un reconocimiento especial al ya histórico equipo de futbolito McHabby y a sus fundadores Gastón, Juan y Pulga, que me ha brindado importantes logros futbolísticos, pero lo que es más importante, la amistad fuera de la cancha.

Agradezco de manera especial al profe Víctor por haberme aceptado en su grupo de trabajo y darme siempre su apoyo incondicional, por sus consejos y tirones de oreja, y por su preocupación y guía más allá del laboratorio.

Gracias a toda mi familia, amigos y profesores.

Gracias a los proyectos FONDECYT N° 1040450, FONDECYT N° 1100324, MECESUP UCH-0106 e INNOVA-Corfo 07CN13PZT-17 por el financiamiento para desarrollar este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Ahora que escribo estas palabras de agradecimiento, me es difícil separar la alegría que siento con la gran pena que me acompaña. Sin embargo, ha llegado el tiempo de detener por unos instantes esta ajetreada vida en la que estamos inmersos y mirar el camino que he recorrido para lograrlo. Allí, aparecen las penas y las alegrías, los éxitos y los fracasos y lo más importante, las personas que han estado conmigo para acompañarme y apoyarme en cada uno de estos momentos. Soy un agradecido de tenerlos a mi alrededor ya que intentan hacer de mí un mejor hombre.

Primero que todo, agradezco a mi mamá María Antonieta y a mi papá Ubald por todo lo que me han dado. Soy un privilegiado de tenerlos. También agradezco a mis hermanos Karinne y Oscar, y a mis sobrinos Joseph y Camila por su cariño y apoyo a la distancia. Gracias a toda mi familia por estar siempre conmigo.

Agradezco a todos mis compañeros de laboratorio, los "old school" Salvador, Andrés, Carla, Dony, Jenny, Marcelo, Oriana, Pilar y Rafael, y a la nueva (y no tan nueva) generación, Natty, Ignacio, JuanMi, miniMario, Iris, Pamela, Gabriela, Nicole y Pablo, por su amistad, apoyo y colaboración tanto dentro como fuera del laboratorio.

Debo dar un reconocimiento especial al ya histórico equipo de fútbolito McHabby y a sus fundadores Gastón, Juan y Pulga, que me ha brindado importantes logros futbolísticos, pero lo que es más importante, la amistad fuera de la cancha.

Agradezco de manera especial al profe Víctor por haberme aceptado en su grupo de trabajo y darme siempre su apoyo incondicional, por sus consejos y tirones de oreja, y por su preocupación y guía más allá del laboratorio.

Gracias a toda mi familia, amigos y profesores.

Gracias a los proyectos FONDECYT N° 1040450, MECESUP UCH-0106 e INNOVA-Corfo 07CN13PZT-17 por el financiamiento para desarrollar este trabajo.

Gracias.

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE MATERIAS	II
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ABREVIATURAS	X
RESUMEN.....	12
ABSTRACT	15
1. INTRODUCCIÓN	18
2. HIPÓTESIS.....	32
3. OBJETIVOS.	34
3.1. OBJETIVO GENERAL	35
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4. MATERIALES Y MÉTODOS	36
4.1. CEPAS Y PLASMIDIOS.....	37
4.2. CULTIVO DE MICROORGANISMOS.	37

4.2.1.	Cultivo de <i>E. coli</i>	37
4.2.2.	Cultivo de <i>X. dendrorhous</i>	37
4.3.	TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.	37
4.3.1.	Extracción de DNA genómico de <i>X. dendrorhous</i>	40
4.3.2.	Extracción de RNA de <i>X. dendrorhous</i>	40
4.3.3.	Transcripción reversa (RT).....	41
4.3.4.	PCR en tiempo real.....	41
4.3.5.	Extracción de DNA plasmidial.	42
4.3.6.	Electroforesis de DNA.....	43
4.3.7.	Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.....	43
4.3.8.	Cuantificación de fragmentos de DNA.	43
4.3.9.	Digestiones de DNA con enzimas de restricción.	44
4.3.10.	Ligación de DNA.	44
4.3.11.	Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i>	44
4.3.12.	Transformación de <i>E. coli</i> por electroporación.....	45
4.3.13.	Preparación de células electrocompetentes de <i>X. dendrorhous</i>	45
4.3.14.	Transformación de <i>X. dendrorhous</i> por electroporación	46
4.3.15.	Diseño de partidores.	46
4.3.16.	Amplificación de DNA.....	46
4.4.	EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE PIGMENTOS	50
4.4.1.	Extracción de carotenoides.	50
4.4.2.	Cuantificación de pigmentos totales por espectrofotometría visible.....	51

4.4.3.	Análisis de los pigmentos por HPLC.....	51
4.5.	ANÁLISIS DE SECUENCIAS.....	52
4.6.	ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO	
REAL.	52
4.6.1.	Diseño de los partidores para PCR en tiempo real.....	53
4.6.2.	Evaluación y selección del kit de PCR en tiempo real.....	54
4.6.3.	Determinación de la especificidad y eficiencia de los partidores para PCR en tiempo real.....	57
5.	RESULTADOS	59
5.1.	DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE	
LOS GENES <i>CRTYB</i> Y <i>CRTI</i> EN LAS DIFERENTES FASES DE		
CRECIMIENTO.....		60
5.2.	EVALUACIÓN DE LA REPRESIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN	
DE LOS GENES <i>CRTYB</i> Y <i>CRTI</i> MEDIADA POR GLUCOSA.....		66
5.3.	OBTENCIÓN DE CEPAS DE <i>X. DENDRORHOUS</i> MUTANTES	
PARA AMBOS TIPOS DE PROCESAMIENTO DEL GEN <i>CRTI</i>.....		69
5.3.1.	Modificación de los sitios aceptores de " <i>splicing</i> " del gen <i>crtI</i>	70
5.3.2.	Inserción de las diferentes variantes del gen <i>crtI</i> en el genoma de <i>X. dendrorhous</i>	72
5.3.3.	Obtención de cepas de <i>X. dendrorhous</i> mutantes homocigotas del gen <i>crtI</i>	74

5.4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DEL GEN <i>CRTI</i> EN LAS CEPAS DE <i>X. DENDRORHOUS</i> MUTANTES DE "SPLICING"	78
5.5. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE MRNA MADURO Y ALTERNATIVO DE UN GEN REPORTERO QUE PORTA EL PRIMER INTRÓN DEL GEN <i>CRTI</i>	80
5.5.1. Construcción del gen reportero interrumpido por el primer intrón del gen <i>crtI</i>	82
5.5.2. Análisis de las cepas de <i>X. dendrorhous</i> portadoras del gen reportero interrumpido por el primer intrón del gen <i>crtI</i>	83
5.6. EVALUACIÓN DE LA REPRESIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN <i>CRTYB</i> MEDIADA POR GLUCOSA EN CEPAS ALBINAS DE <i>X. DENDRORHOUS</i>	88
6. DISCUSIÓN.....	91
6.1. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE <i>X. DENDRORHOUS</i> MEDIANTE QRT-PCR.	93
6.2. EXPRESIÓN DE LOS GENES DE CAROTENOGÉNESIS Y BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES.	95
6.3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MODULADA POR GLUCOSA.	98

6.4.	PROCESAMIENTO DEL PRIMER INTRÓN DEL GEN <i>CRT1</i>	99
6.5.	REGULACIÓN DE LA CAROTENOGÉNESIS EN <i>X.</i> <i>DENDRORHOUS</i>	100
7.	CONCLUSIONES.	102
8.	BIBLIOGRAFÍA.	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plasmidios utilizados en este trabajo.	38
Tabla 2. Cepas utilizadas en este trabajo.	39
Tabla 3. Partidores utilizados en este trabajo	47
Tabla 4. Diseño de partidores para PCR en tiempo real.....	55
Tabla 5: Comparación de 2 kits de PCR en tiempo real.	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características macro y microscópicas de <i>X. dendrorhous</i>	21
Figura 2. Ruta de biosíntesis de astaxantina en <i>X. dendrorhous</i>	24
Figura 3. Generación de las versiones madura y alternativa de los mRNA de los genes <i>crfYB</i> y <i>crfI</i>	27
Figura 4. Traducción de los mRNA maduro y alternativo de los genes <i>crfYB</i> y <i>crfI</i>	29
Figura 5. Curvas de amplificación y disociación de los distintos genes a medir mediante qRT-PCR.	58
Figura 6. Cinética de crecimiento y síntesis de pigmentos de <i>X. dendrorhous</i>	61
Figura 7. Expresión de los mensajeros maduro y alternativo de los genes <i>crfYB</i> y <i>crfI</i> en las diferentes etapas de cultivo.	64
Figura 8. Razón mmRNA / amRNA de los genes <i>crfYB</i> y <i>crfI</i> en las diferentes etapas de cultivo.	65
Figura 9. Regulación de la expresión del gen <i>crfYB</i> mediada por glucosa	67
Figura 10. Regulación de la expresión del gen <i>crfI</i> mediada por glucosa	68
Figura 11. Obtención de las versiones modificadas del gen <i>crfI</i> en sus sitios aceptores de “ <i>splicing</i> ” alternativo y maduro.	71

Figura 12. Obtención de cepas de <i>X. dendrorhous</i> que portan las mutaciones del gen <i>crtI</i>	75
Figura 13. Obtención de cepas de <i>X. dendrorhous</i> mutantes homocigotas utilizando el método del doble recombinante.	77
Figura 14. Predicción del posible mecanismo de elección de los sitios de “ <i>splicing</i> ”	79
Figura 15. Expresión del gen <i>crtI</i> en cepas de <i>X. dendrorhous</i> mutantes de los sitios aceptores de “ <i>splicing</i> ”	81
Figura 16. Inserción del intrón del gen <i>crtI</i> en el gen <i>hph</i>	84
Figura 17. Procesamiento del primer intrón del gen <i>crtI</i> en un gen reportero.	86
Figura 18. Cinética de síntesis de los mensajeros maduro y alternativo de los genes <i>crtI</i> y <i>hph</i>	87
Figura 19. Regulación transcripcional y post-transcripcional del gen <i>crtYB</i> en cepas incapaces de sintetizar pigmentos.	90

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
aá.	Aminoácidos
Amp	Ampicilina
D.O.	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
gDNA	DNA genómico
GGPP	Geranilgeranil difosfato
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
Hyg	Higromicina
IPP	Isopentenil difosfato
Kan	Kanamicina
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
NA	Número de acceso a la base de datos GenBank
Nt	Nucleótido
pBS	Plasmidio pBlueScript SK ⁻
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Ppm	Partes por millón (μg de pigmento/g de biomasa)
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
TAE	Amortiguador Tris-acetato-EDTA

TE	Amortiguador Tris-EDTA
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
UV	Ultra violeta
pI	Punto isoeléctrico
x-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolilo- β -D-galactopiranosido
YM	Medio de cultivo extracto levadura-malta

RESUMEN

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928, los microorganismos se han convertido en una fuente muy importante de productos naturales. Un grupo destacado de moléculas sintetizadas por éstos son los carotenoides, que pertenecen a la familia de los terpenos y de los cuales se han descrito más de 600 estructuras distintas. Muchas de estas moléculas presentan actividad biológica para los organismos, teniendo un potencial uso para el hombre.

La levadura basidiomicete *X. dendrorhous* destaca dentro de los hongos carotenogénicos por su capacidad de sintetizar astaxantina como principal pigmento, la que es utilizada en la industria química y farmacéutica. Para su biosíntesis a partir de GGPP, se ha descrito la participación de los genes *crtYB*, *crtI* y *crtS* que codifican a las enzimas fitoeno β -caroteno sintasa, fitoeno desaturasa y astaxantina sintasa, respectivamente. El β -caroteno es el principal pigmento intermediario de la vía, sintetizado por la acción conjunta de las 2 primeras enzimas y se encuentra ubicuamente en muchos organismos carotenogénicos. Desde el punto de vista molecular, se ha estudiado la estructura y función de los genes de la vía y en nuestro laboratorio se han determinado los niveles transcripcionales de estos en diferentes condiciones de cultivo. Así, se demostró que en general, los niveles de expresión de estos genes son bajos y varían durante el ciclo de crecimiento de la levadura, sugiriendo un mecanismo de regulación transcripcional. Además, se determinó la presencia de variantes de "splicing" del mRNA de los genes *crtYB* y *crtI*, sugiriendo un posible mecanismo de regulación post-transcripcional.

En este trabajo se adaptó la técnica de RT-PCR en tiempo real, determinándose la cinética de expresión de los genes *crfYB* y *crtI* y cómo ésta se ve modificada durante el ciclo de crecimiento de la levadura. Así, se demostró que ambos genes se expresan durante todo el ciclo de crecimiento, teniendo sus máximos de expresión en la etapa exponencial tardía (*crfYB*) y exponencial (*crtI*), pudiendo ser esta variación la que gatilla la inducción de la carotenogénesis en la etapa exponencial tardía de crecimiento. Además, se determinó la relación entre las versiones madura y alternativa de los mRNA, observando que ésta varía durante el ciclo de crecimiento, variación más acentuada en el caso del gen *crtI*, en la cual en la etapa exponencial es de 50:1 (mmRNA: amRNA) hasta fase estacionaria que es de 4:1.

Debido a que la carotenogénesis es un proceso dependiente de la fuente de carbono utilizada para el crecimiento de la levadura, se evaluó la respuesta transcripcional de los genes *crfYB* y *crtI* ante la adición de glucosa al medio de cultivo, determinando que ésta reprime la transcripción de ambos genes alrededor de 5 veces y además, afecta de manera diferencial la generación de los mRNA maduros con respecto a los mRNA alternativos.

En cepas de *X. dendrorhous* mutantes del gen *crtI*, que procesan su mRNA sólo hacia su versión alternativa, se observa que éstas son incapaces de sintetizar pigmentos, indicando que el amRNA no sería productivo y además, se observa la acumulación de mRNA no procesado, demostrando que la generación del amRNA es regulado. Cuando se insertó el primer intrón del gen *crtI* en un gen reportero, se observó la presencia de ambos tipos de procesamiento, indicando que la información

requerida para esto se encontraba contenida en su secuencia. Sin embargo, la cinética de procesamiento no se correlacionó con la del gen silvestre, sugiriendo que la regulación de la síntesis también estaría dada por otras secuencias.

Finalmente, se determinó que los pigmentos tienen un efecto de feedback sobre la expresión del gen *crtYB*, ya que la represión transcripcional por glucosa se pierde en cepas albinas de la levadura.

ABSTRACT

Since the discovery of penicillin in 1928, microorganisms have become an important source of natural products. One outstanding group of molecules synthesized by microorganisms are carotenoids, which belong to the terpenes family, for which more than 600 different structures have been described. Many of these molecules display biological activity in organisms, making them of potential use to humans.

Among carotenogenic fungi, the basidiomycetous yeast *X. dendrorhous* is notable for its ability to synthesize astaxanthin as a main pigment, which is used in the chemical and pharmaceutical industries. Astaxanthin biosynthesis starting from GGPP requires the participation of the *crtYB*, *crtI* and *crtS* genes, which encode for the enzymes phytoene β -carotene synthase, phytoene desaturase and astaxanthin synthase, respectively. The main intermediate pigment in this pathway, β -carotene, is synthesized by the joint action of the first 2 enzymes and is found ubiquitously in many carotenogenic organisms. From a molecular perspective, the gene structure and function of this pathway have been extensively studied, and in our laboratory we have determined the transcriptional levels of these genes in different culture conditions. In our experiments, it was shown that in general, the expression levels of these genes are low and vary during the yeast's growth cycle, suggesting a transcriptional regulation mechanism. In addition, we detected the presence of splicing variants for the *crtYB* and *crtI* genes, suggesting a possible post-transcriptional regulation mechanism.

In this thesis, the Real Time RT-PCR technique was adapted in order to determine the expression kinetic of *crtI* and *crtYB* genes, and its variation during the yeast growth cycle. It was shown that both genes are expressed throughout the entire growth cycle, having their maximum expression levels in late exponential (*crtYB*) and exponential (*crtI*) phases of growth. It may be this variation that triggers the induction of carotenogenesis in the late exponential stage. In addition, we investigated the ratio between mature and alternative versions of the mRNAs, observing variations during the growth cycle. This variation is higher in the case of the *crtI* gene than the *crtYB* gene, for which the exponential phase ratio is 50:1 (mmRNA : amRNA), while during the stationary phase is 4:1.

Because carotenogenesis is a process depending on the carbon source used for yeast growth, we evaluated the transcriptional response of *crtYB* and *crtI* genes to glucose addition into the culture media. We determined that glucose represses around 5 times both genes transcription and also affects differentially the mature mRNA regarding to alternative mRNA synthesis.

In *X. dendrorhous* mutant strains for the *crtI* gene, that process its mRNA only into the alternative version, we observed that they are unable to synthesize pigments, indicating that the amRNA would not be productive. These strains also show the accumulation of unprocessed mRNA, demonstrating that the generation of amRNA is regulated. When we inserted the first intron of the *crtI* gene into a reporter gene, the presence of both types of splice variants was observed, indicating that the information required for the splicing was in the sequence. However, the processing kinetics did not

correlate with the *crtI* gene, suggesting that the synthesis regulation would be given by other sequences.

Finally, it was determined that the pigments have a feedback effect on *crtYB* gene expression, because glucose transcriptional repression is lost in albino yeast strains.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, nos encontramos con una necesidad creciente de productos naturales, los que son utilizados en variados quehaceres de la industria (Gershenzon y Dudareva, 2007). Así, destacan como fuente de estos productos diferentes microorganismos, los cuales son utilizados por su amplia y variada capacidad metabólica, ya sea por sintetizar enzimas activas en condiciones extremas de temperatura, pH, etc. o por la síntesis de muchas moléculas bio-activas para el hombre (Chang y Keasling, 2006; Roberts, 2007). Dentro de estas últimas, encontramos los carotenoides, moléculas provenientes de la ruta de biosíntesis de los terpenos y de los cuales se han identificado más de 600 estructuras distintas (Britton, 1995). Debido a la presencia de enlaces dobles conjugados, los carotenoides son compuestos coloreados, variando su color desde el amarillo pálido hasta rojo oscuro (Armstrong, 1994). En la naturaleza, son sintetizados por bacterias fotosintéticas y no fotosintéticas, algas, plantas y hongos (Karnaukhov, 1990).

Todos los carotenoides derivan de la ruta de biosíntesis de los isoprenoides, compuestos sintetizados a partir de un precursor común de 5 átomos de carbono denominado isopentenil pirofosfato (IPP) (Ogura, 1969). Por su estructura química, se han clasificado en dos grupos: los carotenos, que no presentan átomos de oxígeno en su estructura y las xantófilas, que si poseen átomos de oxígeno.

Debido a las características químicas de los carotenoides, se les han encontrado numerosas aplicaciones y usos, ya sea como colorantes y/o suplementos alimenticios en animales, especialmente salmónidos y crustáceos (Johnson y Lewis, 1979; Schroeder y Johnson, 1993). Además, existen evidencias de que estos

compuestos cumplen un papel importante en la prevención de enfermedades cardiovasculares y el cáncer, catalogándose como productos nutraceuticos (Canfield y col., 1992; Schmidt-Dannert, 2000).

Uno de los carotenoides que presenta un alto interés biotecnológico es la astaxantina, la cual es altamente utilizada en la industria acuícola y farmacéutica (Nakano y col., 1999; Takimoto y col., 2007). La biosíntesis de este pigmento se limita sólo a algunas especies de bacterias marinas (Liaaen-Jensen y Andrewes, 1972), el alga unicelular *Haematococcus pluvialis* (Lorenz y Cysewski, 2000) y la levadura basidiomicete *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex. *Phaffia rhodozyma*) (Andrewes y col., 1976). La levadura *X. dendrorhous*, se caracteriza por sintetizar la astaxantina como su principal pigmento, además de otros carotenoides entre los cuales se encuentra el fitoeno, el licopeno y el β -caroteno (Golubev, 1995; Johnson y col., 1978) (figura 1).

Se ha descrito que debido a que *X. dendrorhous* es un simbiote en árboles, la carotenogénesis sería una respuesta a la presencia de compuestos antifúngicos foto-activables producidos por el hospedero (Schroeder y Johnson, 1995). Además, ya que la levadura carece de algunos de los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo que sí presentan otros organismos (diferentes superóxidos dismutasas [Fe-SOD y Cu/Zn-SOD] (Schroeder y Johnson, 1993)), se ha sugerido que estos pigmentos serían importantes para la protección contra las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas durante su crecimiento (Galano y col., 2010).

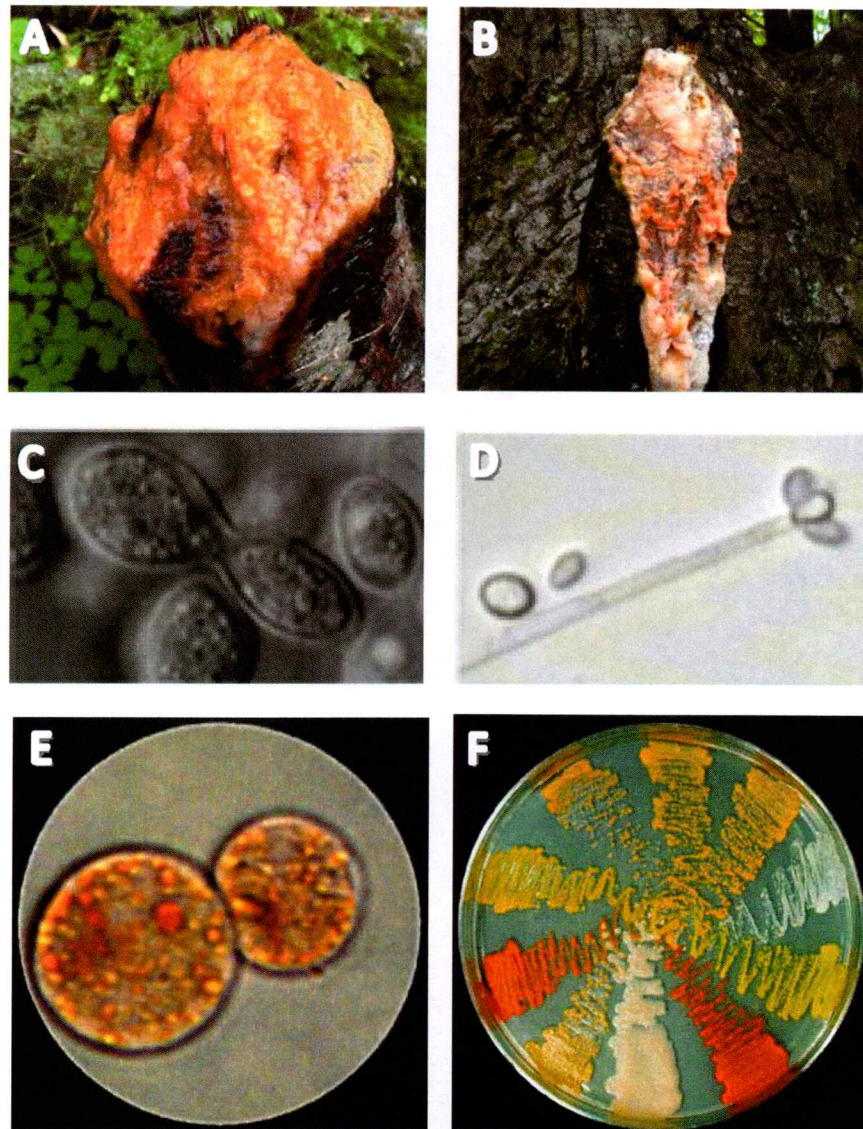


Figura 1. Características macro y microscópicas de *X. dendrorhous*.

