

UCH-FC  
MAG-B  
R 763  
C 1



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

**BIOSINTESIS DE GERANILGERANIL PIROFOSFATO (GGPP), PASO ESENCIAL EN  
LA BIOSINTESIS DE ASTAXANTINA EN *Xanthophyllomyces dendrorhous*.**

Tesis

Entregada a La

Universidad De Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Magister en Ciencias

Mención biología

Facultad De Ciencias

Por

Ignacio Andrés Romero Hinrichsen

12 de Julio, 2014

Director de Tesis

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán

Co-Directora de Tesis

Dra. Jennifer Alcaino Gorman

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGÍSTER

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

IGNACIO ANDRÉS ROMERO HINRICHSEN

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día Lunes 21 de Julio de 2014.

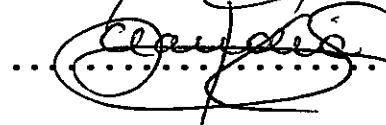
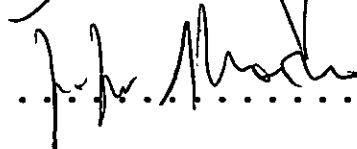
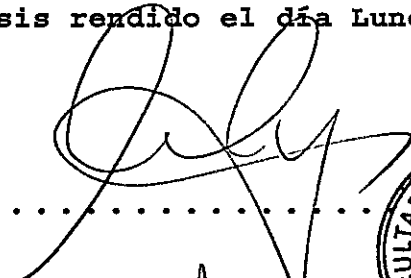
Director de Tesis:  
Dr. Víctor Cifuentes

Co-Director de Tesis  
Dra. Jennifer Alcaíno

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Margarita Carú

Dra. Claudia Stange



*Dedico este trabajo a mi pareja Valentina con quien  
comenzamos una nueva etapa en nuestra vida y a mi familia  
que cuidó de mí en mi etapa anterior...*

## **Agradecimientos**

En primer lugar quiero agradecer al doctor Víctor Cifuentes que me acogió en su laboratorio donde realicé mi tesis de pregrado y donde ahora finalizo mi tesis de magister. De la misma manera quiero agradecer a la doctora Jennifer Alcaíno que me ayudó enormemente en la finalización expedita de este trabajo. También quiero agradecer a la doctora María Cecilia Rojas, quien me acogió en su laboratorio para durante un corto periodo, me enseñó técnicas nuevas y aconsejó también durante mi periodo final. Agradezco también al doctor Rodrigo Cabrera por ayudarme a salir de un problema con mis proteínas el cual llevaba largo tiempo sin poder resolver. Es necesario incluir también a los técnicos del laboratorio Dony y Salvador, quienes con su buena disposición y gran conocimiento brindan ayuda en todo momento a los que lo necesiten en el laboratorio.

En segundo lugar quiero agradecer a mi familia que ha ido creciendo aun a estas alturas: Mónica (mamá), Leopoldo (papá), Francisco (mi hermano), Pía (hermana), José Antonio (hermanito), José, Jaime, Janet, la familia de Jaime (división zamorano). Quienes me han ayudado ya sea dándome ánimo, estando ahí o en forma más simple, siendo parte de la familia. No es posible olvidarme de mi pareja Valentina, con todo su amor, cariño y ánimo, que siempre ha estado tras de mí alentándome, y su familia que siempre me ha acogido y demostrado afecto hacia mí.

Finalmente, pero no menos importante, agradezco a mis amigos, que son muchos para nombrar, pero que están con uno cuando se los necesita. Mi inseparable grupo del colegio y la gente de la universidad que son de los pocos que entienden en lo que trabajo. MUCHAS GRACIAS A TODOS!!!

# Índice de contenidos

Biografía .....	[Error! Marcador no definido.]
Agradecimientos .....	ii
Índice de contenidos .....	iii
Índice de Tablas .....	v
Índice de Figuras .....	vi
Índice de abreviaturas .....	vii
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción .....	3
Isoprenoides y carotenoides.....	3
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> .....	8
Objetivo General.....	14
Objetivos Específicos: .....	14
<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>15</b>
Plásmidos, cepas y condiciones de cultivo .....	15
Técnicas de Biología Molecular.....	20
PCR, electroporación y otros protocolos rutinarios.....	20
Diseño de partidores.....	22
Extracción de DNA genómico de <i>X. dendrorhous</i> .....	22
Extracción de RNA genómico de <i>X. dendrorhous</i> .....	24
Transformación de cepas de <i>X. dendrorhous</i> mediante electroporación.....	25
Extracción y análisis de carotenoides y de esteroides.....	26
Expresión heteróloga de genes en <i>E. coli</i> .....	27

Extracción de proteínas .....	28
Extracción de proteínas de <i>E. coli</i> y visualización en gel de poliacrilamida.....	28
Obtención de extracto enzimático a partir de <i>X. dendrorhous</i> .....	29
Ensayo de actividad prenil transferasa y detección de productos .....	30
<b>Resultados .....</b>	<b>32</b>
Expresión de los genes <i>FPS</i> y <i>crtE</i> de <i>X. dendrorhous</i> en <i>E. coli</i> .....	32
Actividad prenil transferasa de cepas de <i>E. coli</i> recombinantes que expresan los genes <i>FPS</i> y <i>crtE</i> de <i>X. dendrorhous</i> .....	36
Obtención de cepas de <i>X. dendrorhous</i> que sobreexpresan los genes <i>FPS</i> y <i>crtE</i> .....	38
Evaluación del fenotipo en cepas mutantes de <i>X. dendrorhous</i> heterocigotas y que sobreexpresan a los genes <i>FPS</i> y <i>crtE</i> . .....	43
Curvas de crecimiento .....	43
Carotenoides y esteroides .....	45
Niveles de expresión de los genes <i>FPS</i> , <i>crtE</i> , <i>crtS</i> y <i>crtR</i> en cepas de <i>X. dendrorhous</i> .....	50
Actividad prenil transferasa en cepas mutantes de <i>X. dendrorhous</i> heterocigotas y que sobreexpresan los genes <i>FPS</i> y <i>crtE</i> . .....	52
<b>Discusión .....</b>	<b>54</b>
Actividad de proteínas codificadas por los genes <i>FPS</i> y <i>crtE</i> .....	54
Participación de los genes <i>FPS</i> y <i>crtE</i> en la carotenogénesis en <i>X. dendrorhous</i> .....	57
<b>Conclusiones.....</b>	<b>66</b>
<b>Proyecciones.....</b>	<b>66</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>68</b>

## Índice de Tablas

Tabla 1. Plásmidos utilizados en este trabajo.....	16
Tabla 2. Cepas utilizadas en este trabajo.....	18
Tabla 3. Partidores utilizados en este trabajo.....	23
Tabla 4. Actividad prenil transferasa en cepas de expresión heteróloga en <i>E. coli</i> .....	37
Tabla 5. Carotenoides en cepas de <i>X. dendrorhous</i> (en ppm, $\mu\text{g}$ de carotenoides/g de levadura seca).....	47
Tabla 6. Esteroles en cepas de <i>X. dendrorhous</i> (en mg/gr de peso seco de levadura).....	49
Tabla 7. Ensayos de actividad prenil transferasa con extractos de proteínas de cepas de <i>X. dendrorhous</i> .....	53

# Índice de Figuras

Figura 1. Biosíntesis de Isoprenoides.....	5
Figura 2. Biosíntesis de carotenoides en <i>X. dendrorhous</i> .....	11
Figura 3. Posibles vías de síntesis de GGPP. ....	12
Figura 4. PCR de colonias transformantes con pET28-cFPS y pET23-ccrTE.....	34
Figura 5. SDS-PAGE de extractos de proteínas de cepas de <i>E. coli</i> recombinantes.....	35
Figura 6. Vector pXdVexp2.....	39
Figura 7. Vector pXdVexp2-cFPS y pXdVexp2-ccrTE.....	41
Figura 8. Confirmación de vector pVexp2-cFPS o ccrTE.....	42
Figura 9. Curvas de crecimiento de cepas de <i>X. dendrorhous</i> .....	44
Figura 10. Cultivo en placas de cepas de <i>X. dendrorhous</i> .....	46
Figura 11. Composición de carotenoides en cepas de <i>X. dendrorhous</i> .....	48
Figura 12. Esteroles en cepas utilizadas.....	49
Figura 13. Expresión de genes en cepas de <i>X. dendrorhous</i> .....	51



## Índice de Abreviaturas

Amp	ampicilina
abs	absorbancia
cem	coeficiente de extinción molar
cpm	cuentas por minuto
DNA	ácido desoxirribonucleico
DMAPP	dimetilalil pirofosfato
D.O.	densidad óptica
dpm	desintegraciones por minuto
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
FPP	farnesil pirofosfato sintasa
GGPP	geranilgeranil pirofosfato sintasa
GPP	geranil pirofosfato
HCl	ácido clorhídrico
IPP	isopentenil pirofosfato
IPTG	isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido

