

UCH-FC
Biotecnología
C796
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO

**“CARACTERIZACIÓN GENÉTICO-FUNCIONAL DEL GEN DE UN
REPRESOR GENERAL DE LA TRANSCRIPCIÓN EN LA
LEVADURA CAROTENOGÉNICA *XANTHOPHYLLOMYCES
DENDRORHOUS*.”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

PAMELA CECILIA CÓRDOVA VARGAS

Director de Seminario de Título: Dr. Víctor Cifuentes.
Co-directora de Seminario de Título: Dra. Jennifer Alcaíno.

Noviembre 2012
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta. Pamela Cecilia Córdova Vargas.

“CARACTERIZACIÓN GENÉTICO-FUNCIONAL DEL GEN DE UN REPRESOR GENERAL DE LA TRANSCRIPCIÓN EN LA LEVADURA CAROTENOGÉNICA *XANTHOPHYLLOMYCES DENDRORHOUS*.”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dr. Víctor Cifuentes
Director Seminario de Título

Dra. Jennifer Alcaíno
Co-Directora

Comisión de Evaluación

Dr. Nicolás Guiliari
Presidente Comisión

Dra. Margarita Carú
Evaluador

Santiago de Chile, _____

Handwritten signature in blue ink, corresponding to the name Víctor Cifuentes.

Handwritten signature in blue ink, corresponding to the name Jennifer Alcaíno.

Handwritten signature in blue ink, corresponding to the name Nicolás Guiliari.

Handwritten signature in blue ink, corresponding to the name Margarita Carú.



BIOGRAFÍA

Llegué al mundo de forma apresurada luego de sólo ocho meses de gestación la mañana del 31 de marzo de 1988 en la ciudad de Santiago. En ese entonces, mi familia estaba formada por mis padres Mariana Vargas y Manuel Córdova y por mi hermana de 2 años Mariana, luego de cinco años la familia se completo con la llegada de mi hermano Felipe en 1993.



En el año 1994, cuando tenía casi seis años, comencé mi educación básica en el colegio "*The Angel's School*" donde doce años después terminé la educación media en noviembre de 2005. Gracias al esfuerzo y a las buenas decisiones tomadas, logré superar exitosamente la "Prueba de Selección Universitaria" a finales de ese mismo año. Postulé a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular de la Universidad de Chile, en la cual fui aceptada, por lo que en marzo de 2006 comencé la educación superior en dicha institución. A medida que transcurrió el tiempo, fui aprobando los distintos cursos y pude analizar las distintas posibilidades y campos en los cuales podía desarrollarme como científica, decidiéndome finalmente por el área de la microbiología. Así, el año 2009 llegué al Laboratorio de Genética de la Universidad de Chile donde bajo la tutela del Dr. Víctor Cifuentes di mis primeros pasos como investigadora y posteriormente desarrolle mi trabajo de tesis de pregrado. Actualmente, me desempeño como estudiante del programa de "Doctorado en Ciencias con mención en Microbiología" que imparte la Universidad de Chile y espero que sea una gran experiencia y pueda completar esta nueva etapa exitosamente.

DEDICATORIA



A mi mamá Mariana Vargas, mi papá Manuel Córdova,
mi hermana Mariana y mi hermano Felipe,
A mis abuelas Alicia y Nibia.
A Gaby

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que me acompañaron y apoyaron durante la realización de mi seminario de título:

Agradezco principalmente al Dr. Victor Cifuentes, director de este seminario de título, por recibirme en su laboratorio y brindarme su apoyo y una enorme confianza en mis capacidades, además de compartir generosamente su conocimiento y experiencia.

A la Dra. Jennifer Alcaño, co-directora de este seminario de título, por sus consejos, su constante ayuda y apoyo.

Al Dr. Marcelo Baeza por compartir su conocimiento y por sus críticas constructivas.

A Salvador Barahona, por su ayuda incondicional, su gran paciencia, por compartir sus conocimientos y por su buena onda dentro y fuera del laboratorio.

A todos mis compañeros de laboratorio con los que compartí durante la realización de mi tesis, que supieron entregar sus conocimientos de manera oportuna y apropiada.

También quisiera agradecer a todas las personas que fuera del laboratorio me acompañaron durante este período de mi vida:

A mi mamá, mi papá, mi abuela y mis hermanos por su amor, apoyo incondicional y su paciencia.

A mi tía Kena, por su cariño y por los buenos momentos deportivos.

A toda mi familia

A Sole por su cariño y su paciencia.

A TODOS mis amigos por su cariño y buena onda..especialmente a Gaby, Karina, Nicole, Amparo, Natty, Manuel, Pablo, Esteban, Nacho y Diego.

A mi pololo, por su apoyo, amor y paciencia.

Al gran equipo de fútbol femenino JGM y su entrenador, por ser siempre un motivo de alegría y buenos momentos.

A los que no pudieron acompañarme hasta el final, pero dejaron grandes enseñanzas de vida...

GRACIAS!!

Financiado por FONDECYT 1100324

INDICE DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS	vii
INDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> : antecedentes generales.....	1
1.2 Astaxantina	2
1.3 Biosíntesis de carotenoides en <i>X. dendrorhous</i>	5
1.4 Regulación de la carotenogénesis en <i>X. dendrorhous</i>	7
1.5 Represión catabólica en levaduras.....	9
1.6 El complejo corepresor Tup1:Cyc8.....	12
1.7 Hipótesis y objetivos.....	15
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
2.1 Cepas, mantención y condiciones de cultivo.	17
2.2 Plásmidos, ácidos nucleicos y enzimas.....	19
2.3 Determinación del crecimiento celular y biomasa.	19
2.4 Extracción de ácidos nucleicos.....	23
2.4.1 Extracción de DNA genómico de <i>X. dendrorhous</i>	23
2.4.2 Extracción de RNA total de <i>X. dendrorhous</i> y síntesis de cDNA.....	23
2.4.3 Extracción de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>	25
2.5 Digestión de DNA plasmidial con enzimas de restricción.	25
2.6 Electroforesis en geles de agarosa.....	25
2.7 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.	26
2.8 Reacción de ligamiento de fragmentos de DNA a vectores.	26
2.9 Transformación mediante electroporación.....	26
2.9.1 Transformación de <i>E. coli</i>	26
2.9.2 Transformación de <i>X. dendrorhous</i>	27
2.10 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	28
2.11 Secuenciación y análisis bioinformático.....	29

2.12 Extracción de carotenoides totales de <i>X. dendrorhous</i> y análisis mediante RP-HPLC.	29
3 RESULTADOS	32
3.1 Identificación, clonación y secuenciación del gen <i>CYC8</i> de <i>X. dendrorhous</i>	32
3.2 Estructura génica del gen <i>CYC8</i> de <i>X. dendrorhous</i>	34
3.3 Generación de vectores para transformación.	39
3.4 Obtención de mutantes <i>cyc8</i> mediante mutagénesis por reemplazo.	41
3.5 Caracterización de mutantes de la cepa UCD 67-385.	44
3.5.1 Curvas de crecimiento.	44
3.5.2 Producción de carotenoides.	46
3.6 Caracterización del mutante de la cepa AVHÑ 2.4.8.	53
3.6.1 Curvas de crecimiento.	53
3.6.2 Producción de carotenoides.	55
4 DISCUSIÓN.....	59
4.1 Identificación, clonación y secuenciación de la región genómica del gen <i>CYC8</i> de <i>X. dendrorhous</i>	59
4.2 Estructura génica del gen <i>CYC8</i> de <i>X. dendrorhous</i>	60
4.3 Funcionalidad del gen <i>CYC8</i> de <i>X. dendrorhous</i>	63
5 PROYECCIONES.....	69
6 CONCLUSIONES.....	70
8 BIBLIOGRAFÍA.....	71

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas y de levadura utilizadas y construidas en este trabajo.....	18
Tabla 2. Plásmidos utilizados y generados en este trabajo.....	20
Tabla 3. Partidores diseñados y utilizados en este trabajo.	21

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de la ruta de biosíntesis de carotenoides en <i>X. dendrorhous</i>	6
Figura 2. Mecanismo de represión catabólica en levaduras	11
Figura 3. Modelos propuestos para el mecanismo de acción del complejo Cyc8-Tup1.	14
Figura 4. Plásmido pBS_GTR.	33
Figura 5. Caracterización estructural del gen <i>CYC8</i> de <i>X. dendrorhous</i>	36
Figura 6. Vector pGTR_Hyg.	40
Figura 7. Vector pGTR_Zeo.	40
Figura 8. Análisis de PCR de los mutantes 385.T2 y 385.T2ZeoR3.	43
Figura 9. Análisis de PCR de la cepa mutante AV.T8.	45
Figura 10. Crecimiento de las cepas UCD 67-385, 385.T2 y 385.T2ZeoR3.	47
Figura 11. Crecimiento de las cepas UCD 67-385 (385) y 385.T2ZeoR3 en medio mínimo suplementado con glucosa.	48
Figura 12. Producción de carotenoides de las cepas UCD 67-385 (385), 385.T2 y 385.T2ZeoR3.	50
Figura 13. Análisis de la composición de carotenoides.	51
Figura 14. Carotenoides de las cepas UCD 67-385 y 385.T2ZeoR3 crecidas en MMGlu2%.	54
Figura 15. Crecimiento de las cepas AVHN2.4.8 y AV.T8.	56
Figura 16. Segregación fenotípica del mutante AV.T8.	57
Figura 17. Dominios conservados de la potencial proteína codificada por el gen <i>CYC8</i> de <i>X. dendrorhous</i>	61

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
dNTP	Desoxirribonucleotido trifosfato
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
Hyg	Higromicina B
IGS	Espaciador intergénico
ITS	Espaciadores transcritos internos
kpb	Kilo pares de bases
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
min	Minutos
NTG	N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina
ORF	Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
rDNA	DNA ribosomal
RP-HPLC	Cromatografía líquida en fase reversa
STM	Sacarosa- Tris-MgCl
TAE	Tris-acetato-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
TPR	Repetido tetratricopéptido
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U	Unidades enzimáticas
ug	microgramos
UV	ultravioleta
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
YM	Medio de cultivo de levadura-malta
Zeo	Zeocina

RESUMEN

Xanthophyllomyces dendrorhous es una levadura carotenogénica basidiomicete estudiada principalmente por su capacidad de producir astaxantina como pigmento principal. Este compuesto es de gran interés comercial debido a su uso como suplemento alimenticio en acuicultura para la pigmentación apropiada de peces salmónidos y por sus propiedades antioxidantes en la industria farmacéutica. Actualmente, se conoce completa la ruta de biosíntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*, además del perfil de expresión de los genes carotenogénicos. También se ha descrito que la producción de carotenoides tiene relación con el tipo de fuente de carbono (fermentable o no fermentable) disponible en el medio de cultivo. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos de regulación del proceso de carotenogénesis en esta levadura. En nuestro laboratorio, mediante métodos bioinformáticos se determinó la existencia de genes de probables reguladores, entre ellos el gen *MIG1* que está involucrado en represión catabólica y el gen de un represor general de la transcripción (*CYC8*, inicialmente denominado *GTR*). Adicionalmente, se ha descrito que algunos genes carotenogénicos contienen en sus regiones promotoras secuencias reconocidas por Mig1. Se sabe que en otras levaduras el mecanismo de regulación catabólica en el cual participa Mig1 junto al complejo co-represor Tup1-Cyc8, es uno de los circuitos regulatorios más importantes y se encuentra ampliamente conservado en eucariontes. Debido a lo anterior, resulta interesante estudiar el posible rol de este mecanismo en *X. dendrorhous*.

El objetivo general de este trabajo fue caracterizar genética y funcionalmente el gen *CYC8* de *X. dendrorhous*. Para esto, se secuenció una región genómica de 6,5 kpb que contiene el gen *CYC8* completo. Además, mediante secuenciación del cDNA se determinó la estructura génica y se identificó un marco de lectura abierto de 4.410 b. El

análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica de la proteína deducida desde la región codificante arrojó una alta identidad (~70%) con el co-represor general de la transcripción *Cyc8*, presente en otros organismos.

Paralelamente, se obtuvieron mutantes del gen *CYC8* a partir de la cepa silvestre UCD 67-385 y de la cepa sobreproductora de astaxantina AVHN2.4.8. mediante la técnica de mutagénesis por reemplazo. Se evaluó el fenotipo de mutantes heterocigotos (*CYC8/cyc8*) y homocigotos (*cyc8/cyc8*), orientado a la producción de carotenoides y el crecimiento. Los mutantes 385.T2 (*CYC8/cyc8*) y 385.T2ZeoR3 (*cyc8/cyc8*) (derivadas de UCD 67-385) no presentaron diferencias significativas de crecimiento respecto de la cepa silvestre al ser cultivadas en medio YM o MMGlu2%.

Por otra parte, en la cepa 385.T2ZeoR3 la producción de carotenoides comenzó al inicio del crecimiento, mientras que en la cepa silvestre inició al final de la etapa exponencial, lo que se reflejó en un mayor contenido de carotenoides totales en la cepa mutante, luego de 5 días de incubación. Sin embargo, al cultivar las cepas en MMGlu2% no se observó una diferencia en el contenido final de carotenoides, pero sí en la producción de éstos en etapas tempranas de crecimiento. En cuanto a la composición de carotenoides, hubo pequeñas diferencias entre las tres cepas analizadas (UCD 67-385, 385.T2 y 385.T2ZeoR3). Las diferencias más pronunciadas se observaron en la proporción de carotenoides monocíclicos (como hidroxí-cetotoruleno) y en el contenido de β -caroteno y astaxantina en etapas tardías de crecimiento.

El mutante AV.T8 (*cyc8*, derivado de AVHN2.4.8), mostró un retraso significativo en el crecimiento respecto de su parental. Además, se observó una segregación fenotípica respecto de la producción de pigmentos, dando origen a colonias amarillas y rojo-

anaranjadas, lo cual no permitió analizar de manera reproducible la producción de carotenoides en esta cepa.

Finalmente, se puede concluir que el gen *CYC8* de *X. dendrorhous* codifica un posible regulador transcripcional que estaría involucrado en la regulación de la carotenogénesis, teniendo un efecto represor sobre la producción de carotenoides.

ABSTRACT

Xanthophyllomyces dendrorhous is a carotenoid-producing basidiomycete yeast mainly studied for its ability to produce astaxanthin as major pigment. This metabolite has a great commercial interest, because it is used as food supplement in aquaculture for the appropriate pigmentation of salmonid fish and in the pharmaceutical industry for its antioxidant properties. Actually, almost the complete carotenoid biosynthetic pathway and the expression profile of the carotenogenic genes are known in *X. dendrorhous*. The production of carotenoids in this yeast is related to the type of carbon source (fermentable or non-fermentable) available in the culture medium. However, the mechanisms regulating the carotenogenesis process are still unknown. Possible regulatory genes including those involved in catabolite repression and a general transcription repressor gene (*CYC8*, initially named *GTR*) were found in our laboratory by bioinformatics methods. Furthermore, it was reported that some carotenogenic genes contained sequences recognized by Mig1 in their promoter regions. It is known that the catabolic regulatory mechanism in which Mig1 acts with the Tup1-Cyc8 co-repressor complex is one of the most important regulatory circuits in yeast and is widely conserved. Due to the above-mentioned, it is interesting to study the possible role of this mechanism in *X. dendrorhous*.

The general aim of this study was to characterize genetically and functionally the *X. dendrorhous* *CYC8* gene. For this, a genomic region of 6.5 kbp containing the complete *CYC8* gene was sequenced. The gene structure was determined by cDNA sequencing and an ORF of 4,410 pb was identified. Bioinformatic analysis of the amino acid sequence of the protein deduced from the coding region, showed high identity (~ 70%) with the general transcription co-repressor Cyc8 present in other organisms.

In parallel, mutants of the *CYC8* gene were obtained by replacement mutagenesis technique from the wild-type UCD 67-385 strain and AVHN2.4.8, an astaxanthin over-producer strain. The phenotype of heterozygous (*CYC8/cyc8*) and homozygous (*cyc8* / *cyc8*) mutants was evaluated with emphasis on the production of carotenoids and growth. The mutants 385.T2 (*CYC8/cyc8*) and 385.T2ZeoR3 (*cyc8* / *cyc8*), derived from UCD 67-385, did not showed significant differences in growth when compared to the original wild-type strain when were cultured in YM or MMGlu2%.

Moreover, the carotenoid production in 385.T2ZeoR3 started at the beginning of the growth curve, while in the wild-strain it was triggered at the end of the exponential phase. As a result, a higher content of total carotenoids was obtained in the mutant strain after 5 days of cultivation. However, when the strains were grown in MMGlu2%, differences were observed in an early-stage of carotenoid production, but there were not differences in their content at the late stationary phase of growth. Regarding the carotenoid composition, small differences were observed between the three strains tested (UCD 67-385, 385.T2 and 385.T2ZeoR3). The most pronounced differences were observed in the proportion of monocyclic carotenoids (like hydroxyl-keto-torulene) and β -carotene and astaxanthin content in later stages of growth.

The AV.T8 mutant (*cyc8*, derived from AVHN2.4.8), showed a significant delay in growth in respect to its parental. Also, a phenotypic segregation on pigment production was observed, giving rise to yellow and red-orange colonies. This last result did not allow us to study the carotenoid production in this strain, as it was not reproducible.

Finally, we can conclude that the *CYC8* gene of *X. dendrorhous* encodes a potential transcriptional regulator that would be involved in carotenogenesis regulation, having a negative effect on the carotenoid production.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 *Xanthophyllomyces dendrorhous*: antecedentes generales.

Xanthophyllomyces dendrorhous es una levadura carotenogénica basidiomicete aislada originalmente a finales de la década de 1960 por Phaff y colaboradores desde exudados de árboles de regiones montañosas de Japón y Alaska (Libkind y col., 2007, Marcoleta, 2011a). Posteriormente, se obtuvieron aislados procedentes de la patagonia argentina asociados a cuerpos fructíferos de *Cyttaria hariatii* en árboles del género *Nothofagus* (Libkind y col., 2007; Libkind y col., 2008) y del sur de Chile desde hojas de eucaliptus (Weber y col., 2008). Inicialmente, a ésta levadura se le llamó *Phaffia rhodozyma*; sin embargo, en 1995 su nombre cambió a *X. dendrorhous* al describirse su fase perfecta, caracterizada por la formación de un holobasidio con esporas terminales (Golubev, 1995). Principalmente debido a su capacidad de sintetizar carotenoides y por sus propiedades e importancia económica, esta levadura ha sido objeto de numerosos y variados estudios.

Los carotenoides son compuestos orgánicos de 40 átomos de carbono, derivados del isopreno (terpenos), que contienen dos anillos terminales unidos por una cadena de doble enlaces conjugados o sistema de polieno (Frengova y Beshkova, 2009). Esta familia de compuestos está formada por aproximadamente seiscientas moléculas que pueden encontrarse en la mayoría de las formas de vida y son producidos naturalmente por plantas, algas, algunas bacterias y hongos. Estas moléculas cumplen diversas funciones tales como pigmentos fotosintéticos, antioxidantes (protección contra fotooxidación y radicales libres), precursores de la vitamina A o atracción visual

de animales polinizadores (Schroeder y Johnson, 1993; Lodato y col, 2003; Frengova y Beshkova, 2009).

Debido a las condiciones del hábitat natural de *X. dendrorhous* (exudados de árboles) rico en especies reactivas de oxígeno (ROS) y sustancias antifúngicas, se postula que los carotenoides cumplirían un rol protector en la levadura compensando la baja actividad o ausencia de algunas enzimas antioxidantes (Schroeder y Johnson, 1993; Schroeder y Johnson, 1995). El principal carotenoide producido por *X. dendrorhous* es la astaxantina, que posee un alto valor comercial, principalmente por su uso en la industria acuícola como colorante y por sus propiedades antioxidantes y nutracéuticas de interés farmacéutico (Schmidt y col., 2011).

En la naturaleza, la astaxantina es producida por el fitoplancton y es la principal responsable del color anaranjado de invertebrados marinos, peces y aves (Lodato y col, 2003; Libkind y col., 2007; Frengova y Beshkova, 2009; Schmidt y col., 2011). Debido a que los animales no son capaces de sintetizar carotenoides, la astaxantina debe ser suplementada en el alimento de peces salmónidos (salmón y trucha), crecidos en cautiverio, para que logren un crecimiento y reproducción óptimos y adquieran la pigmentación apropiada, la cual resulta más atractiva para los consumidores (Yamane y col, 1997; Frengova y Beshkova, 2009; Rodríguez-Sáiz y col, 2010).

1.2 Astaxantina

Siendo una xantófila, la astaxantina posee propiedades químicas y fisiológicas características de estos compuestos: es altamente lipofílica y muestra un color rojo intenso basado en la luz absorbida por su sistema de polieno. Debido a los grupos funcionales 3-hidroxilo y 4-ceto en los anillos terminales, la astaxantina posee atributos

únicos, como una mayor polaridad que el resto de los carotenoides y una actividad antioxidante mayor que la del β -caroteno, luteína, zeaxantina y cantaxantina (Schroeder y Johnson, 1993; Schroeder y Johnson, 1995; Schmidt y col., 2011). Debido a su elevada actividad antioxidante, cada vez son más las propiedades beneficiosas para la salud humana que se le atribuyen a la astaxantina, entre ellas destacan propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, inmunoestimulantes, fotoprotectoras, neuroprotectoras, anticancerígenas y beneficiosas para la salud cardiovascular entre otras (Frengova y Beshkova, 2009; Schmidt y col., 2011).

Desde un punto de vista económico, la astaxantina tiene un mercado global de 219 millones de dólares en 2007 (29% del total de ventas de carotenoides) y se estima que alcanzará los 253 millones en 2015, considerando que actualmente la industria de cultivo de salmón invierte alrededor del 15% del total del costo de producción en este pigmento (Schmidt y col., 2011).

La gran mayoría de la oferta comercial, cerca del 97%, (Schmidt y col., 2011), hasta la fecha corresponde a astaxantina sintética. Sin embargo, el uso de compuestos químicos como aditivos alimenticios ha sido estrictamente regulado, favoreciéndose alimentos libres de éstos, tanto por los consumidores como por las autoridades (Yamane y col, 1997; Frengova y Beshkova, 2009). Por otra parte, los carotenoides sintéticos son pobremente absorbidos por la carne de peces, lo que representa una desventaja frente a los carotenoides obtenidos de fuentes biológicas (Osterlie y col, 1999; Bjerkeng, 2000). Debido a lo mencionado anteriormente, nace la necesidad de establecer una fuente natural de astaxantina como sistema alternativo de producción, garantizando de esta manera las propiedades beneficiosas de dicho compuesto.