A) y **B)** Colonización de heridas de árboles por levaduras pigmentadas, siendo una de ellas *X. dendrorhous*. **C)** Microscopía de contraste de fases de *X. dendrorhous* en división (aumento 1.000X). **D)** Microscopía de contraste de fases de un holobasidio con basidiosporas terminales (aumento 400X). **E)** Almacenamiento de los distintos pigmentos en gotas de lípidos dentro de la levadura. **F)** Diferentes cepas de *X. dendrorhous* mutantes para la síntesis de pigmentos. (Fotos de Carlos Echavarrri-Erasun y Eric Johnson, 2003 y 2004. ASM MicrobeLibrary).

La utilización de *X. dendrorhous* como fuente natural de astaxantina para la industria presenta algunas ventajas sobre su principal competidor *H. pluvialis*, ya que puede proliferar en forma heterótrofa, con una mayor velocidad de crecimiento y por tener la capacidad de crecer en sustratos de bajo costo (Calo y Gonzalez, 1995). Sin embargo, a pesar de estas ventajas, el principal problema para el uso de *X. dendrorhous* como fuente de astaxantina es la baja producción del pigmento en las cepas silvestres (200 a 400 µg de astaxantina/g de peso seco), que resulta poco atractivo desde un punto de vista industrial. Tales características, han motivado la búsqueda de cepas sobreproductoras mediante mutagénesis con luz ultravioleta (Retamales y col., 1998) o con agentes químicos como nitrosoguanidina y etil-metano-sulfonato (An y col., 1989; Lewis y col., 1990). Sin embargo, la aplicación de técnicas tradicionales para el mejoramiento de las cepas silvestres de *X. dendrorhous* no ha conducido a resultados satisfactorios. La mutación al azar ha generado efectos no deseados de inestabilidad genética, falta de reproducibilidad en fermentaciones industriales y una menor producción de biomasa de las cepas sobreproductoras en comparación con las cepas silvestres (Visser y col., 2003). Estas dificultades, han motivado el estudio de la vía carotenogénica de *X. dendrorhous* y de los genes que participan en ella para buscar potenciales alternativas de modificación y mejoras (Choi y col., 2007; Dominguez-Bocanegr y col., 2007).

Desde el punto de vista genético-molecular, la biosíntesis de los pigmentos carotenoides en *X. dendrorhous* comienza con la unión cabeza-cabeza de dos moléculas de geranilgeranil pirofosfato (GGPP) para formar el fitoeno, reacción catalizada por la enzima fitoeno sintasa (Lodato, 2002; McCarthy y col., 2004). En esta

levadura se ha aislado el gen *crfYB* que codifica a una enzima bifuncional denominada fitoeno- β -caroteno sintasa, que tiene actividad fitoeno sintasa y licopeno ciclasa (β -caroteno sintasa) (Alcaíno, 2002; Arrach y col., 2001; Verdoes y col., 1999a). La secuencia nucleotídica del gen que codifica a esta enzima tiene un tamaño de 2.386 pb y está interrumpida por 4 intrones (figura 2A).

El siguiente paso en la ruta de biosíntesis de astaxantina consiste en 4 desaturaciones sucesivas del fitoeno para dar licopeno, paso catalizado por la enzima fitoeno desaturasa. En *X. dendrorhous*, se ha aislado el gen *crtl* que codifica dicha enzima y también su cDNA (Verdoes y col., 1999b). En esta levadura, la secuencia codificante del gen *crtl* tiene un tamaño de 2.827 pb y está interrumpida por 11 intrones (Johnson, 2003; Lodato y col., 2003) (figura 2B).

La ruta de biosíntesis continúa con la ciclación de los extremos del licopeno para dar β -caroteno, paso también catalizado por la enzima bifuncional fitoeno- β -caroteno sintasa (figura 2C). Finalmente, el β -caroteno es hidroxilado en las posiciones 3 y 3', y además se adicionan grupos ceto en las posiciones 4 y 4', dando lugar a la astaxantina. En *X. dendrorhous*, se ha reportado que ambas actividades estarían presentes en una enzima bifuncional codificada por el gen *crtS*, con un tamaño de 3.166 pb y que estaría interrumpido por 17 intrones (Alvarez y col., 2006; Carmona, 2007; Ojima y col., 2006) (figura 2D).

Recientemente, nuestro laboratorio describió la participación de una enzima tipo citocromo P450 reductasa (CPR) para la síntesis de astaxantina, que tendría un rol auxiliar a la enzima astaxantina sintasa como donadora de electrones. Esta nueva

Carotenogénesis	Gen	Tamaño gen - Nº de Intrones
A GGPP + GGPP ↓ Fitoeno sintasa	<i>crYB</i>	2.386 pb 4 intrones
Fitoeno		
B ↓ Fitoeno desaturasa	<i>crI</i>	2.827 pb 11 intrones
Licopeno		
C ↓ β-caroteno sintasa	<i>crYB</i>	
β-caroteno		
D ↓ Astaxantina sintasa	<i>crS</i>	3.166 pb 17 intrones
Astaxantina	<i>crR</i>	3.006 pb 2 intrones

Figura 2. Ruta de biosíntesis de astaxantina en *X. dendrorhous*.

Síntesis de los distintos carotenoides en *X. dendrorhous*. **A)** Condensación de 2 moléculas de GGPP para la síntesis del fitoeno. **B)** Desaturación del fitoeno para la síntesis del licopeno. **C)** Ciclación de los extremos del licopeno para la síntesis del β-caroteno. **D)** Oxidación del β-caroteno para la síntesis de astaxantina.

enzima, está codificada por el gen *crtR*, con un tamaño de 3.006 pb y que estaría interrumpido por 2 intrones (Alcaíno, 2008; Alcaíno y col., 2008).

En conjunto con la dilucidación de la ruta de biosíntesis de astaxantina en *X. dendrorhous* y sus determinantes genéticos se comenzó con la manipulación específica de los genes participantes en la ruta de biosíntesis de ésta. Así, los experimentos realizados por Verdoes (Verdoes y col., 2003), en donde se aumentó el número de copias de los genes *crtYB* (fitoeno- β -caroteno sintasa) y *crtI* (fitoeno desaturasa), permitieron obtener cepas transformantes que presentaban diferencias en su pigmentación en comparación con la cepa silvestre. Sin embargo, los análisis de estas cepas transformantes indicaron que las diferencias en la pigmentación se debían principalmente a una modificación en la composición de los pigmentos intermediarios, pero no a un aumento significativo en la cantidad final de astaxantina producida (An y col., 1999; Visser y col., 2003). Estos resultados sugirieron que la síntesis de este pigmento sería un proceso regulado y dependiente de factores genéticos y metabólicos.

En nuestro laboratorio, se estudió la cinética de expresión de todos los genes involucrados en la ruta de biosíntesis de astaxantina durante el ciclo de crecimiento de la levadura (Lodato y col., 2007). Los resultados mostraron que los niveles mRNA de los genes *crtYB*, *crtI* y *crtS* son máximos durante el período de inducción de la síntesis de carotenoides, correspondiente a la etapa exponencial tardía de crecimiento. Además, el clonamiento de los cDNAs de los diferentes genes para su posterior estudio, resultó en la presencia de 2 tipos de mRNAs tanto para el gen *crtYB* como

crtI. Para ambos genes se encontró un mRNA procesado de forma correcta generando el mRNA maduro (mmRNA), pero además se encontró un mRNA procesado alternativamente (amRNA) (Alcaíno, 2002; Lodato y col., 2003) (figura 3). La traducción *in-silico* de los mRNAs alternativos de los genes *crtYB* y *crtI* muestra la presencia de codones de término de la traducción a lo largo de ambas secuencias, sugiriendo que estos mensajeros alternativos no serían traducidos a enzimas de carotenogénesis activas (Lodato, 2002). Sin embargo, en ambos casos se restauraría un marco de lectura a partir de un codón AUG río abajo del codón de inicio de la traducción correcto. Si estos mRNAs alternativos fuesen traducidos, se podría sintetizar a partir del amRNA del gen *crtYB*, una proteína trunca carente de 153 aminoácidos en el extremo amino terminal. En el caso del mensajero alternativo del gen *crtI*, el marco de lectura se restablece a partir de un codón AUG que conduciría a la síntesis de una proteína carente de 81 aminoácidos del extremo amino terminal. Como ejemplo de esto, se ha observado que en el hongo *Neurospora crassa* la traducción del mRNA que codifica a la enzima GGPP sintasa se realiza tanto desde el primer AUG que genera la proteína completa, como de 2 AUG internos, generando 2 enzimas GGPP sintasas de diferente tamaño. Estas 3 versiones de la enzima GGPP sintasa son activas ya que retienen los dominios funcionalmente importantes (Vittorioso y col., 1994).

El análisis de la secuencia aminoacídica de la enzima fitoeno β -caroteno sintasa, codificada por el gen *crtYB*, indica que en el extremo amino terminal se encontraría el dominio catalítico licopeno ciclasa (β -caroteno sintasa), por lo que una proteína trunca sin los primeros 153 aminoácidos no presentaría dicha actividad

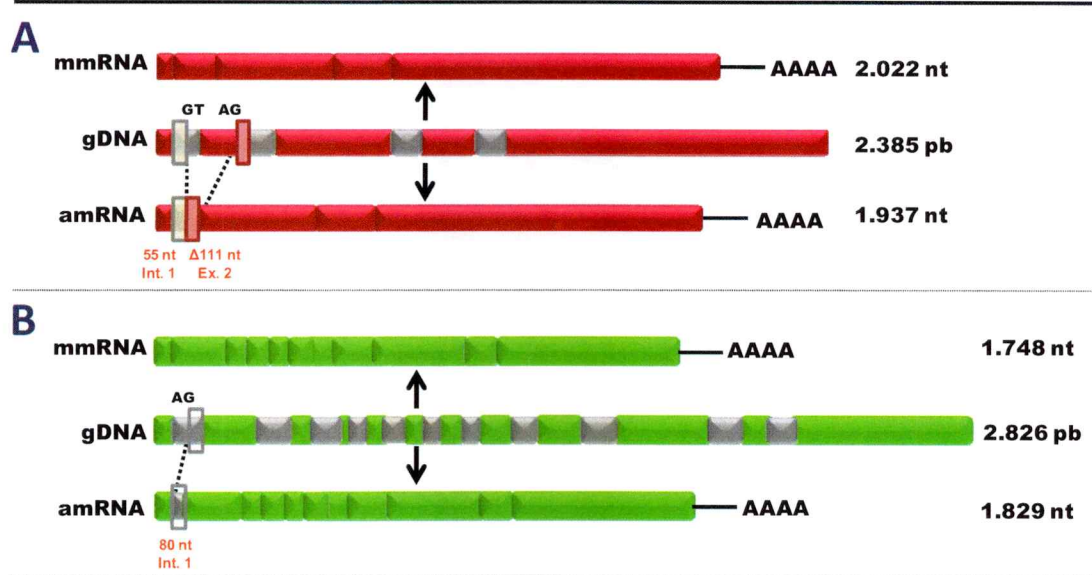


Figura 3. Generación de las versiones madura y alternativa de los mRNA de los genes *crtYB* y *crtI*.

A) Procesamiento del transcrito primario del gen *crtYB* generando las versiones madura y alternativa del mRNA. En la versión madura, todos los intrones han sido eliminados correctamente. En la versión alternativa, se reconoce un sitio dador de “*splicing*” alternativo ubicado en el primer intrón, manteniendo 55 nt de éste y un sitio aceptor de “*splicing*” alternativo ubicado en el segundo exón, eliminando 111 nt de éste. **B)** Procesamiento del transcrito primario del gen *crtI* generando las versiones madura y alternativa del mRNA. En la versión madura, todos los intrones han sido eliminados correctamente. En la versión alternativa, se reconoce un sitio aceptor de “*splicing*” alternativo ubicado en el primer intrón, manteniendo 80 nt de éste.

(Verdoes y col., 1999a). En cuanto a la función fitoeno sintasa, los dominios importantes se encuentran en el extremo carboxilo terminal, por lo que su actividad se podría mantener en esta posible proteína (figura 4A). Verdoes y cols. (1999b) construyeron una forma trunca de la enzima fitoeno β -caroteno sintasa carente de 171 aminoácidos en su extremo amino terminal, obteniendo una proteína que no presentaba actividad licopeno ciclasa pero que conservaba un 30 % de su actividad fitoeno sintasa en un sistema heterólogo de *E. coli*.

Por otra parte, el análisis de la secuencia aminoacídica de la enzima fitoeno desaturasa, codificada por el gen *crtI*, muestra la presencia de diferentes dominios funcionales en esta enzima (Lodato, 2002). Si nos enfocamos en la región amino terminal, que es la región que no estaría presente si se tradujese el amRNA desde su AUG interno, encontramos un dominio perteneciente a la superfamilia de NADB Rossmann de unión a dinucleótido, región muy conservada en enzimas fitoeno desaturasas de bacterias, cianobacterias, algas, plantas y hongos (Armstrong, 1994; Verdoes y col., 1999b) (figura 4B). Además, esta enzima presenta al menos 7 regiones hidrofóbicas en su estructura, lo que hace suponer que la forma activa de la enzima se encontraría asociada a membranas (Cunningham y Gantt, 1998). En la región amino terminal se encontrarían 2 de esas regiones (León, 2000).

De esta manera, la traducción de ambos amRNA conduciría a proteínas truncas que posiblemente no serían activas o presentarían una disminución importante en su actividad. Por lo tanto, la generación de estos mRNAs alternativos podría suponer otro mecanismo de regulación.

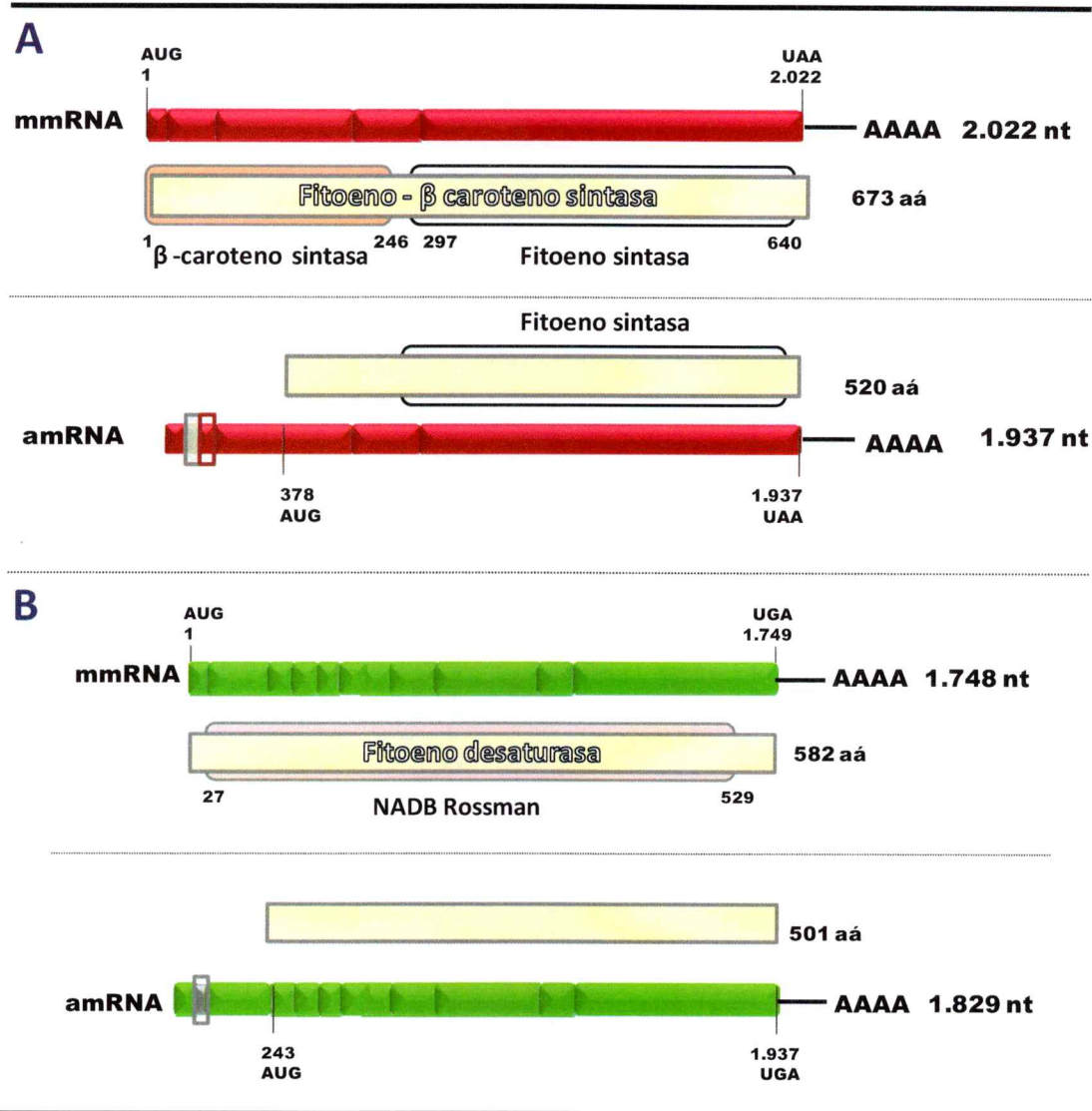


Figura 4. Traducción de los mRNA maduro y alternativo de los genes *crfYB* y *crtI*.

A) Traducción de ambas versiones del mRNA del gen *crfYB*. La proteína silvestre presenta 2 dominios catalíticos: el de fitoeno sintasa en el C-terminal y β-caroteno sintasa en el N-terminal. Este último no se encontraría presente en la enzima sintetizada a partir del amRNA. **B)** Traducción de ambas versiones del mRNA del gen *crtI*. La proteína silvestre presenta un dominio de unión a dinucleótido (NADB Rossmann) que se encontraría incompleto en la enzima sintetizada a partir del amRNA.

Con estos antecedentes, en nuestro laboratorio se evaluó la cinética y razón entre los niveles de expresión de las versiones madura y alternativa de los genes *crtYB* y *crtI* durante las distintas etapas del ciclo de crecimiento de la levadura. Así, mediante PCR semi-cuantitativo se pudo observar que la razón mmRNA/amRNA del gen *crtI* disminuía acorde iba aumentando la edad del cultivo (disminuía el mmRNA y/o aumentaba el amRNA). Para el caso del gen *crtYB*, esta determinación no se pudo realizar debido a los bajos niveles de expresión que presentaron ambas versiones que no permitieron hacer un análisis cuantitativo de estos (Lodato y col., 2003). Complementariamente, se determinó la influencia del metabolismo aerobio en la expresión de los genes de carotenogénesis, ya que se había observado que la cantidad de mRNA de estos genes aumentaba cuando se agotaba la glucosa en el medio de cultivo (Lodato, 2002). El análisis bioinformático de la región promotora de los genes *crtYB* y *crtI* indicó la presencia de potenciales cajas reguladoras tipo Mig1 (Wozniak, 2008). En *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans* y otras levaduras y hongos, estas cajas están presente en genes altamente reprimidos por glucosa (Dowzer y Kelly, 1991; Gancedo, 1998; Nehlin y col., 1991).

Para evaluar el efecto de la fuente de carbono utilizada para el crecimiento de la levadura en la expresión de los genes de carotenogénesis, en nuestro laboratorio se determinó el patrón de expresión de éstos mediante RT-PCR semicuantitativo utilizando glucosa y succinato. Se observó que los patrones de expresión de los genes tempranos de la ruta de biosíntesis de pigmentos, *idi* y *crtE*, no presentaron diferencias significativas entre ambas condiciones de cultivo. Resultado similar se observó para el caso del gen *crtS*, que codifica la enzima astaxantina sintasa, el cual tiene su máximo

de expresión al principio de la fase estacionaria y el comportamiento es similar en ambas fuentes de carbono. Sin embargo, la expresión de los mensajeros alternativos de los genes *crtI* y *crtYB* presentó diferencias en ambos medios de cultivo, ya que sus niveles máximos se modificaron desde la fase exponencial tardía (glucosa) a la fase estacionaria (succinato) (Wozniak, 2008).

En base a lo anteriormente expuesto, se puede señalar que la síntesis de carotenoides es un proceso complejo que estaría regulado a varios niveles. En primer lugar, la expresión de los genes que codifican a las enzimas carotenogénicas estaría regulada a nivel transcripcional en etapas tempranas del ciclo de crecimiento, en respuesta a factores definidos por las condiciones metabólicas. Posteriormente, en etapas tardías del crecimiento, actuarían mecanismos de regulación post-transcripcional como el procesamiento alternativo y post-traducciona, posiblemente en respuesta a niveles de estrés oxidativo y/o inhibición por producto, lo cual daría lugar a la síntesis de carotenoides.

2. HIPÓTESIS.

“La síntesis de pigmentos en X. dendrorhous es un proceso complejo, posiblemente regulado a varios niveles. Transcripcionalmente, la expresión de los genes de la ruta de biosíntesis de pigmentos podría estar regulada por factores metabólicos y post-transcripcionalmente por la generación de RNA mensajeros alternativos.”

3. OBJETIVOS.

3.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar los mecanismos de regulación de la expresión de los genes *crfYB* y *crtI* a nivel transcripcional, dependiente de glucosa, y post-transcripcional, a través del procesamiento alternativo de sus mRNA.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar los niveles de expresión de los genes *crfYB* y *crtI* en las distintas fases de crecimiento.
2. Determinar la relación entre los mensajeros maduro y alternativo de los genes *crfYB* y *crtI*.
3. Evaluar la represión de la transcripción de los genes *crfYB* y *crtI* mediada por glucosa.
4. Obtener cepas de *X. dendrorhous* mutantes para ambos tipos de procesamiento del gen *crtI* y evaluar en ellas la síntesis de pigmentos.
5. Determinar la presencia de mRNAs maduro y alternativo de un gen reportero que porta el primer intrón del gen *crtI*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cepas y plasmidios.

En las tablas 1 y 2 se indican los nombres y descripción de los plasmidios y cepas utilizadas en este trabajo, respectivamente.

4.2. Cultivo de microorganismos.

4.2.1. Cultivo de *E. coli*.

E. coli se cultivó en tubos de 12 ml con 5 ml de medio LB con la siguiente composición: 1 % de bacto triptona, 0,5 % de extracto de levadura y 0,5 % de NaCl. Los cultivos se crecieron toda la noche (12 a 15 h) con agitación a 200 rpm y 37 °C.

4.2.2. Cultivo de *X. dendrorhous*.

X. dendrorhous se cultivó en matraces de 250 ml con 50 ml de medio YM con la siguiente composición: 1 % de glucosa, 0,3 % de extracto de malta, 0,5 % de bacto peptona, 0,3 % de extracto de levadura (An y col., 1989). Los cultivos se crecieron hasta fase estacionaria (5 días) con agitación a 200 rpm y 22 °C.

4.3. Técnicas de biología molecular.

El aislamiento de DNA, PCR, extracción de DNA plasmidial, digestiones de DNA con enzimas de restricción, ligamiento de DNA y otros, se realizaron de acuerdo a métodos estándares (Sambrook y Russell, 2001), adaptados para *X. dendrorhous* en nuestro laboratorio.

Tabla 1. Plasmidios utilizados en este trabajo.