Kan	kanamicina
kb	kilobases
LB	Luria-Bertani
MALDI-TOF	desorción/ionización de matriz asistida por laser – tiempo de vuelo
MVA	ácido mevalónico
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
pb	par de bases (nucleotídicas)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pBS	plásmido Bluescript
RNA	ácido ribonucleico
ROS	especies reactivas de oxígeno
RP-HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento – fase reversa
RT-qPCR	PCR cuantitativo en tiempo real

## Resumen

La astaxantina es un carotenoide rojo-anaranjado de interés económico, particularmente por sus propiedades antioxidantes y por otorgar el color a la carne de salmónidos. Entre los pocos organismos capaces de sintetizar este compuesto se destaca la levadura basidiomicete *X. dendrorhous*. En este trabajo se caracterizó la ruta de biosíntesis de geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), el precursor de los carotenoides en *X. dendrorhous*. Para ello, los genes *FPS* y *crtE* de la levadura, se expresaron en *E. coli* y sobreexpresaron en *X. dendrorhous*. También, se analizaron cepas mutantes heterocigotas de cada uno de estos genes, obtenidas en trabajos anteriores. Se demostró que efectivamente los genes *FPS* y *crtE* codifican enzimas con actividad prenil transferasa: farnesil pirofosfato (FPP)- y GGPP- sintasa, respectivamente. Ambas enzimas actúan en forma secuencial para generar GGPP desde isopentenil pirofosfato (IPP) y dimetilalil pirofosfato (DMAPP). En *X. dendrorhous* se observó que la sobreexpresión de estos genes aumenta la cantidad de carotenoides y en el caso del gen *crtE*, también los esteroides. El crecimiento se vio disminuido en la cepa que sobreexpresa el gen *crtE*, posiblemente debido al drenaje de los precursores de la síntesis de esteroides hacia la carotenogénesis. Finalmente, el análisis de los niveles de RNA mensajero en las cepas mutantes heterocigotas mostró reducción en la expresión de los genes *crtS* y *crtR*, las cuales controlan la síntesis de astaxantina desde beta-caroteno. El mecanismo por el cual sucede esto, aún es desconocido y requiere de más estudios. Finalmente, este trabajo reafirma la importancia y confirma la función de los genes *FPS* y *crtE* en la levadura modelo y los posiciona como posibles blancos en programas de mejoramiento genético.

## Abstract

The astaxantina is a red - orange carotenoid of economic interest, particularly for its antioxidant properties and for granting the color to the meat of salmonids. Among few organisms capable of synthesizing this compound, the basidiomicete yeast *X. dendrorhous* stands out. In this work the biosynthesis pathway of geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) which is the precursor of carotenoids in *X. dendrorhous*, was characterized. For this, the genes *FPS* and *crtE* of the yeast, were expressed in *E. coli* and overexpressed in *X. dendrorhous*. Also, previously obtained mutant strains for each of these genes were analyzed. It was shown that the *FPS* and *crtE* genes encoded enzymes with prenyl transferase activity: farnesyl pyrophosphate ( FPP) - and GGPP synthase, respectively. Both enzymes act sequentially to generate GGPP from isopentenyl pyrophosphate (IPP) and dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP). In *X. dendrorhous* was observed that the overexpression of these genes increased the amount of carotenoids and in the case of the *crtE* gene, also the sterols. Growth was reduced in the strain overexpressing the *crtE* gene, possibly because of the drain of the precursors of the synthesis of sterols to carotenogenesis. Finally, the analysis of messenger RNA levels in the heterozygous mutant strains showed reduced a expression of *crtS* and *crtR* genes, which control the synthesis of astaxanthin from beta - carotene. The mechanism by which this happens is still unknown and requires further study. Finally, this study remarks the importance and confirms the role of the *FPS* and *crtE* genes in yeast model and positions them as potential targets to manipulate in genetic enhancement programs.

# Introducción

## Isoprenoides y carotenoides

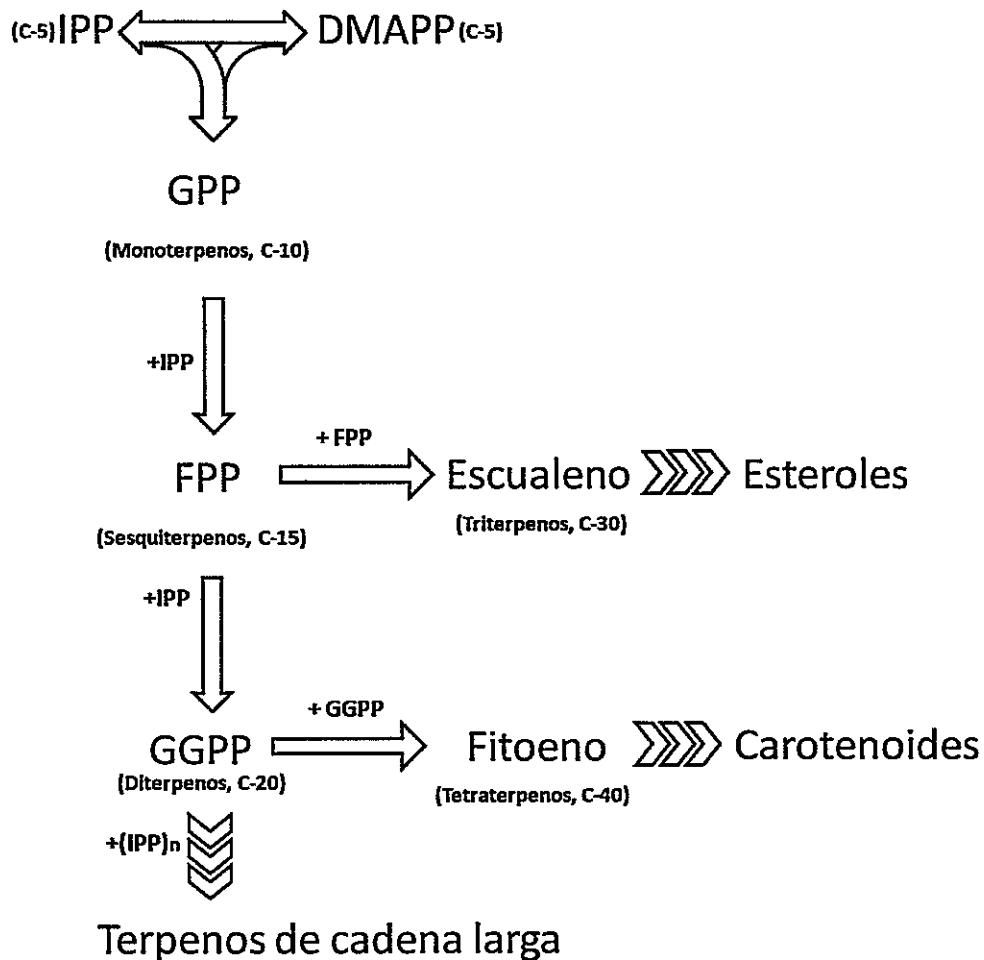
Los isoprenoides o terpenos son un amplio conjunto de moléculas orgánicas hidrocarbonadas que comprenden más de 40.000 compuestos estructuralmente distintos (Misawa, 2011). Su función biológica es variada, cumpliendo múltiples roles tales como pigmentos (carotenoides), hormonas (ácido abscísico), agentes defensivos (fitoalexinas), constituyentes de la membrana celular (esteroles), entre otros. A pesar de su gran diversidad funcional y estructural, la síntesis de isoprenoides comienza invariablemente con la condensación de moléculas de 2-metil-1,3-butadieno o isopreno (molécula de 5 átomos de carbono, C5) que constituye el bloque estructural básico y de la cual deriva el nombre de esta familia de compuestos naturales. Como regla general, los terpenos se clasifican de acuerdo al número de moléculas de isopreno que los conforman. Es así como se pueden distinguir los hemi- (C5), mono- (C10), sesqui- (C15), di - (C20), tri- (C30), tetra- (C40) y otros terpenos de cadena larga. Modificaciones a la cadena hidrocarbonada dan a lugar a la gran diversidad que existe de este tipo de compuestos.

La síntesis de los isoprenoides comienza con la generación de los precursores que puede ocurrir a través de dos vías: (1) la vía del ácido mevalónico o MVA (Katsuki y Bloch, 1967), que está descrita en arqueas, hongos, plantas y animales, y (2) la vía de la deoxi xilulosa 5-fosfato o DOXP/MEP, descrita en bacterias y plastidios (Lichtenthaler, 2000, Wanke y cols., 2001). En levaduras, la síntesis de isopentenil pirofosfato (IPP) ocurre a través de la vía del MVA (Lee y Schmidt-Dannert, 2002) y luego la enzima isopentenil pirofosfato isomerasa, isomeriza al IPP generando dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (Agranoff y cols., 1960, Anderson y cols., 1989). A

continuación, IPP y DMAPP se condensan obteniendo el monoterpeno geranil pirofosfato (GPP, C10) y posteriores condensaciones de IPP permiten la formación de terpenos fosforilados de mayor tamaño tales como el farnesil pirofosfato (FPP, C15) y el geranilgeranil pirofosfato (GGPP, C20) (Withers y Keasling, 2007). La condensación de dos moléculas de FPP o dos de GGPP producen escualeno o fitoeno, respectivamente. El primer compuesto es el precursor de los esteroides y el segundo es el primer carotenoide que se produce en la carotenogénesis (Goodwin, 1971) Figura 1.