En la naturaleza se conocen pocos organismos productores de astaxantina, siendo la microalga *Haematococcus pluvialis* y la levadura *X. dendrorhous* los sistemas

biológicos más prometedores para la producción biotecnológica de este carotenoide (Verdoes y col., 2003; Libkind y col., 2007; Frengova y Beshkova, 2009; Schmidt y col., 2011). Entre ellas, *X. dendrorhous* presenta ciertas ventajas, ya que produce astaxantina no modificada como carotenoide principal, no requiere luz para su crecimiento y pigmentación, puede utilizar variadas fuentes de carbono bajo condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas y presenta un crecimiento relativamente rápido (Yamane y col, 1997; Frengova y Beshkova, 2009). Sin embargo, la producción específica de astaxantina por cepas silvestres de *X. dendrorhous* es muy baja para ser un fuente comercialmente competitiva (Schmidt y col., 2011). Debido a lo anterior, muchos trabajos han intentado mejorar su producción, entre los que destacan: la optimización de las condiciones de cultivo (concentración de glucosa, pH, contenido de oxígeno) (Yamane y col, 1997; Hu y col, 2005; Hu y col, 2006), suplementación de distintos aditivos al medio de cultivo (Gu y col., 1997; Wang y col., 2006; Kim y col., 2007), uso de químicos estimulantes (Gu y col., 1997), iluminación con luz blanca y ultravioleta (de la Fuente y col., 2010), radiación gamma (Najafi y col., 2011), métodos clásicos de mutagénesis química y física (Hu y col, 2006; Ukibe y col., 2008; Rodríguez-Sáiz y col, 2010) e ingeniería metabólica (Misawa y col., 1997; Verdoes y col., 2003). A pesar que no se han logrado resultados satisfactorios, estos estudios han contribuido al conocimiento de la biología de esta levadura como también del proceso de biosíntesis de carotenoides. Actualmente se conocen la mayoría de los genes que controlan la síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*, como también su perfil de expresión a nivel de sus mensajeros (Lodato y col., 2007; Niklitschek y col., 2008; Wozniak y col, 2011). Sin embargo, aún se desconocen muchos aspectos genéticos, entre ellos, aquellos relacionados con los distintos mecanismos reguladores tanto en la carotenogénesis como en otros procesos celulares.

1.3 Biosíntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*.

En eucariontes la síntesis de carotenoides deriva de la ruta del mevalonato, el cual se forma por la condensación de tres moléculas de acetil-CoA (Sandmann, G., 2001). Los pasos siguientes implican dos reacciones quinasa y una descarboxilación, dando origen a isopentenil pirofosfato (IPP, C₅), precursor general de todos los isoprenoides (Sandmann, G., 2001; Schmidt y col., 2011). En la síntesis de carotenoides (Figura 1), el IPP se isomeriza a dimetilalil pirofosfato (DMAPP), por la enzima IPP isomerasa codificada por el gen *idi* (Kajiwara y col., 1997). El siguiente paso es catalizado por la enzima geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) sintasa (codificada por el gen *crtE*), donde por condensación de una molécula de DMAPP con tres moléculas de IPP, se genera geranylgeranyl pirofosfato (GGPP, C₂₀) (Niklitschek y col., 2008). Sin embargo, recientemente se ha descrito el gen *FPS* que codifica una posible farnesil pirofosfato sintasa involucrada en éste paso, sintetizando farnesil pirofosfato (FPP, C₁₅), que luego es convertido a GGPP (Romero, 2010). Posteriormente, dos moléculas de GGPP se condensan, paso catalizado por la enzima bifuncional fitoeno-β-caroteno sintasa (PBS) codificada por el gen *crtYB*, formando el primer carotenoide de la vía, fitoeno (Verdoes y col., 1999a; Rodríguez-Sáiz y col, 2010). Luego, el fitoeno que es incoloro, sufre cuatro desaturaciones catalizadas por la enzima fitoeno desaturasa (PDS), producto del gen *crtI* (Verdoes y col., 1999b; Schmidt y col., 2011). La enzima PDS genera licopeno cuyo color es rojo, el cual es convertido en β-caroteno de color amarillo, por la actividad licopeno ciclasa de la enzima PBS. Finalmente, el β-caroteno es oxidado por acción de la enzima astaxantina sintasa (CrtS, codificada por el gen *crtS*), una citocromo P450 monooxigenasa (Ojima y col., 2006), generándose astaxantina que es de color rojo-anaranjado, como producto final de la vía (Rodríguez-Sáiz y col, 2010).

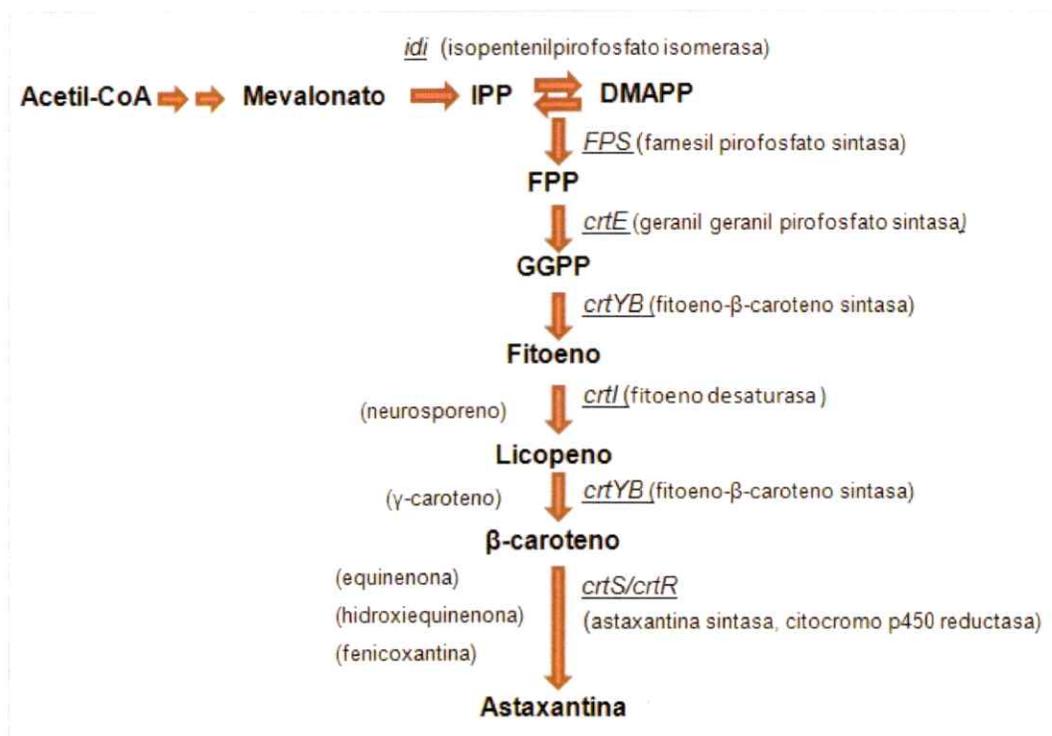


Figura 1. Diagrama de la ruta de biosíntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*.

La ruta de síntesis de astaxantina desde IPP es controlada por siete genes (subrayados) que codifican las enzimas que catalizan cada paso (indicadas entre paréntesis a la derecha de la ruta). A la izquierda se muestran entre paréntesis algunos de los intermediarios que se generan entre un metabolito y el siguiente. Los principales pigmentos producidos son xantófilas, de las cuales la astaxantina representa un 83-87% del total de carotenoides, seguida por fenicoxantina (5-7%), equinenona (3-4%) y β-caroteno (2-2,5%). Adaptado de Wozniak y col., 2011. IPP: isopentenil pirofosfato, DMAPP: dimetilalil pirofosfato, FPP: farnesil pirofosfato, GGPP: geranil geranil pirofosfato.

En éste último paso, también participa una enzima citocromo p450 reductasa, codificada por el gen *crtR*, la cual provee los electrones necesarios a la enzima CrtS para la oxigenación del sustrato (Alcaíno y col., 2008).

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

A pesar de que los genes que controlan la síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous* se han descrito, el conocimiento respecto a la regulación de esta vía es bastante escaso. Diversos estudios han mostrado que existe una relación entre la fuente de carbono utilizada por la levadura y la síntesis de carotenoides (Gancedo y col., 1998, Flores-Cotera y col, 2001; Wozniak y col, 2011; Marcoleta y col, 2011b).

En atención a lo anterior, se sabe que *X. dendrorhous* es capaz de llevar a cabo dos tipos de metabolismo: i) fermentativo, donde los azúcares se oxidan por la vía glicolítica obteniéndose piruvato que posteriormente es convertido en etanol, permitiendo la producción de ATP en ausencia de oxígeno y ii) aerobio, para el cual utiliza fuentes de carbono no fermentables que se incorporan al metabolismo a nivel del ciclo de Krebs (Jones y col, 1992). De esta manera también se obtiene piruvato; sin embargo, este compuesto es destinado principalmente a la producción de acetil-CoA. Luego, el acetil-CoA es metabolizado por las enzimas del ciclo de Krebs sintetizando los precursores necesarios para la carotenogénesis (Marcoleta, 2011a).

Estudios previos han demostrado que la producción de astaxantina disminuye durante el metabolismo fermentativo y aumenta durante el metabolismo aerobio (Wozniak y col, 2011; Marcoleta, 2011a; Lodato y col., 2007). Se ha determinado que al cultivar *X. dendrorhous* en medio completo (YM) suplementado con glucosa (fermentable), la carotenogénesis se induce durante la fase estacionaria de crecimiento. Esta inducción coincide con el agotamiento de la glucosa presente en el medio y con el comienzo del

consumo del etanol producido por la fermentación del azúcar (Lodato y col, 2003; Lodato y col., 2007; Wozniak y col, 2011). Por otra parte, reportes previos indican que añadir etanol al medio de cultivo de *X. dendrorhous* aumenta la cantidad de pigmentos producidos (Marcoleta y col, 2011b). Más aun, al cultivar la levadura en medio completo (YM) suplementado con distintas fuentes de carbono no fermentables (xilosa, succinato, acetato de sodio, glicerol y etanol), aumenta el contenido de carotenoides significativamente en relación al uso de glucosa (Lodato y col., 2007; Wozniak y col, 2011). En concordancia con lo anterior, en cultivos de la levadura en medio mínimo utilizando succinato (no fermentable) como única fuente de carbono, se observó que la producción de carotenoides coincide con el crecimiento de la levadura, aumentando sostenidamente hasta llegar a fase estacionaria (Wozniak y col, 2011). En contraste, en presencia de glucosa la carotenogénesis no se asocia con el crecimiento, confirmando lo descrito previamente (Lodato y col., 2007; Wozniak y col, 2011; Marcoleta y col, 2011b). Esto demuestra que la producción de carotenoides comienza antes y es mayor cuando se utiliza una fuente de carbono no fermentable (Wozniak y col, 2011).

Se sabe que *Saccharomyces cerevisiae*, *X. dendrorhous* y muchas otras levaduras pueden utilizar una variedad de fuentes de carbono, siendo la glucosa y la fructosa las más comunes (Rolland y col., 2002). De esta manera, cuando una de estas azúcares está presente en el medio de cultivo, se reprimen genes involucrados en el uso de fuentes de carbono alternativas y en metabolismo secundario (Jones y col, 1992; Gancedo y col., 1998). Este fenómeno es conocido como "represión catabólica" o "represión por glucosa" (Gancedo y col., 1998; Rolland y col., 2002; Schüller, 2003). Por lo tanto, es esperable que la inhibición de la síntesis de pigmentos en *X. dendrorhous* en presencia de glucosa pueda ser consecuencia de la represión de

componentes del metabolismo respiratorio que controlan la disponibilidad de sustratos de la ruta de carotenogénesis (Marcoleta y col, 2011b; Wozniak y col, 2011). Por otra parte, estudios a nivel de mRNA revelaron que el patrón de expresión de los genes *crtYB*, *crtI* y *crtS* (genes exclusivos de la carotenogénesis), es diferente al crecer la levadura en glucosa o succinato. Se observó que la glucosa causa la represión transcripcional de los tres genes *crtYB*, *crtI* y *crtS*, lo que se correlaciona con una inhibición completa de la síntesis de pigmentos (Marcoleta y col, 2011b). En relación a lo anterior, en *X. dendrorhous* se han identificado homólogos de los genes *GRG2* (gen reprimible por glucosa 2), *INV* (invertasa) y *PDC* (piruvato decarboxilasa), cuya expresión es regulada por glucosa en otras levaduras (Rolland y col., 2002; Marcoleta y col, 2011b). En respuesta a la adición de glucosa al medio de cultivo, se observó la inducción del gen *PDC* y la represión de los genes *INV* y *GRG2*, lo que sugiere que el fenómeno de “represión catabólica” también estaría operando en *X. dendrorhous* (Marcoleta y col, 2011b).

1.5 Represión catabólica en levaduras.

El principal efecto represor de la glucosa tiene lugar a nivel transcripcional y el mecanismo más general de represión catabólica involucra una disminución paralela de los niveles de transcritos de los genes blanco y consecuentemente, de las proteínas que codifican (Gancedo y col., 1998; Rolland y col., 2002). Una de las formas en que la glucosa influye sobre la expresión génica, es facilitando la acción de reguladores negativos (Gancedo y col., 1998) y entre ellos se encuentra el factor Mig1 (codificado por el gen *MIG1*) descrito en *S. cerevisiae* (Trumbly, 1992; Gancedo y col., 1998; Rolland y col., 2002). La proteína Mig1 tiene dos dedos de zinc tipo C_2H_2 , y es capaz de unirse a los promotores de una variedad de genes reprimidos por glucosa. La unión

de Mig1 al DNA requiere de una "caja mig1" o caja GC, con la secuencia consenso (G/C)(C/T)GGGG, pero además requiere de una región rica en AT a unas 59 pb río arriba de la caja GC (Gancedo y col., 1998; Schüller, 2003). En la figura 2 se muestra el mecanismo general y los componentes involucrados en el fenómeno de represión catabólica. La función de Mig1 está determinada por su localización subcelular. En presencia de altos niveles de glucosa (señal de represión), el factor Mig1 migra al núcleo y se une a los promotores de los genes blanco. Mientras que en ausencia de ella, se activa el complejo quinasa Snf1 que fosforila a Mig1, el cual en este estado interactúa con la exportina Msn5 que media su exportación hacia el citoplasma (Trumbly, 1992; Rolland y col., 2002; Schüller, 2003). Por otra parte, la proteína fosfatasa 1 (Glc7), antagonista a Snf1, desfosforila a Mig1 permitiendo su transporte hacia el núcleo y la consecuente represión de los genes blanco (Schüller, 2003). Una vez unido a la región reguladora de los genes blanco, Mig1 recluta un complejo co-represor formado por las proteínas Tup1 y Cyc8 (Ssn6), que posteriormente inhibe la transcripción de los genes que contienen sitios de unión de Mig1 en su región promotora (Gancedo y col., 1998; Rolland y col., 2002; Schüller, 2003). Genes homólogos a *MIG1* se han identificados en las levaduras *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* y el hongo ascomicete *Aspergillus nidulans* (Gancedo y col., 1998). Recientemente, en nuestro laboratorio se aisló y secuenció el cDNA de un gen homólogo a *MIG1* de *X. dendrorhous* (Marcoleta, 2011a). Adicionalmente, mediante análisis bioinformáticos se identificaron posibles "cajas mig1" en las regiones promotoras de los genes *crtS*, *crtYB* y *crtI* (Marcoleta, 2011a; Wozniak y col, 2011). Cabe destacar que también se encontraron estos sitios en la región promotora del gen reprimible por glucosa *GRG2* (Wozniak y col, 2011 ; Marcoleta , 2011a; Marcoleta y col, 2011b).

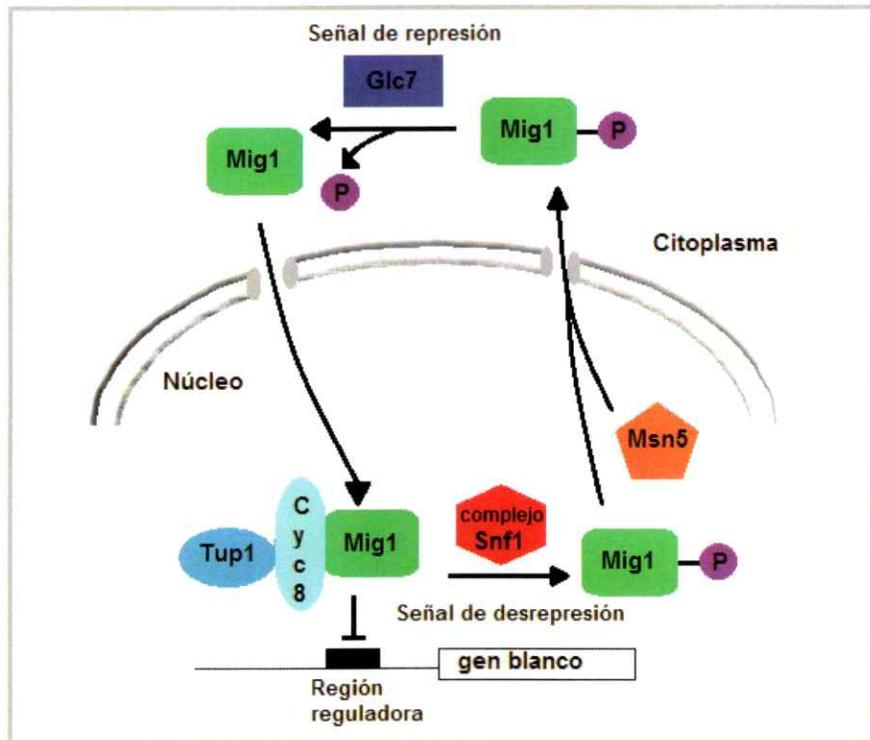


Figura 2. Mecanismo de represión catabólica en levaduras. Se muestra un esquema del mecanismo general del fenómeno de represión catabólica en levaduras y sus principales componentes. Adaptado de Schüller, 2003.

Acorde a lo anterior, experimentos de retraso en la movilidad electroforética (EMSA) revelaron la unión de un factor nuclear a las potenciales "cajas mig1" presentes en la región promotora del gen *crtS* (Marcoleta, 2011a). Estos resultados sugieren que el factor Mig1 tendría un rol en la regulación de la carotenogénesis en *X. dendrorhous* mediante el mecanismo de represión catabólica, especialmente regulando la expresión de los genes *crtYB*, *crtI* y *crtS*.

1.6 El complejo corepresor Tup1:Cyc8.

Las proteínas Cyc8 y Tup1 pertenecen a familias de proteínas conservadas evolutivamente y se sugiere que tanto levaduras como lombrices, moscas y mamíferos, poseen represores que se asemejan a Cyc8 y Tup1, no sólo en secuencia sino también en función (Smith y Johnson, 2000). Tanto Cyc8 como Tup1 son necesarios para la represión de genes regulados por glucosa y oxígeno. La eliminación de uno o ambos genes no es letal para las células, pero tiene efectos pleiotrópicos, originando diversos fenotipos como crecimiento lento, floculación, baja esporulación y pérdida de ciertos aspectos de la represión por glucosa (Gancedo y col., 1998; Smith y Johnson, 2000).

Cyc8 y Tup1 se asocian en un complejo de alto peso molecular compuesto por una unidad de Cyc8 y cuatro de Tup1. El complejo Cyc8-Tup1 reprime alrededor de 150 genes distintos en *S. cerevisiae* y es dirigido a cada grupo de genes blanco por una proteína de unión a DNA secuencia-específica que reconoce uno o más sitios operadores en la región reguladora (Gancedo y col., 1998; Smith y Johnson, 2000; Schüller, 2003). Por ejemplo, los genes reprimidos por glucosa, inducidos por daños en el DNA o regulados por oxígeno, son reconocidos por las proteínas de unión a DNA Mig1, Crt1 y Rox1, respectivamente (Smith y Johnson, 2000).

La proteína Tup1 contiene siete copias de un motivo WD40 en su región carboxilo terminal, las cuales tendrían un rol en la función represora de la proteína (Zhang y col, 2002). Mientras que su extremo amino terminal participaría en la interacción con Cyc8 (Gancedo y col., 1998). Adicionalmente, Tup1 contiene un dominio que incluye al menos dos regiones represoras de la transcripción caracterizadas por no poseer carga y ser ricas en alanina (Gancedo y col., 1998). Sobre la proteína Cyc8, se sabe que en su extremo amino terminal contiene 10 copias de un motivo de 34 aminoácidos, el repetido tetratricopéptido (TPR), y sólo algunos de ellos son requeridos para su función. Se ha propuesto que los TRPs median la interacción proteína-proteína entre Cyc8 con Tup1 y Mig1 (Gancedo y col., 1998; Schüller, 2003) y se ha demostrado que distintas combinaciones de ellos son necesarias para la represión de genes regulados por oxígeno o por glucosa (Tzamarias y col., 1995).

En la figura 3 se representan los modelos (no excluyentes entre sí) propuestos para el mecanismo de acción del complejo Cyc8-Tup1. El primero de ellos (Figura 3A) consiste en la interferencia directa de Cyc8-Tup1 con el activador, impidiendo su función. El segundo modelo (Figura 3B) consiste en la represión por alteración de la estructura local de la cromatina mediada por la interacción entre Tup1 y las histonas H3 y H4. En este caso los genes reprimidos por Cyc8-Tup1 tienen nucleosomas en posiciones que obstruyen la unión de proteínas que favorecen la transcripción al DNA cercano a la caja TATA y al sitio de inicio de la transcripción. Por último, el tercer mecanismo propuesto (Figura 3C) consiste en la interacción directa de Cyc8-Tup1 con la maquinaria general de transcripción cuando esta se ensambla sobre el promotor del gen blanco inhibiendo la fase inicial de la transcripción (Gancedo y col., 1998, Smith y Johnson, 2000).

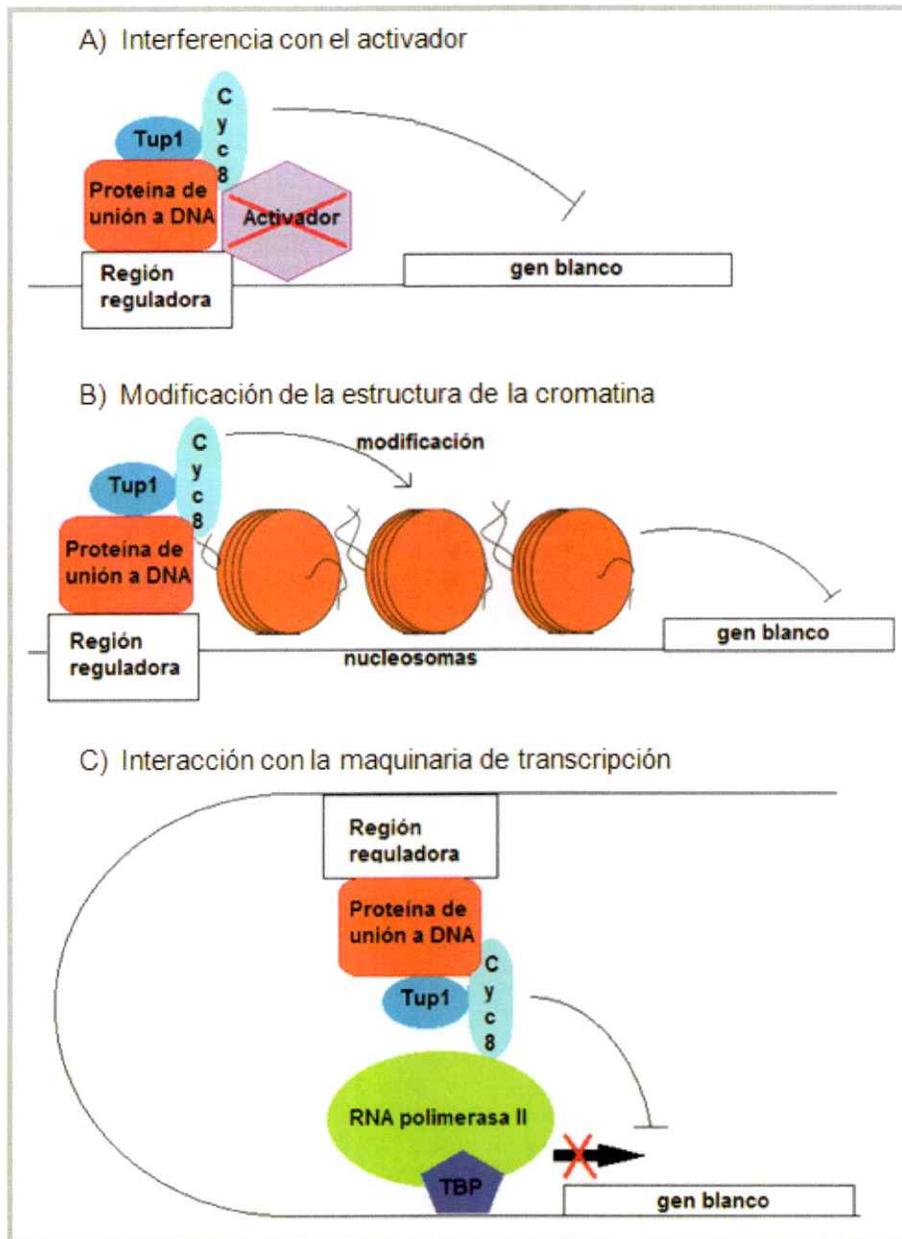


Figura 3. Modelos propuestos para el mecanismo de acción del complejo Cyc8-Tup1. (A) Interferencia con el activador. (B) Modificación de la estructura local de la cromatina. (C) Interacción con la maquinaria general de transcripción; TBP: Proteína de unión a caja TATA ("TATA binding protein"). Adaptado de Smith y Johnson, 2000.