Plasmidios		
	Genotipo/Características relevantes	Fuente / Referencia
pBlueScript SK	Vector de clonamiento. Amp ^R . (pBS)	Stratagene
pMN-Hyg	pBS que porta el módulo de resistencia a higromicina B de <i>X. dendrorhous</i> .	Niklitschek (2007).
pMN-Hyg-IntI	pMN-Hyg interrumpido con el primer intrón del gen <i>crfI</i> .	Este trabajo.
pXD-C13	pBS que porta el gen <i>crfI</i> de <i>X. dendrorhous</i> en un fragmento <i>Bam</i> HI de 15.778 pb.	Niklitschek y col., 2008.
pCI	pBS que porta el gen <i>crfI</i> de <i>X. dendrorhous</i> en un fragmento <i>Xho</i> I- <i>Sma</i> I de 5.336 pb.	Este trabajo.
pCIH	Derivado de pCI en que se ha eliminado un fragmento <i>Eco</i> NI- <i>Eco</i> RV de 2.588 pb del gen <i>crfI</i> e insertado en su reemplazo el módulo de resistencia a higromicina B de <i>X. dendrorhous</i> .	Este trabajo.
pCI-mm	Derivado de pCI que porta mutaciones puntuales en el sitio aceptor de procesamiento alternativo del primer intrón del gen <i>crfI</i> de <i>X. dendrorhous</i>	Este trabajo.
pCI-am	Derivado de pCI que porta mutaciones puntuales en el sitio aceptor de procesamiento normal del primer intrón del gen <i>crfI</i> de <i>X. dendrorhous</i>	Este trabajo.
pCIH-CI	Derivado de pCIH que porta un fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Xho</i> I de 5.357 pb del plasmidio pCI.	Este trabajo.
pCIH-CI-mm	Derivado de pCIH que porta un fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Xho</i> I de 5.357 pb del plasmidio pCI-mm.	Este trabajo.
pCIH-CI-am	Derivado de pCIH que porta un fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Xho</i> I de 5.357 pb del plasmidio pCI-am.	Este trabajo.
pCIH-IntI	Derivado de pCI en que se ha eliminado un fragmento <i>Eco</i> NI- <i>Eco</i> RV de 2.588 pb del gen <i>crfI</i> e insertado en su reemplazo el módulo de resistencia a higromicina B de <i>X. dendrorhous</i> interrumpido con el primer intrón del gen <i>crfI</i> .	Este trabajo.

Tabla 2. Cepas utilizadas en este trabajo.

Cepas		
Genotipo / Características relevantes	Fuente / Referencia	
E. coli DH5 α	F ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA</i> ⁻ <i>argF</i>)U169 <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (<i>rk</i> ⁻ , <i>mk</i> ⁺) <i>phoA</i> <i>supE44</i> λ ⁻ <i>thi</i> ⁻ <i>1gyrA96</i> <i>relA1</i>	GIBCO BRL.
<i>X. dendrorhous</i> UCD 67-385 o ATCC 24230	Silvestre. Hyg ^S	American Type Culture Collection. EE.UU.
<i>X. dendrorhous</i> TI-CIH-wt	Transformante que porta la versión silvestre del gen <i>crtI</i> , obtenido por transformación de la cepa silvestre con el plasmidio pCIH-CI. Hyg ^R	Este trabajo.
<i>X. dendrorhous</i> TI-CIH-mm	Transformante que porta una versión modificada del gen <i>crtI</i> que sólo genera mmRNA, obtenido por transformación de la cepa silvestre con el plasmidio pCIH-CImm. Hyg ^R	Este trabajo.
<i>X. dendrorhous</i> TI-CIH-am	Transformante que porta una versión modificada del gen <i>crtI</i> que sólo genera amRNA, obtenido por transformación de la cepa silvestre con el plasmidio pCIH-CIam. Hyg ^R	Este trabajo.
<i>X. dendrorhous</i> T-I21H	Transformante heterocigoto del gen <i>crtI</i> (<i>crtI</i> / <i>crtI</i> ⁻ :: <i>hph</i>), obtenido por transformación de la cepa silvestre con el plasmidio pCIH. Hyg ^R .	Niklitschek y col., 2008.
<i>X. dendrorhous</i> T-I21H-1H	Doble recombinante de la cepa T-I21H, homocigoto del gen <i>crtI</i> (<i>crtI</i> ⁻ :: <i>hph</i> / <i>crtI</i> ⁻ :: <i>hph</i>). Hyg ^R	Niklitschek y col., 2008.
<i>X. dendrorhous</i> T-I1HI	Transformante heterocigoto del gen <i>crtI</i> (<i>crtI</i> / <i>crtI</i> ⁻ :: <i>hph</i> - <i>IntI</i>), obtenido por transformación de la cepa silvestre con el plasmidio pCIH- <i>IntI</i> . Hyg ^R .	Este trabajo.
<i>X. dendrorhous</i> T-I1HI-1HI	Doble recombinante de la cepa T-I1HI, homocigoto del gen <i>crtI</i> (<i>crtI</i> ⁻ :: <i>hph</i> - <i>IntI</i> / <i>crtI</i> ⁻ :: <i>hph</i> - <i>IntI</i>). Hyg ^R	Este trabajo.

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

La extracción de gDNA se realizó por lisis mecánica de las células con perlas de vidrio según Sambrook y cols. (2001), modificado para *X. dendrorhous*. El pellet celular proveniente de células colectadas desde placas de cultivo o de 30 ml de cultivo líquido, se resuspendió en 500 µl de amortiguador TE (25 mM Tris- HCl, 10 mM EDTA, pH 8) junto con un volumen de perlas de vidrio (Sigma, 425 - 600 µm) y se agitó en vórtex por 5 min. Luego, se agregaron 500 µl de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se homogenizó en vórtex por 2 min. A la fase acuosa se le agregó 500 µl de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se homogenizó en vórtex por 2 min. Se extrajo la fase acuosa y el DNA se precipitó con 1 volumen de etanol absoluto frío (-20 °C). El pellet se lavó con etanol 70 % (v/v) y luego se secó a 37 °C. Posteriormente, el DNA se resuspendió en 100 µl de amortiguador TE-RNAsa (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, RNAsa A 30 µg/ml) e incubó a 37 °C por 1 h. El DNA se guardó a -20 °C hasta su utilización.

4.3.2. Extracción de RNA de *X. dendrorhous*

La extracción de RNA se realizó utilizando el reactivo TRI-Reagent (Ambion Inc.) de acuerdo a las instrucciones del proveedor, adaptado para *X. dendrorhous*. El pellet celular proveniente de 40 ml de cultivo se congeló durante 10 segundos en nitrógeno líquido, se le agregó 4 ml de reactivo TRI-Reagent junto con 500 µl de perlas de vidrio (Sigma, 425 - 600 µm) y se agitó en vórtex por 10 min, incubándose posteriormente durante 8 min a temperatura ambiente. Se agregó 600 µl de cloroformo, se agitó suavemente y se centrifugó a 12.100 x g por 10 min en frío. La

fase acuosa se transfirió a un tubo Eppendorf y se lavó con 1 volumen de fenol:cloroformo (1:1). Se centrifugó a 12.100 x g por 10 min en frío y el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf. Se agregó 1,5 volúmenes de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, se centrifugó a 12.100 x g durante 10 min y el precipitado de RNA fue lavado con etanol 75 % (v/v) y resuspendido en agua tratada con DEPC. Finalmente, la concentración y la calidad de RNA se determinaron por espectrofotometría a 260 nm y por electroforesis en gel de agarosa desnaturante, respectivamente.

4.3.3. Transcripción reversa (RT).

Las reacciones de RT se realizaron siguiendo las recomendaciones del proveedor de la enzima Transcriptasa Reversa (Invitrogen). Primero, 5 µg de RNA total se ajustaron a 11 µl de reacción con agua libre de RNAsa. Se le agregó 1 µl de oligodT₁₅₋₁₈ (25 µM) y 1 µl de dNTPs (10 mM), se calentó a 65 °C por 5 min y se transfirió inmediatamente a hielo. Luego, se le agregó 4 µl de amortiguador 5X y 2 µl de DTT (0,1 M) y se incubó a 37 °C por 2 min. Finalmente, a la mezcla de reacción se le agregó 1 µl de transcriptasa reversa (200 U/µl), se incubó a 37 °C por 50 min y se calentó a 70 °C por 15 min. El cDNA obtenido se guardó a -20 °C hasta su utilización.

4.3.4. PCR en tiempo real

Se utilizó un termociclador Stratagene MX3000p (Stratagene). Las reacciones se hicieron con la mezcla de reacción "SensiMix Plus SYBR" (Quantace), siguiendo las instrucciones del proveedor. Esta mezcla de reacción es una 'Hot Start Mix' que

provee la DNA polimerasa *Taq*, los nucleótidos, el amortiguador y el agente intercalante de DNA SYBR Green I. Las reacciones se efectuaron en un volumen final de 20 μ l, con una concentración final de primarios de 0,5 μ M y de Mg^{+2} de 3 mM. El sustrato de las reacciones fue 1 μ l de reacción de RT o productos de RT-PCR purificados. Para el protocolo de amplificación, se realizó una incubación inicial a 95 °C durante 10 min y luego 35 – 40 ciclos de amplificación con el siguiente programa: 95 °C por 15 s, 60 °C por 15 s y un período de extensión a 72 °C por 15 s. La adquisición de la señal de fluorescencia fue al final del período de extensión. Al finalizar los ciclos de amplificación, se adicionó un análisis de 'melting' para corroborar la presencia de un único producto de amplificado. Este análisis se realizó en el rango de temperaturas 70-95 °C con una pendiente de 0,1 °C/s. Las curvas de calibración se efectuaron con diluciones de un estándar de cada gen a partir de un producto de RT-PCR purificado a partir de geles de agarosa.

4.3.5. Extracción de DNA plasmidial.

La extracción de DNA plasmidial se realizó a partir de cultivos de *E. coli* en medio LB con ampicilina (100 μ g/ml) crecidos toda la noche a 37 °C según Sambrook y cols. (2001). En el caso del DNA plasmidial utilizado para secuenciación, las extracciones se realizaron con el kit de Promega "Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System" y para el caso del DNA plasmidial para la transformación de *X. dendrorhous* se utilizó el kit de Promega "Wizard Plus Midipreps DNA Purification System".

4.3.6. Electroforesis de DNA.

Para visualizar los DNAs plasmidial y cromosómico o los productos de PCR, se realizaron electroforesis en geles de agarosa, siendo posteriormente teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Los geles de agarosa se prepararon en amortiguador TAE 1X con una concentración de agarosa entre 0,7 y 3 % según el tamaño del DNA. Como estándares de peso molecular se utilizaron λ *Hind*III (GIBCO BRL) y 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

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

Los fragmentos de DNA analizados y separados por electroforesis, se recuperaron desde los geles de agarosa y se purificaron con dióxido de silicio (Boyle y Lew, 1995). Para esto, se cortó con un bisturí el trozo de agarosa que contenía el fragmento de DNA de interés y se transfirió a un tubo Eppendorf. El bloque de agarosa se disolvió a 55 °C con 500 µl de NaI 6M y se le agregaron 10 µl de "glassmilk" (dióxido de silicio en NaI 6M). Se incubó por 10 min a temperatura ambiente agitando cada 2 min y se centrifugó eliminándose el sobrenadante. El pellet se lavó 3 veces con 500 µl de "NewWash" (Tris pH 7,5 10 mM, NaCl 50mM, EDTA pH 7,5 25 mM y etanol 50 %) y luego se le agregaron 10 µl de agua estéril. Se incubó por 10 min a 55 °C y posteriormente se centrifugó y se recuperó el sobrenadante.

4.3.8. Cuantificación de fragmentos de DNA.

La cuantificación de los fragmentos de DNA se realizó por comparación de la intensidad de las bandas de DNA en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio,

entre la muestra a cuantificar y un estándar de peso molecular de concentración conocida. Para esto, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0,7 % y la fotografía de éste se analizó con el programa "Kodak® 1D Image Analysis Software" permitiendo obtener el tamaño de fragmento y su concentración.

4.3.9. Digestiones de DNA con enzimas de restricción.

Las digestiones de DNA plasmidial se realizaron de acuerdo a lo indicado por el proveedor de las enzimas (New England Biolabs®; Fermentas y otros).

4.3.10. Ligación de DNA.

Las reacciones de ligación se realizaron siguiendo las recomendaciones del proveedor de la enzima DNA ligasa. Se utilizó el inserto en una proporción 3:1 con respecto al vector, con 2 U de DNA ligasa (GIBCO BRL, New England Biolabs), en un volumen final de 10 µl.

4.3.11. Preparación de células electrocompetentes de *E. coli*.

Se inoculó 500 ml de medio LB con 5 ml de un cultivo de 12 h y se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar una D.O._{560nm} entre 0,5 - 0,8 (fase exponencial temprana-media). Todos los procedimientos siguientes se realizaron a 4 °C, manteniendo las soluciones y las células en hielo. Las células se colectaron centrifugando a 4.000 x g durante 15 min. El sobrenadante se removió y las células se lavaron dos veces con agua destilada estéril, el primer lavado con 500 ml y el segundo con 250 ml. Luego, las células se resuspendieron en 20 ml de glicerol 10 % (v/v), se

centrifugaron y resuspendieron nuevamente en un volumen final de 2 a 3 ml de glicerol 10 % (v/v). Esta suspensión, con una concentración celular de aproximadamente 1×10^{10} células/ml, se fraccionó en alícuotas de 40 μ l las cuales se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

4.3.12. Transformación de *E. coli* por electroporación.

Las alícuotas de células electrocompetentes se descongelaron a temperatura ambiente y luego se enfriaron en hielo al igual que las cubetas de electroporación. A la suspensión de células se le agregó entre 15 a 50 ng de DNA y la mezcla se electroporó con las siguientes condiciones (cubetas de 2 mm): 25 μ F, 200 Ω y 2,5 KV. Inmediatamente después de la electroporación, se adicionó a las células 1 ml de medio LB precalentado a 37 °C y la suspensión de células se transfirió a un tubo Eppendorf, incubándose a 37 °C durante 1 h. Luego, se plaquearon alícuotas de 100 μ l en placas Petri con agar LB, ampicilina (100 μ g/ml) y X-Gal (24 μ g/ml). Las placas se incubaron a 37 °C toda la noche y luego se seleccionaron colonias blancas a las cuales se les extrajo el DNA plasmidial para su posterior análisis.

4.3.13. Preparación de células electrocompetentes de *X. dendrorhous*.

La transformación de *X. dendrorhous* se basó en los protocolos descritos por Adrio (Adrio y col., 1995). Para ello, se inoculó 200 ml de medio YM con 1 - 2 ml de un cultivo de *X. dendrorhous* de 48 h (fase exponencial) y se creció con agitación (200 rpm) a 22 °C hasta alcanzar una D.O._{560nm} entre 4,5 - 5 (fase exponencial temprana-media). Las células se centrifugaron a 5.090 x g durante 5 min, se resuspendieron en

25 ml de amortiguador BD (50 mM amortiguador fosfato de potasio, pH 7, 25 mM ditioneitol [DTT]) e incubaron a 22 °C por 15 min. Las células se lavaron dos veces con 25 ml de amortiguador STM (270 mM sacarosa, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl₂) frío y se resuspendieron en 1 ml de amortiguador STM. Esta suspensión, con una concentración celular aproximada de 1x10⁹ células/ml, se fraccionó en alícuotas de 60 µl que se utilizaron inmediatamente.

4.3.14. Transformación de *X. dendrorhous* por electroporación

A una alícuota de células electrocompetentes, se le agregó entre 10 - 20 µg de DNA transformante en un volumen máximo de 10 µl. Esta mezcla se electroporó con las siguientes condiciones (cubetas de 2 mm): 125 µF, 600 Ω, 0,45 kV. Inmediatamente después de la electroporación, se adicionó a las células 1 ml de medio YM y se incubó a 22 °C por 5 h. Luego, alícuotas de 100 µl se sembraron en placas Petri con agar YM.

4.3.15. Diseño de partidores.

Los partidores utilizados en este trabajo se diseñaron a partir de las secuencias conocidas depositadas en el GenBank de las regiones a amplificar, o de secuencias propias obtenidas en nuestro laboratorio. En la tabla 3 se muestran los nombres y descripción de los partidores que se utilizaron en este trabajo.

4.3.16. Amplificación de DNA.

Las reacciones de PCR realizadas para el análisis de clones y partidores, se hicieron con la enzima DNA polimerasa *Taq*. En el caso que los productos de PCR se

Tabla 3. Partidores utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia 5'→3'	DNA blanco y/o función.	Posición*
Clonación y Análisis			
C13ENIF ¹	CCTCCAGGAGGCTTCCGA	Sitio EcoNI 5' <i>crtl</i>	9.169-9.1861→
C13EVR ¹	GATATCGAGCCTACGAGGGT	Sitio EcoRV 3' <i>crtl</i>	←10.619-10.638
OMSIF ¹	TGTTCTCCTCCTTTAATCCGTA TCAGCTAAC	Mutación sitio "splicing" alternativo	9.845-9876→
OMSIR ¹	ACGGATTAAAGGAGGAGAACCA TTCGGAAACA	Mutación sitio "splicing" alternativo	←9.835-9.866
OASIF ¹	CCTACTTGTTGAGATGTGGTATC	Mutación sitio "splicing" maduro	9.925-9.947→
OASIR ¹	GATACCACATCTCAACAAGTAGG	Mutación sitio "splicing" maduro	←9.925-9.947
PEF-F-EV	GATATCGGCTCATCAGCCGAC	Promotor <i>TEF-1α</i> directo.	1-21→
gpdT-R-EV	GATATCATGAGAGATGACGGAG ATG	Terminador <i>GPD</i> reverso.	←1.894-1.918
Oligo(dT) ₁₈	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	Transcripción reversa.	-
Secuenciación			
C13D21 ¹	GTAGGTAGTTAAGTTGAGAGG	Secuenciar <i>crtl</i>	8.202-8.222→
C13R10 ¹	GTATTCCAACGTGTTTCGCTT	Secuenciar <i>crtl</i>	←8.696-8.716
C13R9 ¹	CCCACAGATACAGGTTAGTC	Secuenciar <i>crtl</i>	←8.927-8.946
C13R1 ¹	CAAGACTGATCTCCGATTCC	Secuenciar <i>crtl</i>	←9.130-9.149
C13D5 ¹	CGAGGCTTACCTTGTCTCTC	Secuenciar <i>crtl</i>	9.184-9.203→
C13R8 ¹	CACTTCTCTCCACCTCTTC	Secuenciar <i>crtl</i>	←9.646-9665

C13D1 ¹	ATCGTGGGTGAGTGT CAGG	Secuenciar <i>ctrl</i>	9.753-9771→
C13R7 ¹	GCTCGTCTTGCTAAAGAAGG	Secuenciar <i>ctrl</i>	←9.966-9.985
C13D9 ¹	AGTTGCTCCGATCATCAGGC	Secuenciar <i>ctrl</i>	10.222- 10.241→
C13R3 ¹	CATCAGGCAAGAGCATCGTT	Secuenciar <i>ctrl</i>	←10.234- 10.253
C13D6 ¹	ATCTCTTCAAGCAGACATTCG	Secuenciar <i>ctrl</i>	10.433- 10.453→
C13R5 ¹	CCAAGACCACTGACATCCTA	Secuenciar <i>ctrl</i>	←10.649- 10.668
C13R4 ¹	CTCTTACCCCTTCGAGGT	Secuenciar <i>ctrl</i>	←10.964- 10.982
C13D2 ¹	CCAGTCTATCTGGACAAGAG	Secuenciar <i>ctrl</i>	11.055- 11.074→
C13R2 ¹	GCGACTGGTGTTCGACTTGA	Secuenciar <i>ctrl</i>	←11.436- 11.455
C13D3 ¹	CGCCGATGTTGTGATTGTCA	Secuenciar <i>ctrl</i>	11.474- 11.493→
C13D4 ¹	TTCTGCCGCTCCCGAAGG	Secuenciar <i>ctrl</i>	11.870- 11.887→
C13D7 ¹	TCCGCCAAGCTTGGACTTC	Secuenciar <i>ctrl</i>	12.079- 12.097→
C13R6 ¹	GGAACGGGTATCGATTCTCA	Secuenciar <i>ctrl</i>	←12.421- 12.440
C13D8 ¹	CCGTTGGTGTCTTGCTTTC	Secuenciar <i>ctrl</i>	12.518- 12.537→
T3	ATTAACCCTCACTAAAG	Secuenciar Inserto de pBS	←774-790
T7	AATACGACTCACTATAG	Secuenciar Inserto de pBS	627-643→

PCR en tiempo real

mACTF ²	CCGCCCTCGTGATTGATAAC	qPCR	17-36→
--------------------	----------------------	------	--------

<i>mACTR</i> ²	AAGGACTCCTACGTTGGTGA	qPCR	←148-167
<i>mmcrfYB2F</i> ³	TCGCATATTACCAGATCCATCTG A	qPCR	77-100→
<i>mmcrfYB2R</i> ³	AATGGCGCATGGACATATCC	qPCR	←238-257
<i>amcrfYBF</i> ⁴	GTGTGCATATGTGTTGCAACCA	qPCR	111-132→
<i>amcrfYBR</i> ⁴	TCTTGGCAACTAGGCACCTTCT	qPCR	←283-304
<i>mmcrtIF</i> ⁵	CATCGTGGGATGTGGTATCG	qPCR	84-103→
<i>mmcrtIR</i> ⁵	TTATCGATTCGATCAGGGGCC	qPCR	←210-230
<i>amcrtIF</i> ⁶	CGTGGTTTAATCCGTATCAGC	qPCR	87-107→
<i>amcrtI2R</i> ⁶	AGGTCACGGTGTTCGAGA	qPCR	←226-243
<i>tmcrtIF</i> ⁵	TTCGATCAGGGGCCAGTTT	qPCR	217-236→
<i>tmcrtIR</i> ⁵	GCTCGTAATGTCTGTGGGCTT	qPCR	←455-475
<i>mmhphF</i> ⁷	CTCGTGCTTTCAGCTTCGAT	qPCR	101-120→
<i>mmhphR</i> ⁷	TCGCTGAATTCCCAATGTC	qPCR	←235-254
<i>amhphF</i> ⁸	TCGTGCTTTCAGCTTCGATG	qPCR	102-121→
<i>amhphR</i> ⁸	ACGGATTAACCCAATGTCAAG	qPCR	←232-253
<i>npmhphF</i> ⁷	ATACGAGGTCGCCAACATCT	qPCR	678-697→
<i>npmhphR</i> ⁷	AATTGCCGTCAACCAAGCTC	qPCR	←828-847

*: Posición de acuerdo al número de acceso a la base de datos Genbank.

1: N° acceso DQ028748.

2: N° acceso X89898.

3: N° acceso AY177204.

4: N° acceso AY174117.

5: N° acceso AY177424.

6: N° acceso AY177425.

7: N° acceso AF190131.

8: Este trabajo.

→: Partidor dirección río abajo.

←: Partidor dirección río arriba.

requiriesen para su posterior clonamiento, se utilizó la enzima DNA polimerasa *Pfu*. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 μ l, que contenía amortiguador de PCR 1X pH 8,4 (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM), 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos, 1 μ M de cada partidor, entre 10 y 100 ng de DNA molde y 1 U de DNA polimerasa. Para las reacciones de PCR se utilizó un termociclador Applied Biosystem 2720, con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineación de los partidores a 55 °C por 30 segundos y elongación a 72 °C por 3 min. Finalmente, se dejó por 10 min a 72 °C para una elongación final y luego la reacción se mantuvo a 4 °C. En algunos casos, la temperatura de alineación de los partidores se modificó para aumentar la especificidad de la reacción.