Es así como la biosíntesis de estas moléculas se puede dividir en 3 etapas: (1) síntesis de los precursores IPP y su isómero DMAPP, (2) elongación de la cadena hidrocarbonada mediante sucesivas condensaciones de IPP y/o la condensación de terpenos de mayor tamaño, (3) modificaciones a la molécula tales como ciclaciones, oxido-reducciones, isomerizaciones u otras (Bouvier y cols., 2005).

Formando parte de los isoprenoides se encuentran los carotenoides, los cuales comprenden un conjunto de pigmentos producidos en forma natural por algunos procariontes, hongos y organismos fotosintéticos (Goodwin, 1980). En la naturaleza estos pigmentos cumplen variados roles esenciales y accesorios, tales como: la pigmentación de tejidos principalmente en flores o frutos, componentes de complejos foto-receptores, agentes foto-protectores, precursores de la vitamina A y agentes antioxidantes (Olson, 1993). Todas estas características hacen de los carotenoides un conjunto de compuestos de gran relevancia biológica y de interés económico.



**Figura 1. Biosíntesis de Isoprenoides.**

La síntesis comienza con la isomerización de IPP a DMAPP. Adiciones sucesivas de IPP u otros terpenos de mayor tamaño como GPP, FPP o GGPP entre otros permiten la elongación de la cadena. Estos derivados condensados conforman el esqueleto básico de moléculas de gran importancia entre las cuales se cuentan los esteroides y los carotenoides.

Estructuralmente los carotenoides se componen principalmente de tetraterpenos con cadenas de enlaces conjugados que confieren las características cromóforas siendo capaces de absorber la luz visible en un rango, que normalmente va de los 400 a 500 nm de longitud de onda (Borenstein y Bunnell, 1966). Modificaciones típicas de los carotenoides comprenden ciclaciones en uno o ambos extremos y la adición de grupos oxigenados. De esta manera, los carotenoides se clasifican como xantofilas, que incluye aquellos que contienen grupos oxigenados, y carotenos que no contienen este tipo de grupos funcionales. Entre los carotenoides de mayor interés comercial destaca la astaxantina, un pigmento de coloración rojo-anaranjado cuya denominación sistemática corresponde a 3,3'-dihidroxi- $\beta$ , $\beta$ '-caroteno-4,4'-diona. Las características más relevantes y económicamente atractivas de este pigmento son su gran capacidad antioxidante y su coloración (Higuera-Ciapara y cols., 2006). Ésta molécula confiere la tonalidad característica a la caparazón de crustáceos, a las plumas de algunas aves como los flamencos y a la carne de salmónidos (Choubert y cols., 2006).

Adicionalmente, el consumo de astaxantina se asocia a efectos beneficiosos para la salud humana mostrando propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, inmunoestimulantes, cardio y neuroprotectoras (Hussein y cols., 2006). Por estos motivos, se ha abierto otro mercado para la astaxantina como lo es la industria nutracéutica. La industria salmonicultora también genera demanda por este carotenoide, ya que en la naturaleza los salmones consumen crustáceos a partir de los cuales obtienen este pigmento. Sin embargo, en cautiverio no tienen acceso a sus presas naturales, por lo que la carne no adquiere su apariencia característica, siendo blanca. La coloración de la carne del salmón es un parámetro fundamental en la producción, ya que es considerada como un indicador de la calidad del producto, por lo



tanto es necesario suplementar astaxantina a la dieta de los salmones. Cerca de un 10-20% del costo total del alimento de los salmones, corresponde a la adición de este pigmento (Ingle de la Mora y cols., 2006).

En la actualidad la producción de astaxantina se realiza principalmente por síntesis química y constituye un mercado que superó los 220 millones de dólares anuales al año 2010 en ganancias y con proyecciones de llegar a los 250 millones de dólares anuales para el año 2018 (BCCRResearch, 2011). Sin embargo, la síntesis química genera subproductos y desechos no deseados como anhídrido p-clorobenzoico (Della Negra y cols., 2007) y da como resultado una mezcla de isómeros cis, cis-trans y trans. Las conformaciones cis tienen una menor absorción a nivel intestinal en los salmones (Bjerkeng y cols., 1995), lo que es un factor importante ya que la astaxantina sintetizada en forma natural se encuentra principalmente en su forma trans.

Por otro lado, y no menos importante, es la opinión pública que favorece el consumo de productos de origen natural por sobre los de origen sintético. Esto también se aplica a la suplementación dentro de la actividad pecuaria, como lo es el cultivo de los salmones. Es por ello que se ha promovido la búsqueda de fuentes naturales de astaxantina proyectándose dos microorganismos como los más prometedores para este propósito. En primer lugar se encuentra la micro alga *Haematococcus pluvialis* (Lorenz y Cysewski, 2000) que produce grandes cantidades de astaxantina y es de fácil cultivo. Actualmente representa la mayor fuente natural de astaxantina utilizada (BCCRResearch, 2011). Sin embargo, la astaxantina producida por esta alga se encuentra esterificada, presentando una absorción reducida en el tracto intestinal de los salmones (White y cols., 2002). Por esta razón, su producción se limita exclusivamente al consumo humano, puesto que en este ámbito las modificaciones en

la molécula no son una limitante para su comercialización. Contrario es el caso de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*, la cual es capaz de sintetizar astaxantina no esterificada (An et al. 1991), encontrándose este pigmento en una proporción mayor al 70% de los pigmentos totales producidos por ella.

### ***Xanthophyllomyces dendrorhous***

*X. dendrorhous* es una levadura basidiomicete originalmente aislada a partir de exudados de árboles de regiones frías del hemisferio norte. En la actualidad también se ha aislado en la Patagonia Argentina y Chilena e incluso desde el continente Antártico (Tognetti y cols., 2013). Se propone que la síntesis de astaxantina en esta levadura se desarrolló como un mecanismo de defensa contra especies reactivas de oxígeno (ROS) y sustancias anti fúngicas, proporcionándole una ventaja competitiva en comparación con otros microorganismos (Schroeder y Johnson, 1993). Esta hipótesis se apoya en estudios que han demostrado la susceptibilidad de *X. dendrorhous* a algunas ROS, consecuencia de una baja actividad catalasa y ausencia de enzimas superóxido dismutasa que usualmente se encuentran presente en otras levaduras (Schroeder y Johnson, 1993). Aludiendo a lo anterior, se ha observado que la astaxantina protege a la levadura del ion superóxido y peróxido de hidrógeno, complementando estas reducidas actividades enzimáticas en la levadura (Schroeder y Johnson, 1995, Wu y cols., 2006).

Debido a que actualmente el rendimiento de astaxantina en cepas silvestres de *X. dendrorhous* no es lo suficientemente alto para competir con la síntesis química, los estudios en dicha levadura se han centrado principalmente en comprender la ruta de biosíntesis de carotenoides y favorecer la producción de astaxantina (Jacobson y cols., 1999). Por ejemplo, se ha intentado optimizar las condiciones de cultivo variando el pH,

las fuentes de carbono y de nitrógeno, oxigenación e iluminación (An y Johnson, 1990). También se ha aplicado el mejoramiento genético mediante mutagénesis al azar con la intención de encontrar mutantes sobreproductores de astaxantina (Lewis y cols., 1990, Retamales y cols., 1998). Si bien se ha mejorado el rendimiento con estas aproximaciones, aun no se logran los niveles de astaxantina deseados. Por ello es que se ha optado por investigar en mayor profundidad la ruta de síntesis del pigmento, identificando y caracterizando los genes estructurales que controlan esta vía con el objetivo de aplicar estrategias de ingeniería metabólica en la levadura (Verdoes y cols., 2003).

Es por esto que numerosos estudios se han realizado en *X. dendrorhous* enfocados a la caracterización de los genes involucrados en la carotenogénesis y su regulación. De esta manera, se ha determinado que el proceso comienza con la condensación de dos moléculas de GGPP formando fitoeno, reacción catalizada por una enzima bifuncional con actividad fitoeno sintasa y licopeno ciclasa codificada por el gen *crtYB* (Verdoes y cols., 1999, Alcaíno, 2002). Luego, el fitoeno sufre cuatro desaturaciones sucesivas obteniéndose como producto licopeno, reacción que es catalizada por la enzima fitoeno desaturasa codificada por el gen *crtI* (Verdoes y cols., 1999). Posteriormente, la actividad licopeno ciclasa codificada por gen *crtYB*, cicla ambos extremos del licopeno generando  $\beta$ -caroteno. Finalmente, al  $\beta$ -caroteno se le agrega un grupo hidroxilo y un grupo ceto a cada anillo para producir astaxantina. Este último paso es catalizado por una enzima citocromo P450 denominada astaxantina sintasa, codificada por el gen *crtS* (Alvarez y cols., 2006, Ojima y cols., 2006). Esta última enzima requiere de electrones para su actividad los que son donados por la enzima citocromo P450 reductasa,

codificada por el gen *crtR* (Alcaino y cols., 2008) (Figura 2). Por otra parte, el análisis de síntesis, la estructura química de los metabolitos y los niveles de los transcritos de los genes carotenogénicos, ha permitido dilucidar algunos de los posibles mecanismos de regulación de esta vía de síntesis. Por ejemplo, se ha detectado productos de procesamiento alternativo de los genes *crtYB* y *crtI* que podrían estar ejerciendo algún rol regulatorio (Lodato y cols., 2003). Además, existen evidencias que indican que probablemente la síntesis de carotenoides es regulada por represión catabólica en esta levadura (Marcoleta y cols., 2011, Wozniak y cols., 2011).