En base al conjunto de antecedentes expuestos y considerando que el mecanismo de represión catabólica se encuentra ampliamente conservado en eucariontes y es uno de los circuitos regulatorios más importantes en levaduras, resulta apropiado pensar que este mecanismo puede también regular el proceso de carotenogénesis. Aunque en la actualidad no se han identificado genes reguladores de dicho proceso en *X. dendrorhous*, en nuestro laboratorio mediante métodos bioinformáticos hemos identificado genes de probables proteínas reguladoras, como *MIG1* y el gen de un represor general de la transcripción mediado por glucosa (*CYC8*, inicialmente llamado *GTR*), homólogo de *Cyc8*. Acorde a lo anterior, en este trabajo se propone caracterizar el gen *CYC8* de *X. dendrorhous* que estaría involucrado en represión catabólica.

1.7 Hipótesis y objetivos.

La hipótesis de este trabajo es la siguiente: El gen *CYC8* participa del fenómeno de represión catabólica y está involucrado en los mecanismos de regulación del proceso de carotenogénesis en *X. dendrorhous*.

En base a la hipótesis anterior, se plantean los siguientes objetivos:

- Objetivo general: Caracterizar estructural y funcionalmente el gen *CYC8* de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*.
- Objetivos específicos:
 - I. Identificar el gen *CYC8* en el genoma de *X. dendrorhous* mediante análisis bioinformáticos.
 - II. Clonar y secuenciar el fragmento de DNA genómico que contiene el gen *CYC8*.

- III. Aislar y secuenciar el cDNA del gen *CYC8*, para determinar la estructura génica.
- IV. Obtener cepas de *X. dendrorhous* mutantes homocigotas (*cyc8*⁻ / *cyc8*⁻) del gen *CYC8*.
- V. Caracterizar fenotípicamente los mutantes *cyc8*⁻ y evaluar su efecto en la carotenogénesis y el crecimiento de la levadura.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepas, mantención y condiciones de cultivo. Las cepas bacterianas y de levadura utilizadas y construídas en este trabajo se describen en la Tabla 1. Los cultivos en medio sólido se realizaron en agar al 1,5%. Las cepas de *E. coli* se cultivaron a 37 °C en medio completo LB (extracto de levadura 10 g/l, triptona 5 g/l, NaCl 5 g/l) (Sambrook y Russell , 2001). En el caso de cepas portadoras de plásmidos con resistencia a antibiótico, el medio se suplementó con ampicilina (100 µg/ml). Las cepas de *X. dendrorhous* se cultivaron a 22 °C en medio completo YM (extracto de levadura 3 g/l, extracto de malta 3 g/l, glucosa 10 g/l y peptona 5 g/l) o en medio mínimo (MM_v) suplementado con glucosa al 2% (MMglu2%) (Wozniak y col, 2011). Las cepas de levadura transformantes y resistentes a higromicina B y zeocina, se cultivaron en medio YM suplementado con los antibióticos a una concentración final de 15 µg/ml, según corresponde. Las cepas de *E. coli* se conservaron con glicerol estéril al 50% en tubos eppendorf a -80 °C y las de levadura de acuerdo a lo descrito por Baeza (Baeza y col, 2009). Brevemente, la cepa a conservar se creció en medio YM sólido a 22 °C y luego se tomó la mayor cantidad posible de células frescas con un aza de siembra que se mezcló con 500 µl de medio YM. Se agregó 500 µl de gelatina estéril tibia (20%), se homogeneizó y se depositaron gotas sobre parafina sólida contenida en la tapa de una placa de petri. Luego de que la gelatina gelificó, se agregó sílica gel con indicador de humedad en la base de la placa (opuesta a la parafina) y se invirtió dejando la parafina con las gotas de gelatina en la parte superior, evitando que la sílica gel las tocara. La placa se selló con PARAFILM y se dejó a temperatura ambiente hasta que las gotas de gelatina se deshidrataron completamente (aspecto plano como "lentejas").

Tabla1. Cepas bacterianas y de levadura utilizadas y construidas en este trabajo.

Cepa	Características	Fuente/Referencia
<i>E. coli</i> DH5 α	Amp ^S	(Sambrook y Russell , 2001)
<i>X.dendrorhous</i> UCD 67-385	Cepa silvestre, diploide (Hyg ^S y Zeo ^S).	(Miller, 1976); ATCC24230
385.T2	Mutante heterocigoto (<i>CYC8/cyc8</i> -). Hyg ^R , Zeo ^S que deriva de UCD 67-385. Un alelo del gen <i>CYC8</i> interrumpido por el módulo de resistencia a higromicina B.	Este trabajo
385.T2ZeoR3	Mutante homocigoto (<i>cyc8/cyc8</i>). Hyg ^R , Zeo ^R , que deriva de UCD 67-385. Un alelo del gen <i>CYC8</i> interrumpido por el módulo de resistencia a higromicina B y el otro por el módulo de resistencia a zeocina.	Este trabajo
AVHN2.4.8	Cepa silvestre para el gen <i>CYC8</i> . Hyg ^S , Zeo ^S . Mutante sobreproductor de astaxantina obtenido en el laboratorio mediante mutagénesis al azar que deriva de la cepa chilena silvestre AVHN2.	Laboratorio de Genética, Facultad de Ciencias- Universidad de Chile. No publicado
AV.T8	Mutante hemocigoto (<i>cyc8</i> -), Hyg ^R , que deriva de AVHN2.4.8.	Este trabajo

Amp^S: sensible a ampicilina; Hyg^S: sensible a higromicina B; Hyg^R: resistente a higromicina B; Zeo^S: sensible a zeocina; Zeo^R: resistente a zeocina. ATCC: American Type Culture Collection.

Las "lentejas" se tomaron con pinzas estériles y se depositaron en tubos de ensayo que contenían algodón sobre sílica gel que se sellaron con PARAFILM para evitar la humedad. Los tubos se almacenaron a temperatura ambiente.

2.2 Plásmidos, ácidos nucleicos y enzimas. Los plásmidos utilizados y construidos en este trabajo se describen en la Tabla 2. Los oligonucleótidos (partidores) diseñados en esta tesis se sintetizaron en *Integrated DNA technologies* (IDT) y se describen en la Tabla 3.

El DNA del bacteriófago lambda digerido con la endonucleasa de restricción *HindIII* (Fermentas) se utilizó como marcador de peso molecular y como indicador de concentración de muestras de DNA analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa. En ocasiones, también se utilizó el marcador de peso molecular comercial GeneRuler 1Kb ladder read (Fermentas).

Las enzimas *Pfu* DNA polimerasa (Agilent), *Taq* DNA polimerasa, RNasa A (US Biological), T4 DNA ligasa (Fermentas) y las endonucleasas de restricción (Fermentas): *EcoRV*, *BamHI*, *BmgBI*, *PmlI*, *AvaI*, *StuI*, *EcoRI*, se utilizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

2.3 Determinación del crecimiento celular y biomasa. El crecimiento celular se determinó midiendo la densidad óptica a 600nm (DO_{600}) en un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV-150-20. Adicionalmente, el crecimiento se analizó en medio sólido YM incubando a 22 °C, tomando un registro fotográfico cada 2 días.

Las curvas de crecimiento se realizaron por triplicados. Para ello se inocularon matraces de 1l que contenían 800 ml de medio YM o MMGlu2% con 8 ml de un cultivo de una $DO_{600} \sim 10$ o con el volumen necesario para dejar una DO_{600} inicial de $\sim 0,1$.

Tabla 2. Plásmidos utilizados y generados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Fuente /Referencia
PBluescript II SK(+)XR	Vector clonamiento. MCS incluido en el gen <i>lacZ</i> . Amp ^R , ColE1 ori	Stratagene
pMN-Hyg	pBluescript II SK(+) XR con el módulo de resistencia a higromicina B (gen <i>hph</i> de <i>E. coli</i> bajo el promotor del factor de elongación 1 α y el terminador de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de <i>X. dendrorhous</i>) clonado en el sitio <i>EcoRV</i> .	(Niklitschek, 2007).
pZeo	pBluescript II SK(+) XR con el módulo de resistencia a zeocina (gen <i>ble</i> de <i>Streptoalloteichus hindustanus</i> bajo el promotor del factor de elongación 1 α y el terminador de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de <i>X. dendrorhous</i>) clonado en el sitio <i>EcoRV</i> .	No publicado. Plásmido de laboratorio, no comercial.
pBS_GTR	pBluescript II SK(+) XR con un fragmento de 2.437pb de la región genómica del gen <i>CYC8</i> de <i>X. dendrorhous</i> clonado en el sitio <i>EcoRV</i> .	Este trabajo
pGTR_Hyg	pBS_GTR con el módulo de resistencia a higromicina B inserto en el sitio <i>BmgBI</i> , interrumpiendo el gen <i>CYC8</i> .	Este trabajo
pGTR_Zeo	pBS_GTR con el módulo de resistencia a zeocina inserto entre los sitios <i>PmlI</i> y <i>BmgBI</i> , interrumpiendo el gen <i>CYC8</i> .	Este trabajo

MCS: sitio de múltiple clonamiento; Amp^R: resistencia a ampicilina; ColE1 ori: Origen de replicación bacteriano. *Gen *ble* fue obtenido desde el plásmido comercial pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen).

Tabla 3. Partidores diseñados y utilizados en este trabajo.

Partidor	Blanco de hibridación	Secuencia (5' a 3')	Dirección
GTR1Fwd	Gen CYC8: Exón 9	ttcccactaccaccgatgac	R
GTR2Fwd	Gen CYC8: Exón 9	cttcgaccatctcggtaaac	R
GTR3Fwd	Gen CYC8: Intrón 7	gagatcagttcacaggaacac	R
GTR4Fwd	Gen CYC8: Exón 6	gctgtttgtagatgatgccc	R
GTR5Fwd	Gen CYC8: Intrón 3	gacgctactttggatggaag	R
GTR6Fwd	Gen CYC8: Exón 2	atcccagcgacttgagtaag	R
GTR7Fwd	Gen CYC8: Exón 1	tgctgttgctggtgctgctg	R
GTR1Rev	Gen CYC8: Exón 1	tcagatcacccatccaaccc	D
GTR2Rev	Gen CYC8: Intrón 1	ccgttcttcagacagattgc	D
GTR3Rev	Gen CYC8: Intrón 2	cattgttgctcctccattcgtc	D
GTR4Rev	Gen CYC8: Exón 5	ggtacgggattggtattctg	D
GTR5Rev	Gen CYC8: Exón 7	ctggtttcagcttggctcag	D
GTR6Rev	Gen CYC8: Intrón 8	caaccgatggttgattcctc	D
GTR7Rev	Gen CYC8: Exón 9	tcgatctgggctcactctac	D
GTR_RT1Fwd	Gen CYC8: Exón 9	gtgccacctccgcctcaag	D
GTR_RT2Fwd	Gen CYC8: Exón 5	ggtacgggattggtattctg	D
GTR_RT3Fwd	Gen CYC8: Exón 9	cacggtggaagaagatctcc	D
GTR_RT4Fwd	Gen CYC8: Exón 9	gacattcagacacctaccctg	D
GTR_RT5Fwd	Gen CYC8: Exón 9	cgacttccggtggaacag	D
GTR_RT6Fwd	Gen CYC8: Exón 10	cttccatctctttcttcgcc	D
GTR_RT7Fwd	Gen CYC8: Exón 10	cttcccttattacttcttgcc	D
GTR_RT1Rev	Gen CYC8: Exón 9	cgcggtcgggtgaacgtc	R
GTR_RT2Rev	Gen CYC8: Exón 5	gaaagcctcctctgcatgc	R
GTR_RT3Rev	Gen CYC8: Exón 9	ggaacggagatctggcgcc	R
GTR_RT5Rev	Gen CYC8: Exón 10	cgacagcgtccgaattagac	R
GTR_RT6Rev	Gen CYC8: Exón 10	gaggccgaagcattagcag	R
GTR_RT7Rev	Gen CYC8: Exón 10	gacacaacatatacacagccg	R
GTR_cDNAupFwd	Río arriba de CYC8	ctgtgtccgtagagatgatc	D
GTR_cDNAup1Fwd	Río arriba de CYC8	cccgatcatccgtctctg	D
GTR_cDNAup2Fwd	Río arriba de CYC8	ctccatccattcttgttccc	D
GTR_ORFupFwd	Gen CYC8: Exón 1	atggcgattggaacagtgtag	D
GTR_ORFFwd	Gen CYC8: Exón 1	gccattctcctggtcggcg	D
GTR_ORF2Fwd	Gen CYC8: Exón 1	gctcgagcgaaccttaatc	D
GTR_cDNAupRev	Río arriba de CYC8	ccggcttttttccattcttc	R
GTR_cDNAup1Rev	Río arriba de CYC8	cggatgaagagcacaggg	R
GTR_cDNAup2Rev	Río arriba de CYC8	cgaacgaacggacagataaac	R
GTR_cDNAup3Rev	Gen CYC8: Exón 1	gaatgagttgctggtgctgc	R
GTR_ORFdownRev	Gen CYC8: Exón 9	ttagtcagagaaccatttacc	R
GTR_cDNARev	Gen CYC8: Intrón 9	gagaaccatttacccttcaag	R
GTR_cDNA2Rev	Gen CYC8: Exón 10	ccttcgtctcatcatcatag	R
GTR_cDNARev3	Gen CYC8: Exón 10	gtcatcgacgatcgtaggg	R
GTR_cDNAup2Rev	Río arriba de CYC8	cgaacgaacggacagataaac	R
GTR_cDNAup3Rev	Gen CYC8: Exón 1	gaatgagttgctggtgctgc	R
M13Fw	pBluescriptII SK(+)(XR) (río arriba de MCS)	gtaaaacgacggccag	D

Luego se incubó con agitación constante a 22 °C y se registró la densidad óptica cada 8-12 horas durante al menos 5 días.

Para la determinación de pigmento específico se cuantificó la biomasa mediante la medición del peso seco correspondiente a una alícuota de 1 ml de cultivo. Se tomaron tres medidas independientes para luego obtener un promedio.

2.4 Extracción de ácidos nucleicos.

2.4.1 Extracción de DNA genómico de *X. dendrorhous*. Para la extracción de DNA genómico de la levadura se tomó con un aza de siembra una cantidad considerable de células frescas a partir de placa y se depositaron en un tubo de 2 ml (tapa rosca) que contenían 600 µl de tampón TE (Tris 25 mM; EDTA 10 mM, pH 8,0) y entre 100 y 250 µl de perlas de vidrio de 0,5 mm (BioSpec). Luego se agregaron 600 µl de fenol-cloroformo-álcool isoamílico (25:24:1) y se agitó durante 40 s en el equipo Mini-beadbeater-16 (BioSpec). Después se centrifugó por 10 min a 18.626 x g. La fase acuosa (superior) se transfirió a un tubo eppendorf limpio de 1,5 ml, se agregó un volumen de cloroformo-álcool isoamílico (24:1), se homogeneizó en vórtex y se centrifugó por 1 min a 18.626 x g. La fase superior, se traspasó a un tubo eppendorf limpio de 1,5 ml y se agregó 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se homogeneizó y se dejó a -20 °C por al menos 2 horas para precipitar el DNA. Luego se centrifugó a 18.626 x g por 10 min, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar a 37 °C por 5 min. Finalmente el DNA se suspendió en 100 a 200 µl de tampón TE-RNasa (Tris 10 mM; EDTA 1 mM, RNasa A 40 µg/ml, pH 8,0) y se almacenó a -20 °C.

2.4.2 Extracción de RNA total de *X. dendrorhous* y síntesis de cDNA. La extracción de RNA de *X. dendrorhous* se llevó a cabo según el protocolo descrito por Marcoleta y

colaboradores (Marcoleta y col, 2011b). Para extraer RNA, se colectaron 40 ml de cultivo ($DO_{600} > 2$), se centrifugó a 4.000 x g por 5 min y se descartó el sobrenadante. El precipitado celular se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento. Al momento de extraer el RNA, se descongelaron las células y se agregó 4 ml de TRIreagent (Ambion) y 0,5 ml de perlas de vidrio de 0,5 mm (Biospec). Luego se agitó en vórtex por un total de 8 min, dejando los tubos en hielo durante 2 min cada 2 min de agitación. Después de la lisis, se incubó a temperatura ambiente durante 8 min y se traspasó el contenido a un nuevo tubo con 0,6 ml de cloroformo. Se mezcló invirtiendo el tubo suavemente y una vez homogeneizado, se centrifugó por 5 min a 4.000 x g. En caso de que el sobrenadante no quedara transparente, se repitió el paso anterior. Los pasos siguientes se realizaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, manteniendo las muestras en hielo. La fase acuosa se transfirió a tubos eppendorf y se agregó un volumen de fenol ácido (pH 4,0): cloroformo 1:1, se mezcló y se centrifugó por 5 min a 9.500 x g. Nuevamente la fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf y se agregó 1,5 volúmenes de isopropanol para precipitar el RNA. Se dejó por 10 min en hielo, se centrifugó 5 min a 18.626 x g y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 0,5 ml de etanol 75% que luego se retiró mediante el uso de micropipeta. Una vez que el precipitado estuvo seco, se suspendió en 80 μl de agua bidestilada (libre de nucleasas). La muestra de RNA obtenida se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. La calidad del RNA extraído, se determinó de acuerdo a la razón (DO_{260} / DO_{280}) (Sambrook y Russell , 2001). Adicionalmente, su concentración y calidad se estimó mediante electroforesis en geles de agarosa 0,7%, según la intensidad de las bandas correspondientes a los RNAs ribosomales.

La síntesis de cDNA, se realizó con 5 μg de RNA total, 1,25 μM de partidor oligo-dT¹⁸,

0,5 μ M de dNTPs y 200 U de transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) en un volumen final de 20 μ l, de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante de la enzima.

2.4.3 Extracción de DNA plasmidial de *E. coli*. Para la extracción y purificación de DNA plasmidial desde un cultivo de *E. coli*, se utilizaron los kit comerciales AxyPrep™ Plasmid Miniprep y Midiprep Kit de Axygen, según las instrucciones del fabricante.

2.5 Digestión de DNA plasmidial con enzimas de restricción. Las digestiones de DNA plasmidial con las enzimas de restricción *EcoRV*, *BamHI*, *BmgBI*, *PmlI*, *AvaI*, *StuI*, *EcoRI* (Fermentas), se realizaron de acuerdo a las instrucciones recomendadas por el fabricante. En general, se utilizó un exceso de enzima (10 U) para cortar un máximo de 1 μ g, con "buffer" 1X (específico para cada enzima) a un volumen final de 20 μ l y se incubó durante 1 h a 37 °C. Para linealizar los vectores que se utilizaron para la transformación de *X. dendrorhous*, se cortaron 20 μ g de vector con 20 U de enzima en un volumen final de 120 μ l. Las digestiones con más de una enzima simultáneamente, se llevaron a cabo según las recomendaciones del fabricante, tomando en cuenta la compatibilidad de "buffer", según las enzimas utilizadas.

2.6 Electroforesis en geles de agarosa. La integridad y concentración de DNA cromosómico, plasmidial, RNA o fragmentos de PCR se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa 0,7-1% (dependiendo del tamaño de banda esperado) en "buffer" TAE 1X (Tris-acetato 40 Mm; EDTA 1 Mm; pH 8) con bromuro de etidio 0,5 μ g/ml. Las muestras a analizar se mezclaron con "buffer" de carga BCP 1X (rojo cresol (Sigma) 10 mM; glicerol 30%) y el DNA se visualizó en un transluminador (Arquimed) que irradia el gel con luz UV. El tamaño y concentración de las bandas analizadas se estimó con el programa Kodak 1D versión 2.0.1 utilizando como

estándar de peso molecular el DNA del bacteriófago lambda digerido con la enzima *HindIII* (Fermentas).

2.7 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa. La purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se llevó a cabo utilizando el kit comercial Ultra Clean™ 15 DNA Purification Kit (MO BIO), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

2.8 Reacción de ligamiento de fragmentos de DNA a vectores. Para ligar fragmentos de DNA o módulos de resistencia a los distintos vectores se utilizó la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen) según las recomendaciones del fabricante. En general se utilizó 5 U de enzima para un total de aproximadamente 200 ng de DNA, "buffer" 1X y una relación inserto: vector de 5:1, en un volumen final de 20 µl. Se incubó a 22 °C durante al menos 1 h y la mezcla de ligado se dializó durante 10 min antes de ser utilizada para electroporar.

2.9 Transformación mediante electroporación

2.9.1 Transformación de *E. coli*. Para obtener células electrocompetentes de *E. coli* DH5α se utilizó el protocolo descrito previamente (Sambrook y Russell , 2001). Brevemente, se inoculó 1l de medio LB con 100 ml de un cultivo bacteriano saturado. Se dejó crecer con agitación constante hasta llegar a una densidad óptica a 600nm (DO₆₀₀) de 0,5-0,8 (fase exponencial de crecimiento). A partir desde este punto en adelante, se trabajó con material mantenido en hielo y centrifugando a 4 °C.

Las células se colectaron mediante centrifugación a 16.300 x g por 15 min. Se lavaron 2 veces con agua destilada fría esteril; el primer lavado con 1l total de agua y el segundo con 500 ml, y una vez con 20 ml de glicerol 10%. Posteriormente, el

sedimento celular se suspendió en 2-3 ml de glicerol 10% frío, obteniéndose una concentración de $1-3 \times 10^{10}$ células/ml. Finalmente, las células electrocompetentes se almacenaron en alícuotas de 40 μ l a -80 °C hasta el momento de su utilización.