4.4. Extracción y análisis de pigmentos.

4.4.1. Extracción de carotenoides.

La extracción de los carotenoides se realizó con método descrito por An y cols. (1989) con algunas modificaciones. El pellet de células proveniente de 50 ml de cultivo se lavó con 1 ml de agua y se resuspendió en 1 ml de agua. Se le agregó 1/2 volumen de perlas de vidrio (Sigma, 425 - 600 μ m) y se agitó en vórtex por 2 min. Se incubó en hielo por 2 min y se le agregó 1 ml de acetona. Se homogenizó en vórtex por 2 min y posteriormente se centrifugó por 10 min a 12.100 x g a 4 °C. La fase que contenía los pigmentos se transfirió a otro tubo. Al pellet celular resultante se le realizó una nueva extracción de pigmentos con 2 ml de acetona, agitándose en vórtex por 2 min. Este procedimiento se repitió hasta que los restos celulares quedaron blancos.

Los extractos de acetona se juntaron y se les agregó 1/5 volumen de éter de petróleo. Se agitó en vórtex por 2 min y se centrifugó por 3 min a $12.100 \times g$ a $4^\circ C$. Se extrajo la fase de éter de petróleo para su posterior análisis.

4.4.2. Cuantificación de pigmentos totales por espectrofotometría visible.

Se determinó el volumen de éter de petróleo en que se extrajeron los pigmentos y se midió su absorbancia a 450 nm.

El contenido de carotenoides totales se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración en ppm } (\mu\text{g pigmentos /g muestra}) = \frac{A_{450} \times \text{volumen final (ml)} \times 10^4}{2.592 \times \text{peso muestra (g)}}$$

Donde:

A_{450} = Absorbancia a 450 nanómetros.

10^4 = Factor de conversión de unidades a ppm ($\mu\text{g/g}$).

2.592 = Coeficiente de extinción molar de β -caroteno en éter de petróleo.

4.4.3. Análisis de los pigmentos por HPLC.

Los pigmentos disueltos en éter de petróleo se secaron con nitrógeno gaseoso y posteriormente se resuspendieron en 100 μl de acetona. Los pigmentos se separaron por HPLC (Nelis y De Leenheer, 1989) con una columna de fase reversa RP-18 Lichrocart 125-4 (Merck), utilizando una solución de

acetonitrilo:metanol:isopropanol (85:10:5 v/v) como fase móvil con un flujo de 1 ml/min a temperatura ambiente, en condiciones isocráticas. Los espectros de cada máximo de elución fueron obtenidos utilizando un detector con arreglo de diodos. Los carotenoides fueron identificados de acuerdo a sus espectros de absorción, tiempos de retención y comparación con estándares específicos.

4.5. Análisis de secuencias.

Las secuencias nucleotídicas se determinaron en nuestro laboratorio con el kit "GE Healthcare DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit" y se analizaron con los programas Chromas versión 1.43, Sequencing Analysis V3.7 y ContigExpress 2003. Las secuencias nucleotídicas se alinearon con el programa AlignX 2003, ajustadas manualmente para incrementar la identidad. Además, todas estas herramientas se complementaron con el uso del paquete de programas Vector NTI 10.3

4.6. Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real.

Los ensayos de RT-PCR han sido utilizados con éxito en el análisis de los niveles de mRNA de genes de carotenogénesis de plantas y del alga *H. pluvialis* (Giuliano y col., 1993; Grunewald y col., 2000) debido a su alta sensibilidad, especialmente útil en el caso de transcritos con una baja concentración celular. Sin embargo, el desarrollo de nuevas técnicas ha permitido aumentar la sensibilidad de detección de los transcritos, la repetitividad de los ensayos y mayor velocidad de análisis de los resultados, entregando mediciones más confiables y precisas.

En nuestro laboratorio, se determinaron mediante RT-PCR semi cuantitativo los niveles de expresión de los genes de carotenogénesis *idi*, *crtE*, *crtYB*, *crtI* y *crtS* de *X. dendrorhous*, de diferentes cepas y en diferentes condiciones de cultivo. Para disponer de una metodología más sensible y robusta para la cuantificación de la expresión génica de los genes de carotenogénesis de *X. dendrorhous*, se montó la técnica de transcripción reversa acoplada a PCR en tiempo real.

4.6.1. Diseño de los partidores para PCR en tiempo real.

Para montar la técnica de PCR en tiempo real, se diseñaron los juegos de partidores considerando los siguientes parámetros:

- Al menos uno de los partidores de cada gen a medir se ubique en la unión exón – exón de éste para evitar amplificación de gDNA.
- La calidad de los partidores, considerando los valores de T_m , % GC, estabilidad en el extremo 3', número de mononucleótidos consecutivos y generación de dímeros, evaluada con el software AmplifX v1.5.4 (Gautam y col., 2008) sea mayor al 90 %. Si el partidador ubicado en la unión exón – exón del gen a medir tiene un menor valor, se elegirá aquel partidador que tenga el mejor valor de calidad y que además tenga entre 4 a 12 nt en la región 3' de la unión exón – exón.
- La diferencia de T_m entre los partidores de un mismo gen sea menor a 2 °C y el rango de T_m de todos los partidores sea entre 53 – 58 °C.

- El tamaño de amplificado de todos los genes a medir sea similar, entre 140 a 250 pb.

Estos valores se establecieron para permitir la medición conjunta de todos los genes en un mismo experimento de PCR en tiempo real. En la tabla 4 se indican los valores estimados de calidad y T_m de los partidores utilizados para medir los mRNAs maduros de los genes de actina (ACT), *crfYB* y *crtI* y los mRNAs alternativos de los genes *crfYB* y *crtI*. Además, se indica el tamaño del amplicón a obtener, predicho de acuerdo con la secuencia nucleotídica de cada uno de los genes.

4.6.2. Evaluación y selección del kit de PCR en tiempo real.

La eficiencia y certeza de las mediciones mediante PCR en tiempo real varían dependiendo del kit de amplificación que se utilice. Para nuestro sistema, se evaluaron 2 de estos kits, "*Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix*" (Stratagene) y "*SensiMix Plus SYBR*" (Quantace), determinándose la sensibilidad y robustez de éstos. Se utilizó como DNA molde 6 muestras de cDNA, correspondiente a 3 réplicas biológicas de un cultivo de *X. dendrorhous* (1, 2 y 3) en una condición control (C) y sometido a un estímulo (E). La evaluación de estos kit se realizó utilizando los partidores para el mRNA del gen de actina y para el mmRNA del gen *crtI* (tabla 5).

El menor valor de Ct obtenido para cada una de las mediciones y una menor variación entre las diferentes réplicas biológicas indican que el kit "*SensiMix Plus SYBR*" (Quantace) es más sensible y robusto que el kit "*Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix*" (Stratagene).

Tabla 4. Diseño de partidores para PCR en tiempo real.

Gen	RNA	Partidores	Calidad (%)	Tm (°C)	Tamaño Amplicón (nt)
Actina	mmRNA	mACTF-RT	91	55,5	151
		mACTR-RT	93	54,6	
crtYB	mmRNA	mmcrtYB2F-RT	86	55,3	181
		mmcrtYB2R-RT	95	55,1	
	amRNA	amcrtYBF-RT	87	56,7	194
		amcrtYBR-RT	98	57,9	
crtI	mmRNA	mmcrtIF-RT	90	54,9	147
		mmcrtIR-RT	93	56,2	
	amRNA	amcrtIF-RT	90	53,8	157
		amcrtIR2-RT	90	54,8	

Tabla 5: Comparación de 2 kits de PCR en tiempo real.

Gen	Muestra *	Ct		Desviación Estándar	
		Stratagene	Quantace	Stratagene	Quantace
ACT	C-1	21,7	16,4		
	C-2	20,9	15,9	0,4	0,4
	C-3	21,4	15,6		
	E-1	20,2	15,1		
	E-2	20,6	15,1	0,2	0,2
	E-3	20,4	15,5		
mmcrtf	C-1	23,9	19,8		
	C-2	24,1	19,2	0,8	0,5
	C-3	22,6	18,9		
	E-1	23,7	20,1		
	E-2	23,1	19,9	0,3	0,1
	E-3	23,4	19,9		

* Réplicas biológicas (1, 2, 3) de los cultivos sometidos a una condición control (C) y a un estímulo (E).

4.6.3. Determinación de la especificidad y eficiencia de los partidores para PCR en tiempo real.

Para determinar la especificidad de los partidores, se realizó una reacción de PCR en tiempo real utilizando como DNA molde una muestra de cDNA, a la que se le acopló una curva de disociación ("*melting*") de los productos obtenidos (figura 5). En cada una de las mediciones se observó un valor de amplificado significativo (Ct) menor a 30 para todos los genes. Este resultado es indicativo de una señal fuerte de amplificado, ubicándose en el rango de mayor certeza de los resultados (Pfaffl, 2001; Pfaffl y col., 2002). En la curva de disociación se observó un único pico para cada reacción, correspondiente a un único producto de amplificado. Además, no se observó otra señal que sugiriese la generación de dímeros de partidores.

Finalmente, se determinó la eficiencia de amplificación de los partidores diseñados. Para esto, se realizó una reacción de PCR convencional teniendo como DNA molde una muestra de cDNA. Luego, el producto de amplificación obtenido se diluyó de manera seriada hasta 10^{-6} y se realizó una reacción de PCR en tiempo real utilizando como DNA blanco las diluciones desde 10^{-3} a 10^{-6} . Finalmente, a partir de la ecuación de la recta del gráfico de Ct vs Concentración de DNA blanco, se obtuvo el valor de eficiencia de los partidores. Así, los valores obtenidos fueron: Actina 98,8 % ($R^2= 0,996$), *mmcrfYB* 90,1 % ($R^2= 0,999$), *amcrfYB* 98 % ($R^2= 0,996$), *mmcrtI* 103,4 % ($R^2= 0,997$), *amcrtI* 103,5 % ($R^2= 0,996$).

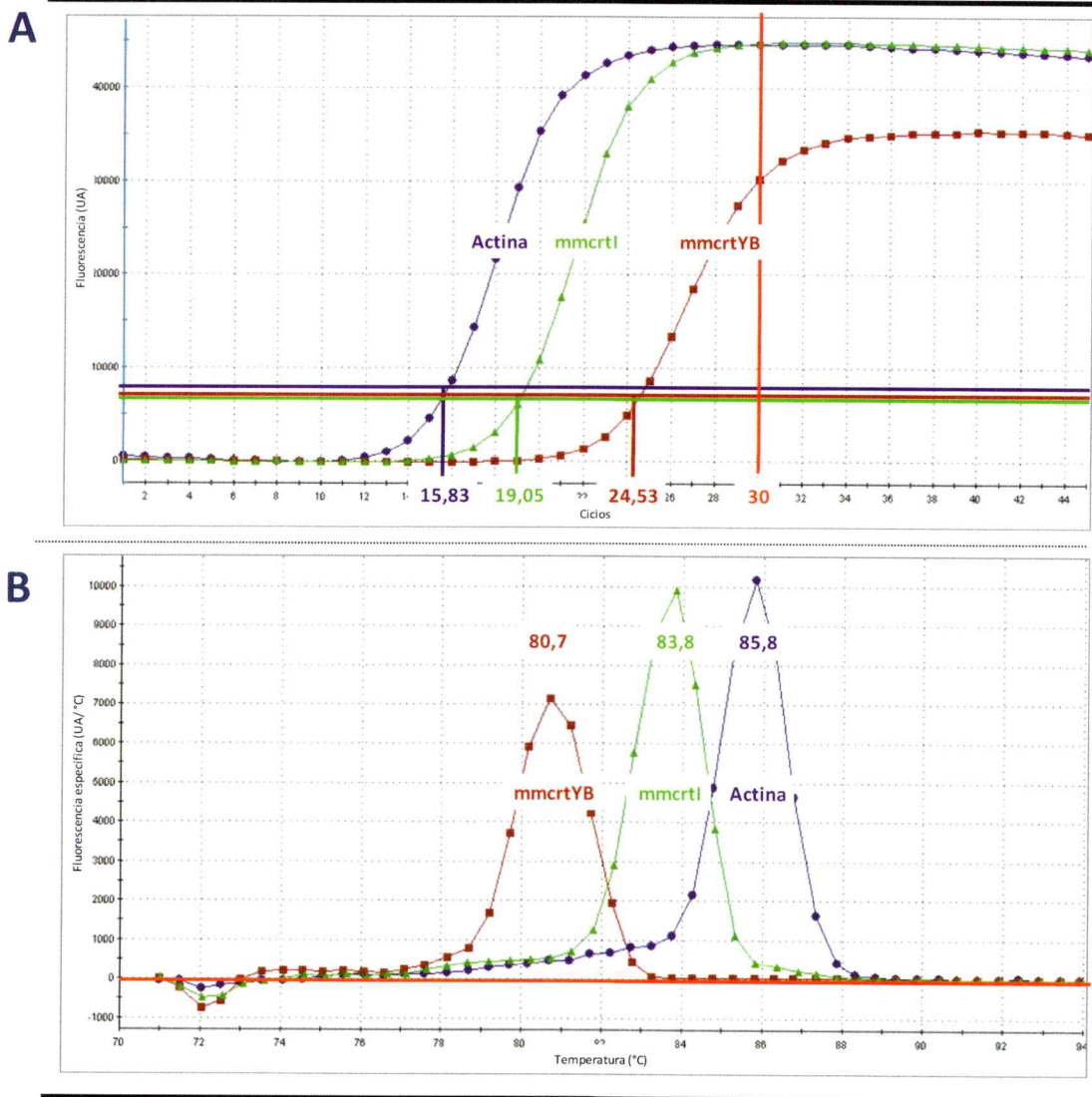


Figura 5. Curvas de amplificación y disociación de los distintos genes a medir mediante qRT-PCR.

A) Curvas de amplificación obtenidas para el mRNA del gen de actina y los mmRNA de los genes *crtyB* y *crtl*. En todos los casos el valor de Ct es menor a 30, ubicándose dentro del rango más confiable de medición. Se graficó la fluorescencia emitida (en unidades arbitrarias (UA)) en función del número de ciclos de amplificación. **B)** Curva de disociación de los productos amplificados previamente. Se observa un único pico que indica la presencia de un único producto de PCR. Se graficó la fluorescencia específica (variación de la fluorescencia (UA) por unidad de temperatura (°C)) en función de la temperatura (°C).

5. RESULTADOS

5.1. Determinación de los niveles de expresión de los genes *crfYB* y *crfI* en las diferentes fases de crecimiento.

Se ha observado que la carotenogénesis en *X. dendrorhous* es un proceso altamente regulado, teniendo valores máximos de síntesis en etapas tardías del crecimiento. Además, se ha determinado la cinética de expresión de los genes que codifican a las enzimas que participan en la ruta de biosíntesis de astaxantina, observándose una variación en los niveles de cada uno de los transcritos. Así, diferentes condiciones de cultivo influyen en el crecimiento y pigmentación de la levadura, requiriéndose para la comparación entre diferentes cepas considerar la fase de crecimiento en la cual se encuentra y no el tiempo de cultivo. Por este motivo, se construyó una curva de crecimiento modelo de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* crecida en medio YM – glucosa (1%), con la cual se definió la D.O. aproximada y los tiempos en los cuales podemos encontrarla en sus diferentes etapas de cultivo (figura 6). Así, utilizando la información previa, se creció la levadura y se colectaron muestras en cada una de las 5 diferentes etapas para realizar análisis de pigmentos y mRNA de los genes de carotenogénesis.

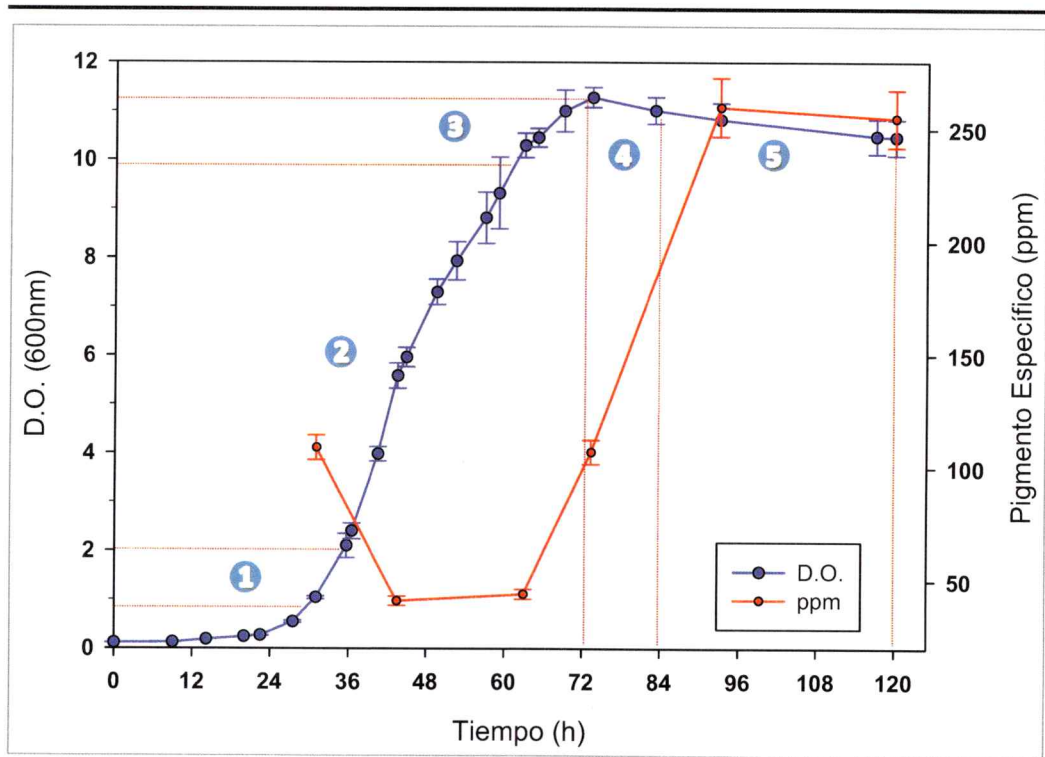


Figura 6. Cinética de crecimiento y síntesis de pigmentos de *X. dendrorhous*.

Curva de crecimiento de la cepa silvestre de *X. dendrorhous* en medio de cultivo YM – glucosa (1%). Se definieron 5 etapas de crecimiento: 1) exponencial temprana; 2) exponencial; 3) exponencial tardía; 4) estacionaria temprana y 5) estacionaria. En cada una de estas etapas se determinó la cantidad de pigmentos específicos. Se observa la inducción de la síntesis de pigmentos en la etapa exponencial tardía de crecimiento. El pigmento específico está cuantificado en partes por millón (ppm), correspondiente μg de pigmento/g de biomasa.

Los resultados de las mediciones de la cantidad de pigmentos específicos indican que la producción se induce al término de la fase exponencial tardía de crecimiento de la levadura, correspondiéndose con lo determinado anteriormente en nuestro laboratorio (Lodato, 2002; Wozniak, 2008).

Por otra parte, se determinaron los niveles de mRNA mediante qRT-PCR de los mmRNA de los genes *crfYB* y *crtI*, que podrían dar cuenta de la variación en la cantidad de pigmentos en la célula (figura 7A). Así, observamos que los niveles de mRNA de los genes *crfYB* y *crtI* varían durante el ciclo de crecimiento, teniendo sus máximos de expresión en la fase exponencial tardía y exponencial, respectivamente. Para dilucidar si la variación en estos niveles era producto de una variación en la transcripción y no en un aumento en la generación de sus versiones alternativas, se midieron los niveles de expresión de los amRNA (figuras 7B y C) y se determinó la razón mmRNA / amRNA de ambos genes (figura 8A y B). Se puede observar que la cantidad de mmRNA del gen *crtI* es entre 3 a 48 veces mayor que su versión alternativa, además de ser entre 4 a 39 veces mayor con respecto al gen *crfYB* en sus dos versiones. Se puede observar que la relación entre ambos mensajeros también varía durante el ciclo de crecimiento de la levadura, siendo esta variación más marcada para el caso del gen *crtI*. En el caso del gen *crfYB* esta variación es menos marcada y además, la versión alternativa representa en algunos casos el 50 % del mRNA total del gen transcrito.

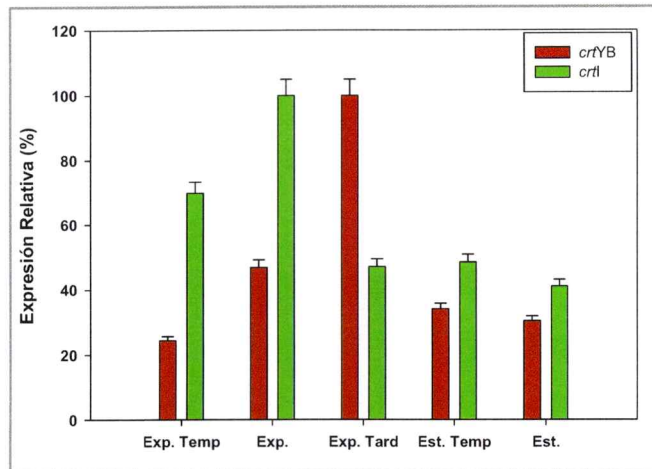
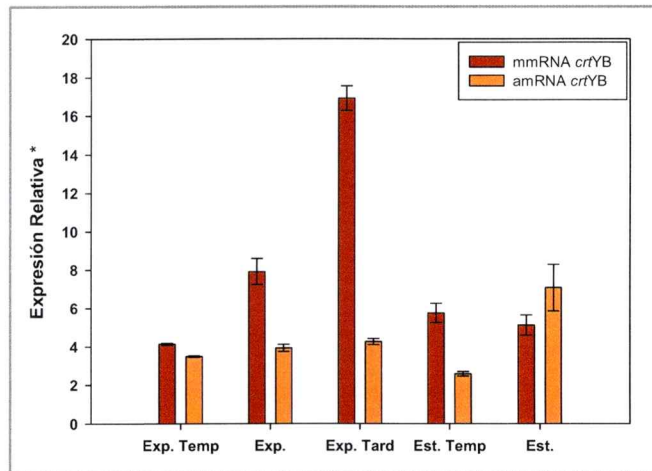
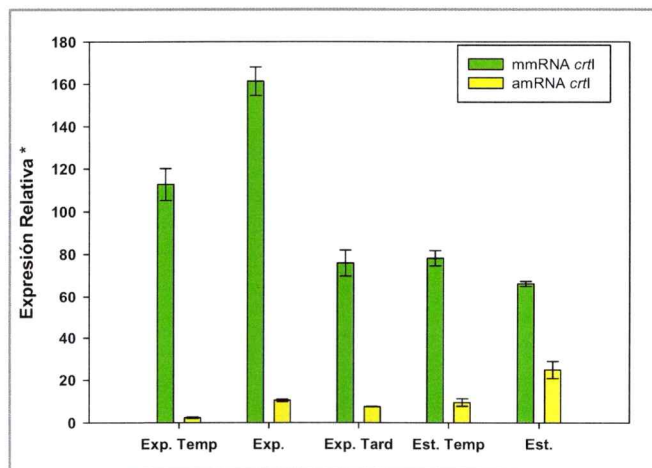
A**B****C**

Figura 7. Expresión de los mensajeros maduro y alternativo de los genes *crfYB* y *crtI* en las diferentes etapas de cultivo.

A) Expresión relativa de los mmRNA de los genes *crfYB* y *crtI*. Para cada uno de los genes se determinó su máximo de expresión al que se le asignó el valor de 100 %. **B)** Expresión relativa del mRNA maduro y alternativo del gen *crfYB*. **C)** Expresión relativa del mRNA maduro y alternativo del gen *crtI*. * Los valores corresponden a la cantidad de moléculas por cada 1.000 moléculas de mRNA del gen de actina.