#### **Biosíntesis de GGPP en *X. dendrorhous***

A pesar de los numerosos estudios concernientes a la carotenogénesis en esta levadura, pocos se han enfocado en las etapas previas a ésta, particularmente en lo que se refiere a la formación del GGPP. Para la síntesis de dicha molécula, en distintos organismos se han descrito tres sistemas presentes en la Figura 3. El primero de ellos comprende la participación de las enzimas FPP- y GGPP- sintasas, donde la primera sintetiza FPP a partir de la adición secuencial de dos moléculas de IPP a DMAPP, y la segunda produce GGPP a partir de FPP e IPP (Caplin y cols., 1994). El segundo sistema involucra sólo a la enzima GGPP-sintasa, capaz de producir GGPP a partir de DMAPP y tres moléculas de IPP adicionadas de manera secuencial (Ohnuma y cols., 1994). Finalmente, aunque de menor frecuencia en la naturaleza, el tercer sistema consiste en la coexistencia de los dos sistemas descritos previamente en un organismo (Saito y cols., 2007). Estudios anteriores en *X. dendrorhous* describen la existencia del segundo sistema en esta levadura, cuya enzima GGPP-sintasa es codificada por el gen *crtE* (Verdoes y cols., 2003). Sin embargo, estudios recientes han permitido la



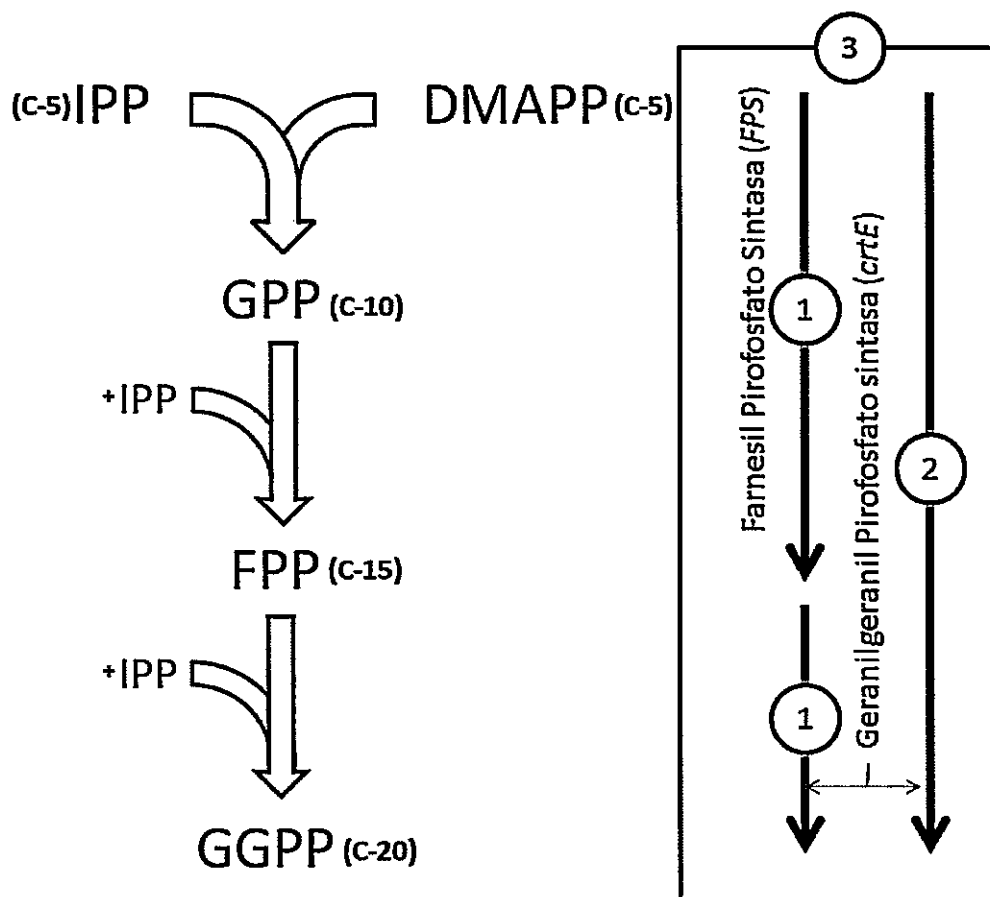


Figura 3. Posibles vías de síntesis de GGPP.

La síntesis de GGPP puede ocurrir de tres formas distintas dependiendo del número de enzimas involucradas. Es así como en el primer sistema la síntesis de FPP puede ser realizada por una FPP-sintasa (gen *FPS*), seguido de la síntesis de GGPP por acción de una GGPP-sintasa (gen *crtE*) (1). En el segundo sistema la síntesis de GGPP es realizada en su totalidad por una única enzima GGPP-sintasa (2). En tercer sistema consiste en la coexistencia de los dos sistemas descritos anteriormente en un mismo organismo (3). Abreviaturas utilizadas: IPP (Isopentenil pirofosfato), DMAPP (dimetilalil pirofosfato), GPP (geranil pirofosfato), FPP (farnesil pirofosfato) y GGPP (geranylgeranil pirofosfato). Se indica el número de átomos de carbono de cada metabolito.

cual también podría estar involucrado en la síntesis de GGPP a partir de DMAPP e IPP en *X. dendrorhous* (Romero, 2010). Lo anterior indicaría que en esta levadura, la síntesis de GGPP en realidad ocurre a través del primer sistema descrito.

Ambos genes, FPS y crtE, han sido caracterizados y se han obtenido mutantes de delección heterocigotos en *X. dendrorhous* (Niklitschek, 2008, Romero, 2010). Hasta el momento, no ha sido posible la obtención de mutantes homocigotos de estos genes a pesar de numerosos intentos, lo que sugiere que ambos genes son esenciales en la levadura. Además, ambos productos génicos se encuentran involucrados en una serie de procesos de importancia biológica. En primer lugar, la condensación de dos moléculas de FPP da lugar a escualeno, que a su vez es el precursor de los esteroides los cuales son componentes fundamentales de la membrana celular siendo el ergosterol el principal esteroide en hongos (Bloch, 1981, Bloch, 1992). Adicionalmente, el FPP y el GGPP también son utilizados en la prenilación de algunas proteínas donde se adiciona una o más de estas moléculas regulando la actividad catalítica (Zverina y cols., 2012).

A pesar que estudios previos han demostrado que la remoción de un alelo en forma parcial o total del gen FPS afecta la biosíntesis de carotenoides (Romero, 2010), actualmente no se sabe con certeza si el producto del gen FPS efectivamente participa en la síntesis de GGPP desde DMAPP. Tampoco existe certeza de que ambos genes, FPS y crtE, colaboran en la síntesis de los precursores de la carotenogénesis. Por estos motivos, en esta tesis se buscó profundizar en la caracterización de los genes FPS y crtE, así como estudiar la actividad enzimática que codifican de tal manera de tener mayores antecedentes sobre la función de estos genes en *X. dendrorhous*.



En base a los antecedentes expuestos, en esta tesis se propuso la siguiente hipótesis:

“Los genes FPS y crtE participan en forma conjunta en la formación de precursores de la carotenogénesis en la levadura *X. dendrorhous*, entonces su manipulación genética (mutación o sobreexpresión) alteraría la actividad prenil transferasa y consecuentemente la síntesis de carotenoides en esta levadura”

Para ello se propusieron los siguientes objetivos:

**Objetivo General:**

Estudiar la función de los genes FPS y crtE de *X. dendrorhous*.

**Objetivos Específicos:**

- Expresar heterológamente los genes FPS y crtE en un hospedero heterologo como *E. coli* y medir actividad prenil transferasa.
- Obtener cepas de *X. dendrorhous* que sobreexpresan de manera independiente a los genes FPS y crtE.
- Evaluar la producción de carotenoides y de ergosterol en cepas mutantes de *X. dendrorhous* heterocigotas y que sobreexpresan a los genes FPS y crtE.
- Medir los niveles de transcritos y la actividad prenil transferasa en cepas mutantes de *X. dendrorhous* heterocigotas y que sobreexpresan a los genes FPS y crtE.



## **Materiales y Métodos**

### **Plásmidos, cepas y condiciones de cultivo**

Los plásmidos utilizados y construidos en este trabajo se describen en la Tabla 1. De la misma manera, las cepas de *E. coli* y de *X. dendrorhous* utilizadas y generadas en este trabajo se detallan en la Tabla 2.