Al momento de transformar, se descongeló una alícuota de células electrocompetentes y se agregó 5-10 μ l de mezcla de ligado (dializado) o 1 ng de vector puro (si es el caso). La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,2 cm preenfriada y la electroporación se llevó a cabo con el equipo BioRad Gene Pulser X Cell, bajo las condiciones de 25 μ F, 200 Ω y 2,5 KV. Posteriormente, las células se suspendieron e incubaron durante 1 h a 37 °C en 1 ml de medio LB. Transcurrida la hora, se sembraron alícuotas de 100 μ l en medio LB sólido suplementado con el antibiótico ampicilina (100 μ g/ml) y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido, 80 μ g/ml), y se incubaron durante una noche a 37 °C. Luego se evaluó la aparición de colonias transformantes, resistentes a ampicilina, y recombinantes, blancas ya que no metabolizan el X-gal (Sambrook y Russell , 2001).

2.9.2 Transformación de *X. dendrorhous*. La obtención de células electrocompetentes de *X. dendrorhous* se llevó a cabo según el protocolo descrito por Adrio y Veiga (Adrio y Veiga, 1995). Brevemente, se sembró 2 ml de un cultivo de 2 días en 200 ml de medio YM y se dejó crecer con agitación constante hasta una DO_{600} de 2-4 (aproximadamente 24 h). Luego de alcanzar la DO_{600} deseada, las células se cosecharon por centrifugación a 4 °C a 16.300 x g por 5 min. El sedimento celular se suspendió en 25 ml de "buffer" fosfato de potasio 50 mM (pH 7) con 25 mM de DTT y se incubó por 15 min a 22 °C. A partir de este paso todos los procedimientos se realizaron a 4 °C con material enfriado en hielo. Las células se lavaron 2 veces con 25 ml de solución STM (sacarosa 270 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 7; $MgCl_2$ 1 mM) y el

sedimento celular se suspendió en 500 μ l de solución STM. Para electroporar se mezcló 60 μ l de la suspensión de células electrocompetentes y 10 μ l de vector lineal (a una concentración mínima de 1 μ g/ μ l), la mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,2 cm enfriada. La electroporación se llevó a cabo con el equipo BioRad Gene Pulser X Cell, bajo las condiciones 125 μ F, 600 Ω y 450 V. Una vez realizada la electroporación, las células se suspendieron en 1 ml de medio YM y se incubó durante 4 h, en el caso de la cepa UCD 67-385, y 8 h, en el caso de la cepa AVHN2.4.8. Transcurrido el tiempo de incubación, se sembraron alícuotas de 100 μ l en medio YM sólido suplementado sólo con higromicina B o con higromicina B y zeocina, dependiendo del vector utilizado y de la cepa transformada. Las placas se incubaron a 22 °C por al menos 2 días y se evaluó la aparición de colonias resistentes a los antibióticos utilizados.

2.10 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). En general, las reacciones de amplificación de DNA se realizaron con *Taq* DNA polimerasa (GenLab). Cada reacción estaba compuesta por: 1X "buffer" PCR (Tris-HCl 200 mM; KCl 500 mM; pH 8,4); MgCl₂ 2 mM; 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 μ M de cada partidor; 10-20 ng de DNA molde y 1U de DNA polimerasa en un volumen final de 25 μ l. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Applied Biosystems 2720 utilizando el siguiente programa estándar: 3 min de denaturación (o 5 min para PCR de colonia) a 94 °C, seguido de 35 ciclos de: 30 s a 94 °C (denaturación), 30 s a 55 °C (hibridación de partidores o *annealing*), 3 min (o 4 min para fragmentos sobre 3 kpb) a 72 °C (elongación). Luego la reacción se mantuvo 10 min a 72 °C para una elongación final y se almacenó a 4 °C hasta su análisis. Para amplificar fragmentos que posteriormente serían secuenciados, se utilizó la enzima *Pfu* DNA polimerasa (Agilent)

según las recomendaciones del fabricante cambiando el tiempo de elongación del programa estándar de 3 a 1 min.

2.11 Secuenciación y análisis bioinformático. La secuenciación de DNA se realizó en un secuenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) con el kit de terminadores fluorescentes BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Se utilizó un mínimo de 200 o 50 ng totales de DNA para la secuenciación de plásmidos o de fragmentos de DNA purificados, respectivamente.

Para el análisis de secuencias se utilizaron las herramientas ContigExpress y AlignX del programa Vector NT Advance v.11 (Invitrogen) y los programas disponibles en línea como la herramienta BLAST u ORF Finder del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Además, las secuencias del transcriptoma y genoma de la cepa UCD 67-385 disponibles en nuestro laboratorio, se analizaron con el programa CLC Genomics Workbench.

Por otra parte, para la identificación de cada cepa se secuenció la región IGS con los partidores 5SRNA y LR12R y se comparó (usando la herramienta AlignX) con la base de datos disponible en el laboratorio la cual posee las secuencias IGS características de todas las cepas utilizadas en este trabajo y de la mayoría de las cepas de *X. dendrorhous* disponibles en el laboratorio.

2.12 Extracción de carotenoides totales de *X. dendrorhous* y análisis mediante RP-HPLC. Los carotenoides totales se obtuvieron mediante extracción con acetona según el protocolo descrito previamente por An y colaboradores (An y col, 1989; Wozniak y col, 2011). Brevemente, se extrajo carotenoides desde muestras entre 30 y 40 ml de cultivo. Las células se cosecharon por centrifugación a 4.000 x g por 5 min y

se lavaron una vez con 10 ml de agua destilada. Se descartó el sobrenadante y el sedimento celular se suspendió en 1 ml de agua destilada, se transfirió la mezcla a un tubo de 7 ml (tapa rosca), se agregó 0,5 ml de perlas de vidrio de 0,5 mm (BioSpec) y se agitó por 3 min en el equipo Mini-bead beater-16 (BioSpec). Luego se agregó 1 ml de acetona y se agitó nuevamente por 3 min. El homogeneizado se centrifugó por 5 min a 4.000 x g y se recuperó la fase líquida. Al tubo de 7 ml que contenía los restos celulares, se le agregó 2 ml de acetona, se agitó por 3 min, se centrifugó a 4.000 x g por 5 min y se recuperó la fase líquida en el mismo tubo utilizado anteriormente. Este paso se repitió hasta que los restos celulares quedaran blancos. Posteriormente se midió el volumen de extracto de acetona finalmente recuperado y se agregó una quinta parte del volumen de éter de petróleo, se homogeneizó en vórtex por 5 min y centrifugó a 4.000 x g por 5 min. Se transfirió la fase superior a un tubo limpio y se agregó 1 ml de agua para retirar los restos de acetona. Se agitó en vórtex y se centrifugó a 4.000 x g por 5 min. Finalmente, se recuperó el éter de petróleo (fase donde se encontraban disueltos los carotenoides), se traspasó a un tubo limpio de vidrio y se registró su volumen y densidad óptica a 474 nm.

Para determinar los carotenoides totales contenidos en cada muestra procesada se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Carotenoides totales} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g de peso seco}} \right) = \left(\frac{Ep * Abs_{474} * 100 * Vol PS}{PS * 21 * Vol muestra} \right)$$

Donde Ep: volumen de éter de petróleo recuperado (ml); Abs₄₇₄: absorbancia a 474nm; Vol PS: volumen utilizado para determinar el peso seco; PS: peso seco (g) y Vol muestra: volumen de muestra utilizado para extraer los carotenoides.

Se dejó evaporar el éter de petróleo a temperatura ambiente cubriendo los tubos con papel aluminio y una vez que éste se evaporó completamente, los carotenoides se

suspendieron en acetona (80-200 μ l) y se analizó su composición en un equipo de cromatografía líquida de fase reversa (RP-HPLC, Shimadzu SPD-M10VP). Para ello se utilizó una columna Lichrosper RP18 125-4 (Merck) y como fase móvil, una mezcla de acetonitrilo: metanol: isopropanol (75:20:5) con un flujo de 1ml/min. Cada compuesto se identificó de acuerdo a su tiempo de retención y su espectro de absorción, en comparación a estándares (Mercadantey Egeland, 2004).

3 RESULTADOS

3.1 Identificación, clonación y secuenciación del gen *CYC8* de *X. dendrorhous*.

Se analizaron secuencias del genoma de *X. dendrorhous* disponibles en nuestro laboratorio y luego utilizando la herramienta BLASTx (NCBI) se comparó contra secuencias de la base de datos de GenBank. De esta manera, se logró identificar una región de aproximadamente 2,5 kpb que al ser traducida *in silico* presentaba alta identidad y similitud con un regulador general de la transcripción (Cyc8) presente en otros organismos. En base a su secuencia nucleotídica se diseñaron partidores para amplificar mediante PCR (usando *Pfu* DNA polimerasa) la región de 2,5 kpb con DNA genómico de la cepa silvestre UCD 67-385 como molde. Con la pareja de partidores GTR1Fwd y GTR1Rev (Tabla 3) se obtuvo un fragmento de aproximadamente 2.400 pb que fue purificado a partir de un gel de agarosa y posteriormente ligado en el sitio *EcoRV* del plásmido pBluescript II SK(+). Se transformó la cepa DH-5 α de *E. coli* mediante electroporación con la mezcla de ligado y se seleccionaron las colonias recombinantes en placas de medio LB suplementado con ampicilina y X-gal. Finalmente, mediante PCR de colonia se identificó un clon que poseía el vector con la región de 2.400 pb inserta, la construcción se llamó pBS_GTR (Figura 4A). Una vez purificado el plásmido pBS_GTR se determinó la orientación del fragmento clonado mediante análisis de restricción (Figura 4B) con la enzima *Bam*HI y con una combinación de las enzimas *Eco*RI y *Stu*I. Se secuenció la región clonada y se obtuvieron 14 secuencias que fueron ensambladas en una sola secuencia consenso de ~2,4 kpb usando la herramienta ContigExpress. Posteriormente, nuestro laboratorio impulsó la secuenciación del genoma completo de *X. dendrorhous*, por lo que se tuvieron nuevas secuencias disponibles para el análisis y finalmente se determinó una región genómica de 6,5 kpb que contiene el gen *CYC8* completo.

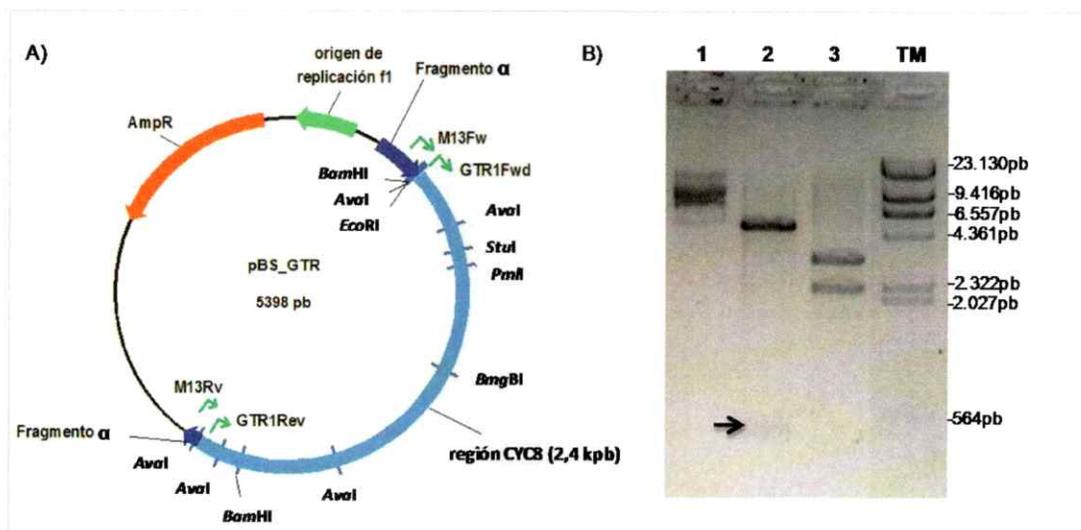


Figura 4. Plásmido pBS_GTR. A) Esquema del vector pBS_GTR indicando sitios de restricción de importancia para este trabajo y sitios de hibridación de partidores (flechas). Además, se destacan características propias del vector: AmpR (gen de resistencia a ampicilina), origen de replicación y el gen del fragmento α de la enzima β -galactosidasa interrumpido por la región CYC8 clonada. B) Análisis de restricción del plásmido pBS_GTR. Carril 1: Plásmido sin digerir; carril 2: digestión con *Eco*RI y *Stu*I (la flecha indica una banda tenue correspondiente al fragmento más pequeño); carril 3: digestión con *Bam*HI; TM: DNA del fago lambda digerido con la enzima *Hind*III.

Ésto se comprobó al secuenciar el cDNA de dicho gen. Por lo tanto, el vector pBS_GTR sólo posee una región del gen *CYC8* la cual correspondería al N-terminal de la proteína codificada. Paralelamente, se amplificó por PCR la región genómica de 2,4 kpb correspondiente al gen *CYC8* de la cepa AVHN2.4.8 (equivalente a la región clonada de la cepa UCD 67-385) y se secuenció en ambas direcciones. El interés en estudiar esta segunda cepa se debe a que AVHN2.4.8 es una cepa sobreproductora de astaxantina que deriva de la cepa nativa AVHN2 aislada a partir de hojas de avellano de la 8^{va} región de Chile. Posteriormente, mediante dos procesos secuenciales de mutagénesis química utilizando NTG se obtuvo la cepa AHN2.4.8. El análisis de la secuencia obtenida para la región *CYC8* (2,4 kpb) de AVHN2.4.8 indicó que ambas cepas (UCD 67-385 y AVHN2.4.8) presentan un 94,9% de identidad en esta región. Además, la cepa AVHN2.4.8 presentó un 99,9% de identidad respecto a su cepa parental AVHN2, en la región analizada.

3.2 Estructura génica del gen *CYC8* de *X. dendrorhous*. En una primera instancia, para determinar la secuencia del cDNA del gen *CYC8*, se utilizaron distintas parejas de partidores diseñados a partir de secuencias de DNA genómico para buscar mediante PCR el gen *CYC8* en una genoteca de cDNA de la levadura (cepa UCD 67-385) crecida en glucosa como única fuente de carbono, construida previamente en nuestro laboratorio (Marcoleta, 2007). Sin embargo, no se obtuvo resultados positivos. Por esta razón, se optó por una nueva estrategia en la cual se extrajo RNA total de un cultivo de la cepa UCD 67-385 crecido en medio YM a partir del cual se sintetizó cDNA mediante transcripción reversa (RT) utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) y el partidador oligodT¹⁸. Diversos fragmentos del cDNA del gen *CYC8* se amplificaron por PCR (con *Pfu* DNA polimerasa) utilizando la reacción de RT como

molde (RT-PCR) y distintas parejas de partidores. En total se utilizaron 10 parejas de partidores: [GTR1Fwd + GTR4Rev], [GTR2Fwd + GTR1Rev], [GTR_RT2Fwd + GTR_RT3Rev], [GTR_ORF2Fwd + GTR_RT1Rev], [GTR_RT5Fwd + oligodT³⁰], [GTR_RT6Fwd + GTR_RT7Rev], [GTR_RT5Fwd + GTR_RT7Rev], [GTR_RT1Fwd + GTR_cDNA2Rev], [GTR_RT4Fwd + GTR_RT5Rev] y [GTR_RT5Fwd + GTR_RT5Rev], obteniendo amplificadores de 890 pb, 1.182 pb, 1.709 pb, 1.403 pb, 2.200 pb, 1,648 pb, 2.136 pb, 1.744 pb, 1.229 pb y 389 pb respectivamente. Cada fragmento de DNA se secuenció y se ensamblaron en una secuencia final de 4.985 pb. Posteriormente, en el año 2011, nuestro laboratorio tuvo acceso al transcriptoma de la cepa UCD 67-385. El transcriptoma se obtuvo a partir de RNA de la levadura en fase exponencial de crecimiento, utilizando glucosa o succinato como única fuente de carbono. Con esta información fue posible obtener una secuencia final de 5.276 pb correspondiente al cDNA del gen *CYC8*, que se encontró en el transcriptoma de la levadura crecida en glucosa y también en succinato. Al comparar las secuencias de cDNA y de DNA genómico, se identificaron 9 intrones y 10 exones (Figura 5). El análisis de la secuencia del cDNA reveló la presencia de un ORF de 4.410 b el cual fue traducido virtualmente originando una proteína de 1.469 aminoácidos, con un peso molecular calculado de 155,04 kDa. Por otra parte, al someter la secuencia del ORF a un análisis bioinformático utilizando la herramienta BLAST (*blastx*, *blastp*) del Centro Nacional de información biotecnológica (NCBI) se encontró similitud con el represor transcripcional Cyc8 (Figura 5). Esta proteína es ampliamente conservada tanto en levaduras como en otros organismos eucariontes y participa junto a otras proteínas en diversos procesos entre ellos la represión catabólica. La proteína Cyc8 de *S. cerevisiae* contiene 10 repetidos tipo TPR (tetratricopéptido) en su estructura los cuales son esenciales para el cumplimiento de su función (Schultz y col, 1990; Smith y Johnson, 2000).

1891 AACCCGTATCCGCCCTACATTCACCCGATGACGGCTGGCCCCGATGGGCGTCCGACATGGTTATCCACACGCCGGTCCCGCTGATGCCGGT
661 P S E R A L P S S T V E M E W E R S R E A S A M H G G A S G
1981 CCATCCGAGCGAGCTCTCCCTTCTCCACCGTTGAGATGGAATGGGAACGATCTCGAGAAGCCTCGGCAATGCATGGAGGTCCCTCAGGT
691 T T T G G G P G Y Y S G T G S H G G R R S P F D H R R R S D
2071 ACAACAACCGGAGGGGACCGGGCTACTACTCTGGCACAGGCTCTCACGGTGGAGAAGATCTCCCTTTGATCACCGTCGACGATCGGAT
721 E S T A A S E D R G D R R G S G A R S P F P S A Y P P T A G
2161 GAAAGTACGGCTGCTTCAAGACAGGGGAGACCGAAGAGGTTGAGGCGCCAGATCTCCGTTCCCATCTGCTTATCTCCACCGGCTGGA
751 Y H H P P Q Q Q P P Q H P F H S H P A G Q E R P R S P I I
2251 TACCACCATCTCCACAACAGCAACAGCCCCCTCAACACCCATCCATAGTCACCCGCGGTTCAGGAACGCCCTCGATCACCCATCATA
781 P L S S H D S Q S A A A A A G S V V G A S A G R R Y D P T M
2341 CCTCTTAGTTCGACGACTCACAGTCTGCCGCGCTGCTGCCGTAGCGTTGTCGGCGCCTCCGCGGAAGGAGGTATGATCCCACGATG
811 N P S S N T V S N S P N S V P K H R R S S V G K G S S R M A
2431 AACCCATCTTAAACACAGTATCGAATTCCTCGAACAGCGTCCGAAACATCGAAGGTCCTCGGTCCGTAAGGCTCTTCCCGAATGGCT
841 A E E E L L S T S P A G G P S S S S A A A A V K E S G G G G
2521 GCCGAAGAGGAATGTGTAGCACTAGTCTGACGGCGGACCATCTTCATCTTCTGCCGCTGCCGCTGTCAAGGAATCAGGTGGCGGGGGA
871 G S R K R K N G T Q V G L K G E E K K A R R S R N S T T S G
2611 GGCTCAAGAAAGAGAAAAATGGTACCAGGTAGGATTGAAGGGTGAAGAGAAGAGCCAGACGGTCGAGAAGACTCGACGACTCCCGT
901 G N S K A D R A E K A E R E R G E K A D R T G G G D D E G G
2701 GGAAACAGCAAGGCCGACCGAGCGGAAAGGCAGAGAGAGAACGAGGCGAAAAGGCCGACAGGACGGTGGCGGGGATGATGAGGAGGC
931 E K A E K P E K G G R H D R T E K V D K V E K N G T S K A E
2791 GAAAAGGCAGAGAAACAGAAAAGGGAGGCCGACACGACCGGACCGAAAAGGTGGACAAGGTAGAGAAGAAGCGGACAAGTAAAGCAGAA
961 K N G K K V G D G P S L K V T L N A N S G N N K S G K N S Q
2881 AAGAATGGAAAGAGGTAGGGGACGGCCCTTCGCTCAAGGTGACGTTAAATGCAAACCTCGGCAACAACAAGTCTGGCAAAAATTCACCG
991 S S T G R S A S G P A P A A A A L R Y V D D N Y D D E D E G
2971 TCATCCACTGGGCGATCGGCATCCGACCAGCCCTGCTGCTGCCGCCCTACGATACGTCGATGACAACTATGATGATGAGGACGAAGGG
1021 S N S D A V G A A D L L M G L A G G F S F S S N Q S Q P P P
3061 TCTAATTCGGACGCTGTCGGCGCTGCCGATCTCTGATGGGTCTTCTGTTGGCTTTTCGTTTTCTTCAAACCAATCTCAACCTCCACCG
1051 P P S Q P A P L P L P S L S S P Q T Q P Q V N G V S K P T V
3151 CCTCCATCTCAACCCGCTCCGCTCCCTCTCCATCTCTTCTTCCGACAGCCAGCCGCGAGGTGAATGGAGTGTGCAAAACCAACGGTC
1081 P S V P A P P L F P V P S V T S I H N L T S P S P S S I P V
3241 CCTTCTGTCCCTGCGCCTCTCTGTTCCCGTCCCATCCGTCGACGTCGATCCACAATTTGACGAGCCGAGTCCCAGCTCTATCCCTGTT
1111 P S T T A P S T L T P K T L S S Q T Q P T T T K M T T V T T
3331 CCGTCTACAACCGCGCTTCTACTCTGACGCCTAAAACCTTGCTTCTCAGACTCAACCGACGACGACAAAGATGACAACGGTACGAGC
1141 I H V P T T K P G F S E E A L K N L R S S R P T T P M D V V
3421 ATCCACGTACCAACGACCAACCTGGATTTTCTGAAGAAGCCTTGAAGAATCTTCGATCGTCCAGGCCGACAACACCGATGGATGTCGTT
1171 P G S K D L K L G T G S T T S T P S K R S S S L V N S Q T P
3511 CCTGGATCAAAAGACCTTAAGCTGGGTACTGGGTCTACAACCTCGACCCCGTCAAAGAGGTCATGTCGCTGGTGAACCTCAAACTCCA
1201 V V A A S A T N A P I D E T I A T S P T E T S P K I E S T E
3601 GTCGTTGCTGCTTCGGCCACGAACGCACCTATCGATGAGACTATTGCGACCTCGCCAACCGAAACATCTCCTAAAATCGAATCTACTGAA
1231 D K G L P S T N A F N G G S G Q D K V G A N G A T P S S P S
3691 GACAAAGGTCTGCCCTACTAATGCCTTCAATGGAGGTTCCGGACAAGCAAGGTCGGTCAAAACGGAGCAACGCCCTAGCTCGCCCTCC
1261 I S T P A R S K E V D E P M R S T S T S S S P T R I T S A P
3781 ATTTCTACCCCGCTCGTTCAAAGGAGTTGACGAACCGATGAGATCAACGCTACTAGTCTTCTCCCAAGAATCACATCTGCCCCC
1291 D S I S G T I P A E P T L S I V K D V S M T S D H E K C P A
3871 GACTCTAATTCGGGACCATCCCGGCTGAGCCTACTTTATCGATTGTAAGAATGTCTCAATGACGAGCGATCACGAGAATGTCTCTGTT

```

1321 V P A S T S T P S S K P S S S S S N H L S R L L S P N P T P
3961 GTTCCTGCCTCCACTTCGACGCCATCATCTAAGCCGTCGAGCAGTAGCAATCATCTCAGTCGTCTTGTGTCACCCAATCCTACACCC

1351 V S A T T A P S S T P A S A L D G S S K A M P D R T A V S P
4051 GTCTCTGCGACAACAGCACCTTCGTCGACACCTGCATCAGCTCTAGACGGCTCTTCGAAAGCGATGCCGGACCGAACAGCTGTTTCTCCA

1381 Q R S P L P S M T V N L D S T M N G G E V K S T D D R K P S
4141 CAACGTTGCGCCTTGCCAAGCATGACTGTAATTTGGATTGACCATGAACGGCGGGGAAGTCAAGTCGACGGATGACCGAAAGCCGTCC

1411 P P K T L G A A N A S A S S P S P S K E K I S P V V D G D K
4231 CCCCCAAGACACTTGGAGCTGCTAATGCTTCGGCCTCGTCGCCTTCACCGAGCAAAGAAAAGATCTCGCCAGTAGTAGATGGGGACAAG

1441 I S E S E A I A E K A D G N K T N T D A D V E M E D V K A *
4321 ATCTCCGAGAGCGAGGCGATAGCCGAGAAGGCCGATGGTAACAAGACCAATACCGATGCCGACGTGAAATGGAAGATGTCAAAGCCCTGA

```

B) Estructura génica del gen *CYC8*



C) Análisis mediante BlastP (secuencia aminoacídica deducida)

Nombre de la secuencia	Cobertura	E value	Identidad
TPR-containing protein Mql1 (<i>Ustilago maydis</i>)	27%	0.0	74%
general transcriptional repressor (<i>Cryptococcus neoformans</i>)	25%	0.0	73%
general transcriptional repressor (<i>Cryptococcus gattii</i>)	25%	0.0	73%
transcriptional corepressor Cyc8 (<i>Aspergillus fumigatus</i>)	27%	0.0	68%
transcriptional corepressor Cyc8 (<i>Coccidioides posadasii</i>)	27%	0.0	67%
transcriptional corepressor Cyc8 (<i>Ajellomyces dermatitidis</i>)	31%	0.0	61%
transcriptional corepressor Cyc8 (<i>Aspergillus niger</i>)	26%	0.0	68%
RCM-1 protein (<i>Uncinocarpus reesii</i>)	27%	0.0	67%

Figura 5. Caracterización estructural del gen *CYC8* de *X. dendrorhous*. A) Secuencia nucleotídica de la región codificante y de la estructura primaria de la proteína respectiva deducida mediante traducción *in silico*. El codón de inicio y término se destacan en rojo. Los cuatro posibles motivos TPR predichos mediante la herramienta BlastP se pueden diferenciar por estar subrayados en negro (motivo I), rojo (motivo II), verde (motivo IV) y azul (motivo IV). B) Estructura exón – intrón del gen *CYC8* de *X. dendrorhous*. E: exón. Se indican con flechas la posición del codón de inicio y término de la traducción. Además, se indica la región clonada en el vector pBS_GTR con una línea roja. C) Análisis mediante BlastP de la secuencia aminoacídica deducida codificada por el ORF del gen *CYC8*. Se muestran las proteínas con mayor identidad presentes en la base de datos no redundante.