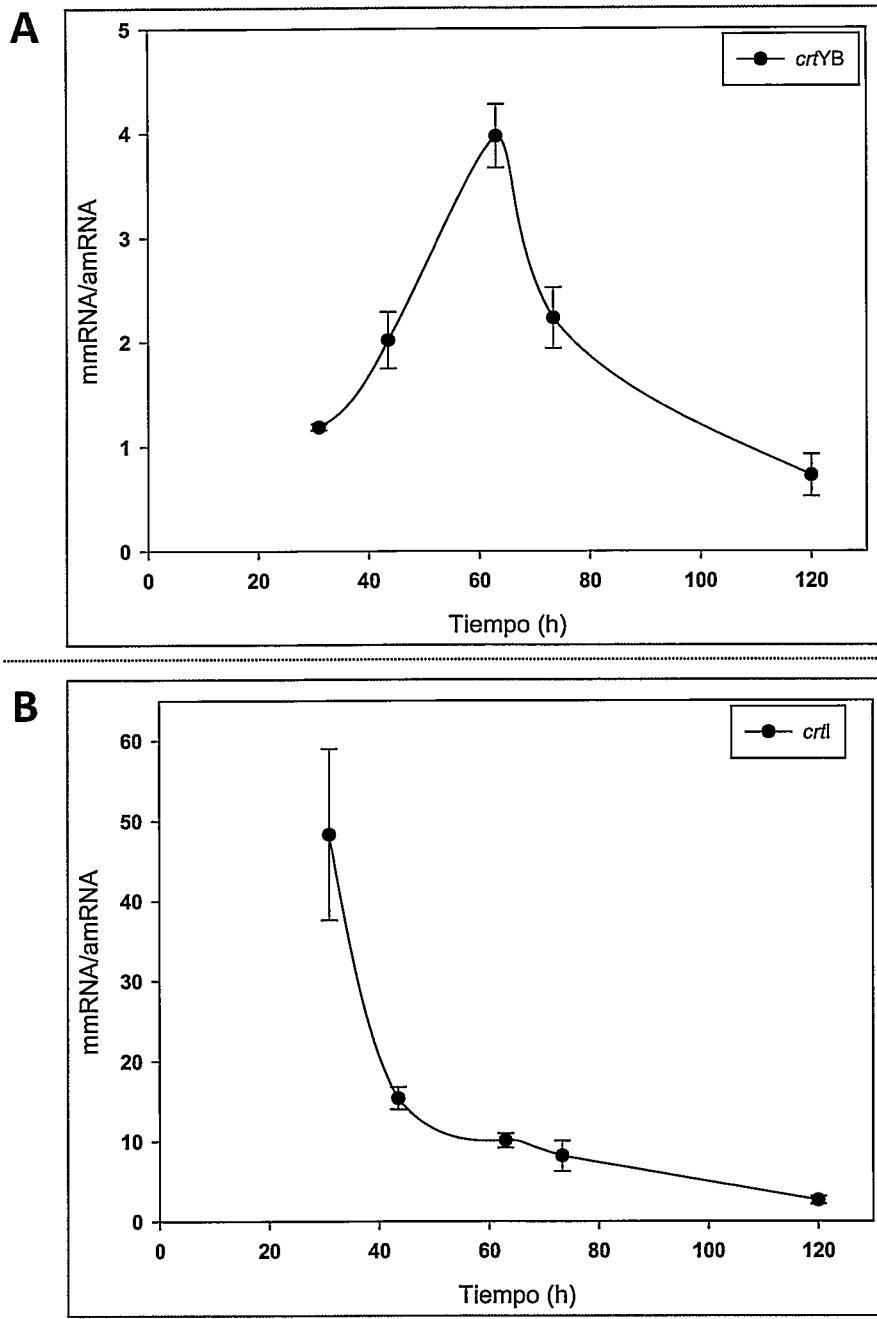


Figura 8. Razón mmRNA / amRNA de los genes *crtYB* y *crtI* en las diferentes etapas de cultivo.

Razón mmRNA / amRNA de los genes A) *crtYB* y B) *crtI* en las diferentes etapas de cultivo.

Experimentos previos realizados en nuestro laboratorio sugieren que la glucosa podría tener un papel regulador en la carotenogénesis, aún cuando este mecanismo no se ha dilucidado. La determinación de la cantidad de glucosa presente en el medio de cultivo durante el ciclo de crecimiento muestra que ésta es consumida rápidamente, por lo que encontramos altas concentraciones de glucosa sólo en las primeras etapas del crecimiento. Considerando esto y contrastándolo con los resultados indicados anteriormente, podemos observar que la mayor relación mmRNA/amRNA del gen *crtI* se encuentra en la etapa exponencial temprana de crecimiento de la levadura, coincidiendo con la mayor concentración de glucosa en el medio de cultivo antes de ser consumida. Por este motivo, se evaluó el efecto que podría tener la glucosa en la expresión los genes *crtYB* y *crtI*.

5.2. Evaluación de la represión de la transcripción de los genes *crtYB* y *crtI* mediada por glucosa.

Se creció la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* hasta fase estacionaria de crecimiento en un medio de cultivo YM sin glucosa. Luego, este cultivo se dividió en dos matraces iguales, siendo uno de ellos el cultivo control y el otro el cultivo de prueba al que se le agregó glucosa hasta una concentración final de 2 %. Se colectaron muestras a intervalos cortos (20 – 120 min) e intermedios (2 – 24 h) de tiempo, a las que se les extrajo RNA y se determinaron los niveles de expresión mediante qRT-PCR de las versiones madura y alternativa de los genes *crtYB* (figura 9) y *crtI* (figura 10).

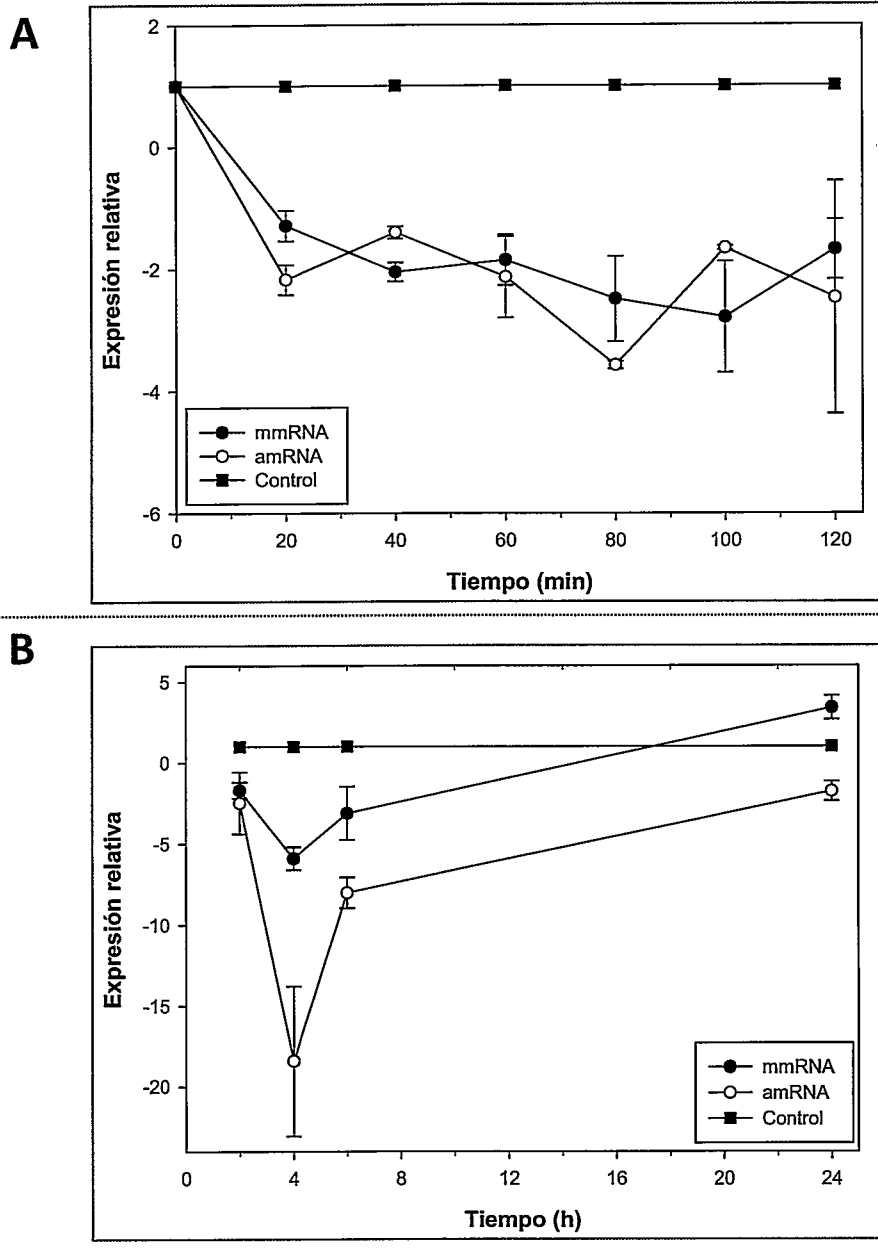


Figura 9. Regulación de la expresión del gen *crfYB* mediada por glucosa.

Determinación de los niveles de mRNA de la versión madura y alternativa del gen *crfYB* a intervalos cortos (A) y e intermedios (B) de tiempo post adición de glucosa. Los valores de expresión relativa corresponden a la diferencia en los niveles de mRNA entre el cultivo control sin glucosa y el cultivo con glucosa. Los valores negativos indican una disminución en los niveles de mRNA.

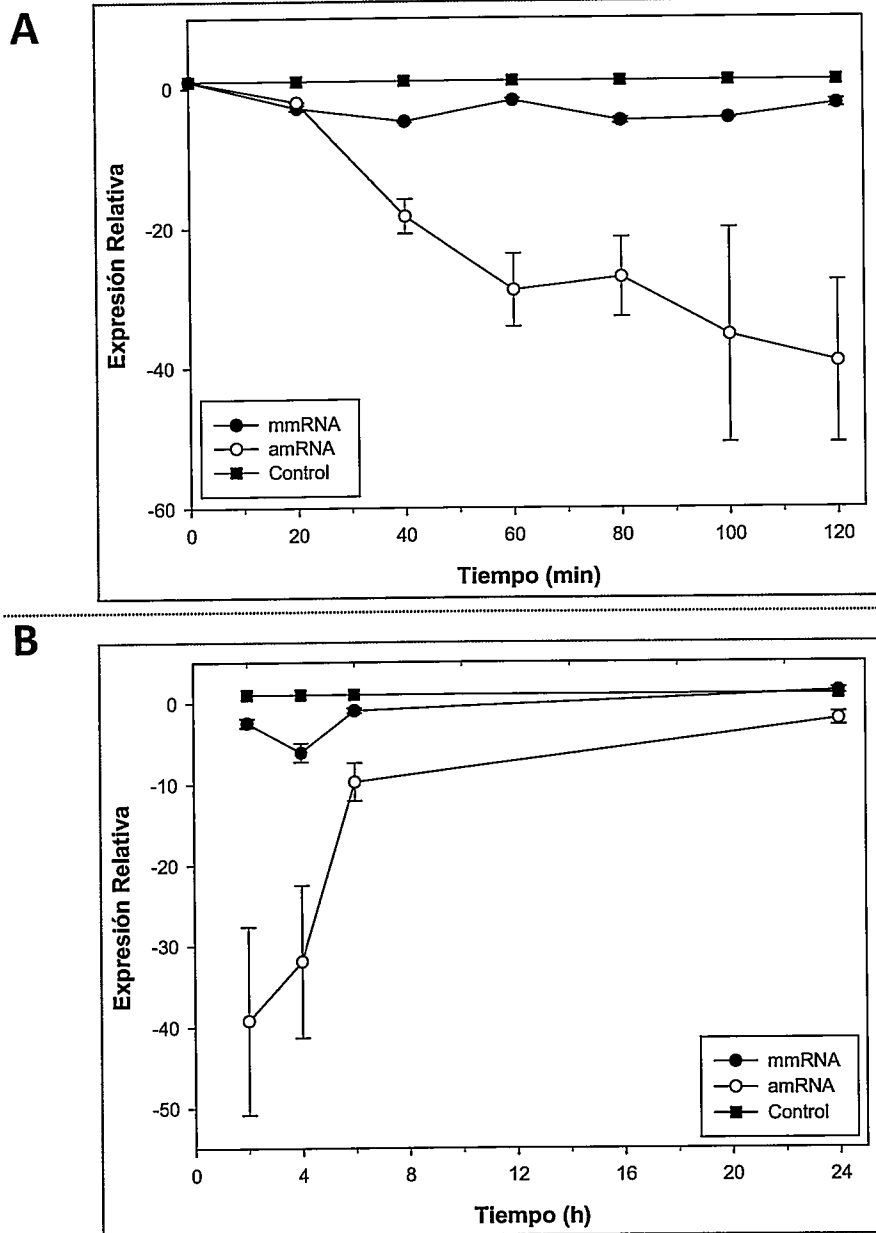


Figura 10. Regulación de la expresión del gen *crtI* mediada por glucosa.

Determinación de los niveles de mRNA de la versión madura y alternativa del gen *crtI* a intervalos cortos (A) y e intermedios (B) de tiempo post adición de glucosa. Los valores calculados corresponden a la diferencia en los niveles de mRNA entre el cultivo control sin glucosa y el cultivo con glucosa. Los valores negativos indican una disminución en los niveles de mRNA.

A intervalos cortos de tiempo, observamos que los niveles de expresión de los genes *crfYB* y *crtI* disminuyen con respecto al cultivo control. Esta disminución es similar en el caso del gen *crfYB* tanto para su mRNA maduro como alternativo (figura 9A). Sin embargo, en el caso del gen *crtI*, la disminución en los niveles de expresión es diferencial entre las versiones madura y alternativa, ya que esta última muestra una disminución mucho más acentuada de al menos 20 veces con respecto al cultivo control (figura 10A). A intervalos intermedios de tiempo, también observamos una disminución en los niveles de expresión de los genes *crfYB* y *crtI*. Sin embargo, a diferencia de lo observado a tiempos cortos post-adición de glucosa, la disminución de las versiones madura y alternativa del gen *crfYB* es diferencial, ya que esta última muestra una disminución mucho más acentuada de al menos 15 veces con respecto al cultivo control (figura 9B). Para el caso del gen *crtI*, su respuesta es similar a la observada a intervalos cortos de tiempo (figura 10B). En ambos casos, se recuperan los niveles transcripcionales iniciales después de las 24 h.

Los resultados anteriores indican que la expresión de los genes *crfYB* y *crtI* es regulada por glucosa y que la variación en la generación de los mRNA maduro y alternativo de estos genes, sugiere la participación de un mecanismo de regulación post-transcripcional dependiente de glucosa.

5.3. Obtención de cepas de *X. dendrorhous* mutantes para ambos tipos de procesamiento del gen *crtI*.

Los resultados previos indican que los niveles de expresión de los genes *crfYB* y *crtI* varían durante el ciclo de crecimiento de la levadura, tanto en su mRNA maduro

como alternativo. Además, observamos una respuesta diferencial de ambos tipos de mRNA cuando se adiciona glucosa al medio de cultivo. En ambas situaciones, el comportamiento del gen *ctrl* presenta diferencias mucho más acentuadas en la generación de ambas versiones de mRNA en comparación con el gen *crfYB*, por lo que se convierte en el mejor candidato para profundizar el estudio de este fenómeno.

5.3.1. Modificación de los sitios aceptores de “*splicing*” del gen *ctrl*.

Para evaluar si la presencia y/o variación en la generación de los mensajeros maduro y alternativo del gen *ctrl* afecta la síntesis de pigmentos en *X. dendrorhous*, se modificaron los sitios aceptores de “*splicing*” del primer intrón de este gen para generar cepas de la levadura que produjesen sólo la versión madura o alternativa de éste respectivamente. Para esto, se sub-clonó el gen *ctrl* a partir de un fragmento *Bam*HI de 15.788 pb (pXD-C13) en 2 fragmentos: i) un fragmento *Xho*I de 4.779 pb que incluía la región 5' y el ORF del gen *ctrl* y ii) un fragmento *Nde*I – *Sma*I de 795 pb correspondiente a la región 3' del gen *ctrl*. Ambos fragmentos fueron unidos y clonados, obteniéndose un inserto *Xho*I – *Sma*I de 5.336 pb (pCI) que contenía las 2.827 pb del ORF del gen *ctrl*, además de 1.859 pb correspondiente a su región 5' y 650 pb a su región 3' (figura 11A). Los análisis de la secuencia obtenida permitieron ubicar las 177 pb del primer intrón del gen *ctrl* entre las posiciones 1.905 y 2.082 del inserto y los 2 sitios aceptores de “*splicing*”, alternativo y maduro, en las posiciones 2.001 y 2.081 respectivamente. Además, se ubicaron los sitios de restricción de las enzimas *Eco*NI y *Eco*RV que flanquean a este primer intrón, las que se utilizaron posteriormente. A partir de la secuencia del primer intrón del gen *ctrl*, se diseñaron 2

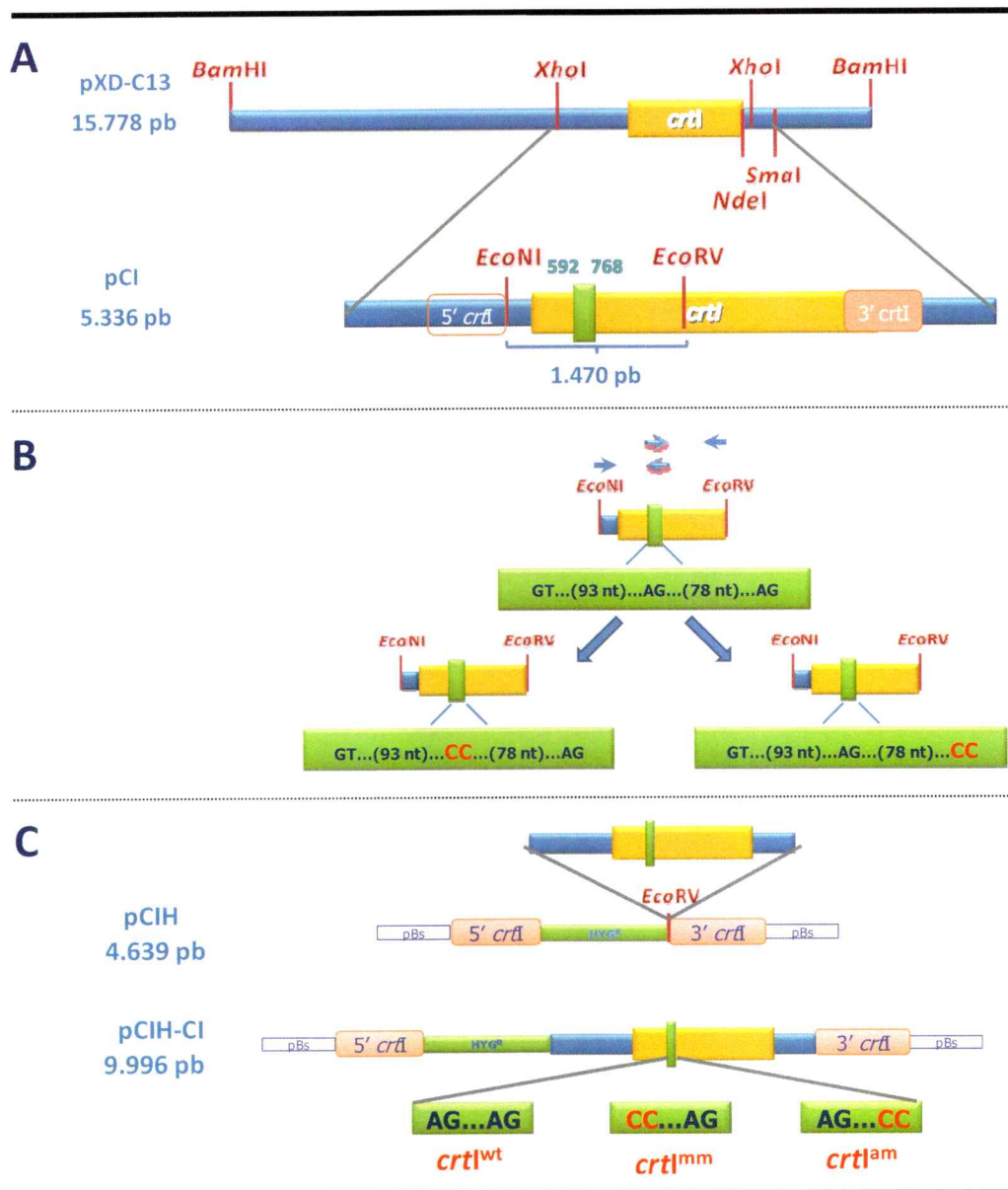


Figura 11. Obtención de las versiones modificadas del gen *crtI* en sus sitios aceptores de “*splicing*” alternativo y maduro.

A) Sub-clonado del *crtI* desde un fragmento *Bam*HI de 15.778 pb a un fragmento de 5.336 pb. **B)** Generación de las mutaciones puntuales de los sitios aceptores de “*splicing*” mediante elongación y PCR. **C)** Inserción del gen *crtI* silvestre (*crtI^{wt}*), mutante del sitio aceptor de “*splicing*” alternativo (*crtI^{mm}*) y mutante del sitio aceptor de “*splicing*” maduro (*crtI^{am}*) en el plasmidio de transformación pCIH de *X. dendrorhous*.

partidores divergentes entre sí ubicados en cada uno de los sitios aceptores de “*splicing*”, portando en su secuencia 2 modificaciones puntuales con respecto al DNA molde. Estas modificaciones correspondieron al cambio de la secuencia aceptora de “*splicing*” “AG” por las bases “CC”, generando 2 mutaciones puntuales que evitan la generación del mRNA alternativo para el primer sitio AG y maduro en el caso del segundo sitio AG (figura 11B).

Luego, utilizando los partidores externos ubicados desde los sitios de restricción *EcoNI* (5') y *EcoRV* (3'), se amplificaron cada uno de los fragmentos, los cuales se unieron por elongación y PCR. Los fragmentos resultantes se clonaron y secuenciaron completamente para confirmar las modificaciones realizadas.

Finalmente, se eliminó el fragmento *EcoNI* – *EcoRV* del gen *crtI* silvestre y se insertó en su reemplazo las versiones de mutantes para los sitios aceptores de “*splicing*”. Así, se obtuvo el plasmidio pCI-mm que porta la mutación del sitio de “*splicing*” alternativo y sólo produce mensajero maduro, y el plasmidio pCI-am que porta la mutación del sitio de “*splicing*” maduro y sólo produce mensajero alternativo.

5.3.2. Inserción de las diferentes variantes del gen *crtI* en el genoma de *X. dendrorhous*.

Para la inserción de las diferentes variantes del gen *crtI* en el genoma de *X. dendrorhous*, se necesitaba además eliminar su versión silvestre presente en el genoma. Para esto, se diseñó una estrategia conjunta en la cual se elimina por recombinación y reemplazo el gen silvestre y se inserta en su lugar la versión

modificada del gen junto a un módulo de selección, un gen que le confiere resistencia al antibiótico higromicina B a las cepas de *X. dendrorhous* que lo portan. Para esto, al plasmidio pCI que porta al gen *crtI* en un fragmento de 5.336 pb se le eliminó un fragmento *EcoNI* – *EcoRV* de 2.588 pb y se insertó en su reemplazo el módulo de resistencia a higromicina B, restableciéndose el sitio de restricción *EcoRV* (Niklitschek, 2007). Luego, en este sitio se insertó el fragmento *BamHI* – *XhoI* de 5.357 pb proveniente de los plasmidios pCI, pCI-mm y pCI-am para obtener los plasmidios de transformación de *X. dendrorhous* con las versiones del gen *crtI* silvestre (pCIH-CI), que sólo generaría mensajero maduro (pCIH-CI-mm) o que solo generaría mensajero alternativo (pCIH-CI-am) (figura 11C). Finalmente, la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* se transformó en forma individual con los 3 plasmidios derivados del plasmidio pCIH, seleccionándose las colonias transformantes en un medio de cultivo YM con higromicina B 10 µg/ml.