Para la replicación de plásmidos y expresión heteróloga de genes se utilizaron las cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  y BL21-Gold (DE3), respectivamente. Éstas se cultivaron a 37°C en medio Luria-Bertani (LB: 1% triptona, 0,5% NaCl y 0,5% extracto de levadura) con agitación constante (Sambrook y Russell, 2001). En el caso de cultivos en placas con medio semi-sólido, se le adicionó 1,5% de agar al medio LB. Para la selección de transformantes, el medio se suplementó con ampicilina (Amp) (100  $\mu$ g/ml) o kanamicina (Kan) (50  $\mu$ g/ml), según corresponda. Las cepas de *E. coli* se almacenaron mediante crio-preservación en LB con glicerol 30% a una temperatura de -80°C.

Para *X. dendrorhous*, se utilizó la cepa parental silvestre UCD 67-385 (ATCC 24230) la cual es una cepa diploide (Hermosilla 2003). Las cepas mutantes heterocigotas (Nikliitschek, 2008, Romero, 2010) y de sobreexpresión de los genes *FPS* y *crtE*, derivan de UCD 67-385. *X. dendrorhous* se cultivó a 22°C con agitación constante en medio para levaduras YM (0,3% extracto de levadura, 0,3% extracto de malta, 0,5% peptona). En caso de cultivos en placas, se agregó 1,5% de agar al medio como agente gelificante. Las cepas de levadura se preservaron mediante el método de perlas de gelatina descrito previamente (Baeza y cols., 2009). Brevemente, a partir de un cultivo fresco en medio YM-agar al 1,5% se colectó las células con un asa estéril y

**Tabla 1. Plásmidos utilizados en este trabajo.**

Plásmido	Descripción	Referencia o Fuente
pBluescript SK- (pBS)	ColE1 ori; AmpR; vector de clonación con selección de colonias blanco-azul.	Stratagene
pXd- <i>crtE</i>	pBS que contiene el cDNA del gen <i>crtE</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	(Niklitschek, 2008)
pXd- <i>crtE</i> -NN	pBS que contiene el cDNA del gen <i>crtE</i> de <i>X. dendrorhous</i> con los sitios de restricción <i>NdeI</i> y <i>NcoI</i> en los extremos 5' y 3' respectivamente.	Este trabajo
pXd- <i>cFPS</i>	pBS que contiene el cDNA del gen <i>FPS</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	Este trabajo
pXd- <i>cFPS</i> -NN	pBS que contiene el cDNA del gen <i>FPS</i> de <i>X. dendrorhous</i> con los sitios de restricción <i>NdeI</i> y <i>NcoI</i> en los extremos 5' y 3' respectivamente.	Este trabajo
pXdVexp2	Vector de expresión para <i>X. dendrorhous</i> : pBS portador del promotor del gen de ubiquitina [GenBank: KJ140285] y el terminador del gen GPD [GenBank: Y08366] de <i>X. dendrorhous</i> , con un sitio de restricción <i>BamHI</i> entre ambos para insertar el gen a expresar. Además, el plásmido contiene un módulo de resistencia a higromicina B para la selección de transformantes. Todo esto flanqueado por regiones de DNA del <i>locus int</i> [Genbank: KJ140286] para la integración genómica.	Laboratorio de Genética (trabajo aun no publicado).
pXdVexp2- <i>crtE</i>	pXdVexp2 portador del cDNA del gen <i>crtE</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	Este trabajo
pXdVexp2- <i>cFPS</i>	pXdVexp2 portador del cDNA del gen <i>FPS</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	Este trabajo
pET28a(+)	Vector de expresión para <i>E. coli</i> . pBR322 ori; KanR; represor LacI.	Novagen
pET28- <i>crtE</i>	pET28a(+) portador del cDNA del gen <i>crtE</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	Este trabajo
pET28- <i>cFPS</i>	pET28a(+) portador del cDNA del gen <i>crtE</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	Este trabajo

---

*dendrorhous.*

---

**Tabla 2. Cepas utilizadas en este trabajo.**

Cepa	Genotipo y/o Descripción	Referencia o Fuente
<i>E. coli</i> :		
DH-5 $\alpha$	F- $\phi$ 80d lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZY-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk- mk+) phoA supE44I-thi-1 gyrA96 relA1	Sambrook y Russell, 2001
BL21-Gold (DE3)	B F <sup>-</sup> ompT hsdS(r <sub>B</sub> m <sub>B</sub> ) dcm <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> gal $\lambda$ (DE3) endA Hte	Stratagene
BL21+pET28	Cepa BL21-Gold (DE3) portadora del plásmido pET28.	Este trabajo
BL21+FPS	Cepa BL21-Gold (DE3) portadora del plásmido pET28-FPS.	Este trabajo
BL21+crtE	Cepa BL21-Gold (DE3) portadora del plásmido pET28-crtE.	Este trabajo
<i>X. dendrorhous</i> :		
UCD 67-385	ATCC 24230, cepa silvestre diploide (Hermosilla y cols., 2003).	ATCC 24230
385-FPS <sup>(+/+)</sup>	(FPS <sup>+</sup> /FPS <sup>::hph</sup> ). Transformante heterocigoto derivado de la cepa UCD 67-385 con una porción de uno de los alelos del gen <i>FPS</i> reemplazada por un módulo de resistencia a higromicina B.	(Romero, 2010)
385-crtE <sup>(+/+)</sup>	(crtE <sup>+</sup> /crtE <sup>::hph</sup> ). Transformante heterocigoto derivado de la cepa UCD 67-385 con una porción de uno de los alelos del gen <i>crtE</i> reemplazada por un módulo de resistencia a higromicina B.	(Niklitschek, 2008)
385-XdVexp2 <sup>(+/+)</sup>	(int <sup>+</sup> int <sup>::hph</sup> ). Transformante heterocigoto derivado de la cepa UCD 67-385 con un alelo del locus <i>int</i> [GenBank: KJ140286] interrumpido por el módulo de sobreexpresión vacío (sin un ORF insertado) y un módulo de resistencia a higromicina B.	Este trabajo

---

385-FPS <sup>(+/+, +1)</sup>	( <i>int</i> <sup>+</sup> / <i>int</i> <sup>-:npn+FPS</sup> ). Transformante heterocigoto derivado de la cepa UCD 67-385 con un alelo del <i>locus int</i> interrumpido por el módulo de sobreexpresión con el cDNA del gen <i>FPS</i> y un módulo de resistencia a higromicina B.	Este trabajo
385-crtE <sup>(+/+, +1)</sup>	( <i>int</i> <sup>+</sup> / <i>int</i> <sup>-:npn+crtE</sup> ). Transformante heterocigoto derivado de la cepa UCD 67-385 con un alelo del <i>locus int</i> interrumpido por el módulo de sobreexpresión con el cDNA del gen <i>crtE</i> y un módulo de resistencia a higromicina B.	Este trabajo

---

se suspendieron en 500  $\mu$ l de medio de cultivo YM. Luego, se agregó 1 volumen de gelatina tibia al 20% y se homogeneizó.

Posteriormente, se tomó la mezcla con una micropipeta y se depositaron gotas de la mezcla sobre una placa con parafina sólida. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y una vez gelificadas se agregó a la base de la placa la sílica gel. La placa se selló con Parafilm™ y se dejó a temperatura ambiente hasta que las gotas estuviesen deshidratadas. Finalmente, se tomaron las perlas con una pinza estéril y se depositaron en un tubo con sílica como desecante y algodón sobre ella. Los tubos se sellaron para evitar la rehidratación de las perlas y se almacenaron a 4°C.

El crecimiento celular de los cultivos se determinó de acuerdo al cambio de absorbancia del cultivo a 600 nm de longitud de onda, para lo cual se utilizó un espectrofotómetro de doble haz Jasco (V-630). Para la determinación del peso seco de levadura o de *E. coli*, se colectó y pesó por triplicado en una balanza analítica (Shimadzu, AV220) el pellet celular de 1 o 5 ml de cultivo que se secó por 16 horas a 80°C.

## **Técnicas de Biología Molecular**

### **PCR, electroporación y otros protocolos rutinarios**

Las reacciones de PCR estándar, digestiones enzimáticas, extracciones de DNA plasmídico a partir de *E. coli*, reacciones de ligado y electrotransformación de *E. coli*, se realizaron de acuerdo a procedimientos estándar descritos en el manual de clonamiento (Sambrook y Russell, 2001) o según las especificaciones indicadas por los fabricantes. Los ácidos nucleicos obtenidos (DNA genómico, DNA plasmídico, RNA, productos de PCR, etc) se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0,7-1%

teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y visualizados sobre un transiluminador de luz UV (UVP, high performance UV transiluminator TFM-26V). Como estándar de tamaño molecular se utilizó el DNA de fago lambda digerido con la enzima de restricción *HindIII*.

La mezcla de PCR estándar se compone de buffer de PCR 1X, MgCl<sub>2</sub> 2mM, desoxinucleotidos (dNTP's: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 0,2 µM, partidores 1 mM de cada uno y 5U de *Taq* DNA polimerasa (obtenida en el laboratorio), para un volumen total de 25 µl. El protocolo de PCR estándar se realizó en un termociclador Applied Biosystems 2720 y consistió en un inicio a 94 °C por 3 min (o 5 en caso de PCR de colonias). Luego, 35 ciclos con 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C, 3 min a 72°C. Finalmente, se incluyó 10 min a 72°C para permitir una elongación final.