Al traducir *in silico* la secuencia del cDNA del gen *CYC8* de *X. dendrorhous* y analizar la secuencia aminoacídica obtenida utilizando la herramienta BlastP, se identificaron 4 motivos TPR (cada uno con tres repetidos en tándem) (Figura 5A) en la región N-terminal que es la más conservada entre las proteínas de los organismos comparados.

3.3 Generación de vectores para transformación. Para obtener los vectores pGTR_Hyg y pGTR_Zeo (Tabla 2), se utilizó como base el vector pBS_GTR. En primera instancia, el plásmido pBS_GTR fue digerido con la enzima *BmgBI* que posee un sólo sitio de corte en la región *CYC8* del vector (Figura 4A). La digestión del plásmido se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa y posteriormente el plásmido lineal se purificó a partir del gel. Paralelamente, el módulo de resistencia a higromicina B se liberó desde el plásmido pMN-Hyg (Tabla 2) mediante digestión con *EcoRV*. Una vez purificados tanto el vector lineal como el módulo de resistencia, éstos se ligaron y se transformó *E. coli* DH5 α mediante electroporación. Las colonias transformantes se seleccionaron en medio sólido LB suplementado con ampicilina. Como el vector pBS_GTR ya tenía interrumpido el gen *lacZ* original, todas las colonias eran blancas. Por esta razón, las colonias recombinantes se identificaron mediante PCR de colonia utilizando los partidores HF y HR (Tabla 3), que amplifican específicamente el gen *hph* de resistencia a higromicina B. Se analizaron aproximadamente 300 colonias de las cuales sólo una poseía el plásmido pGTR_Hyg (Figura 6A). Para determinar la orientación del inserto respecto del vector inicial, se purificó el plásmido y se analizó mediante PCR utilizando parejas de partidores que sólo dan origen a un amplificado en una de las orientaciones posibles (figura 6B). Para la obtención del vector pGTR_Zeo (figura 7A), el plásmido pBS_GTR se digirió con la enzima de restricción *BmgBI* y purificó a partir de un gel de agarosa.

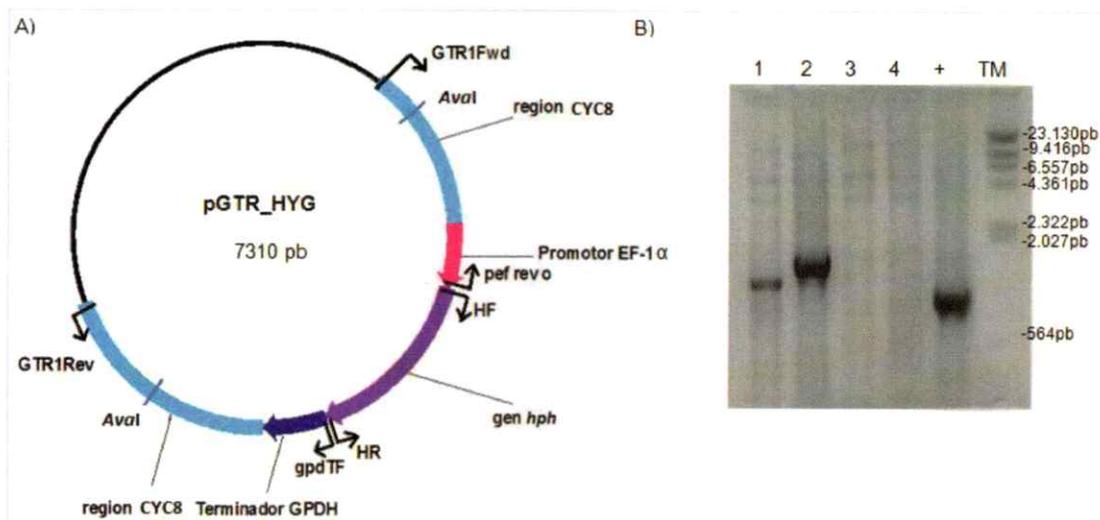


Figura 6. Vector pGTR_Hyg. A) Esquema del vector pGTR_Hyg indicando sitios de restricción *AvaI* (que permiten liberar el inserto) y sitios de hibridación de partidores (flechas) utilizados B. B) Análisis de PCR del plásmido pGTR_Hyg. Los partidores usados fueron: carril 1:GTR1Fwd y pef rev o; carril 2: GTR1Rev y gpdTF; carril 3: GTR1Fwd y gpdTF; carril 4: GTR1Rev y pef rev o; carril +: control positivo usando los partidores HF y HR, TM: DNA del fago lambda digerido con la enzima *HindIII*.

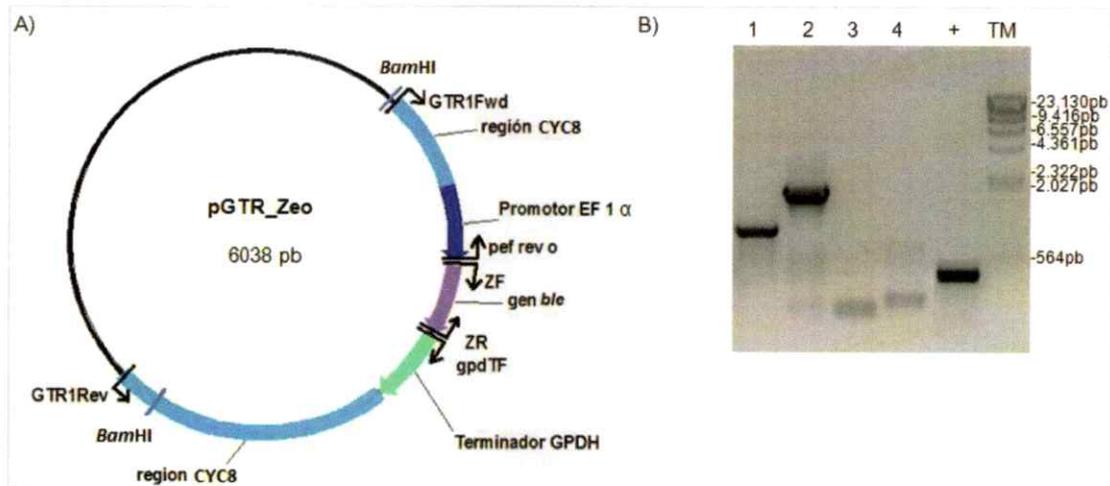


Figura 7. Vector pGTR_Zeo. A) Esquema del vector pGTR_Zeo indicando sitios de restricción *BamHI* (que permiten liberar el inserto) y sitios de hibridación de partidores (flechas) utilizados en B. B) Análisis de PCR del plásmido pGTR_Zeo. Los partidores usados fueron: carril 1:GTR1Fwd y pef rev o; carril 2: GTR1Rev y gpdTF; carril 3: GTR1Fwd y gpdTF; carril 4: GTR1Rev y pef rev o; carril +: control positivo usando los partidores ZF y ZR; carril TM: DNA del fago lambda digerido con la enzima *HindIII*.

Luego, éste se digirió con la enzima *PmlI* con el objetivo de eliminar un segmento de 527 pb del gen *CYC8* para favorecer la posterior obtención de cepas mutantes *cyc8*. Una vez purificado el vector lineal se ligó al módulo de resistencia a zeocina el cual se obtuvo mediante restricción del plásmido pZeo (Tabla 2) con *EcoRV*. Con la mezcla de ligado se transformó *E. coli* DH5 α y se seleccionaron las colonias transformantes de la misma forma que para pGTR_Hyg. Se analizaron 20 colonias mediante PCR (utilizando los partidores PEFForEV y GPDHtRev (Tabla 3) y se identificaron 8 que poseían el plásmido deseado de las cuales sólo dos se almacenaron a -80 °C. Una vez purificado el DNA plasmidial de las colonias seleccionadas, se analizó la orientación del inserto mediante PCR (figura 7B).

3.4 Obtención de mutantes *cyc8* mediante mutagénesis por reemplazo. La obtención de mutantes se llevó a cabo mediante mutagénesis por reemplazo (Niklitschek, 2008), proceso en el cual una región de uno o ambos alelos del gen *CYC8* se interrumpe o reemplaza por un módulo de resistencia a antibiótico. Antecedentes experimentales indican que la cepa silvestre UCD 67-385 es diploide (Hermosilla y col, 2003), por lo que se espera que luego de su transformación se obtenga un mutante heterocigoto (*CYC8/cyc8*). Para esto, el vector pGTR_Hyg fue digerido con la enzima *AvaI*, liberando la región del vector que contiene el módulo de resistencia a higromicina B flanqueado por secuencias del gen *CYC8* (Figura 6A). De esta manera, se espera que las regiones del gen *CYC8* presentes en el fragmento utilizado para transformar, recombinen con las regiones equivalentes presentes en el genoma de la levadura y den origen a un alelo mutante que se encuentre interrumpido por el módulo de resistencia a antibiótico (Niklitschek y col, 2008). La levadura fue transformada mediante electroporación con el vector digerido y las colonias transformantes se

seleccionaron en placas de medio YM suplementado con higromicina B. Se obtuvo seis colonias a las cuales se les extrajo DNA genómico para confirmar mediante PCR (Figura 8A) la integración del módulo de resistencia en el *locus* correcto (*CYC8*) y por ende, el reemplazo del gen silvestre por el gen mutado. De esta manera se comprobó que solo tres transformantes poseían la inserción correcta y se denominaron 385.T1, 385.T2 y 385.T3. Los tres transformantes además del gen *hph* en *CYC8*, poseían una alelo silvestre indicando que son heterocigotos. Debido a que 385.T1, 385.T2 y 385.T3 no presentaron diferencias fenotípicas ni genotípicas entre sí, para los análisis siguientes se seleccionó la cepa 385.T2 (Figura 8B). Luego de obtener el mutante heterocigoto (*CYC8/cyc8*), se intentó obtener una cepa mutante homocigota (*cyc8/cyc8*) mediante el método del doble recombinante (DRM) descrito por Niklitschek y colaboradores (Niklitschek y col, 2008). Sin embargo, no se obtuvo resultados satisfactorios por lo que se abordó una nueva estrategia. Ésta consistió en reemplazar el alelo silvestre del gen *CYC8* por un segundo módulo de resistencia a antibiótico. Para esto, la cepa 385.T2 se transformó mediante electroporación con el vector pGTR_Zeo digerido con la enzima *Bam*HI. Las células transformadas se sembraron en medio sólido YM suplementado con higromicina B y zeocina, esperando que aquellas colonias resistentes a ambos antibióticos tuviesen ambos alelos del gen *CYC8* mutados. De esta manera se obtuvo 12 posibles transformantes y se analizó el DNA genómico de 6 de ellos mediante PCR. Sólo 3 de las colonias analizadas tenían la inserción correcta y no poseían un alelo silvestre, por lo tanto correspondían a mutantes homocigotos (*cyc8 / cyc8*). Finalmente, dos colonias se seleccionaron para ser almacenadas y se denominaron 385.T2ZeoR3 y 385.T2ZeoR11; sin embargo, se seleccionó la cepa 385.T2ZeoR3 para trabajos posteriores (Figura 8C). Finalmente, se confirmó que todos los mutantes obtenidos derivaban de la cepa silvestre UCD 67-385.

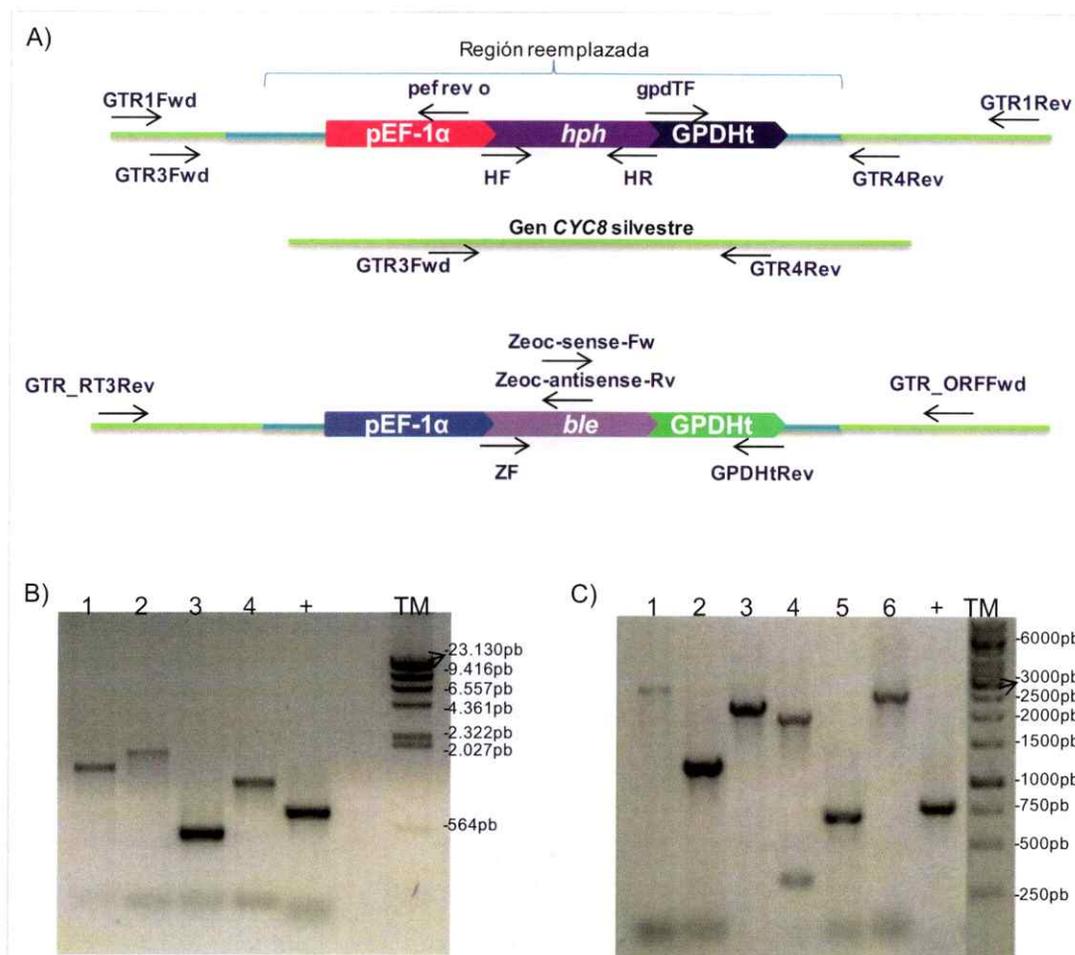


Figura 8. Análisis de PCR de los mutantes 385.T2 y 385.T2ZeoR3. Utilizando partidores específicos se confirmó el reemplazo del gen silvestre por el gen modificado. A) Esquema de los partidores utilizados (fechas). Arriba: gen *CYC8* con el módulo de resistencia a higromicina B; centro: gen *CYC8* silvestre; abajo: gen *CYC8* con el módulo de resistencia a zeocina. B) Análisis de la cepa 385.T2. Partidores utilizados: carril 1: GTR1Fwd y pef rev o; carril 2: GTR1Rev y gpdTF; carril 3: GTR3Fwd y GTR4Rev (banda de 500 pb (gen silvestre) o 2,4 kpb (gen modificado) que no se observa en este caso, ya que se favorece la amplificación del fragmento de menor tamaño); carril 4: HF y HR; +: ITS1 e ITS4 (amplifican la región ITS); TM: DNA del fago lambda digerido con la enzima *HindIII*. C) Análisis de la cepa 385.T2ZeoR3. Carril 1: GTR1Fwd y HR; carril 2: HF y HR; carril 3: ZF y GTR_ORFFwd; carril 4: zeoc-antisense-Rv y GTR_RT3Rev; carril 5: zeoc-sense-fw y GPDHtRev; carril 6: GTR3Fwd y GTR4Rev (sólo se observa la banda de 2,4 kpb correspondiente al gen modificado); +: ITS1 y ITS4; TM: GeneRuler 1 Kb ladder read.

Para esto, la región IGS de cada mutante se amplificó y secuenció con los partidores 5SRNA y LR12R. Una vez obtenidas las secuencias, estas se compararon con la secuencia de la cepa UCD 67-385 disponible en la base de datos del laboratorio, confirmando que los mutantes efectivamente derivaban de la cepa mencionada.

Paralelamente, mediante el mismo proceso descrito, se obtuvo el mutante que deriva de la cepa AVHN2.4.8. En este caso se obtuvo diez transformantes de las cuales sólo uno tenía la mutación correcta y se denominó AV.T8 (Tabla 1 y Figura 9). La cepa AV.T8 se analizó repetidas veces mediante PCR con distintas combinaciones de partidores (Figura 9). Con sólo dos parejas de partidores que amplifican regiones menores de 500 pb se detectó una región silvestre del gen *CYC8*, mientras que con combinaciones de partidores que amplifican regiones de mayor o igual tamaño, no se obtuvo un amplificado. Este resultado sugiere que AV.T8 sería un mutante hemicingoto (*cyc8*), ya que al parecer la cepa AVHN2.4.8 poseería solo una copia funcional del gen *CYC8* o dos copias no idénticas. Es importante destacar que las mismas parejas de partidores que no amplificaron al utilizar DNA genómico de AV.T8 de molde, si amplificaron cuando se uso DNA de la cepa parental AVHN2.4.8.

En este caso también se amplificó y secuenció la región IGS del mutante AV.T8. De esta manera, se confirmó que éste efectivamente deriva de AVHN2.4.8.

3.5 Caracterización de mutantes de la cepa UCD 67-385.

3.5.1 Curvas de crecimiento. Con el objetivo de evaluar cambios fenotípicos en los mutantes respecto de la cepa silvestre UCD 67-385, en primera instancia se realizaron curvas de crecimiento. Para ello, se crecieron las cepas UCD 67-385, 385.T2 y 385.T2ZeoR3, (*CYC8* / *CYC8*), (*CYC8* / *cyc8*) y (*cyc8* / *cyc8*), respectivamente, en medio líquido YM por 5 días.

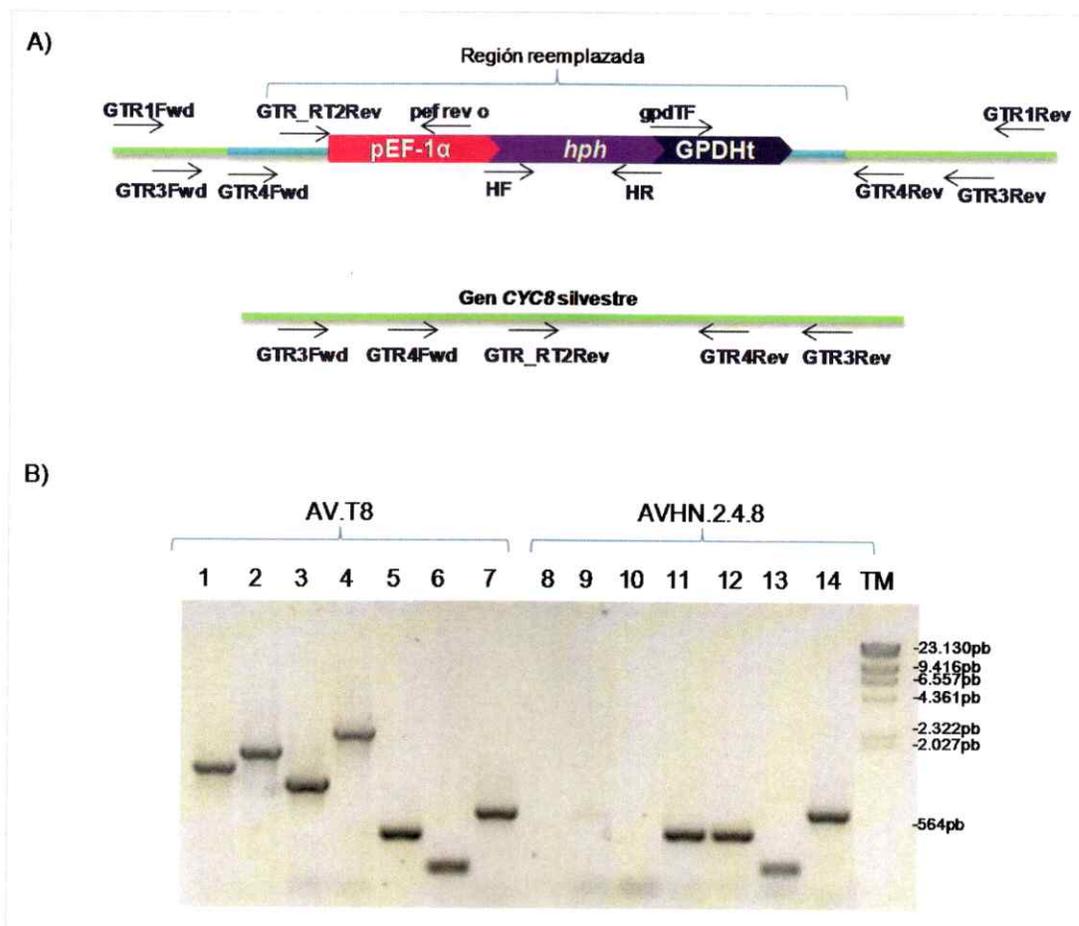


Figura 9. Análisis de PCR de la cepa mutante AV.T8. Se utilizaron partidores específicos para confirmar el reemplazo del gen silvestre por el gen interrumpido con el módulo de resistencia a higromicina B. A) Esquema de los sitios de hibridación de los partidores utilizados (flechas). Arriba: gen *CYC8* con el módulo de resistencia a higromicina B; abajo: gen *CYC8* silvestre. B) Partidores utilizados: carril 1 y 8: GTR1Fwd y pef rev o; carril 2 y 9: GTR1Rev y gpdTF; carril 3 y 10: HF y HR; carril 4 y 11: GTR3Fwd y GTR4Rev (banda de 500 pb (gen silvestre) o 2,4 kpb (gen modificado)); carril 5 y 12: GTR3Rev y GTR_RT2Rev (494 pb); carril 6 y 13: GTR4Fwd y GTR4Rev (215 pb); carril 7 y 14: ITS1 e ITS4 (control positivo); TM: DNA del fago lambda digerido con la enzima *HindIII*. En la parte superior se indican las cepas cuyo DNA fue analizado en las reacciones de la parte inferior.