Trabajos previos en nuestro laboratorio demostraron que la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* es diploide (Hermosilla y col., 2003) y por lo tanto, en una primera transformación se obtienen cepas heterocigotas (León, 2000; Niklitschek, 2007). Así, la obtención de cepas homocigotas para la modificación realizada debe ser obtenida en un segundo paso de transformación. Por otra parte, se demostró que la eliminación de una copia del gen *crtI* en el genoma de la levadura, genera cepas que son pálidas en su pigmentación, ya que producen una menor cantidad de pigmento en comparación con la cepa silvestre. La mutación de ambos alelos del gen *crtI* genera cepas albinas (Niklitschek y col., 2008).

Una vez obtenidas las colonias transformantes, estas se crecieron en placas de cultivo YM e YM con higromicina B, conjuntamente con la cepa parental (figura 12). De esta manera, se pudo observar que aquellas cepas transformadas con el módulo que porta el gen silvestre y aquellas cepas transformadas con el módulo que porta la mutación para sólo generar mRNA maduro, su fenotipo fue idéntico al de la cepa sin transformar. Sin embargo, las cepas obtenidas producto de la transformación de la cepa silvestre con el gen que portaba la mutación para sólo generar mRNA alternativo presentaron una coloración más pálida que la cepa silvestre, similar a la coloración presentada por las cepas heterocigotas para el gen *crtI*. Este resultado sugiere que los mRNA alternativos no son productivos y por lo tanto, cepas homocigotas para este tipo de procesamiento son albinas.

5.3.3. Obtención de cepas de *X. dendrorhous* mutantes homocigotas del gen *crtI*.

La característica diploide de la cepa silvestre UCD67-385 de *X. dendrorhous* hace necesario 2 pasos de transformación para poder obtener cepas homocigotas. Sin embargo, no se cuenta con las herramientas moleculares para realizar la transformación y selección de las cepas de manera rápida y confiable. Por este motivo, se desarrolló en nuestro laboratorio el método que denominamos "Método del Doble Recombinante" (DRM) (Niklitschek y col., 2008). Este método consiste en crecer las cepas heterocigotas de la levadura a distintas concentraciones del antibiótico de selección, partiendo el inóculo desde una concentración baja del antibiótico (higromicina B) y una vez crecido el cultivo, éste se utiliza como inóculo en una

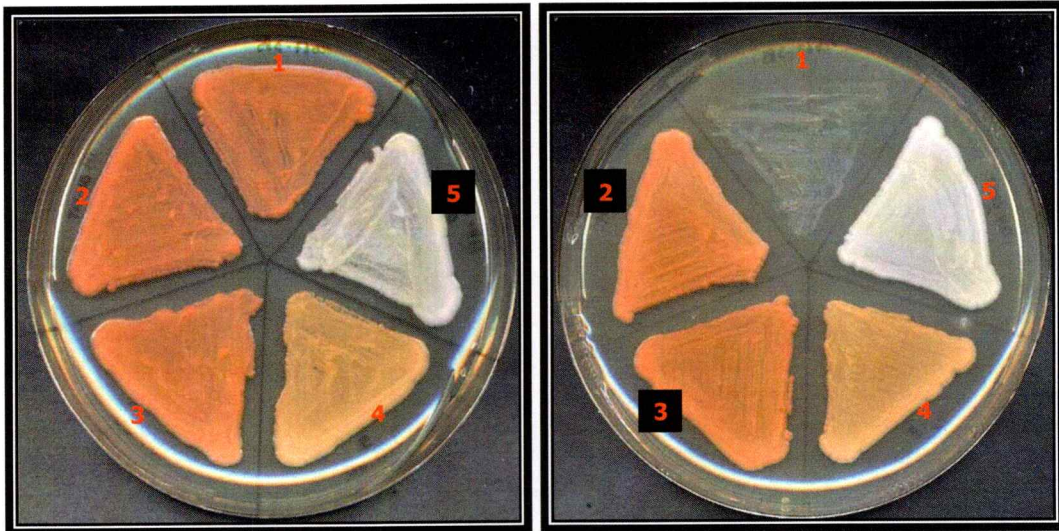


Figura 12. Obtención de cepas de *X. dendrorhous* que portan las mutaciones del gen *crtI*.

Crecimiento de las distintas cepas transformantes de *X. dendrorhous* en medio YM (A) e YM higromicina (10 µg/ml) (B) para su posterior análisis. 1) Silvestre UCD67-385; 2) T1-*crtI*^{wt}/*crtI*^{wt}; 3) T1-*crtI*^{mm}/*crtI*^{mm}; 4) T1-*crtI*^{am}/*crtI*^{wt}. La cepa 5 (T5-3H) corresponde a una cepa mutante homocigota para el gen *crtI* (*crtI*⁻ / *crtI*^{-::hph})(Niklitschek, 2007).

siguiente etapa en la cual la concentración del antibiótico en el medio de cultivo es mayor. Lo que ocurre es que naturalmente *X. dendrorhous* presenta una frecuencia elevada de eventos de recombinación mitótica, en comparación con otras levaduras como *S. cerevisiae*, que hace que en condiciones normales de cultivo se pueda observar la segregación de algunos caracteres. Tomando como base que las cepas de la levadura que porten 2 o más copias del gen de resistencia verán favorecido su crecimiento a altas concentraciones del antibiótico en comparación con las cepas heterocigotas, después de repetir varias veces el incremento del antibiótico nos encontraremos con un cultivo enriquecido en cepas que hayan recombinado y que sean homocigotas para el gen de selección. Así, cepas heterocigotas para el gen *crtl* que portaban la mutación en el sitio aceptor de "splicing" maduro, se crecieron en concentraciones crecientes de higromicina B, desde 30 µg/ml hasta 800 µg/ml, plaqueándose las diluciones 1×10^{-3} y 1×10^{-4} en medio YM sin y con higromicina. Las placas se incubaron a 22 °C durante 5 días, siendo analizadas visualmente en búsqueda de colonias que presentaran un cambio fenotípico. De esta manera y como era de esperarse, se pudo aislar colonias albinas, correspondiente a mutantes homocigotas para el gen *crtl* (figura 13). El análisis fenotípico de las cepas transformantes de *X. dendrorhous*, indica que aquellas que sólo producen el mRNA maduro no presentan variaciones en su pigmentación en comparación con la cepa silvestre. Por otra parte, las cepas homocigotas que sólo producen el mRNA alternativo presentan un fenotipo albino.

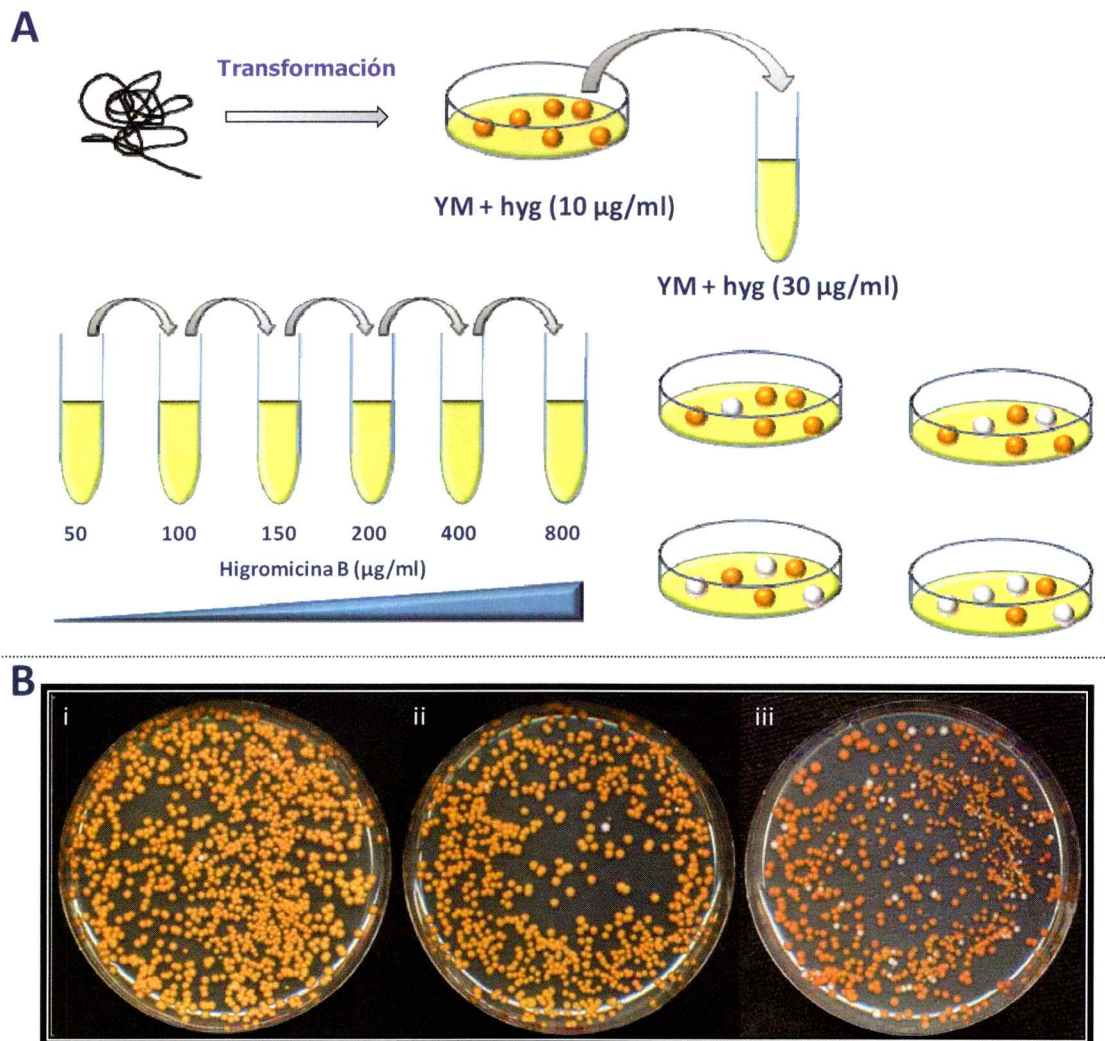


Figura 13. Obtención de cepas de *X. dendrorhous* mutantes homocigotas utilizando el método del doble recombinante.

A) Esquema del método del doble recombinante. Las cepas transformantes heterocigotas de *X. dendrorhous* resistentes a higromicina B son crecidas en concentraciones crecientes del antibiótico y luego plaqueadas para el aislamiento de las cepas mutantes. **B)** Colonias provenientes de los cultivos con i) 50, ii) 100 y iii) 150 µg/ml de higromicina B. Se observa un aumento en la aparición de las colonias albinas producto de la recombinación mitótica.

5.4. Determinación de los niveles de expresión del gen *crf1* en las cepas de *X. dendrorhous* mutantes de “*splicing*”.

Se ha observado que la generación de las versiones madura y alternativa del gen *crf1* varían durante el ciclo de crecimiento de la levadura, sugiriendo un posible mecanismo de regulación de la síntesis de cada uno de estos mensajeros. Sin embargo, es posible también que la generación de éstos fuese sólo dependiente de la afinidad de la maquinaria de procesamiento por uno u otro sitio aceptor de “*splicing*”, favoreciéndose siempre el sitio para generar la versión productiva del gen (mmRNA) y generando en una menor frecuencia la versión no productiva (amRNA) (figura 14A). Frente a esta disyuntiva, se quiso dilucidar si la generación del mRNA alternativo, que siempre se encuentra en menor proporción en la célula en comparación con el mRNA maduro, es dependiente de la afinidad de la maquinaria de procesamiento por uno u otro sitio aceptor de “*splicing*”, o si la generación del mRNA alternativo está determinado por otros factores dentro de la célula. En el primer caso, se debería esperar que en aquellas cepas que presentan sólo el sitio aceptor de “*splicing*” alternativo, todo el mRNA transcrito debiera ser procesado hacia el amRNA por no contar con otro sitio de procesamiento (figura 14B). Por el contrario, si la generación de mRNA alternativo es dependiente de otros factores, en estas cepas la cantidad de amRNA sería independiente de la cantidad de mRNA transcrito, asemejándose a la cepa silvestre (figura 14C).

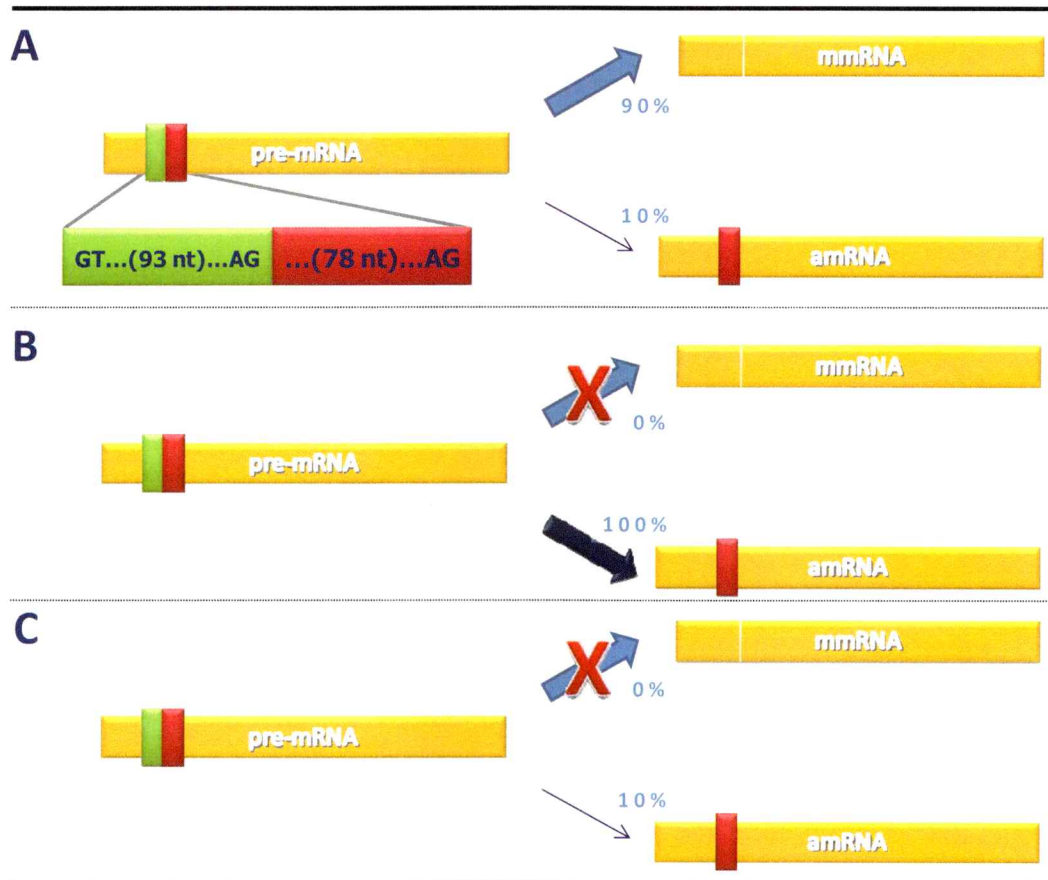


Figura 14. Predicción del posible mecanismo de elección de los sitios de "splicing".

A) En la cepa silvestre de *X. dendrorhous* en condiciones normales de crecimiento (fase exponencial), un 90 % del mRNA del gen *crtI* corresponde al mmRNA y un 10 % al amRNA. Si la generación del amRNA depende sólo de la afinidad de la maquinaria transcripcional por alguno de los sitios de "splicing", en una cepa carente del sitio aceptor de "splicing" maduro el 100 % del mRNA será amRNA (**B**). Si el procesamiento alternativo depende de otros factores, la generación de mmRNA y amRNA será independiente (**C**). pre-mRNA: mRNA no procesado proveniente del gen *crtI*.

Para evaluar esto, se diseñó un nuevo juego de partidores que permitiesen amplificar otra región del gen *crtI*. Estos partidores se ubicaron río abajo del primer intrón, en la unión exón IV – exón V para el partidor directo y en la unión exón VII – exón VIII para el partidor reverso. Esta región es compartida por el mmRNA y amRNA, por lo que los niveles de expresión determinados con este juego de partidores es un indicativo del mRNA total (tmRNA) transcrito. Luego, todas las cepas transformantes de *X. dendrorhous* (TI-CIH-wt, mm y am) se crecieron hasta fase exponencial, en donde el gen *crtI* alcanza su máximo de expresión y por lo tanto la abundancia de ambos mRNAs es relativamente alta. Luego, se determinaron los niveles de expresión del gen *crtI* como tmRNA y las versiones madura y alternativa de este (figura 15). Podemos observar que los niveles de mRNA del gen *crtI* no varían entre las cepas, indicando que la pérdida en la capacidad de síntesis de pigmentos por parte de la cepa albina se debe exclusivamente a que no puede generar mRNA maduro. Además, se puede observar que la cantidad de mRNA alternativo generado tanto por la cepa silvestre como por la cepa albina es igual. Este resultado sugiere que la generación del amRNA depende de factores regulatorios post- transcripcionales y no depende de la cantidad de tmRNA que se haya generado.

5.5. Determinación de la presencia de mRNA maduro y alternativo de un gen reportero que porta el primer intrón del gen *crtI*.

Los resultados anteriores demuestran que el procesamiento del primer intrón del gen *crtI* es un proceso regulado, en donde la generación y abundancia de las versiones madura y alternativa de éste dependería de algunos factores post-

A mRNA *crtI*

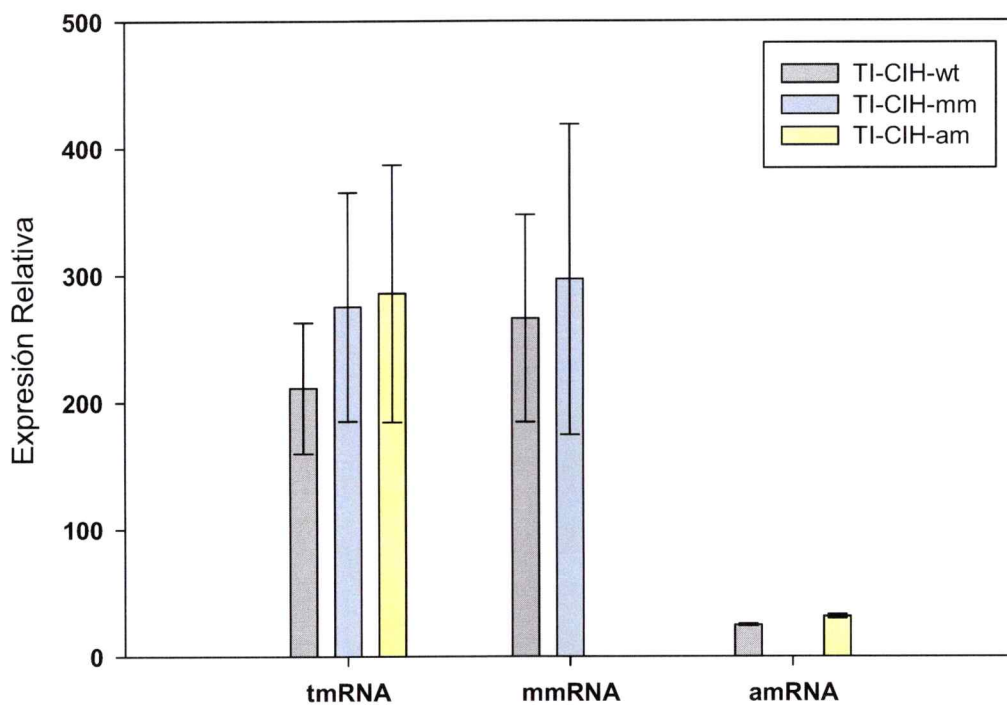
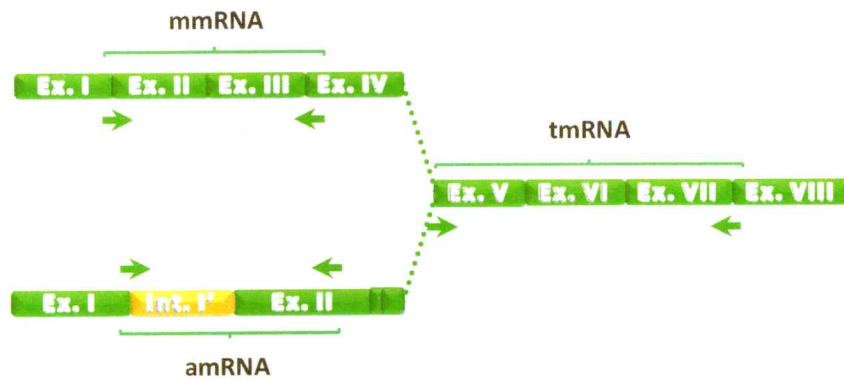


Figura 15. Expresión del gen *crtI* en cepas de *X. dendrorhous* mutantes de los sitios aceptores de “*splicing*”.

A) Esquema de la posición de los partidores para amplificar las distintas versiones del mRNA del gen *crtI*. **B)** Determinación de los niveles de expresión relativa de las distintas variantes del gen *crtI* de las cepas de *X. dendrorhous* mutantes de los sitios aceptores de “*splicing*”. Los valores están referidos por cada 1.000 moléculas de actina. tmRNA: mRNA total transcrito.

transcripcionales. Sin embargo, se desconoce si la información requerida para la generación de ambas versiones de este mRNA se encuentra en este primer intrón, o si depende de otras regiones del gen para su procesamiento. Para evaluar esto, se interrumpió un gen reportero que naturalmente no tiene intrones, con el primer intrón del gen *ctrl* y se evaluó si era procesado de manera normal y si además generaba la versión alternativa.

5.5.1. Construcción del gen reportero interrumpido por el primer intrón del gen *ctrl*.

Para la selección del gen reportero a utilizar, se consideraron las siguientes características: i) que sea un gen heterólogo para evitar cualquier interferencia con el gen propio de la levadura; ii) que no presente naturalmente intrones para evitar las señales propias de procesamiento y iii) que genere un fenotipo detectable cuando el intrón es procesado. Así, se seleccionó como gen reportero el gen *hph* de *E. coli*, que codifica a la enzima higromicina B fosfotransferasa y cuya versión silvestre le otorga resistencia a higromicina B a las cepas de *X. dendrorhous* que lo portan. Para seleccionar el sitio para la inserción del intrón, se buscó el contexto genético en el cual se encontraba en el gen *ctrl*. Así, antes del sitio dador de "splicing" y después del sitio aceptor de "splicing" se encontró la secuencia GG y GA respectivamente. Por lo tanto, se buscó en el gen *hph* la secuencia GGGA, encontrándola en las posiciones 258, 683 y 920 desde el sitio de inicio de la traducción. Debido a que en el gen *ctrl* el primer intrón se ubica hacia el extremo 5', se seleccionó la primera posición (258) para la inserción de éste. Una vez definida esta ubicación, se diseñaron partidores con sus

respectivas regiones adaptadoras para posteriormente, mediante elongación y PCR, obtener el módulo de resistencia a higromicina B portando el primer intrón del gen *crfI*. El producto final de PCR se clonó y secuenció completamente para corroborar la construcción, obteniéndose el plasmidio pMN-Hyg-IntI. Toda esta construcción está flanqueada con los sitios de restricción *EcoRV*, por lo que en su liberación genera un fragmento de 2.088 pb que se insertó entre los sitios *EcoNI* – *EcoRV* del plasmidio pCI, obteniéndose el plasmidio pCIH-IntI (figura 16). Este módulo se utilizó para transformar la cepa silvestre de *X. dendrorhous*.