Para realizar transcripción reversa se preparó una mezcla inicial conteniendo 5 µg de RNA, oligo-dT 1,92 µM y dNTP's 0,77 mM. Esta se calentó a 65 °C por 5 min y luego se enfrió a 4 °C. Luego, se agregó buffer de reacción 5X a una concentración final 1X (Invitrogen M-MLV *reverse transcriptase*), DTT a 0,01 M y 200 U de transcriptasa reversa (Invitrogen M-MLV *reverse transcriptase*), para un volumen final de 20 µl. Finalmente, se realizó la elongación a 37 °C por 50 min, 70 °C por 15 min y se almacenó el producto a -20 °C.

El PCR en tiempo real se realizó en un termociclador de tiempo real Mx3000P (Stratagene) utilizando una mezcla compuesta de mix de reacción (Bioline, Sensimix™ SYBR Hi-ROX), partidores a 0,25 µM cada uno y cDNA proveniente de la reacción de transcripción reversa en un volumen final de 20 µl. El protocolo de reacción consistió en inicio a 95 °C por 10 min, 40 ciclos a 95 °C por 15 s, 60 °C por 15 s, 72 °C por 15 s

### **Diseño de partidores**

Los partidos utilizados en este trabajo fueron sintetizados por *Integrated DNA Technologies* y fueron diseñados a partir de las secuencias conocidas de los genes *FPS* y *crtE* obtenidas en nuestro laboratorio. También se diseñaron partidores cuyas secuencias fuesen complementarias con los promotores y terminadores de los vectores de expresión y de sobreexpresión, y de regiones río arriba y río abajo de los insertos analizados en cada caso. Los nombres, descripción y secuencia de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 3.

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

La extracción de DNA genómico se realizó según el método de ruptura celular con perlas de vidrio (Sambrook y Russell, 2001), modificado para *X. dendrorhous* (Niklitschek, 2008). Para ello, con un aza estéril, se tomó un pellet de *X. dendrorhous* cultivada por 2 días a 22°C en placas YM-agar y se depositó en un tubo Eppendorf. Luego, el pellet se suspendió en 500 µl de buffer Tris-EDTA (Tris 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM), se agregó 50 µL de perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro (BioSpec) y las células se rompieron mecánicamente mediante agitación en vórtex por 10 min. El lisado se centrifugó y se colectó el sobrenadante en un tubo nuevo. Luego, se lavó dos veces con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y una vez con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), centrifugando y recuperando la fase acuosa superior en cada punto. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante, se agregó 2 volúmenes de etanol absoluto y el DNA se dejó precipitar por 16 h a -20°C. El DNA precipitado se recuperó mediante centrifugación a 14.000 x g por 10 min, eliminándose el etanol. Finalmente, el pellet de DNA se secó y se suspendió en Tris-EDTA (10 mM: 1 mM) con RNasa A (30 µg/ml) o agua bidestilada estéril.



**Tabla 3. Partidores utilizados en este trabajo.**

Partidor	Secuencia 5' a 3'	Blanco, Dirección y/o Característica
GPDT Sense	atgaaaaagcctgaactcacc	Módulo <i>hph</i> , partidor directo.
TEF Sec R	cctaattctgtcgacaacgcg	Módulo <i>hph</i> , partidor reverso.
TEF Antisense	ctattccttgccctcggac	Módulo <i>hph</i> , partidor reverso.
Ubi Fw2	tctatggactaagtgccgacc	Promotor <i>ubi</i> , partidor directo.
mActF-RT	ccgccctcgtgatgataac	Gen de <i>actina</i> , partidor directo.
mActR-RT	tcaccaacgtaggagtcctt	Gen de <i>actina</i> , partidor reverso.
Int_Pre_Fw	acccgctcccgatccgattt	<i>Locus int</i> , partidor directo.
Int_Post_Rv	agttcggactcgagtgatc	<i>Locus int</i> , partidor reverso.
mcrE-NdeI-R	cccgaacataatgtcacagagggatatcggc	Gen <i>crtE</i> , partidor reverso. El sitio <i>NdeI</i> está marcado.
mcrE-NcoI-F2	gactagccatggattacgcaacatcctc	Gen <i>crtE</i> , partidor directo. El sitio <i>NcoI</i> está marcado.
mcrEF-RT	tgttgcatgctacataccg	cDNA <i>crtE</i> , partidor directo (para qPCR).
mcrER-RT	gttggcgaagctgaagat	cDNA <i>crtE</i> , partidor reverso (para qPCR).
mcrEF	atggattacgcaacatcctc	Gen <i>crtE</i> , inicio de ORF
mcrER	tcacagagggatatcggctag	Gen <i>crtE</i> , fin de ORF
mFPS-NdeI-R	cccgaacataatgttacttgcttcgcttatagac	Gen <i>FPS</i> , reverse primer. El sitio <i>NdeI</i> está marcado.
mFPS-NcoI-F	gactagccatggccactacgacctgaag	Gen <i>FPS</i> , partidor directo. El sitio <i>NcoI</i> está marcado.
mFPSF2-RT	tggtaaaagttgagggagtgct	cDNA <i>FPS</i> , partidor directo (para qPCR).
mFPSR2-RT	agcggtaacagatcgatgag	cDNA <i>FPS</i> , partidor reverso (para qPCR).
FPS-O2F	atgtccactacgctgaaga	Gen <i>FPS</i> , inicio de ORF
FPS-O1R	ttacttgcttcgcttatagacc	Gen <i>FPS</i> , fin de ORF
FPSnewF	ctatgtcgatctgctagagc	Gen <i>FPS</i> , partidor directo.
FPSnewR	tcgagcacatcatcctgaac	Gen <i>FPS</i> , partidor reverso.
mcrSF-RT	atggctctgcagggttga	cDNA <i>crtS</i> , partidor directo (para qPCR).
mcrSR-RT	tgctccataagctcgatcccaa	cDNA <i>crtS</i> , partidor reverso (para qPCR).
mcrRF-RT	ctgggaacaagacctacga	cDNA <i>crtR</i> , partidor directo (para qPCR).
mcrRR-RT	ggaacctcggttacgacaaa	cDNA <i>crtR</i> , partidor reverso (para qPCR).

### **Extracción de RNA genómico de *X. dendrorhous***

La extracción de RNA se realizó de acuerdo a un protocolo modificado de Chomczynski y Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987, Lodato et al., 2004). Para ello se cosecharon las células luego de diferentes tiempos de cultivo, se suspendieron en 200 µl de buffer de lisis (Acetato de sodio 0,5 M pH 5,5, SDS 5%, EDTA 1 mM) y se rompieron mediante ruptura mecánica con perlas de vidrio de 0,5 mm (BioSpec) en un molidor *mini bead beater-16* (BioSpec) durante 2 min. Luego, se agregó 800 µl de Tri-Reagent (Ambion), se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se llevó nuevamente al molidor por 2 min. Posteriormente, se agregó 200 µl de cloroformo, se mezcló con suavidad y se incubó en hielo durante 6 min. La mezcla luego se centrifugó a 14.000 x g por 10 min y se recuperó la fase acuosa. El RNA se precipitó con 1 volumen de isopropanol y 0,5 volumen de buffer de precipitación (NaCl 1,2 M, citrato de sodio 0,8 M) e incubando una hora a -20°C. El RNA se lavó con etanol 70% v/v y se suspendió en agua bidestilada libre de nucleasas. La integridad del RNA se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7% teñido con bromuro de etidio. La pureza y cantidad se verificó mediante espectrofotometría en un equipo Shimadzu de doble haz (LC-10AT). Para ello se midió la absorbancia a 230, 260, 280 nm estableciéndose las relaciones 260/280 y 260/230. La primera da cuenta de la contaminación con proteínas siendo >1,7 un valor aceptable, en tanto que la segunda da cuenta de la contaminación con fenol siendo >1,8 un valor aceptable. La medición a 260 nm nos permite obtener la concentración de ácidos nucleicos totales en la extracción.



### **Transformación de cepas de *X. dendrorhous* mediante electroporación**

Las células electrocompetentes de *X. dendrorhous* se prepararon según descrito previamente (Adrio y cols., 1995). Para ello se inoculó un matraz con 200 ml de medio YM con un cultivo de *X. dendrorhous* de 48 h a una dilución de 1:100 y se dejó a 22°C con agitación constante hasta una D.O.<sub>600nm</sub> de 0,4 – 0,5 (dilución 1:10). Se colectaron las células por centrifugación a 4.000 x g durante 5 min y luego se suspendieron en 25 ml de buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 7,0 y 25 mM ditioneitol (DTT). Las células se incubaron a 22°C por 10 min y posteriormente se lavaron 2 veces con buffer STM (270 mM Sacarosa, 10 mM Tris-HCL pH 7,5, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) frío. Finalmente, las células se suspendieron en 500 µl de buffer STM frío y se mantuvieron en hielo hasta su utilización.