Cada 8-12 h se midió la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) para evaluar el crecimiento. Se estimó el tiempo generacional de cada cepa siendo de $4,7 \pm 0,2$ h, $4,6 \pm 0,2$ h y $6,2 \pm 0,1$ h para las cepas UCD 67-385, 385.T2 y 385.T2ZeoR3, respectivamente (Figura 10A). Con esta información, se concluyó que no existe un cambio significativo en el crecimiento entre las cepas UCD 67-385 y 385.T2, mientras que la cepa 385.T2ZeoR3 sí presenta una disminución en la tasa de crecimiento respecto de las otras dos cepas estudiadas. Paralelamente, se analizó de manera cualitativa el crecimiento de las 3 cepas en medio sólido YM. Para esto, se tomaron alícuotas de cultivos a una $DO_{600} \sim 5$ y se hicieron diluciones seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-4} . Se depositaron 10 μ l de cada dilución en una misma placa de medio YM y se incubó a 22 °C tomando registros fotográficos cada 2 o 3 días (Figura 10B). En este caso se observó un pequeño retraso en la aparición de colonias de la cepa 385.T2ZeoR3 respecto de las otras dos cepas, lo que también se reflejó a largo plazo en la obtención de colonias de menor tamaño. Adicionalmente, se construyó una curva de crecimiento de las cepas UCD 67-385 y 385.T2ZeoR3 en medio mínimo líquido suplementado con glucosa (MMglu2%) como única fuente de carbono (Figura 11). Al crecer las cepas en MMglu2% se observó una disminución general en la tasa de crecimiento respecto a cuando las cepas son cultivadas en medio rico (YM). El retraso en el crecimiento se reflejó en un aumento de los tiempos generacionales siendo de $15,4 \pm 2,3$ h y $15,8 \pm 2,3$ h para las cepas UCD 67-385 y 385.T2ZeoR3, respectivamente. En este caso, no existe una diferencia significativa en el crecimiento de ambas cepas.

3.5.2 Producción de carotenoides. Para evaluar la producción de carotenoides, se tomaron muestras a lo largo de la curva de crecimiento de las cepas crecidas en medio YM.

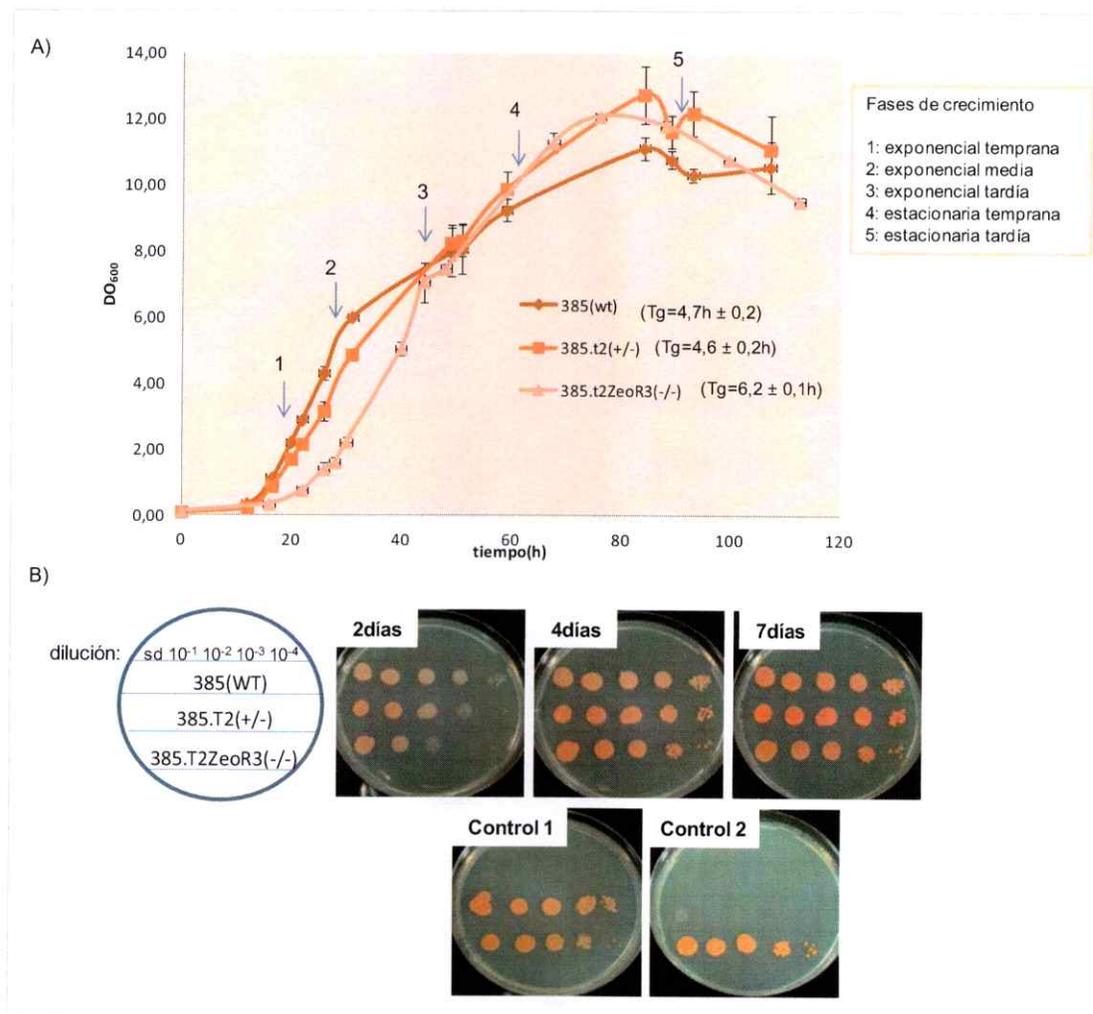


Figura 10. Crecimiento de las cepas UCD 67-385, 385.T2 y 385.T2ZeoR3. A) Curvas de crecimiento en medio líquido YM. Tg: tiempo generacional. Los datos corresponden al promedio de 3 experimentos independientes; barras: desviación estándar. B) Crecimiento en medio sólido. En la parte superior izquierda se muestra un esquema del orden de siembra y las diluciones correspondientes; sd: sin diluir. El crecimiento se registró después de 2, 5 y 7 días de incubación a 22 °C en medio YM. Control 1: YM suplementado con higromicina B; control 2: YM suplementado con higromicina B y zeocina.

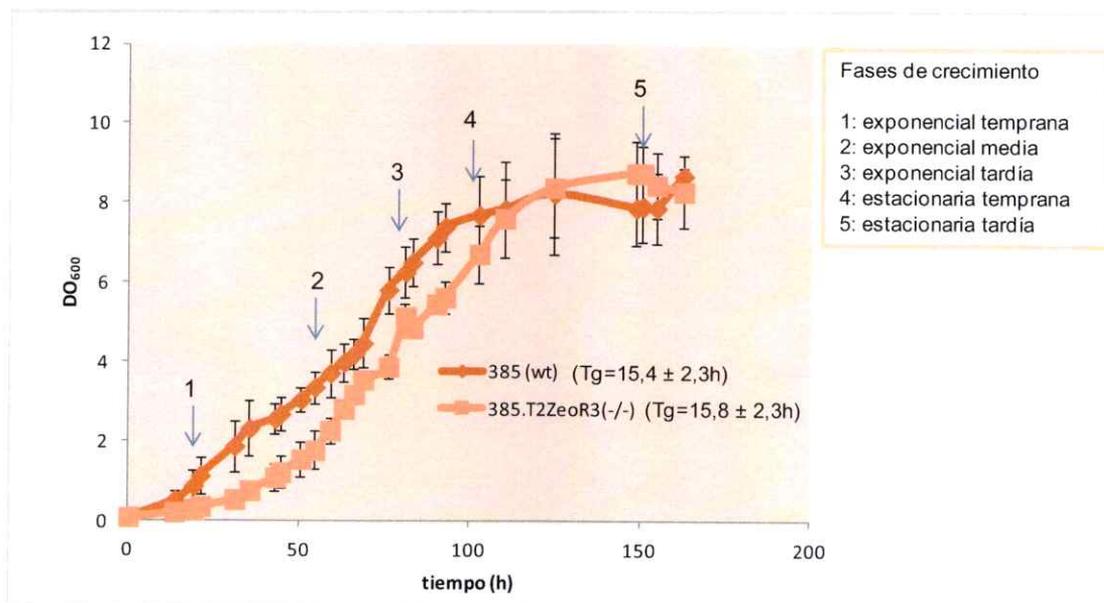


Figura 11. Crecimiento de las cepas UCD 67-385 (385) y 385.T2ZeoR3 en medio mínimo suplementado con glucosa. Curvas de crecimiento (DO_{600} versus tiempo) en medio mínimo suplementado con glucosa al 2%. T_g : tiempo generacional promedio. Los datos corresponden al promedio de al menos 3 experimentos independientes; barras: desviación estándar.

De cada cepa se tomaron 5 muestras de acuerdo a la Figura 10 (puntos 1 a 5), donde cada una corresponde a una fase de crecimiento distinta. Como control, cada vez que se tomó una muestra se sembró una dilución en medio sólido YM para confirmar que cada cultivo correspondía a una población homogénea en cuanto a pigmentación. Las distintas muestras se procesaron y analizaron en cuanto al contenido total de carotenoides y la composición de éstos. De acuerdo a los datos obtenidos, se observó que la producción de carotenoides en el mutante homocigoto 385.T2ZeoR3 comienza en estadios tempranos de crecimiento, mientras que en la cepa UCD 67-385 la producción de carotenoides se induce tardíamente sin una correlación directa con el crecimiento (Figura 12). Debido a lo anterior, la cepa 385.T2ZeoR3 alcanza una producción significativamente mayor (~7 y ~3 veces mayor que UCD 67-385 y 385.T2, respectivamente) de carotenoides totales al final de la curva de crecimiento (Figura 12A) en comparación a las otras dos cepas analizadas. En el caso de la cepa heterocigota 385.T2 se observa un fenotipo de pigmentación intermedio entre la cepa silvestre y la cepa 385.T2ZeoR3 (Figura 12). Paralelamente, se realizó un análisis cualitativo de la pigmentación, para lo cual se sembraron las distintas cepas a modo de césped en una misma placa de medio YM y se tomó un registro fotográfico cada 2 o 3 días (Figura 12B). Se observó que durante los primeros días de incubación ambos mutantes mostraron una mayor pigmentación que la cepa silvestre y que la diferencia se fue atenuando pero aun se mantuvo incluso después de 10 días de incubación.

Al analizar la composición de los carotenoides extraídos (Figura 13), se observó una fluctuación general en cuanto a la cantidad de cada compuesto a medida que se avanzó por las diferentes fases de crecimiento. Sin embargo, cabe destacar que en las tres cepas analizadas la astaxantina siempre estuvo presente en mayor proporción.

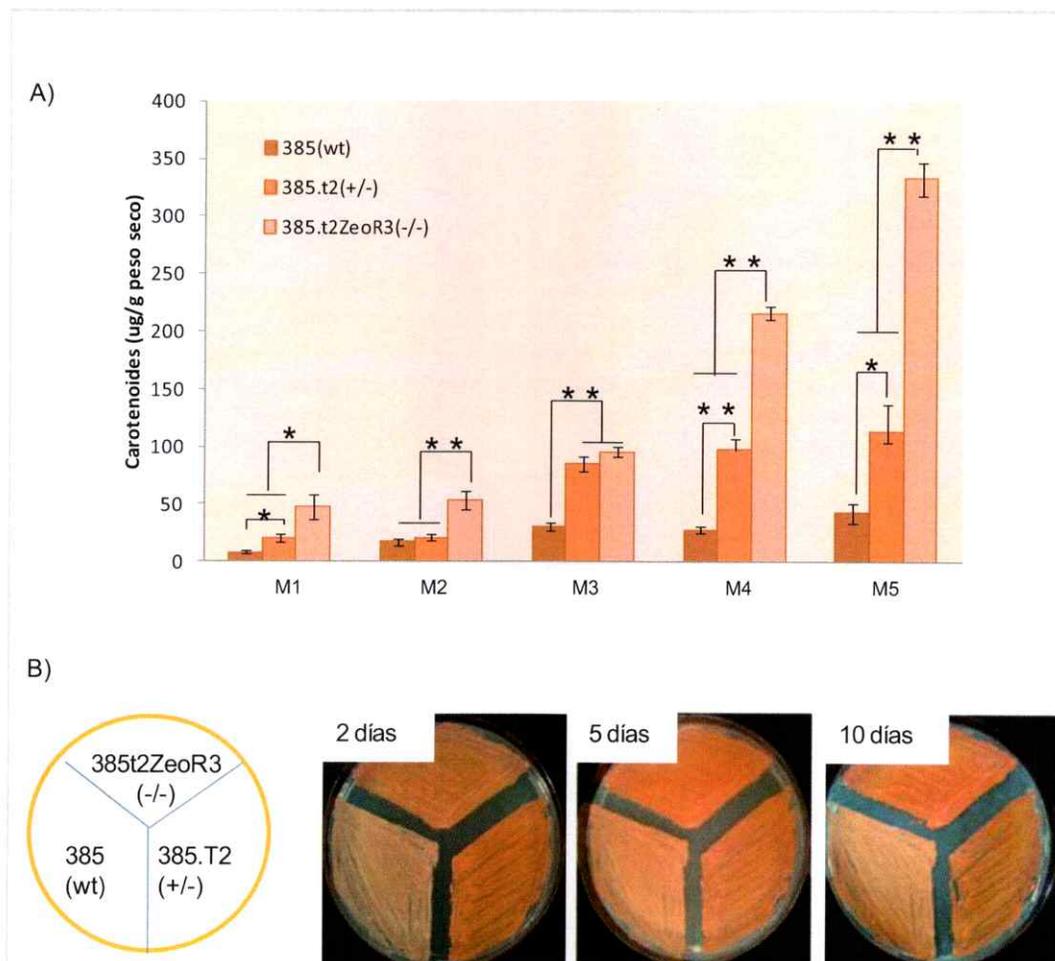


Figura 12. Producción de carotenoides de las cepas UCD 67-385 (385), 385.T2 y 385.T2ZeoR3. A) Carotenoides totales obtenidos de 5 muestras (M) representativas de distintas fases de crecimiento. B) Observación cualitativa de la coloración de las cepas crecidas en medio sólido YM a 22 °C por 10 días. Los datos de A corresponden al promedio de tres experimentos independientes; Las muestras M1, M2, M3, M4 y M5 son representativas de las fases de crecimiento exponencial temprana, exponencial media, exponencial tardía, estacionaria temprana y estacionaria tardía respectivamente (ver Figura 10). Barras: desviación estándar; prueba de t-Student *P<0,05; **P<0,01.

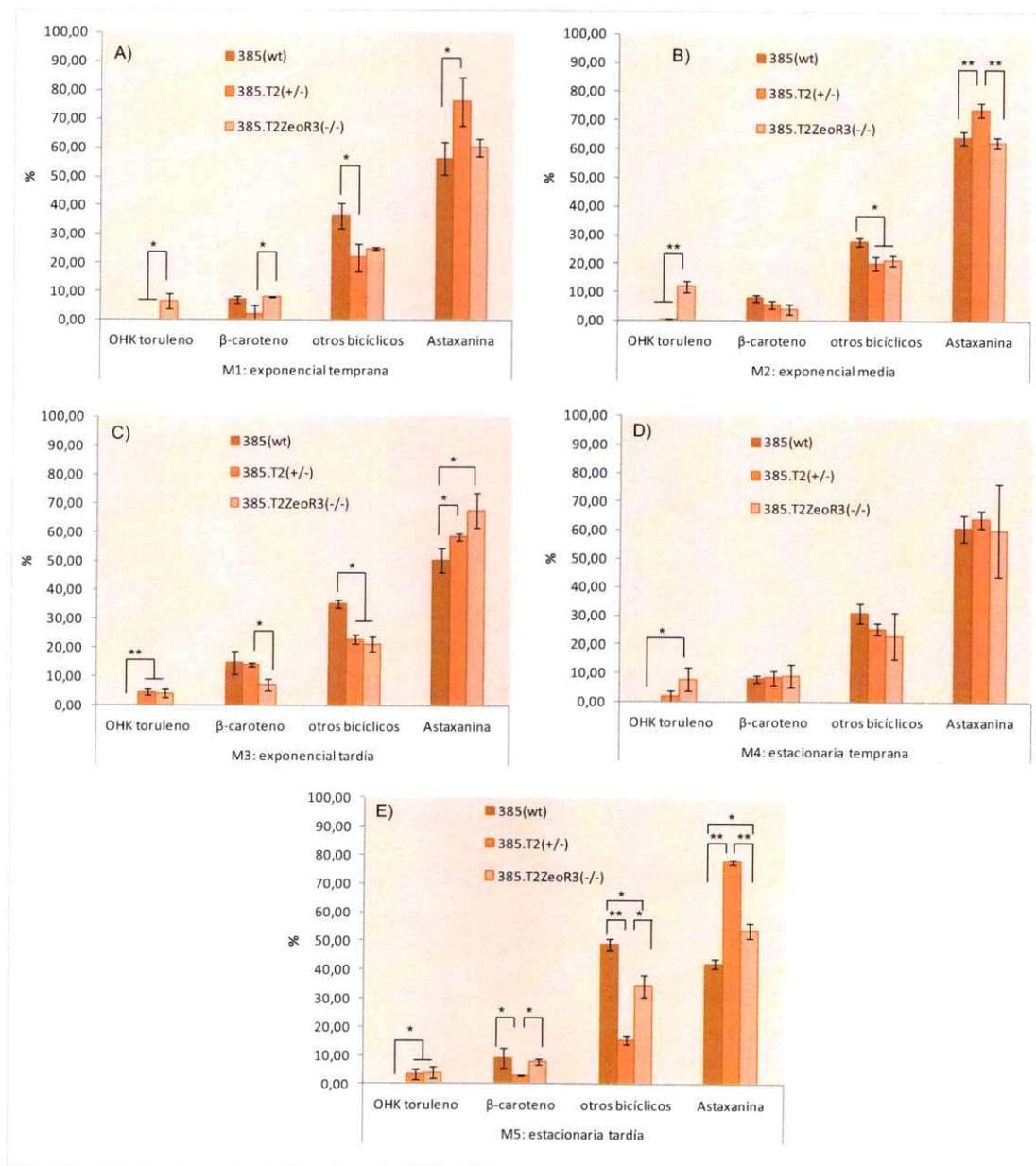


Figura 13. Análisis de la composición de carotenoides. Composición porcentual de los carotenoides extraídos a partir de las muestras descritas en la Figura 12: A) Fase exponencial temprana (M1). B) Fase exponencial media (M2). C) Fase exponencial tardía (M3). D) Fase estacionaria temprana (M4). E) Fase estacionaria tardía (M5). La categoría "otros bicíclicos": incluye los carotenoides cantaxantina, fenicoxantina, equinenona e hidroxiequinenona. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes; barras: desviación estándar; prueba de t-Student: *P<0,05; **P<0,01.

En la figura 13 se puede observar que tanto al inicio (Figura 13A; M1) como en etapas más tardías (Figura 13E; M5) de la curva de crecimiento, la cepa 385.T2 presenta un porcentaje significativamente mayor de astaxantina (~80%) que las otras dos cepas analizadas (~60%). Paralelamente, la cepa 385.T2 en estadios tardíos de crecimiento (Figura 13E) tiene una menor proporción de β -caroteno que las cepas UCD 67-385 y 385.T2ZeoR3. Estas dos últimas además presentan un mayor porcentaje de otros carotenoides bicíclicos como hidroxiequinenona, equinenona, fenicoxantina y cantaxantina que son anteriores a la astaxantina en la ruta de biosíntesis (Figura 1 y Figura 13). Cabe destacar, que una menor proporción de astaxantina en la cepa 385.T2ZeoR3, se debe a un aumento en los carotenoides anteriores en la ruta posiblemente por una producción continua de éstos. Es decir, no existe una disminución en la cantidad total de astaxantina, sino sólo disminuye el porcentaje de ésta en base al total de carotenoides. Más aún, al cuantificar la astaxantina total producida por el mutante 385.T2ZeoR3, se observó que ésta fue aumentando a lo largo de toda la curva de crecimiento alcanzando un valor final de 179 [$\mu\text{g/g}$ de peso seco], lo que equivale a diez y dos veces la astaxantina producida por la cepa silvestre (18 $\mu\text{g/g}$ de peso seco) y el mutante heterocigoto (89 $\mu\text{g/g}$ de peso seco) respectivamente.

Por otra parte, en la cepa silvestre prácticamente no se detectó el compuesto OHK-toruleno (hidroxi-ceto-toruleno), el cual es producto de una ramificación de la vía, posterior a la producción de fitoeno (Verdoes y col, 2003), mientras que en todas las muestras de carotenoides de la cepa 385.T2ZeoR3 si se detectó la presencia de este compuesto (Figura 13A-E). Paralelamente, se analizó la producción de carotenoides de las cepas UCD 67-385 y 385.T2ZeoR3 cultivadas en medio líquido MMglu2%, con

glucosa como única fuente de carbono. De esta manera es posible observar si existe una correlación directa entre el crecimiento y la producción de carotenoides en la cepa 385.T2ZeoR3 y no en la cepa UCD 67-385, donde la producción de carotenoides es gatillada una vez que la glucosa del medio se ha agotado (Lodato y col, 2003). En la figura 14 se observa que existe una diferencia significativa entre ambas cepas en la producción de carotenoides durante las primeras fases de crecimiento. En el caso de la cepa 385.T2ZeoR3, la producción de pigmentos comienza en etapas tempranas de crecimiento y se mantiene hasta el final de las etapas evaluadas, mientras que en la cepa silvestre sólo se observa una producción elevada de carotenoides en fases tardías de crecimiento (Figura 14A). A las 150 h, el contenido de carotenoides no muestra diferencias significativas entre ambas cepas, lo que contrasta con lo observado al crecer las cepas en medio completo YM (Figura 12A). Al analizar la composición de carotenoides, sólo se encontraron pequeñas diferencias entre ambas cepas bajo estas condiciones (Figura 14B-F). Entre ellas se puede destacar que la proporción de astaxantina en etapas tardías de crecimiento (Figura 14E-F: M4 y M5) es mayor en la cepa 385.T2ZeoR3 (~80%) con respecto a la cepa silvestre (~60%), lo cual no se observó tan marcadamente al crecer ambas cepas en medio YM.