5.5.2. Análisis de las cepas de *X. dendrorhous* portadoras del gen reportero interrumpido por el primer intrón del gen *crfI*.

La transformación de la cepa silvestre de *X. dendrorhous* con el plasmidio pCIH-IntI dio como resultado cepas heterocigotas para el gen *crfI* que además eran resistentes al antibiótico higromicina B, indicando que el intrón era procesado correctamente. Así, mediante el método del doble recombinante se pudieron obtener las cepas homocigotas. Como control para los experimentos posteriores, se contaba con las cepas TI-CIH hetero y homocigotas para el gen *crfI*, que portaban el módulo de resistencia a higromicina B sin el intrón.

Para la determinación de las diferentes variantes del mRNA del gen *hph*, se diseñaron los siguientes juegos de partidores: i) *hph*-npmRNA que permiten amplificar el mRNA no procesado, ii) *hph*-mmRNA que permiten amplificar la versión madura del gen, en la cual el intrón ha sido procesado de manera correcta y iii) *hph*-amRNA que permiten amplificar la versión alternativa del gen, en la cual el intrón ha sido procesado

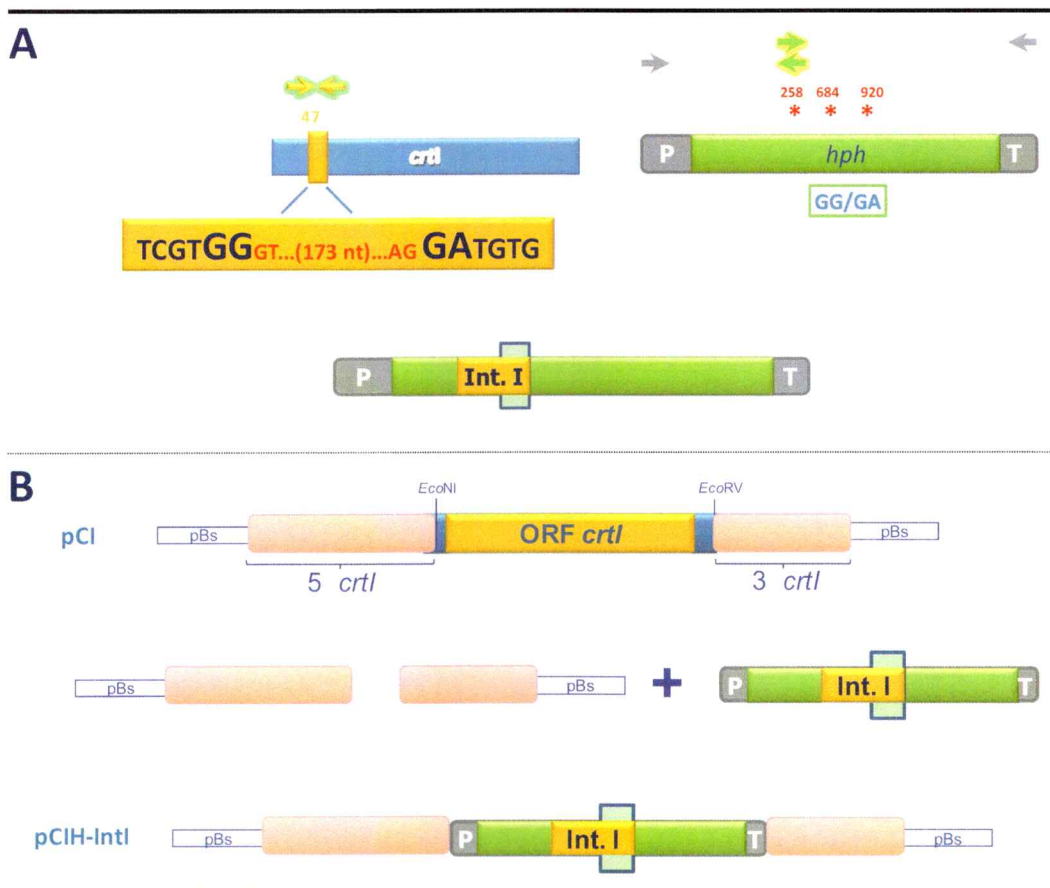


Figura 16. Inserción del intrón del gen *crtI* en el gen *hph*.

A) Se identificó en el gen *hph* un contexto genético similar al que se encontraba el intrón del gen *crtI* de manera silvestre, uniendo ambas partes mediante elongación y PCR. **B)** La construcción obtenida se insertó entre los sitios *EcoNI* y *EcoRV* del plasmidio que portaba el gen *crtI* para la posterior transformación de *X. dendrorhous*. P: promotor del gen *TEF-1α*. T: terminador de la transcripción del gen *GPD*.

de manera alternativa (figura 17A).

Las 4 cepas transformantes y la cepa silvestre se crecieron hasta fase exponencial, en donde la generación de las versiones de mRNA alternativo y maduro del gen *crtI* son relativamente altas, determinándose mediante RT-PCR la presencia de las diferentes versiones del gen *hph* (figura 17B).

Se puede observar que aquellas cepas que portan el gen *hph* interrumpido por el intrón del gen *crtI* generan, además del RNA mensajero no procesado (npmRNA) y del RNA mensajero procesado completamente (mmRNA), versiones del mRNA en el que el intrón del gen *crtI* es procesado de manera alternativa. Por otra parte, observamos que la cepa que no posee este intrón, sólo produce el mmRNA. Este resultado indica que la información requerida para que el intrón del gen *crtI* genere ambas versiones de mRNA depende exclusivamente de su secuencia.

Dado este resultado, se evaluó si la cinética a la cual se generan ambos mRNA también está definida sólo en la secuencia del primer intrón del gen *crtI*. Para esto, la cepa mutante homocigota se creció en medio YM líquido y se colectaron muestras en las diferentes etapas de cultivo (exponencial temprana, exponencial, exponencial tardía, estacionaria temprana y estacionaria) a las que mediante qRT-PCR se le midió los niveles de expresión del gen *hph* en sus versiones madura y alternativa (figura 18).

Podemos observar que la cantidad de mRNA maduro del gen *hph* es aproximadamente 13 veces mayor que la cantidad de mRNA alternativo para todos los puntos medidos. Este resultado se diferencia del observado para el caso del gen *crtI*,

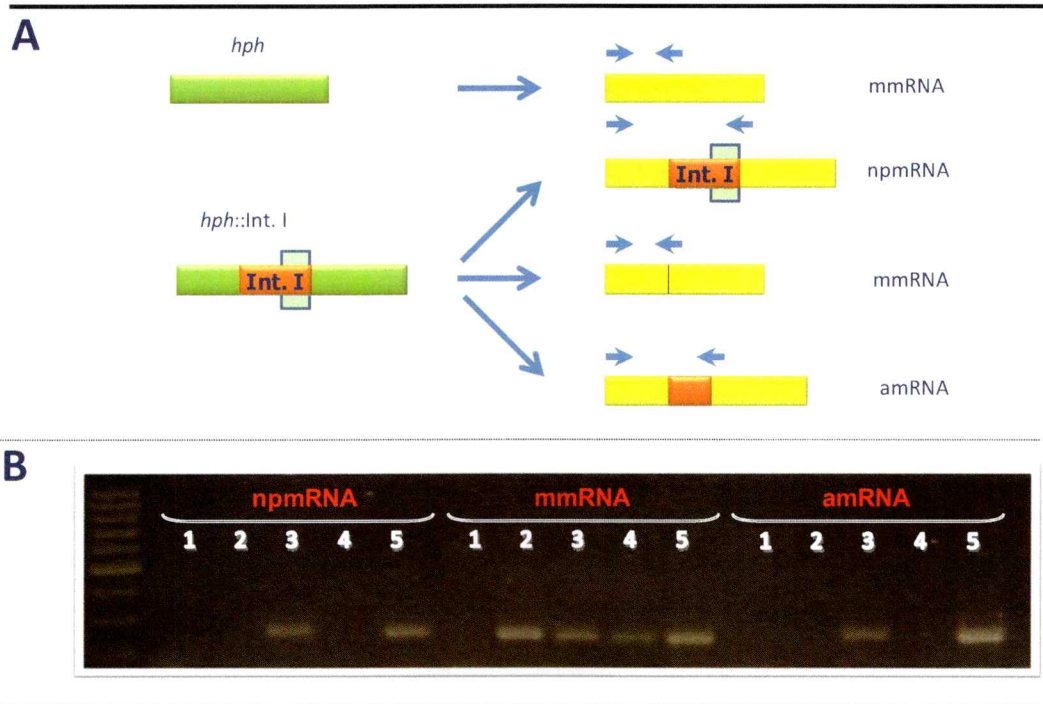


Figura 17. Procesamiento del primer intrón del gen *ctrl* en un gen reportero.

A) Esquema de la posición de los partidores diseñados para determinar el procesamiento normal y alternativo del primer intrón del gen *ctrl*. **B)** Electroforesis en un gel de agarosa 2 % para visualizar los productos de RT-PCR de las diferentes partes del gen *hph* y en las diferentes cepas. 1) UCD67-385, 2) *hph* heterocigoto, 3) *hph*-Int. I heterocigoto, 4) *hph* homocigoto, 5) *hph*-Int. I homocigoto.

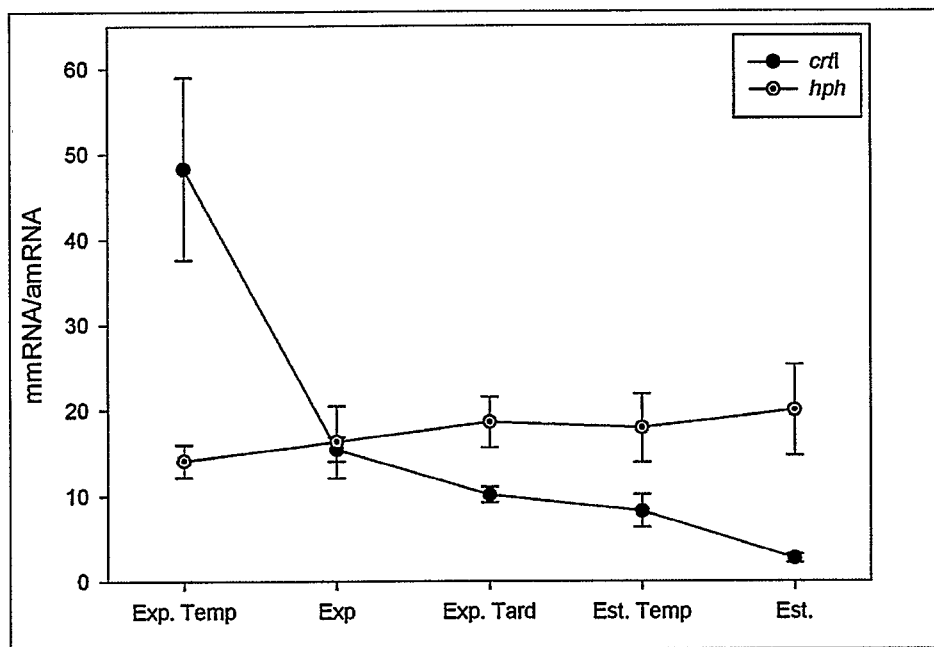


Figura 18. Cinética de síntesis de los mensajeros maduro y alternativo de los genes *crtI* y *hph*.

Se determinó la razón de mmRNA / amRNA del gen *crtI* y del gen *hph* que porta el primer intrón del gen *crtI* en las diferentes etapas de cultivo.

en el cual la generación de las versiones madura y alternativa varían durante el ciclo de crecimiento. Así, esto sugiere que aunque la información requerida para que el primer intrón del gen *crtI* se procese de forma madura o alternativa está contenida en su secuencia, la cinética con la cual se genera una u otra versión depende de otros factores asociados al contexto genético en el cual se encuentra de manera silvestre.

5.6. Evaluación de la represión de la transcripción del gen *crtYB* mediada por glucosa en cepas albinas de *X. dendrorhous*.

Los genes de carotenogénesis *crtYB* y *crtI* presentan 2 variantes de procesamiento de su mRNA, generando diferencialmente las versiones madura y alternativa. Además, la transcripción de estos genes es regulada de acuerdo a factores metabólicos, como la presencia de glucosa en el medio de cultivo, reprimiendo su transcripción y modificando la tasa a la cual se generan ambas versiones. Sin embargo, se desconoce la relación que existe entre los pigmentos producidos por la levadura y la regulación de la transcripción de los genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides. Debido a que durante el desarrollo de este trabajo se obtuvieron cepas mutantes para el gen *crtI*, que eran incapaces de sintetizar pigmentos, se determinó si la respuesta a nivel transcripcional y post-transcripcional del gen *crtYB* era similar a la respuesta de éste en la cepa silvestre. Para ello, se creció la cepa albina TI-CIH hasta fase estacionaria de crecimiento en un medio de cultivo YM sin glucosa. Luego, este cultivo se dividió en dos matraces iguales, siendo uno de ellos el cultivo control y el otro el cultivo de prueba al que se le agregó glucosa hasta una concentración final de 2 %. Se colectaron muestras a intervalos intermedios (2 – 24 h) de tiempo, a las que

se les extrajo RNA y mediante qRT-PCR se determinaron los niveles de expresión de las versiones madura y alternativa del gen *crfYB* (figura 19). Como estas cepas son mutantes para el gen *crfI*, la medición de éste no puede realizarse.

A intervalos intermedios de tiempo, observamos que los niveles de expresión del mmRNA del gen *crfYB* no varían con respecto al cultivo control e incluso aumentan sus niveles transcripcionales. Esta respuesta es diferente a lo que ocurre en la cepa silvestre, en la cual se observa una disminución en los niveles de expresión. En el caso del amRNA del gen *crfYB*, observamos una disminución en sus niveles de expresión, al igual que para la cepa silvestre. Sin embargo, la magnitud de esta respuesta es menor a la observada en la cepa silvestre.

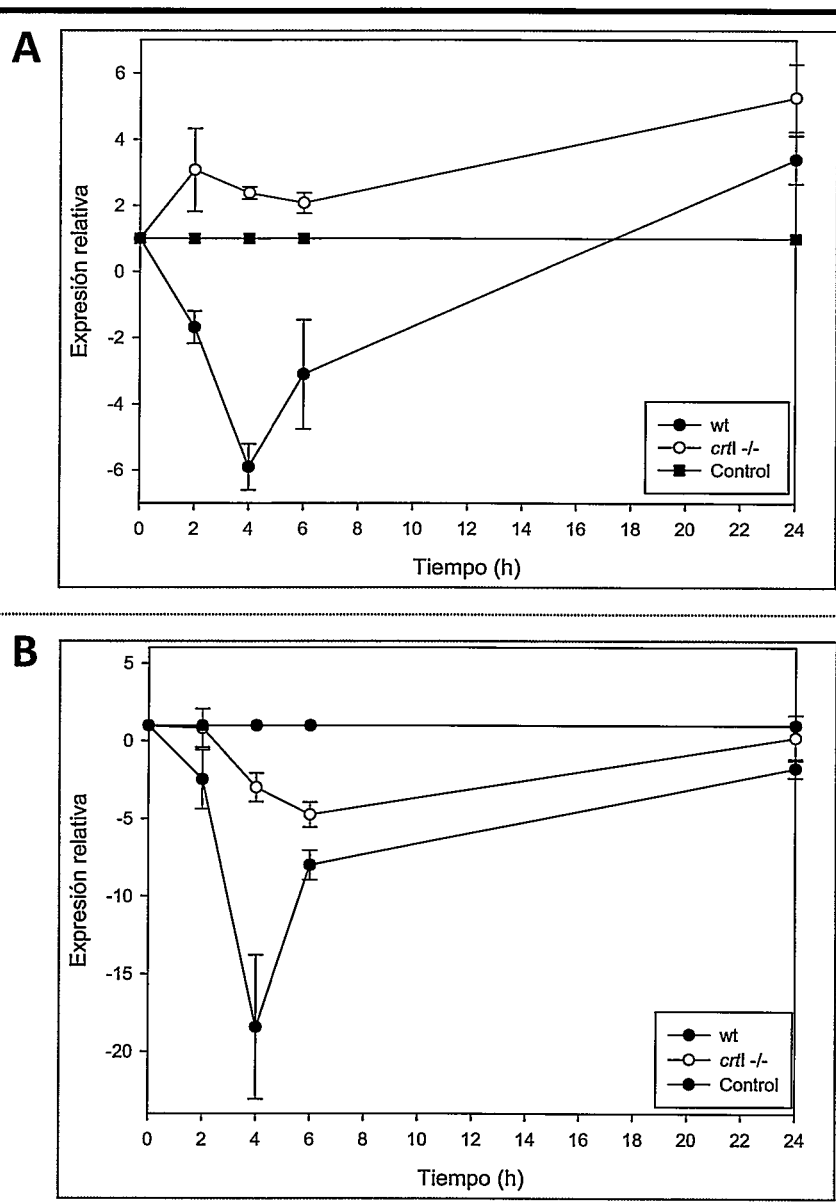


Figura 19. Regulación transcripcional y post-transcripcional del gen *crtYB* en cepas incapaces de sintetizar pigmentos.

Determinación de los niveles de expresión de la versión madura (A) y alternativa (B) del gen *crtYB* a intervalos intermedios de tiempo post adición de glucosa. Esta medición se realizó para la cepa silvestre (wt) y la cepa albina (*crtI*^{-/-}). Los valores calculados corresponden a la diferencia en los niveles de mRNA entre el cultivo control sin glucosa y el cultivo con glucosa. Los valores negativos indican una disminución en los niveles de mRNA

6. DISCUSIÓN

Los carotenoides han sido ampliamente estudiados por su participación en la fotosíntesis, donde actúan como pigmentos accesorios captadores de luz y energía en plantas y bacterias fotosintéticas. Por otra parte, dependiendo de la estructura y concentración de estos, pueden modular la fluidez de la membrana y la permeabilidad de los protones en todos los organismos. (Britton y col., 2004). En *X. dendrorhous*, se ha observado que la carotenogénesis es un proceso complejo cuya regulación y función no han sido dilucidadas completamente. El alto interés biotecnológico generado por dicha levadura, dada su capacidad de síntesis de astaxantina, sumado a que la carotenogénesis es considerada un ejemplo de la síntesis de metabolitos secundarios del tipo terpenoides, hacen relevante el estudio de este proceso y los factores que lo modifican (Klassen, 2010; Rodríguez-Ortiz y col., 2009). Así, estudios de los mecanismos de regulación de la síntesis de pigmentos en esta levadura, han descrito la sensibilidad de este proceso a factores físicos, químicos y biológicos (Liu y Wu, 2006; Lodato y col., 2007; Rodríguez-Saiz y col., 2010).

En este trabajo se estandarizó la técnica de PCR en tiempo real para determinar los niveles de expresión de los genes de *X. dendrorhous*. Utilizando esta técnica, se determinó la cinética de expresión de los genes *crfYB* y *crtI* que codifican para las enzimas fitoeno β -caroteno sintasa y fitoeno desaturasa respectivamente y la cinética de síntesis de sus mensajeros alternativos. Finalmente, se determinó la respuesta transcripcional de los genes *crfYB* y *crtI* frente a la adición de glucosa al medio de cultivo y cómo esta respuesta varía en cepas incapaces de sintetizar pigmentos.

6.1. Determinación de la expresión génica de *X. dendrorhous* mediante qRT-PCR.

La técnica de PCR en tiempo real ha revolucionado la manera en la cual se determina la presencia y cantidad de un determinado fragmento de DNA en una muestra (Gibson y col., 1996; Heid y col., 1996). Sin embargo, la estandarización de ésta y el análisis de los resultados tienen como supuestos algunos parámetros que han sido ampliamente discutidos pero que muchas veces no son considerados (Pfaffl, 2001; Pfaffl y col., 2002). Así, en el desarrollo de este trabajo se evaluaron los parámetros más relevantes para obtener los resultados repetitivos y que las conclusiones reflejen lo que sucede realmente en la levadura.

La comparación entre diferentes muestras establece el desafío de la homogeneidad en el procesamiento de éstas. Así, desde la recolección del cultivo hasta la medición de los niveles de expresión mediante PCR en tiempo real se probaron y evaluaron diferentes alternativas hasta lograr una metodología eficiente y repetitiva.

- a. Obtención del RNA. La obtención del RNA total y/o mRNA de *X. dendrorhous* presenta una dificultad adicional a la obtención de estos desde otras levaduras cuyos protocolos han sido ampliamente desarrollados. Principalmente, la complejidad de su pared celular hace necesaria la modificación de los protocolos estándares e imposibilita la utilización de kits de purificación. En nuestro laboratorio, inicialmente se utilizó el método de Chomzinsky (Chomczynski y Sacchi, 1987), para la determinación de la expresión génica mediante RT-PCR semi cuantitativo (Lodato y col., 2007). Paralelamente, en nuestro laboratorio se

evaluaron otras metodologías para la obtención de RNA de alta calidad para la construcción de una genoteca de cDNA, lo que finalmente derivó en el protocolo utilizado en este trabajo. Los resultados obtenidos utilizando esta metodología indican que el RNA obtenido presenta una alta calidad y una alta reproducibilidad entre las diferentes muestras.

- b. Síntesis del cDNA. La eficiencia en la transcripción reversa del mRNA influye significativamente en la calidad de las mediciones posteriores. Por este motivo, la síntesis del cDNA se realizó utilizando el partidador Oligo dT(18) a partir de RNA total, en desmedro de la utilización de partidores de secuencia aleatoria y/o a partir de mRNA purificado. Por otra parte, la eficiencia en la transcripción reversa depende de la enzima utilizada y de la secuencia de los mRNA, ya que estos pueden generar estructuras secundarias estables que impiden una eficiente transcripción. Este fenómeno cobra aún más relevancia en el caso de organismos en los cuales el porcentaje de guaninas y citocinas (%GC) en su genoma es alto y por lo tanto la estabilidad de las estructuras secundarias de sus mRNA interfiere fuertemente en la síntesis del cDNA. Aún cuando la complejidad genómica de *X. dendrorhous* hace que este microorganismo no se considere como rico en GC y que este porcentaje de los genes a medir fluctúa entre un 49,3% y 54,2% (Actina 54,2%, *mmcrfYB* 50,4%, *amcrfYB* 50,8%, *mmcrtI* 49,8% y *amcrtI* 49,3%), se evaluó la eficiencia de diferentes enzimas transcriptasa reversa (Albertini y col., 2006; Levesque-Sergerie y col., 2007). Los resultados de las mediciones realizadas no mostraron variaciones significativas entre las diferentes enzimas,

haciendo suponer que la posible estructuración de los mRNAs a medir no influían en la transcripción reversa.

- c. Diseño de los partidores y medición de los niveles de expresión. Los algoritmos utilizados para convertir los valores de amplificación (Ct) en unidades de medida con significado biológico (cantidad de DNA o mRNA en la muestra y/o veces en las cuales se expresa un gen con respecto a otro), supone que la metodología utilizada para medirlos (partidores y kits), son eficientes y robustos. Así, en este trabajo se puso principal énfasis en el diseño de los partidores utilizados para que la eficiencia y especificidad de estos estuviese en el rango óptimo de medición y comparación. Además, se evaluaron distintos protocolos de amplificación y distintos kit de medición.

Finalmente, los resultados y las conclusiones de estos experimentos se lograron a partir de la medición de tres réplicas biológicas, con dos réplicas técnicas cada una, obteniendo 6 resultados independientes para cada condición evaluada. De esta manera se espera acercarse lo más posible a lo que ocurre naturalmente.