Para transformar *X. dendrorhous*, 60 µl de células electrocompetentes, se mezclaron con 10 - 20 µg de DNA transformante y se depositaron en cubetas de electroporación frías de 2 mm de apertura. Los parámetros de electroporación fueron 450 V, 125 µF y 600 Ω en un equipo Gene Pulser X Cell de BioRad. Luego de aplicar el pulso eléctrico, se agregó 1 ml de medio YM a las células que posteriormente se transfirieron a un tubo Eppendorf y se incubaron a 22°C por 6 h. Finalmente, las células se sembraron en placas YM-agar con higromicina B (12,5 µg/ml) como antibiótico de selección.

Una vez transformadas las cepas y seleccionadas las colonias transformantes, se confirmó su identidad como *X. dendrorhous* mediante análisis de las secuencias ITS1 e ITS2 (Fell y Blatt, 1999).

## Extracción y análisis de carotenoides y de esteroides

La extracción de carotenoides se realizó según el protocolo descrito previamente (An y cols., 1989), modificado en nuestro laboratorio (Niklitschek, 2008). Brevemente, se colectaron las células provenientes de 10 ml de cultivo de *X. dendrorhous* mediante centrifugación a 4.000 x g durante 5 min. Posteriormente, el pellet celular se lavó 1 vez con agua destilada y luego se suspendió en 1 ml de agua destilada. A continuación se agregó 500 µL de perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro (BioSpec) y las células se rompieron mecánicamente mediante agitación en vórtex por 5 min. Luego, se agregó 1 ml de acetona y se agitó en vórtex por otros 5 min. Se centrifugó a 4.000 x g por 5 min y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. Posteriormente, se realizó extracciones sucesivas con 2 ml de acetona hasta que los restos celulares quedaron blancos. El sobrenadante obtenido en cada extracción se almacenó en un mismo tubo al que luego se le agregó 1/5 del volumen colectado de éter de petróleo, se agitó en vórtex por 5 min y se centrifugó a 4.000 x g por 5 min. Finalmente, se recuperó la fase superior que corresponde al éter de petróleo con los pigmentos. Los pigmentos se cuantificaron por espectrofotometría en cubetas de infrasil utilizando un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV-150-02. Para ello, se determinó el volumen recuperado de éter de petróleo y se midió su absorbancia a 474 nm. La cantidad de carotenoides totales obtenidos se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Carotenoides totales } (\mu\text{g de pigmentos/g de muestra}) = \left( \frac{\text{Abs} * \text{volumen eter} * 10^4}{\text{cem} * \text{g de celulas}} \right)$$

Donde Abs: Absorbancia medida a 474 nm,  $10^4$ : Constante de conversión de unidades µg / g , cem: Coeficiente de extinción molar de astaxantina (2.100).

Los esteroides se extrajeron según descrito previamente (Shang, 2006). Para ello, al pellet celular proveniente de 5 ml de cultivo se le agregó 4 g de KOH, se mezcló con 16 ml de etanol al 60% v/v y se incubó a 80°C durante 2 h. Los esteroides no saponificables se extrajeron con 10 ml de éter de petróleo y se cuantificaron mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 280 nm en cubetas de infrasil con un espectrofotómetro de doble haz Jasco (V-630). La cantidad de esteroides se determinó según la misma fórmula utilizada para medir pigmentos, pero midiendo absorbancia a una longitud de onda de 280 nm. Utilizando un coeficiente de extinción molar 11.500.

Los carotenoides y esteroides disueltos en éter de petróleo se secaron a temperatura ambiente y luego se suspendieron en 100 µl de acetona. Su composición se analizó por RP-HPLC (*Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography*), con una columna de fase reversa RP-18 Lichrocart 125-4 (Merck) en un equipo Shimadzu (LC-10AT). Como fase móvil se utilizó acetonitrilo:metanol:isopropanol (85:10:5 v/v) o metanol:agua (97:3 v/v) para separar carotenoides o esteroides, respectivamente, con un flujo de 1 ml/min a temperatura ambiente y en condiciones isocráticas. Los espectros de cada máximo de elución se obtuvieron con un detector con arreglos de diodos Shimadzu (SPD-M10A). Los carotenoides y esteroides se identificaron de acuerdo a sus espectros de absorción, tiempos de retención y comparación con estándares específicos.

### **Expresión heteróloga de genes en *E. coli***

Se clonó el cDNA de los genes *FPS* y *crtE* en el vector de expresión pET28a(+). Previamente los cDNAs de cada gen, se amplificaron por RT-PCR utilizando partidores con los sitios de restricción *NcoI* y *NdeI* en los extremos y se clonaron en pBS. Así, los plásmidos portadores de ambos cDNAs y el vector de expresión, se digirieron con las

enzimas de restricción correspondientes para realizar un clonación direccional. Luego de la reacción de ligado y transformación, los transformantes se seleccionaron en medio LB-agar suplementado con kanamicina (50 µg/ml). Los transformantes obtenidos se confirmaron mediante PCR de colonias y el inserto de los plásmidos que contenían se secuenció completamente.

Los vectores de expresión obtenidos se introdujeron en la cepa BL21-Gold(DE3) de *E. coli*. La inducción de la expresión se realizó según lo descrito por el proveedor de las cepas (Stratagene) y modificado en nuestro laboratorio. La cepa se incubó a 37°C en medio LB con kanamicina (50 µg/ml) durante 12 horas con agitación constante. A partir de este cultivo se inoculó un matraz nuevo con medio LB con el mismo antibiótico, el cual se incubó hasta una DO<sub>600</sub> 0.5-0.7. Posteriormente, el cultivo se dividió en dos matraces y solo a uno de ellos se le agregó IPTG a una concentración final de 100 µM, mientras que el otro matraz se mantuvo como control sin inducir. Los cultivos se incubaron durante 1 hora a 37°C con agitación constante. Finalmente, las células se cosecharon y se procesaron inmediatamente o se congelaron a -80°C para una posterior extracción de proteínas.

## **Extracción de proteínas**

### **Extracción de proteínas de *E. coli* y visualización en gel de poliacrilamida**

Para obtener el extracto de proteínas totales de *E. coli*, se centrifugó 2 ml del cultivo, se descartó el sobrenadante y el pellet se suspendió en buffer de carga desnaturante para proteínas (Tris 227 mM pH 6,8, Glicerol 18%, p/v Azul de bromofenol 0,002%, SDS 3,6%, β-Mercaptoetanol 2,36 M). La mezcla se calentó a 95°C por 5 min y luego se almacenó en frío o se cargó en un gel de poliacrilamida para su visualización.

Para separar las fracciones proteicas solubles e insolubles, se cosecharon las células de 5 ml de cultivo de *E. coli* y se suspendieron en 1 ml de buffer MOPS pH 7,5 50 mM con un coctel inhibidor de proteasas (Complete, Roche Biomedicals). La suspensión celular se lisó con un sonicador Cole Parmer 4710 mediante 12 pulsos de 10 s a una carga de 40%, separados por 30 s de incubación en hielo. Luego se centrifugo a 14.000 x g durante 10 min y se recuperó el sobrenadante. El pellet restante se lavó 2 veces con buffer Tris-HCl pH 7,5 20 mM, se suspendió en 400 µl de SDS 1% y se incubó a 95°C por 15 min para favorecer su suspensión. Posteriormente, se almacenó en frio. Para la visualización de proteínas mediante SDS-PAGE se agregó a una alícuota de las muestras obtenidas buffer de carga para proteínas a una concentración final (Tris pH 6,8 227 mM, Glicerol 18%, Azul de bromofenol 0,002% p/v, SDS 3,6%, β-Mercaptoetanol 2,36 M). Los geles de poliacrilamida se realizaron al 12% p/v, utilizando una mezcla acrilamida-bis acrilamida 29:1.

#### **Obtención de extracto enzimático a partir de *X. dendrorhous***

Las células de los distintos cultivos de *X. dendrorhous* se cosecharon mediante centrifugación. El pellet celular se lavó 2 veces con agua destilada y luego se suspendió en buffer de extracción de proteínas (MOPS 50 mM pH 7,5, EDTA 5 mM, Sorbitol 0,5 M y coctel de inhibición de proteasas). Posteriormente, se agregó 500 µl de perlas de vidrio (Biospec) de 0,5 mm y se sonicó con 15 pulsos de 30 s a una carga de 90% separados por 1,5 min de incubación en hielo. El lisado se transfirió a un nuevo tubo, sin arrastrar perlas de vidrio, y se centrifugó a 14.000 x g durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se descartó el pellet que contiene las proteínas de membrana celular. El sobrenadante se centrifugó a 100.000 x g durante una hora y

nuevamente se recuperó el sobrenadante, que contiene las proteínas solubles, el cual se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **Ensayo de actividad prenil transferasa y detección de productos**

Previó a los ensayos enzimáticos, los extractos proteicos obtenidos se filtraron a través de una columna de exclusión de metabolitos PD-10 (General Electrics Healthcare) de acuerdo a lo indicado por los fabricantes. En primer lugar, se ambientó la columna con buffer de elución (MOPS 50 mM pH 7,5,  $\text{MgCl}_2$  5 mM). Luego, se depositó hasta 2,5 ml del extracto proteico en la parte superior de la columna y una vez que éste ingresó en la columna, se agregó 3,5 ml de buffer de elución para recuperar a las proteínas. Finalmente, la concentración de proteínas obtenidas se determinó mediante uso del kit de determinación de proteínas con azul de Coomasie (Bradford, Thermo Scientific).