3.6 Caracterización del mutante de la cepa AVHN2.4.8. El mutante AV.T8 obtenido a partir de la cepa AVHN2.4.8, fue caracterizado principalmente mediante curvas de crecimiento y observación macroscópica de la pigmentación.

3.6.1 Curvas de crecimiento. Se realizaron curvas de crecimiento de las cepas AVHN 2.4.8 y AV.T8 con el objetivo de evaluar diferencias en la tasa de crecimiento. Para esto se cultivaron ambas cepas en medio líquido YM y se registró la DO_{600} cada 8-12 h.

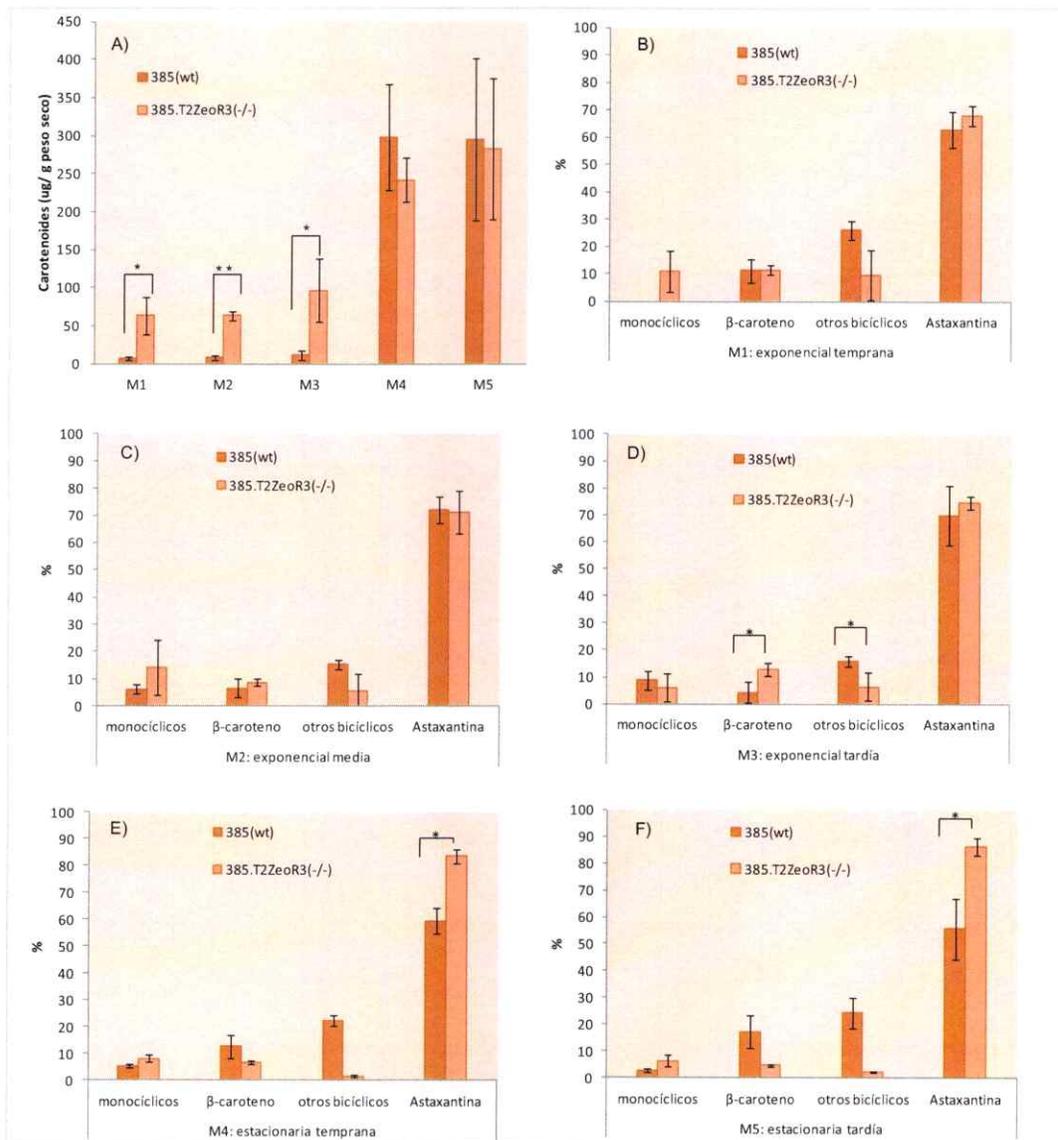
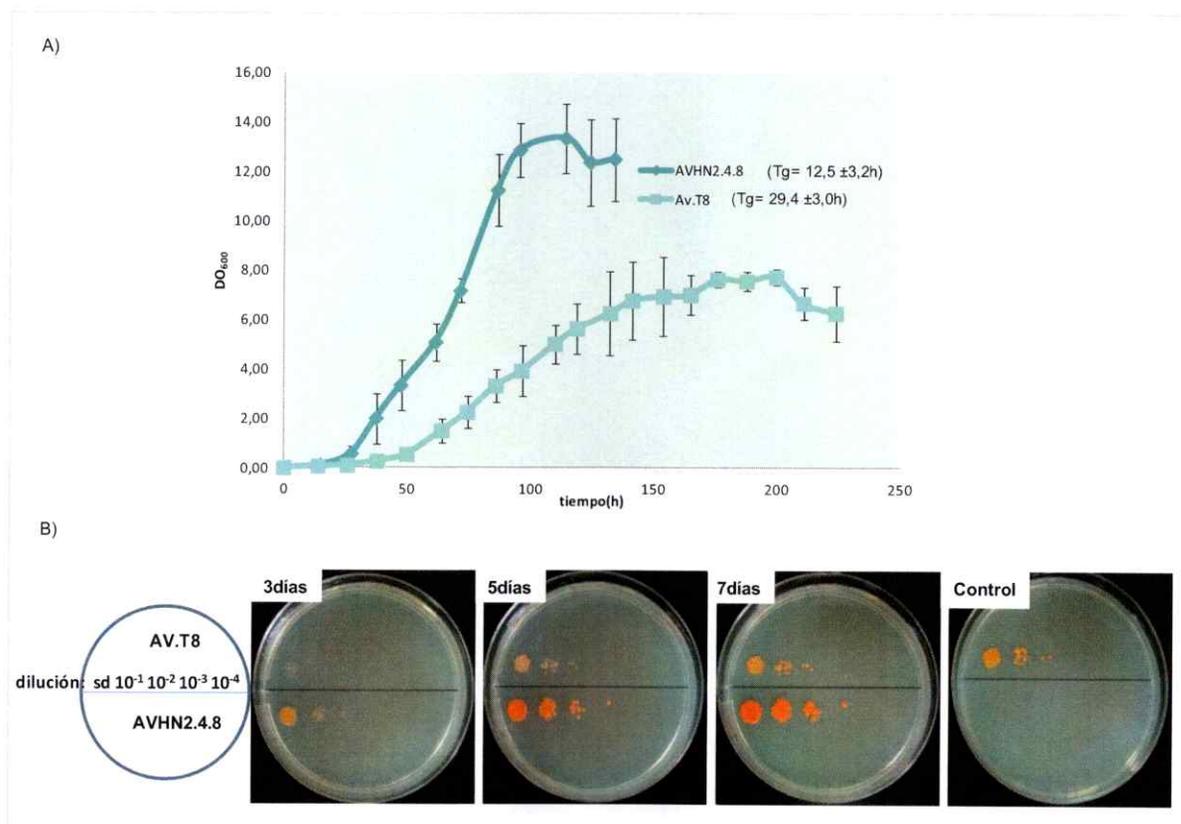


Figura 14. Carotenoides de las cepas UCD 67-385 y 385.T2ZeoR3 crecidas en MMGlu2%. A) Carotenoides totales obtenidos de 5 muestras (M) representativas de distintas fases de crecimiento. B-F): Composición porcentual de los carotenoides extraídos a partir de las muestras de A. La división “monocíclicos” incluye los carotenoides: hidroxilo ceto toruleno (OHK toruleno), toruleno, neurosporeno e hidroxilo ceto γ - caroteno (OHK γ - caroteno). La división “otros bicíclicos” incluye los carotenoides fenicoxantina, cantaxantina, hidroxiequinenona y equinenona. Prueba t-Student: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

De acuerdo a los datos obtenidos se determinó los tiempos generacionales de cada cepa, siendo $12,5 \pm 3,2$ h y $29,4 \pm 3,0$ h para AVHN2.4.8 y AV.T8, respectivamente. Según lo obtenido se pudo concluir que la cepa mutante AV.T8 presenta una disminución significativa de su tasa de crecimiento respecto de la cepa parental (Figura 15A). Paralelamente, se evaluó cualitativamente el crecimiento de ambas cepas en medio YM sólido (Figura 15B). Se prepararon distintas diluciones a partir de cultivos de ambas cepas y se sembraron en una placa de la misma manera en que se describió anteriormente para la cepa UCD 67-385 y los mutantes que derivan de esta. En este caso también se observó un retraso significativo en el crecimiento del mutante AV.T8 respecto de la cepa parental AVHN2.4.8 lo que se reflejó en una aparición tardía de las colonias de AV.T8 en la placa y en un menor tamaño de las mismas (Figura 15B).

3.6.2 Producción de carotenoides. Al igual como se realizó para la cepa UCD 67-385 y sus mutantes, en el caso de AVHN2.4.8 y AV.T8, se tomaron muestras a lo largo de la curva de crecimiento que corresponden a diferentes estadios de crecimiento de acuerdo al mismo criterio descrito anteriormente (el valor de DO_{600}). Además, a partir de cada muestra se tomaron alícuotas y se sembró una dilución en medio sólido para controlar que el cultivo correspondía a una población homogénea y no existía segregación fenotípica. En el caso de la cepa AVHN2.4.8 se observó una población homogénea de colonias, lo que no fue así para el mutante AV.T8 que presentó dos fenotipos diferentes en cuanto a la pigmentación de las colonias: colonias rojo anaranjadas y colonias amarillas (Figura 15B y 16). En este caso se aislaron ambos tipos de colonias y se analizó su DNA genómico mediante PCR confirmando que ambos tipos de colonias (rojas y amarillas) poseían la mutación correspondiente del gen *CYC8* y el módulo de resistencia a higromicina B.



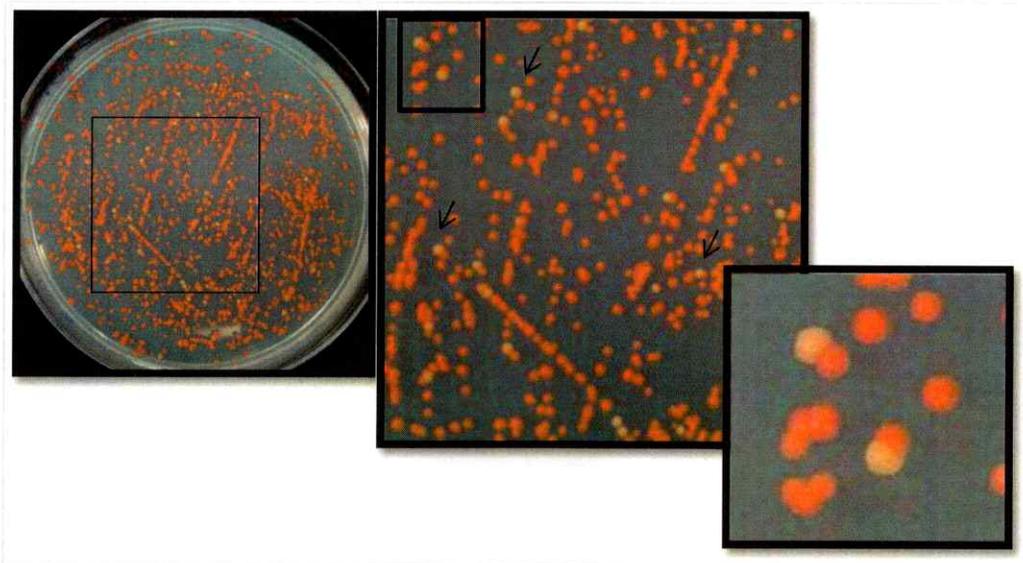


Figura 16. Segregación fenotípica del mutante AV.T8. La imagen evidencia la existencia de dos fenotipos del mutante AV.T8 en cuanto a coloración (colonias amarillas y rojo-anaranjadas). Las imágenes hacia la derecha corresponden a ampliaciones progresivas de la imagen original.

Debido a lo mencionado anteriormente, las muestras tomadas de la cepa AV.T8 no fueron procesadas para la extracción de carotenoides, ya que para obtener datos confiables y reproducibles se debe disponer de una población homogénea en cuanto a la producción de carotenoides y a la composición de estos.

4 DISCUSIÓN

4.1 Identificación, clonación y secuenciación de la región genómica del gen *CYC8* de *X. dendrorhous*.

Inicialmente mediante el análisis de secuencias genómicas de *X. dendrorhous* se logró identificar una región de 2,5 kpb correspondientes a una porción del gen *CYC8* que es homóloga a genes de reguladores transcripcionales descritos en otros organismos (Smith y Johnson, 2000; Loubradou y col, 2001; Olmedo y col, 2010). Este fragmento de DNA se clonó y secuenció con el objetivo de posteriormente demostrar su funcionalidad mediante la obtención de mutantes de este gen. El aislamiento y secuenciación de su cDNA permitió obtener su estructura génica y se determinó finalmente que el gen completo es de 6,5 kpb. El fragmento de 2,5 kpb clonado inicialmente abarca desde el exón 1 hasta el primer tercio del exón 9, lo que incluiría la región codificante de la región N-terminal de la proteína que contiene los motivos TPR determinados *in silico*. Las características mencionadas serían favorables al momento de obtener mutantes utilizando esta región como base ya que de esta manera se estaría asegurando interrumpir o eliminar una región esencial para la función de la potencial proteína que sería codificada por el gen *CYC8* (Schultz y col, 1990).

Por otra parte, la región clonada se obtuvo a partir de DNA genómico de la cepa UCD 67-385, esta misma región (proveniente de la cepa UCD 67-385) se utilizó como base para mutar dicho gen en la cepa AVHN2.4.8. Luego de amplificar y secuenciar este gen en ambas cepas (UCD 67-385 y AVHN2.4.8), se determinó que sus secuencias no son completamente idénticas (94,9% de identidad) pero sí lo suficiente para permitir la recombinación homóloga necesaria para llevar a cabo la mutagénesis por reemplazo génico realizada en este trabajo.

4.2 Estructura génica del gen *CYC8* de *X. dendrorhous*

Al obtener la secuencia del cDNA del gen *CYC8* se determinó su estructura. El gen se compone de 10 exones los cuales contienen un ORF de 4,410 pb, que al traducirse *in silico* da origen a una proteína de 1,469 aminoácidos. El análisis con la herramienta Blastp (Figura 5) arrojó altos porcentajes de identidad y similitud con represores transcripcionales ortólogos de Cyc8 (descrito principalmente en *S. cerevisiae*), el cual se encuentra altamente conservado en eucariontes. Entre estas proteínas encontramos Mql1 (Loubradou y col, 2001) y RCM-1 (Olmedo y col, 2010), las cuales se ha descrito que cumplen la misma función que Cyc8 en *S. cerevisiae*, en los microorganismos *Ustilago maydis* y *Uncinocarpus reessii*, respectivamente. Si bien no se obtuvo una de las más altas identidades al comparar con la proteína de *S. cerevisiae*, si se obtuvo alta identidad al comparar con proteínas de organismos más cercanos a *X. dendrorhous* como los basidiomicetes *Ustilago maydis* y aquellos del género *Cryptococcus*, entre otros.

Se detectaron cuatro posibles motivos TPR (Figura 5 y Figura 17A) en el análisis de la secuencia aminoacídica deducida mediante traducción *in silico* del ORF del gen *CYC8*. A pesar que se han descrito distintos repetidos tipo TPR en cuanto a la secuencia consenso que se repite, el motivo encontrado en este caso coincide en tipo y también en posición relativa dentro de la proteína con los motivos encontrados en las proteínas Cyc8 descritas en otros organismos incluyendo *S. cerevisiae* (Smith y Johnson, 2000; Loubradou y col, 2001; Olmedo y col, 2010). Esto podría indicar que existe similitud estructural, ya que usualmente estos repetidos en tándem se estructuran en una hélice con giro hacia la derecha donde el largo de la hélice depende del número de repetidos (Smith y Johnson, 2000), que en este caso es de 3 repetidos en tándem por motivo.

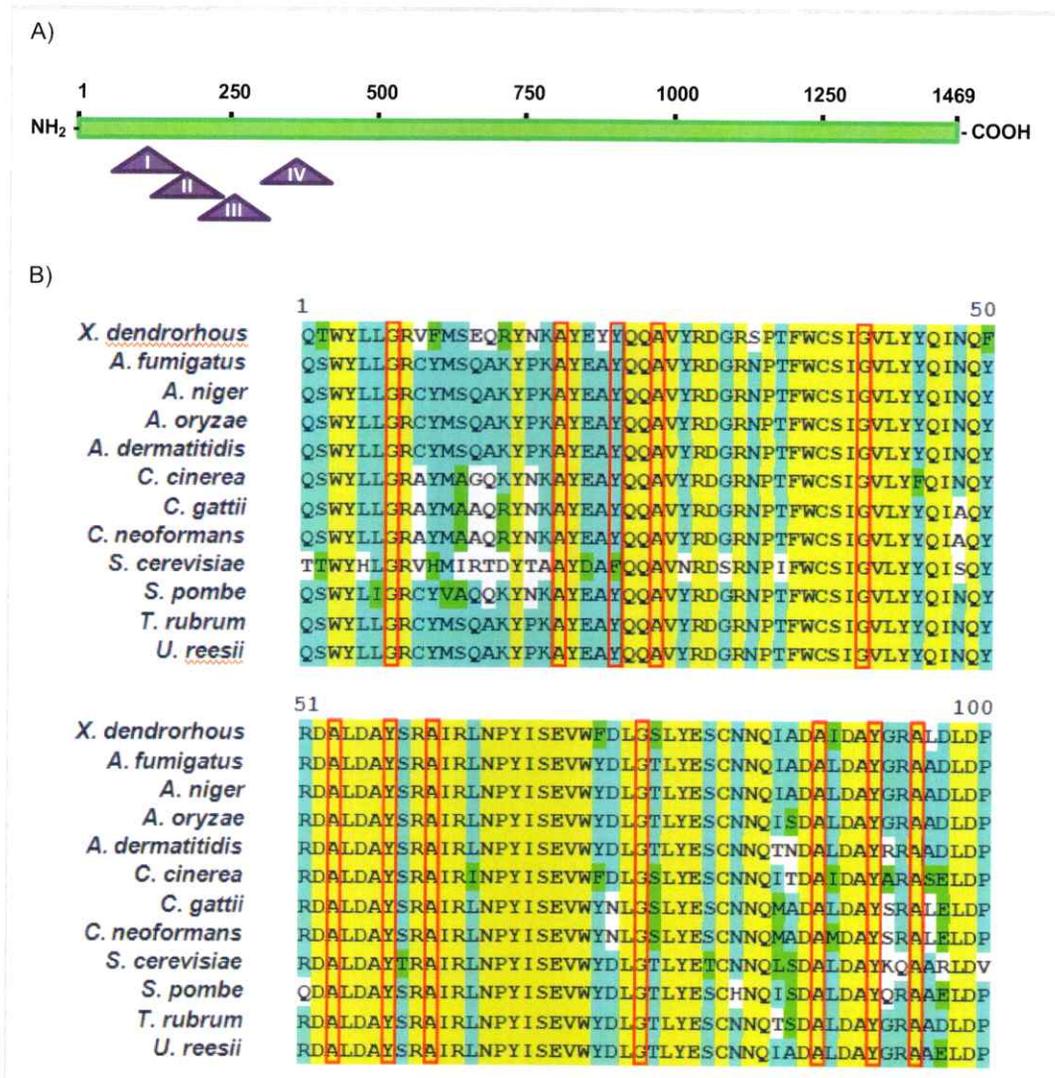


Figura 17. Dominios conservados de la potencial proteína codificada por el gen *CYC8* de *X. dendrorhous*. A) Esquema de la proteína deducida. Se destacan los 4 motivos TPR (triángulos morados: I-IV) deducidos *in silico*. B) Alineamiento múltiple de uno de los motivos TPR conservados de la posible proteína Cyc8 de *X. dendrorhous* y de otros hongos y levaduras. Los residuos se muestran coloreados de acuerdo a su similitud: Idénticos (amarillos), conservados (celeste), bloque de similares (verde) y no similares (blanco). Encerrados en rectángulos rojos se destacan los 12 aminoácidos conservados responsables de la especificidad de interacción.

Se ha descrito que los motivos TPR tienen un rol en la interacción proteína-proteína principalmente con proteínas que poseen motivos WD40 (Smith y Johnson, 2000). Respecto a lo anterior, cabe mencionar que el análisis bioinformático con la herramienta BlastP indicó que solo doce aminoácidos conservados se requieren para la especificidad de interacción (Figura 17B), los que se encuentran conservados entre los distintos repetidos TPR. Sin embargo, los motivos encontrados en la potencial proteína Cyc8 de *X. dendrorhous*, además de mantener los doce residuos específicos conservados, presentan identidad en el resto del motivo, incluso al compararlos con los presentes en la proteína Cyc8 de *S. cerevisiae* (Figura 17B). Finalmente, cabe mencionar que al observar los porcentajes de cobertura (Figura 5C), estos no superan el 30%. Lo anterior se puede deber a que en la proteína deducida de *X. dendrorhous* existen alrededor de quinientos aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal respecto a las proteínas con las que presenta identidad. Este fenómeno no es un caso aislado, puesto que también en la proteína Mig1 deducida de *X. dendrorhous* se encontró una diferencia de tamaño de alrededor de treientos aminoácidos respecto de la proteína descrita en *S. cerevisiae* (Marcoleta, 2011a). Sin embargo, diversos estudios indican que el dominio N-terminal, el cual posee los motivos TPR de la proteína Cyc8 de *S. cerevisiae* y de proteínas equivalentes en otros organismos, es el único dominio funcional de este corepresor (Trumbly, 1988; Tzamarias y Struhl, 1995) y éste presenta alta similitud con la proteína deducida de *X. dendrorhous*.

De acuerdo a lo anterior, se considera válido proponer que el gen estudiado en este trabajo corresponde a un ortólogo del gen que codifica el co-represor transcripcional Cyc8 presente en *S. cerevisiae*, aunque esto debe ser confirmado con estudios complementarios.