6.2. Expresión de los genes de carotenogénesis y biosíntesis de carotenoides.

La expresión de los genes que codifican a las enzimas que participan en la ruta de biosíntesis de pigmentos en *X. dendrorhous*, ha sido determinada en nuestro laboratorio mediante la técnica de RT-PCR semi cuantitativo, observándose la cinética de síntesis de éstos (Lodato y col., 2004; Lodato y col., 2007). Sin embargo, el bajo nivel de expresión mostrado por estos genes, principalmente el gen *crfYB*, ha

dificultado su cuantificación fiable (Lodato y col., 2003). La incorporación de la técnica de PCR en tiempo real, cuya sensibilidad de medición es mayor que las técnicas convencionales de PCR (Bustin y col., 2005), permitió determinar certeramente estos valores y así poder contrastarlos con otros genes y otras condiciones de cultivo. De esta manera, observamos que el nivel de expresión del gen *crtYB* varía durante el ciclo de crecimiento de la levadura teniendo su máximo de expresión en la etapa exponencial tardía. Este máximo de expresión, se corresponde con la etapa de inducción de la carotenogénesis, sugiriendo que este aumento podría gatillar la síntesis de pigmentos en la levadura. Experimentos realizados por Visser y colaboradores, demostraron que un aumento de la dosis génica del gen *crtYB* en *X. dendrorhous* aumenta la cantidad de pigmentos producidos por la levadura (Visser y col., 2003). En otros organismos carotenogénicos se ha observado la dependencia directa que existe entre los niveles de expresión del gen que codifica para la enzima fitoeno sintasa y la síntesis de pigmentos (Fujisawa y Misawa, 2010). En plantas, se demostró que la síntesis y acumulación de pigmentos está determinada por la inducción del gen *PSY* que codificaría para esta enzima (Fraser y col., 2007; Toledo-Ortiz y col., 2010).

En el caso del gen *crtI*, sus niveles de expresión también varían durante el ciclo de crecimiento de la levadura, teniendo su máximo de expresión en la fase exponencial. Ya que la carotenogénesis de *X. dendrorhous* se gatilla en etapas posteriores, este resultado sugiere que la enzima fitoeno desaturasa codificada por este gen podría ser requerida en etapas previas a la inducción de la síntesis de pigmentos. En otros organismos carotenogénicos se ha observado que las enzimas

que sintetizan los pigmentos accesorios para la fotosíntesis se agrupan en complejos multienzimáticos asociados a membranas (Cunningham y Gantt, 1998; De la Guardia y col., 1971). Así, los dominios hidrofóbicos presentes en esta enzima y la naturaleza hidrofóbica del fitoeno y licopeno (sustrato y producto respectivamente) sugiere que esta proteína sería una de las que se encontraría asociada a la membrana (Lopez y col., 2008). Por este motivo, la expresión y síntesis de esta proteína previo a la inducción de la carotenogénesis sería necesaria para el correcto ensamblaje del complejo multienzimático. En experimentos realizados por Verdoes y colaboradores, en los que se aumentó la dosis génica del gen *ctrl* en *X. dendrorhous*, se observó una variación en la composición de los pigmentos producidos pero no un aumento significativo de estos. Esta modificación en la composición de los pigmentos se debería posiblemente un aumento en la cantidad de proteína fitoeno desaturasa que afectaría el ensamblaje del complejo carotenogénico en la levadura (Verdoes y col., 2003).

Por otra parte, la cinética de síntesis de los pigmentos en *X. dendrorhous* muestra que en las etapas tempranas de crecimiento, la cantidad de pigmentos presentes en la célula disminuyen en más de un 80%. Cuando el cultivo comienza a ingresar a su fase estacionaria, se induce la síntesis de los pigmentos siguiendo una cinética esperable para los metabolitos secundarios (Fox y Howlett, 2008; Zhong y Xiao, 2009). Sin embargo, la carencia de algunos de los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo que sí presentan otros organismos, sugiere que en *X. dendrorhous* estos pigmentos serían importantes para la protección contra las especies reactivas de oxígeno producidas durante el crecimiento de la levadura

(Galano y col., 2010; Schroeder y Johnson, 1993). En este sentido, se puede observar que aunque los niveles de expresión de los genes *crfYB* y *crfI* varían durante el ciclo de crecimiento, hay un nivel de expresión basal entre un 20 a 40% de su nivel máximo de expresión, que podría determinar una cantidad basal de pigmento en la célula para cumplir su rol biológico.

6.3. Regulación de la expresión génica modulada por glucosa.

La síntesis de pigmentos en *X. dendrorhous* es un proceso que se ve afectado por diferentes factores, destacándose la fuente de carbono utilizada para su crecimiento (Wozniak, 2008). El análisis bioinformático de la región promotora de los genes que codifican a las enzimas que participan en la ruta de biosíntesis de astaxantina, muestran la presencia de posibles sitios de unión del regulador MIG1 (Alvarez y col., 2006; Wozniak y col., (enviado)), el cual es un factor transcripcional que media procesos de represión por glucosa en diversas levaduras (Carmona y col., 2002; Klein y col., 1998; Kuchin y Carlson, 2003; Zaragoza y col., 2000). 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 los genes *crfYB* y *crfI* implicados en la síntesis de β -caroteno a partir de GGPP. En ambos, el efecto de la glucosa resultó ser máximo entre 2 y 4 horas después del tratamiento, restableciéndose los niveles normales luego de 24 horas.

Interesantemente, el efecto represor que tiene la glucosa sobre los genes *crfYB* y *crfI* 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 la expresión diferencial de estos sugiere la participación de mecanismos post-transcripcionales de regulación (Lui y col., 2010). Así, la disminución diferencial de los mRNA podría deberse a la modificación de los factores que controlan el procesamiento alternativo de estos genes (Kim y col., 2002; Yin y col., 2003). 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, variación posiblemente dependiente de la fuente de carbono utilizada, la edad del cultivo y del contenido de carotenoides. Alternativamente, en *S. cerevisiae* se ha observado que la regulación post-transcripcional de genes reprimidos por glucosa está determinada por un aumento en la degradación de los mRNA, modificando la vida media de éstos (Hilgers y col., 2006).

Un fenómeno importante que observamos es que la represión mediada por glucosa del gen *crfYB* se ve seriamente comprometida en cepas mutantes incapaces de sintetizar pigmentos. 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.

6.4. Procesamiento del primer intrón del gen *crtl*.

Aún cuando no se ha encontrado la función de los mRNAs alternativos de los genes *crfYB* y *crtl*, o si estos participan regulando la síntesis de pigmentos de *X. dendrorhous*, observamos que la generación de los mismos varía durante el crecimiento de la levadura. Por otra parte, observamos un mecanismo diferencial de

respuesta frente a la glucosa de parte de los mensajeros alternativos con respecto a sus versiones maduras. Ambos fenómenos se ven acentuados para el caso del gen *crtl* y por este motivo, se profundizó más en sus mecanismos de regulación. Así, los resultados obtenidos sugieren que la síntesis del mensajero alternativo es independiente del nivel de expresión, ya que en cepas que portan una mutación en el sitio aceptor de "splicing" maduro, se acumulan pre-mRNAs que mantienen su primer intrón sin procesar, manteniéndose la cantidad de amRNA en comparación con la cepa silvestre. Por otra parte, observamos que en las cepas que sólo producen la versión madura de este gen, la pigmentación es idéntica a la cepa silvestre y por lo tanto, la generación de las versiones alternativas de los mRNAs no participarían en la regulación de la carotenogénesis.

La inserción del primer intrón del gen *crtl* en un gen reportero, permitió demostrar que éste porta toda la información requerida para que se procese de manera normal o alternativa. Sin embargo, las señales que regulan su cinética de procesamiento no se encontrarían presentes dentro del intrón, ya que durante toda la fase de crecimiento de la levadura la relación mmRNA / amRNA se mantiene constante.

6.5. Regulación de la carotenogénesis en *X. dendrorhous*.

La complejidad de los carotenoides sintetizados por *X. dendrorhous*, principalmente bicíclicos y oxidados, y el bajo número de genes que codifican a las enzimas que participan en su biosíntesis, hacen de esta levadura un buen modelo de estudio de la regulación y síntesis de estos compuestos. En este sentido, se ha

observado que la regulación de la carotenogénesis podría estar dada a varios niveles. Genéticamente, se demostró la participación de 4 genes que codificarían a las enzimas que catalizan las 11 reacciones enzimáticas para la síntesis de astaxantina a partir de GGPP. Además, se demostró que la cantidad y composición de los pigmentos producidos es dependiente del número de copia de estos genes en el genoma de la levadura.

Transcripcionalmente, se demostró que la expresión de los genes de carotenogénesis varía durante el crecimiento de la levadura y responde además, a la adición de glucosa al medio de cultivo. Sin embargo, no se ha encontrado una relación directa entre los niveles de los mRNA mensajeros y la síntesis de pigmentos. La aparición de mRNAs alternativos para los genes *crtYB* y *crtI* sugirió la participación de un nuevo nivel de regulación, en el cual el procesamiento del mRNA hacia las versiones maduras o alternativas de estos genes sería el factor clave de regulación. Sin embargo, la cinética de aparición de dichas versiones no explica directamente la modificación de la síntesis de los pigmentos. Estudios más acabados en este tema deberían considerar la sobreexpresión de las versiones alternativas de ambos genes en la cepa silvestre de la levadura y evaluar en ellas si la síntesis y composición de los pigmentos se ven modificadas.

Finalmente, la integración de la proteómica de esta levadura a los estudios de genómica, transcriptómica y metabolómica que se están desarrollando en nuestro laboratorio, permitirá complementar todos estos procesos, facilitando el entendimiento conjunto de la carotenogénesis.

7. CONCLUSIONES.

- Los genes *crtYB* y *crtI* se expresan durante todo el ciclo de crecimiento de la levadura, siendo sus niveles de expresión variables durante éste. El nivel máximo de expresión del gen *crtYB* se corresponde con la inducción de la carotenogénesis, por lo que la síntesis de fitoeno podría ser un paso clave en la biosíntesis de pigmentos en *X. dendrorhous*.
- La relación mmRNA / amRNA de los genes *crtYB* y *crtI* varía durante el ciclo de crecimiento, siendo más pronunciada para este último. La repetitibilidad de este fenómeno sugiere la participación de mecanismos moduladores del procesamiento de ambos mRNAs.
- Los genes *crtYB* y *crtI* son regulados transcripcionalmente por glucosa, reprimiendo su expresión. Además, la glucosa regularía post-transcripcionalmente la generación de las versiones maduras y alternativas de dichos genes.
- El mRNA alternativo del gen *crtI* no se traduce a una proteína activa, o esta no está involucrada en la ruta de biosíntesis de pigmentos. Además, las cepas de *X. dendrorhous* que sólo producen el mmRNA de gen *crtI* no ven afectada la síntesis de pigmentos.
- Los niveles de mRNA del gen *crtYB* y la generación de su mensajero maduro y alternativo depende de la presencia de pigmentos en la célula. De esta manera, los pigmentos tendrían un efecto de feedback negativo sobre el gen que modularía la síntesis de pigmentos en *X. dendrorhous*.

8. BIBLIOGRAFÍA.

- Adrio, J. L., Lopez, M., Casqueiro, J., Fernandez, C., y Veiga, M. 1995. Electrophoretic karyotype of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *Curr. Genet.* 27:447-450.
- Albertini, V., Jain, A., Vignati, S., Napoli, S., Rinaldi, A., Kwee, I., Nur-e-Alam, M., Bergant, J., Bertoni, F., Carbone, G. M., Rohr, J., y Catapano, C. V. 2006. Novel GC-rich DNA-binding compound produced by a genetically engineered mutant of the mithramycin producer *Streptomyces argillaceus* exhibits improved transcriptional repressor activity: implications for cancer therapy. *Nucleic Acids Res.* 34:1721-1734.
- Alcaíno, J. 2002. Organización estructural del gen de la fitoeno sintasa en el genoma de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex. *Phaffia rhodozyma*). Seminario de título para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- Alcaíno, J. 2008. Estudio de la participación de una citocromo P450 reductasa (CPR) en la biosíntesis de astaxantina en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias Mención en Microbiología. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- Alcaíno, 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.
- 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.* 43:261-272.
- 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.* 43:261-272.
- An, G. H., Schuman, D. B., y Johnson, E. A. 1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* Mutants with Increased Astaxanthin Content. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:116-124.
- An, G. H., Cho, M. H., y Johnson, E. A. 1999. Monocyclic carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*). *J. Biosci. Bioeng.* 88:189-193.

- Andrewes, A. G., Phaff, H. J., y Starr, M. P. 1976. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast. *Phytochemistry*. 15:1003-1007.
- Armstrong, G. A. 1994. Eubacteria show their true colors: genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *J. Bacteriol.* 176:4795-4802.
- Arrach, N., Fernandez-Martin, R., Cerda-Olmedo, E., y Avalos, J. 2001. A single gene for lycopene cyclase, phytoene synthase, and regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:1687-1692.
- Boyle, J. S., y Lew, A. M. 1995. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends Genet.* 11:8.
- Britton, G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* 9:1551-1558.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., y Pfander, H. 2004. *Carotenoids Handbook*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., y Pfaffl, M. W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *J Mol Endocrinol.* 34:597-601.
- Calo, P., y Gonzalez, T. 1995. The yeast *Phaffia rhodozyma* as an industrial source of astaxanthin. *Microbiologia.* 11:386-388.
- Canfield, L. M., Forage, J. W., y Valenzuela, J. G. 1992. Carotenoids as cellular antioxidants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 200:260-265.
- Carmona, M. 2007. Caracterización estructural del gen *AST* de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex. *Phaffia rhodozyma*) Tesis para optar al Grado de Magíster en Ciencias Biológicas Mención en Genética. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- 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.* 19:459-465.
- Cunningham, F. X., y Gantt, E. 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:557-583.
- Chang, M. C. Y., y Keasling, J. D. 2006. Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes. *Nat Chem Biol.* 2:674-681.
- Choi, S. K., Kim, J. H., Park, Y. S., Kim, Y. J., y Chang, H. I. 2007. An efficient method for the extraction of astaxanthin from the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17:847-852.

- Chomczynski, P., y Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- De la Guardia, M. D., Aragon, C. M., Murillo, F. J., y Cerda-Olmedo, E. 1971. A carotenogenic enzyme aggregate in *Phycomyces*: evidence from quantitative complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 68:2012-2015.
- Dominguez-Bocanegra, A. R., Ponce-Noyola, T., y Torres-Munoz, J. A. 2007. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75:783-791.
- Dowzer, C. E., y Kelly, J. M. 1991. Analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol.* 11:5701-5709.
- Fox, E. M., y Howlett, B. J. 2008. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Curr Opin Microbiol.* 11:481-487.
- Fraser, P. D., Enfissi, E. M., Halket, J. M., Truesdale, M. R., Yu, D., Gerrish, C., y Bramley, P. M. 2007. Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: effects on isoprenoids, plastids, and intermediary metabolism. *Plant Cell.* 19:3194-3211.
- Fujisawa, M., y Misawa, N. 2010. Enrichment of carotenoids in flaxseed by introducing a bacterial phytoene synthase gene. *Methods Mol Biol.* 643:201-211.
- Galano, A., Vargas, R., y Martinez, A. 2010. Carotenoids can act as antioxidants by oxidizing the superoxide radical anion. *Phys Chem Chem Phys.* 12:193-200.
- Gancedo, J. M. 1998. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62:334-361.
- Gautam, P., Shankar, J., Madan, T., Sirdeshmukh, R., Sundaram, C. S., Gade, W. N., Basir, S. F., y Sarma, P. U. 2008. Proteomic and transcriptomic analysis of *Aspergillus fumigatus* on exposure to amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:4220-4227.
- Gershenzon, J., y Dudareva, N. 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nat Chem Biol.* 3:408-414.
- Gibson, U. E., Heid, C. A., y Williams, P. M. 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 6:995-1001.
- Giuliano, G., Bartley, G. E., y Scolnik, P. A. 1993. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *Plant Cell.* 5:379-387.
- Golubev, W. I. 1995. Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Yeast.* 11:101-110.

- Grunewald, K., Eckert, M., Hirschberg, J., y Hagen, C. 2000. Phytoene desaturase is localized exclusively in the chloroplast and up-regulated at the mRNA level during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, chlorophyceae). *Plant Physiol.* 122:1261-1268.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., y Williams, P. M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6:986-994.
- Hermosilla, G., Martinez, C., Retamales, P., Leon, R., y Cifuentes, V. 2003. Genetic determination of ploidy level in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Antonie Leeuwenhoek.* 84:279-287.
- Hilgers, V., Teixeira, D., y Parker, R. 2006. Translation-independent inhibition of mRNA deadenylation during stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA.* 12:1835-1845.
- Johnson, E. A., Villa, T. G., Lewis, M. J., y Phaff, H. J. 1978. Simple method for the isolation of astaxanthin from the basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma*. *Appl. Environ. Microbiol.* 35:1155-1159.
- Johnson, E. A., y Lewis, M. J. 1979. Astaxanthin Formation by the Yeast *Phaffia rhodozyma*. *J Gen Microbiol.* 115:173-183.
- Johnson, E. A. 2003. *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. *Int. Microbiol.* 6:169-174.
- Karnaukhov, V. N. 1990. Carotenoids: recent progress, problems and prospects. *Comp Biochem Physiol B.* 95:1-20.
- Kim, M. J., Kim, M., y Park, S. D. 2002. Post-transcriptional regulation of *ura4+* gene expression by glucose in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cells.* 14:437-443.
- Klassen, J. L. 2010. Phylogenetic and evolutionary patterns in microbial carotenoid biosynthesis are revealed by comparative genomics. *PLoS One.* 5:e11257.
- 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.
- León, R. 2000. Aislamiento y caracterización del gen de la fitoeno deshidrogenasa de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex *Phaffia rhodozyma*). Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias Mención en Biología. Universidad de Chile. Santiago, Chile.

- Levesque-Sergerie, J. P., Duquette, M., Thibault, C., Delbecchi, L., y Bissonnette, N. 2007. Detection limits of several commercial reverse transcriptase enzymes: impact on the low- and high-abundance transcript levels assessed by quantitative RT-PCR. *BMC Mol Biol.* 8:93.
- Lewis, M. J., Ragot, N., Berlant, M. C., y Miranda, M. 1990. Selection of Astaxanthin-Overproducing Mutants of *Phaffia rhodozyma* with β -ionone. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2944-2945.
- Liaaen-Jensen, S., y Andrewes, A. G. 1972. Microbial carotenoids. *Annu Rev Microbiol.* 26:225-248.
- Liu, Y. S., y Wu, J. Y. 2006. Hydrogen peroxide-induced astaxanthin biosynthesis and catalase activity in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 73:663-668.
- Lodato, P. 2002. Estudio de la expresión de genes de la carotenogénesis en *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex. *Phaffia rhodozyma*). Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias Mención en Biología. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- 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.* 69:4676-4682.
- 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.* 37:83-93.
- 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.* 40:73-84.
- 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.* 40:73-84.
- Lopez, A. B., Yang, Y., Thannhauser, T. W., y Li, L. 2008. Phytoene desaturase is present in a large protein complex in the plastid membrane. *Physiol Plant.* 133:190-198.
- Lorenz, R. T., y Cysewski, G. R. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.* 18:160-167.

- Lui, J., Campbell, S. G., y Ashe, M. P. 2010. Inhibition of translation initiation following glucose depletion in yeast facilitates a rationalization of mRNA content. *Biochem Soc Trans.* 38:1131-1136.
- McCarthy, S. S., Kobayashi, M. C., y Niyogi, K. K. 2004. White Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* Are Defective in Phytoene Synthase. *Genetics.* 168:1249-1257.
- Nakano, T., Kanmuri, T., Sato, M., y Takeuchi, M. 1999. Effect of astaxanthin rich red yeast (*Phaffia rhodozyma*) on oxidative stress in rainbow trout. *Biochim. Biophys. Acta.* 1426:119-125.
- 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.* 10:3373-3377.
- Nellis, H. J., y De Leenheer, A. P. 1989. Profiling and quantitation of bacterial carotenoids by liquid chromatography and photodiode array detection. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:3065-3071.
- Niklitschek, M. 2007. Desarrollo de un casete de resistencia a antibiótico en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Seminario de título para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- Niklitschek, M., Alcaino, J., Barahona, S., Sepulveda, D., Lozano, C., Carmona, M., Marcoleta, A., Martínez, C., Lodato, P., Baeza, M., y Cifuentes, V. 2008. Genomic organization of the structural genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biol. Res.* 41:93-108.
- Ogura, K. 1969. Biosynthesis of isoprenoids—enzyme reaction in carbon chain prolongation due to C5 unit condensation. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* 14:219-229.
- 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.* 275:148-158.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:e45.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., y Dempfle, L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30:e36.

- Retamales, P., Leon, R., Martinez, C., Hermosilla, G., Pincheira, G., y Cifuentes, V. 1998. Complementation analysis with new genetic markers in *Phaffia rhodozyma*. *Antonie Leeuwenhoek*. 73:229-236.
- Roberts, S. C. 2007. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nat Chem Biol*. 3:387-395.
- 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*. 75:405-413.
- Rodriguez-Saiz, M., de la Fuente, J. L., y Barredo, J. L. 2010. *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. *Appl Microbiol Biotechnol*. 88:645-658.
- Sambrook, J., y Russell, D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Schmidt-Dannert, C. 2000. Engineering novel carotenoids in microorganisms. *Curr Opin Biotechnol*. 11:255-261.
- Schroeder, W. A., y Johnson, E. A. 1993. Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol*. 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*. 270:18374-18379.
- Takimoto, T., Takahashi, K., y Akiba, Y. 2007. Effect of dietary supplementation of astaxanthin by *Phaffia rhodozyma* on lipid peroxidation, drug metabolism and some immunological variables in male broiler chicks fed on diets with or without oxidised fat. *Br. Poult. Sci*. 48:90-97.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., y Rodriguez-Concepcion, M. 2010. Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107:11626-11631.
- Verdoes, J. C., Krubasik, K. P., Sandmann, G., y van Ooyen, A. J. 1999a. Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Mol. Gen. Genet*. 262:453-461.
- Verdoes, J. C., Misawa, N., y van Ooyen, A. J. 1999b. Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnol. Bioeng*. 63:750-755.
- 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. 69:3728-3738.
- Visser, H., van Ooyen, A. J., y Verdoes, J. C. 2003. Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. FEMS Yeast Res. 4:221-231.
- Vittorioso, P., Carattoli, A., Londei, P., y Macino, G. 1994. Internal translational initiation in the mRNA from the *Neurospora crassa* albino-3 gene. J Biol Chem. 269:26650-26654.
- Wozniak, A. 2008. Influencia del metabolismo aerobio en la expresión de los genes de carotenogénesis y la biosíntesis de pigmentos en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias Mención en Microbiología. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- Wozniak, A., Lozano, C., Barahona, S., Niklitschek, M., Marcoleta, A., Alcaíno, J., Sepulveda, D., Baeza, M., y Cifuentes, V. (enviado). Differential carotenoid production and gene expression in *Xanthophyllomyces dendrorhous* grown in a non-fermentable carbon source. FEMS Yeast Research.
- Yin, Z., Wilson, S., Hauser, N. C., Tournu, H., Hoheisel, J. D., y Brown, A. J. 2003. Glucose triggers different global responses in yeast, depending on the strength of the signal, and transiently stabilizes ribosomal protein mRNAs. Mol Microbiol. 48:713-724.
- Zaragoza, O., Rodriguez, C., y Gancedo, C. 2000. Isolation of the MIG1 gene from *Candida albicans* and effects of its disruption on catabolite repression. J Bacteriol. 182:320-326.
- Zhong, J. J., y Xiao, J. H. 2009. Secondary metabolites from higher fungi: discovery, bioactivity, and bioproduction. Adv Biochem Eng Biotechnol. 113:79-150.