4.3 Funcionalidad del gen *CYC8* de *X. dendrorhous*.

La funcionalidad se analizó mediante la obtención de cepas mutantes del gen *CYC8*. Para ello se utilizó la técnica de mutagénesis por reemplazo génico que se basa en el proceso natural de recombinación homóloga de la célula para intercambiar un alelo silvestre por un alelo modificado. Esta técnica ha sido previamente validada para la obtención de mutantes de *X. dendrorhous* (Alcaíno y col, 2008; Niklitschek y col, 2008) y la caracterización funcional de los genes mutados.

En el caso de la cepa UCD 67- 385 no hubo dificultades para obtener los mutantes. Los alelos silvestres fueron reemplazados por módulos de resistencia a antibióticos flanqueados por secuencias que permitieron la recombinación correspondiente. Como se mencionó anteriormente, la región modificada coincide con el DNA que codifica la región N-terminal de la proteína deducida, lo que probablemente provocaría una pérdida de función de la proteína.

En el caso de la cepa sobreproductora AVHN2.4.8 se desconoce estrictamente el número de copias del gen *CYC8*. Por esto, hubo dificultad para determinar si el mutante AV.T8 obtenido poseía aun una copia del gen silvestre. Sin embargo, mediante análisis de PCR no fue posible detectar una región silvestre que si se detectó repetidas veces en la cepa parental (Figura 9). Sin embargo, al analizar una región más pequeña del gen, si fue posible detectar la presencia de un posible segundo alelo. Lo anterior en conjunto con el drástico cambio en el fenotipo obtenido (bastante diferente del parental), lleva a pensar que el posible segundo alelo no sería idéntico al mutado y aparentemente tampoco sería funcional.

A simple vista notamos diferencias en la pigmentación de las cepas mutantes obtenidas, principalmente en la cepa 385.T2ZeoR3. Además se observó claramente un retraso en el crecimiento del mutante AV.T8 respecto de su parental. Considerando que *Cyc8* es un co-represor general de la transcripción y funciona en conjunto con diferentes proteínas regulando la expresión de diversos genes, es de esperar que mutantes en el gen correspondiente en *X. dendrorhous* tenga efectos pleiotrópicos afectando distintos aspectos celulares, entre estos el crecimiento y la carotenogénesis.

En primera instancia se analizó el crecimiento de las cepas obtenidas. Una de las cualidades positivas de *X. dendrorhous* es su crecimiento relativamente rápido (Yamane y col, 1997; Frengova y Beshkova, 2009). Por esto, resulta favorable obtener mutantes cuya tasa de crecimiento no se retrase respecto de la cepa silvestre. La cepa mutante 385.T2 no presentó diferencias significativas en el crecimiento respecto de la cepa silvestre. Por otra parte, el mutante homocigoto (*cyc8*⁻ / *cyc8*⁻) sí presentó un leve retraso en el crecimiento lo que se reflejó en un tiempo generacional mayor y colonias de menor tamaño (Figuras 10 y 11). En contraste, el mutante AV.T8 que deriva de la cepa AVHN2.4.8, mostró un retraso significativo en el crecimiento respecto a la cepa parental (Figura 15) y un cambio en el tiempo generacional de 12,5 h para la cepa parental a 29,4 h en la cepa mutante. Este resultado concuerda con lo observado en *S. cerevisiae*. La mutación *cyc8*⁻ en esta última levadura genera varios cambios fenotípicos y entre ellos se encuentra un retraso en el crecimiento (Limbach y Zitomer, 2000; Smith y Johnson, 2000; Schüller, 2003).

La cepa AVHN2.4.8 es sobreproductora de astaxantina producto de una serie de procesos de mutagénesis al azar con NTG, por lo que se desconocen los genes afectados en esta cepa. De acuerdo a lo anterior, es posible que la cepa AVHN2.4.8 se

encuentre “desregulada” en más de un proceso y que añadir una mutación extra que además puede alterar varios aspectos, resulte en un fenotipo tan drástico como el observado a diferencia de lo ocurrido en las mutantes derivadas de la cepa UCD 67-385 la cual es una cepa silvestre.

Existen diversos antecedentes que indican que la carotenogénesis está regulada por represión catabólica (Lodato y col, 2007; Marcoleta, 2011a; Marcoleta y col, 2011b; Wozniak y col, 2011). Dado que el gen *CYC8* de *X. dendrorhous*, posiblemente codifica un ortólogo del co-represor transcripcional *Cyc8* (que participa en represión catabólica) (Smith y Johnson, 2000; Schüller, 2003), esperábamos que mutar este gen provocara un aumento en la producción de carotenoides. Efectivamente, al analizar la producción de carotenoides de las cepas 385.T2 y 385.T2ZeoR3 al ser cultivadas en medio YM, se observaron diferencias significativas respecto de la cepa silvestre. Principalmente, la producción de carotenoides en la mutante 385.T2ZeoR3 comienza en etapas tempranas de crecimiento y es continua hasta fases tardías. Si bien en la cepa 385.T2 también se observan diferencias respecto de la cepa silvestre, éstas no son tan evidentes en etapas tempranas de crecimiento (Figura 12). Este resultado indica que probablemente en el mutante homocigoto (*cyc8*⁻ / *cyc8*⁻) una o más rutas metabólicas no están reprimidas a diferencia de la cepa silvestre, provocando un aumento en la producción de carotenoides en etapas tempranas de crecimiento cuando la glucosa es la principal fuente de carbono. La observación anterior se confirmó al cultivar las cepas UCD 67-385 y 385.T2ZeoR3 en MMGlu2% (Figura 14A). En este caso se observó una correlación directa entre la producción de pigmentos y el crecimiento en el mutante, mientras que en la cepa silvestre la producción de carotenoides se hace evidente solo a partir de la fase exponencial tardía o fase

estacionaria temprana de crecimiento, etapas donde se sabe que la glucosa presente en el medio ha disminuido significativamente (Lodato y col, 2007; Wozniak y col, 2011). En cuanto a la producción total de carotenoides obtenidos al final de la curva de crecimiento (en medio YM), también se observaron diferencias, donde la cepa 385.T2ZeoR3 presentó un contenido de carotenoides significativamente mayor que el mutante heterocigoto y la cepa silvestre (Figura 12). En contraste a lo observado en medio YM, al cultivar las cepas en MMGlu2% no se observó una diferencia significativa en el contenido final de carotenoides entre el mutante homocigoto y la cepa silvestre. Considerando que el medio YM es un medio complejo que además de glucosa al 1% contiene otros componentes y azúcares (como maltosa), es posible que se mantenga un cierto nivel de represión, lo que impediría una producción mayor de carotenoides en la cepa silvestre durante el período de tiempo analizado en este trabajo. Además, se ha descrito que la producción de etanol a partir de glucosa y el posterior consumo de éste por parte de la levadura, estimula la producción de carotenoides (Marcoleta y col, 2011b). En medio MMGlu2% la cantidad de etanol producido por la levadura (~2 g/l) (Wozniak, 2008) es aproximadamente el doble que en medio YM (~1 g/l) (Lodato y col, 2007), por lo que esto también podría provocar una diferencia en la producción de pigmentos al cultivar la levadura en medio YM o MMGlu2%.

Por otra parte, es posible que exista más de un mecanismo de regulación de la biosíntesis de carotenoides en *X. dendrorhous* a nivel transcripcional, ya que según estudios transcriptómicos de qRT-PCR de los genes carotenogénicos se ha demostrado que no hay una relación directa entre su transcripción y la síntesis de pigmentos, lo que sugiere que mecanismos de regulación post-transcripcional y/o traduccional estarían involucrados (Marcoleta y col 2011b). Debido a lo anterior, mutar

un sólo componente de uno de los posibles circuitos regulatorios, no sería suficiente para obtener un cambio muy significativo en la producción de pigmentos, ya que existen otros factores, aparte de la glucosa, que también afectan la carotenogénesis como por ejemplo la presencia de especies reactivas de oxígeno (Schroeder y col, 1995), entre otros.

El análisis de la composición de carotenoides reveló pequeñas diferencias entre las cepa silvestre y mutantes. Sin embargo, destaca una mayor proporción de astaxantina y menor de β -caroteno en la cepa 385.T2 en comparación a las otras dos cepas en estadios tardíos de crecimiento (Figura 13). Esto sugiere una mayor conversión de β -caroteno en astaxantina. Por otra parte, en la cepa silvestre no se detectó el compuesto monocíclico OHK-toruleno mientras que sí se encontró en las cepas mutantes, lo cual puede indicar que uno o más genes involucrados en la síntesis de este compuesto pueden estar desregulados en los mutantes (Figura 13). En contraste a lo anterior, al crecer las cepas UCD 67-385 y 385.T2ZeoR3 en MMGlu2% prácticamente no se observó diferencias en la composición, excepto en etapas tardías donde el contenido de astaxantina fue mayor en la cepa mutante, lo cual concuerda con lo obtenido en medio YM anteriormente (Figura 13 y 14). Esto puede deberse a una alteración en la regulación de uno o más genes involucrados en los distintos pasos de síntesis de carotenoides.

Finalmente, al evaluar cualitativamente la pigmentación del mutante AV.T8, se observó la presencia de dos fenotipos diferentes en cuanto a la pigmentación de las colonias, encontrándose colonias amarillas y rojo-anaranjadas. Sorprendentemente se logró demostrar mediante análisis de PCR que ambos tipos de colonias poseían la misma mutación en el gen *CYC8*. En este trabajo se comprobó que la cepa parental

AVHN2.4.8, a pesar de poseer mutaciones al azar, es estable al crecerla en medio YM. Esto sugiere, que la inestabilidad observada en el mutante AV.T8 (*cyc8*; derivado de AVHN2.4.8) sería consecuencia de la mutación introducida en este estudio. Hasta la fecha, variados fenotipos han sido asociados con la mutación del regulador transcripcional *Cyc8* (Gancedo, 1998; Limbach y Zitomer, 2000; Schüller, 2003). Sin embargo, no existen antecedentes claros que permitan explicar la inestabilidad provocada en la cepa AV.T8. Considerando que esta cepa además porta mutaciones al azar, resulta difícil interpretar de forma precisa el fenómeno observado.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se puede afirmar que el gen *CYC8* está involucrado directa o indirectamente en un mecanismo regulatorio del proceso de biosíntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*. Estudios previos advierten la presencia de "cajas *mig1*" en las regiones promotoras de los genes carotenogénicos *crtI*, *crtYB* y *crtS* (Marcoleta, 2011a; Wozniak y col, 2011). Dado que Mig1 y Cyc8 actúan en conjunto para llevar a cabo la regulación por glucosa (Schüller, 2003), se sugiere que el cambio en la producción y composición de carotenoides en las cepas mutantes del gen *CYC8*, podría ser el resultado de una alteración en la expresión de los genes *crtI*, *crtYB* y *crtS*. Para comprobar esta hipótesis, considerando que *CYC8* actuaría como un represor de la transcripción, es necesario realizar estudios a nivel de la expresión (mRNA) de dichos genes en las cepas mutantes del gen *CYC8*. Aun así, queda mucho por estudiar para descifrar completamente cómo es posible que el producto del gen *CYC8* influya sobre la carotenogénesis y si otros factores estarían actuando en conjunto con él.

5 PROYECCIONES

En vista de lo expuesto anteriormente, sería interesante continuar estudiando la función del gen *CYC8* de *X. dendrorhous* a distintos niveles, entre ellos:

- Evaluar el efecto de la mutación de este gen en la expresión de genes carotenogénicos y genes regulados por glucosa a nivel de mRNA en distintas fases de crecimiento y en variadas fuentes de carbono.
- Identificar los genes que codifican para los otros factores (Tup1 y Snf1) que potencialmente tendrían un rol en el mismo mecanismo regulatorio que la proteína codificada por el gen *CYC8*. En el caso de encontrar dichos genes sería interesante caracterizarlos genética y funcionalmente de manera de tener una visión más completa de cómo este mecanismo podría estar regulando la carotenogénesis en *X. dendrorhous*.
- Evaluar la funcionalidad del gen *CYC8* mediante ensayos de complementación heteróloga en cepas *cyc8⁻* de *S. cerevisiae*.

6 CONCLUSIONES

- De acuerdo a los resultados obtenidos, es posible concluir que el gen *CYC8* de *X. dendrorhous* codifica un potencial co-represor transcripcional, homólogo del gen *CYC8* presente en *S. cerevisiae* y otras levaduras, el cual tiene un efecto represor sobre la producción de carotenoides, principalmente en fases tempranas de crecimiento. Lo anterior se desprende de los resultados obtenidos, ya que, en el mutante homocigoto (*cyc8⁻/cyc8⁻*) se observó un aumento significativo en la producción de carotenoides, además de cambios en la composición de éstos, en comparación con la cepa silvestre. Por otra parte, este mutante presentó un retraso en el crecimiento, lo que también se ha descrito para mutantes *cyc8⁻* en otros organismos.
- Se obtuvieron evidencias que sugieren que la carotenogénesis en *X. dendrorhous* estaría regulada, al menos en parte, por el mecanismo de represión catabólica donde el factor Cyc8 actuaría como un co-represor de acuerdo a lo descrito previamente en otras especies. Lo anterior, es apoyado por estudios previos que demuestran que existe represión de la carotenogénesis en presencia de glucosa.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Adrio, J.L. y Veiga, M. (1995). Transformation of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnology techniques*, 9, 509-512.
- Alcaíno, J., Barahona, S., Carmona, M., Lozano, C., Marcoleta, A., Niklitschek, M., Sepúlveda, D., et al. (2008). Cloning of the cytochrome p450 reductase (*crtR*) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC microbiology*, 8, 169.
- An, G. H., Schuman, D. B. y Johnson, E. A. (1989). Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Applied and environmental microbiology*, 55, 116-124.
- Baeza, M., Retamales, P., Sepúlveda, D., Lodato, P., Jiménez, A. y Cifuentes, V. (2009). Isolation, characterization and long term preservation of mutant strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of basic microbiology*, 49, 135-141.
- Bjerkeng, B. (2000). Carotenoid pigmentation of salmonid fishes - recent progress. . En Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R. *Avances en Nutrición Acuícola V*. pp 71-89. *Memorias del V simposium internacional de nutrición Acuícola 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.*
- De la Fuente, J. L., Rodríguez-Sáiz, M., Schleissner, C., Díez, B., Peiro, E. y Barredo, J. L. (2010). High-titer production of astaxanthin by the semi-industrial fermentation of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of biotechnology*, 148, 144-146.
- Flores-Cotera, L. B., Martín, R. y Sánchez, S. (2001). Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium. *Applied microbiology and biotechnology*, 55, 341-347.
- Frengova, G. I. y Beshkova, D. M. (2009). Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 36, 163-180.
- Gancedo, J. M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62, 334-361.
- Golubev, W. (1995). Perfect State of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phafia Rhodozyma*). *Yeast*, 11, 101-110.
- Gu, W. L., An, G. H. y Johnson, E. A. (1997). Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 19, 114-117.
- Hermosilla, G., Martínez, C., Retamales, P., León, R. y Cifuentes, V. (2003). Genetic determination of ploidy level in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 84, 279-287.
- Hu, Z.-C., Zheng, Y.-G., Wang, Z. y Shen, Y.C. (2005). Effect of sugar-feeding strategies on astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *World journal of microbiology and biotechnology*, 21, 771-775.

- Hu, Z.-C., Zheng, Y.-G., Wang, Z. y Shen, Y.C. (2006). pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Enzyme and microbial technology*, 39, 586-590.
- Jones, E.W., Pringle, J.R., Broach, J. R. (1992) The Molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces* Vol 2. En Johnston, M y Carlson, M. Carbon and phosphate utilization. pp 193-242. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Kajiwara, S., Fraser, P. D., Kondo, K. y Misawa, N. (1997). Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, 426, 421-426.
- Kim, S.-K., Lee, J.-H., Lee, C.-H. y Yoon, Y.C. (2007). Increased carotenoid production in *Xanthophyllomyces dendrorhous* G276 using plant extracts. *Journal of microbiology* (Seoul, Korea), 45, 128-132.
- Libkind, D., Moliné, M., de García, V., Fontenla, S. y van Broock, M. (2008). Characterization of a novel South American population of the astaxanthin producing yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 35, 151-158.
- Libkind, D., Ruffini, A., van Broock, M., Alves, L. y Sampaio, J. P. (2007). Biogeography, host specificity, and molecular phylogeny of the basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma* and its sexual form, *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied and environmental microbiology*, 73, 1120-1125.
- Limbach, M. P., y Zitomer, R. S. (2000). The isolation and characterization of missense mutants in the general repressor protein Ssn6 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular general genetics*, 263, 455-462.
- Lodato P., Alcaíno, J., Barahona, S., Niklitschek, M., Carmona, M., Wozniak, A., Baeza, M., Jiménez, A. y Cifuentes V. (2007). Expression of the carotenoid biosynthesis genes in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biological research* 40, 73-84.
- Lodato, P., Alcaíno, J., Barahona, S., Retamales, P. y Cifuentes, V. (2003). Alternative splicing of transcripts from *crtI* and *crtYB* genes of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied and environmental microbiology*, 69, 4676-4682.
- Loubradou, G., Brachmann, a, Feldbrügge, M. y Kahmann, R. (2001). A homologue of the transcriptional repressor Ssn6p antagonizes cAMP signalling in *Ustilago maydis*. *Molecular microbiology*, 40, 719-730.
- Marcoleta, A. (2007). Identificación y caracterización de genes que se expresan en el metabolismo fermentativo de *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Seminario de Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular, Facultad de ciencias, Universidad de Chile.
- Marcoleta, A. (2011a). Regulación transcripcional de la ruta de biosíntesis de astaxantina de *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis de Doctorado en ciencias mención Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Marcoleta, A., Niklitschek, M., Wozniak, A., Lozano, C., Alcaíno, J., Baeza, M. y Cifuentes, V. (2011b). "Glucose and ethanol-dependent transcriptional regulation of the astaxanthin biosynthesis pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous*". *BMC microbiology*, 11, 190.

- Mercadante, A.Z. y Egeland, E.S. (2004). Carotenoids. Handbook. Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. Birkhäuser Verlag Basel-Boston-Berlin.
- Miller, M. W., Yoneyama, M., y Soneda, M. (1976). *Phaffia*, a New Yeast Genus in the *Deuteromycotina* (*Blastomycetes*). International journal of systematic bacteriology, 286-291.
- Misawa, N. y Shimada, H. (1997). Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. Journal of biotechnology, 59, 169-181.
- Najafi, N., Ahmadi, A. reza, Hosseini, R. y Golkhoo, S. (2011). Gamma irradiation as a useful tool for the isolation of astaxanthin-overproducing mutant strains of *Phaffia rhodozyma*, Can. J. Microbiol, 57, 1-5.
- Niklitschek, M. (2007). Desarrollo de un casete de resistencia a antibiótico en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Seminario de Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile
- Niklitschek, M., Alcaíno, J., Barahona, S., Sepúlveda, 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*. Biological research, 41, 93-108.
- Ojima, K., Breitenbach, J., Visser, H., Setoguchi, Y., Tabata, K., Hoshino, T., Van den Berg, J., et al. (2006). Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a beta-carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. Molecular genetics and genomics, 275, 148-158.
- Olmedo, M., Navarro-Sampedro, L., Ruger-Herreros, C., Kim, S.-R., Jeong, B.-K., Lee, B.-U. y Corrochano, L. M. (2010). A role in the regulation of transcription by light for RCO-1 and RCM-1, the *Neurospora* homologs of the yeast Tup1-Ssn6 repressor. Fungal genetics and biology, 47, 939-952.
- Osterlie, M., Bjerkeng, B. y Liaaen-Jensen, S. (1999). Accumulation of Astaxanthin all-E, 9Z and 13Z Geometrical Isomers and 3 and 3' RS Optical Isomers in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) is selective. The journal of nutrition, 391-396.
- Rolland, F., Winderickx, J. y Thevelein, J. M. (2002). Glucose-sensing and signalling mechanisms in yeast. FEMS yeast research, 2, 183-201.
- Romero, I.(2010). Participación del gen farnesil pirofosfato sintasa en la biosíntesis de astaxantina en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Seminario de Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Sambrook, J y Russell D. W. (2001). Molecular Cloning. A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandmann, G. (2001). Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. Archives of biochemistry and biophysics, 385, 4-12.
- Schmidt, I., Schewe, H., Gassel, S., Jin, C., Buckingham, J., Hümbelin, M., Sandmann, G., et al. (2011). Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma*/*Xanthophyllomyces dendrorhous*. Applied microbiology and biotechnology, 89, 555-571.

- Schroeder, A. y Johnson, E. A. (1993). Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia Rhodozyma*. *Food Microbiology*, 139, 907-912.
- Schroeder, W. A. y Johnson, E. A. (1995). Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *The Journal of biological chemistry*, 270, 18374-18379.
- Schüller, H.-J. (2003). Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics*, 43, 139-160.
- Schultz, J., Marshall-Carlson, L. y Carlson, M. (1990). The N-terminal TPR region is the functional domain of SSN6, a nuclear phosphoprotein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 10, 4744-4756.
- Smith, R. L. y Johnson, a D. (2000). Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends in biochemical sciences*, 25, 325-330.
- Trumbly, R. J. (1988). Cloning and characterization of the *CYC8* gene mediating glucose repression in yeast. *Gene*, 73, 97-111.
- Trumbly, R. J. (1992). Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology*, 6, 15-21.
- Tzamarias, D. y Struhl, K. (1995). Distinct TPR motifs of Cyc8 are involved in recruiting the Cyc8-Tup1 corepressor complex to differentially regulated promoters. *Genes and development*, 9, 821-831.
- Ukibe, K., Katsuragi T., Tani, Y. y Takagi, H. (2008). Efficient screening for astaxanthin-overproducing mutants of the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* by flow cytometry. *FEMS microbiol lett* 286, 241-248
- Verdoes, J. C., Krubasik, K. P., Sandmann, G., y Van Ooyen, A. J. (1999a). Isolation and functional characterization of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Molecular general genetics* , 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*. *Biotechnology and bioengineering*, 63, 750-755.
- Verdoes, J. C., Sandmann, G., Visser, H., Diaz, M., Mossel, M. V. y Van Ooyen, A. J. (2003). Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Applied and environmental microbiology*, 69, 3728-3738.
- Wang, W., Yu, L. y Zhou, P. (2006). Effects of different fungal elicitors on growth, total carotenoids and astaxanthin formation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Bioresource technology*, 97, 26-31.
- Weber, R. W. S., Becerra, J., Silva, M. J., y Davoli, P. (2008). An unusual *Xanthophyllomyces* strain from leaves of *Eucalyptus globulus* in Chile. *Mycological research*, 112, 861-867.
- Wozniak, A. (2008). Influencia del metabolismo aerobio en la expresión de los genes de carotenogénesis y la biosíntesis de pigmentos en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis de Doctorado en ciencias mención Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

- Wozniak, A., Lozano, C., Barahona, S., Niklitschek, M., Marcoleta, A., Alcaíno, J., Sepulveda, D., et al. (2011). Differential carotenoid production and gene expression in *Xanthophyllomyces dendrorhous* grown in a nonfermentable carbon source. *FEMS yeast research*, 11, 252-262.
- Yamane, Y., Higashida, K., Nakashimada, Y., Kakizono, T. y Nishio, N. (1997). Influence of Oxygen and Glucose on Primary Metabolism and Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma* in Batch and Fed-Batch Cultures: Kinetic and Stoichiometric Analysis. *Applied and environmental microbiology*, 63, 4471-4478.
- Zhang, Z., Varanasi, U., y Trumbly, R. J. (2002). Functional dissection of the global repressor Tup1 in yeast: dominant role of the C-terminal repression domain. *Genetics*, 161, 957-969.