Cada ensayo enzimático se realizó en un volumen final de 500  $\mu\text{l}$  que contenía 12  $\mu\text{g}$  de proteínas, buffer (MOPS 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, DTT 6 mM), 100.000 dpm de IPP marcado con carbono-14 ( $^{14}\text{C}$ -IPP) (56,6 mCi/mmol, 0,81 nmol), IPP frío (20,2  $\mu\text{M}$ ) y DMAPP (20,2  $\mu\text{M}$ ), GPP (16,4  $\mu\text{M}$ ) o FPP (13,8  $\mu\text{M}$ ), todos a concentraciones saturantes. La reacción se incubó una hora a  $22^{\circ}\text{C}$ . Después se agregó 1 volumen de n-hexano, se agitó en vortex durante 5 min y luego se centrifugó a 14.000 x g por 1 min. Se recuperó la fase orgánica (1° fase hexánica) y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A la fase acuosa se le adicionó HCl a una concentración final de 0,66 N y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante una hora. Luego, se adicionó 1 volumen de n-hexano, se agitó en vortex por 5 min y luego se centrifugó a 14.000 x g por 1 min. Se recuperó la fase orgánica (2° fase



hexánica) y se almacenó a -20°C. La fase acuosa restante también se almacenó a -20°C.

Se determinó la actividad enzimática total mediante comparación de la radioactividad medida a partir de una alícuota de 50 µl de cada una de las tres fases (2 fases hexánicas y una fase acuosa) en contador de centelleo (Perkin Elmer Tri-Carb 2810TR). Una unidad enzimática (U) se definió como 1 µmol de producto formado por min bajo las condiciones del ensayo. La actividad prenil transferasa se expresó en U/mg de proteína.

Para separar los prenil alcoholes generados, cada fase hexánica restante se evaporó con nitrógeno hasta llegar a un volumen de 10 a 15 µl que luego se depositó en una placa de cromatografía en capa fina de fase reversa (TLC, Silica gel 60 RP-18, Merck). Como referencia, en el mismo punto de carga, se agregaron los estándares de prenil alcoholes (C<sub>5</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>15</sub> y C<sub>20</sub>) y como fase móvil se utilizó acetona:agua (9:1). Una vez finalizada la cromatografía, la placa se roció con solución de Lieberman-Burchard y se sometió a fuego indirecto hasta revelado. Una vez que se revelaron los estándares, la placa se dividió en secciones de 2.5 mm y se midió la radioactividad con el contador de centelleo de cada uno de los segmentos.

## Resultados

### Expresión de los genes *FPS* y *crtE* de *X. dendrorhous* en *E. coli*

Se construyeron los vectores de expresión de los genes *FPS* y *crtE* de *X. dendrorhous* en *E. coli*. Para ello, el cDNA de los genes en estudio se sub-clonaron en el vector de expresión pET28a(+) digerido con las enzimas *NdeI* y *NcoI* de tal manera que la expresión de los genes quedó bajo el control del promotor T7Lac. En primer lugar fue necesario incluir los sitios de restricción mencionados en el cDNA de cada gen para permitir su inserción direccionada en el vector de expresión. Así, a partir de los plásmidos pXd-c*FPS* y pXd-c*crtE*, se amplificó mediante PCR el correspondiente cDNA con las parejas de partidores m*FPS*-*NcoI*-F+m*FPS*-*NdeI*-R y m*crtE*-*NcoI*-F2+m*crtE*-*NdeI*-R (Tabla 3), respectivamente, que contienen los sitios de restricción *NdeI* y *NcoI*. Los productos de PCR esperados, de 1.088 y 1.151 pb para el cDNA de *FPS* y *crtE*, se confirmaron en geles de agarosa y luego se purificaron por el método de dióxido de silicio *glass milk* para clonarlos en el vector pBluescript digerido con la enzima *EcoRV*. De esta manera se obtuvo a los plásmidos pXd-c*FPS*-NN y pXd*crtE*-NN (Tabla 3), portadores del cDNA de cada gen con los sitios de restricción deseados. Posteriormente, estos últimos plásmidos se digirieron con las enzimas de restricción *NdeI* y *NcoI* para liberar el inserto de cada uno de ellos, y con las mismas enzimas se digirió al vector de expresión pET28a(+). Las reacciones de digestión se evaluaron en geles de agarosa y los fragmentos de DNA deseados también fueron purificados por el método de *glass milk*. Una vez purificados los insertos y el vector pET28a(+) digeridos con las mismas enzimas, se ligaron y se transformó por electroporación la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* para la replicación de los plásmidos. Los transformantes se seleccionaron en placas con medio LB con kanamicina y las colonias resultantes se aislaron y analizaron

mediante PCR de colonias con partidores específicos para cada cDNA (Figura 4). De esta manera se obtuvo a los plásmidos pET28-*cFPS* y pET28-*crtE* (Tabla 1), cuyos insertos fueron secuenciados para confirmar su correcta construcción.

Posteriormente, se transformó la cepa de expresión de *E. coli* BL21 Gold(DE3) mediante electroporación con los plásmidos pET28a(+), pET28-*cFPS* y pET28-*crtE*, y los transformantes se seleccionaron en placas con medio LB suplementado con kanamicina (50 µg/ml). De esta manera se obtuvieron las cepas BL21+pET28, BL21+FPS y BL21+crtE, respectivamente (Tabla 2).

La inducción de la expresión de los genes en las cepas resultantes se realizó en triplicados con IPTG de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Como control se usó a los respectivos cultivos sin inducir. Luego del protocolo de inducción, se obtuvo la fracción total de proteínas las que se visualizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 1,2 % p/v teñido con azul de Coomasie. Entre las bandas de proteínas, solo se observó una banda de un tamaño similar a lo esperado de 40,24 y 42,16 kDa en los extractos de las cepas BL21+FPS y BL21+crtE, respectivamente, cuando los cultivos fueron tratados con IPTG (Figura 5). Sin embargo, la proteína codificada por el gen *FPS* presentó una migración menor a lo esperado. Para confirmar la identidad de las bandas de las proteínas observadas, cada una se escindió del gel y se analizó mediante espectrometría de masa MALDI-TOF (servicio contratado en CEPEDeq, <http://www.cepedeq.uchile.cl/>). Los resultados devueltos indicaron que efectivamente las bandas analizadas correspondían a las proteínas esperadas: una proteína farnesil pirofosfato sintasa (FPP-sintasa) y una proteína geranylgeranyl pirofosfato sintasa (GGPP-sintasa), codificadas por los genes *FPS* y *crtE*, respectivamente.

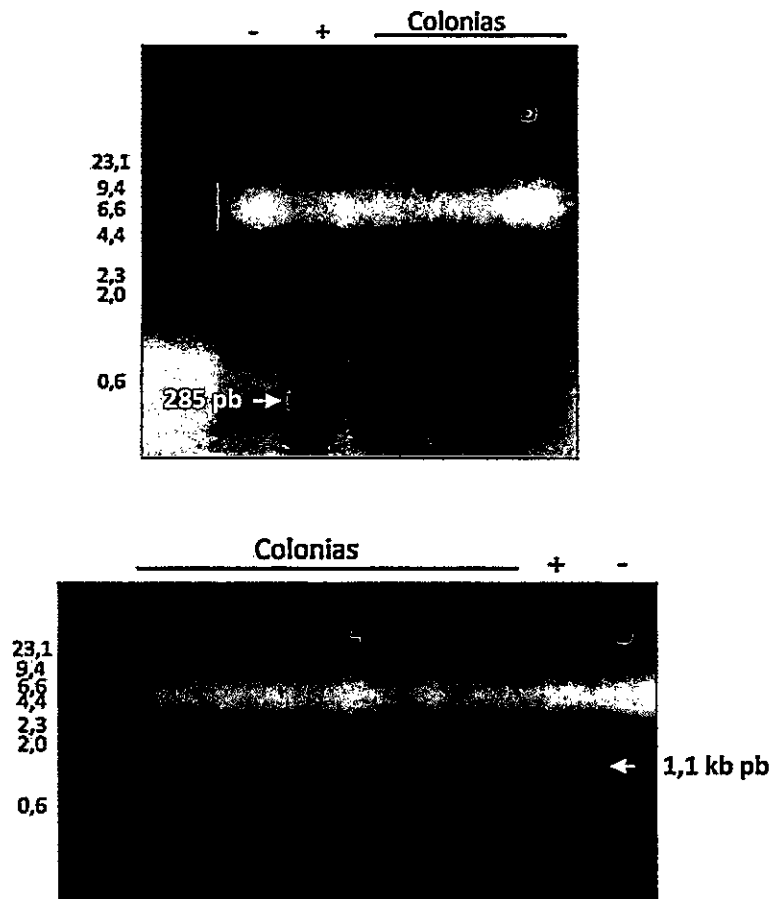
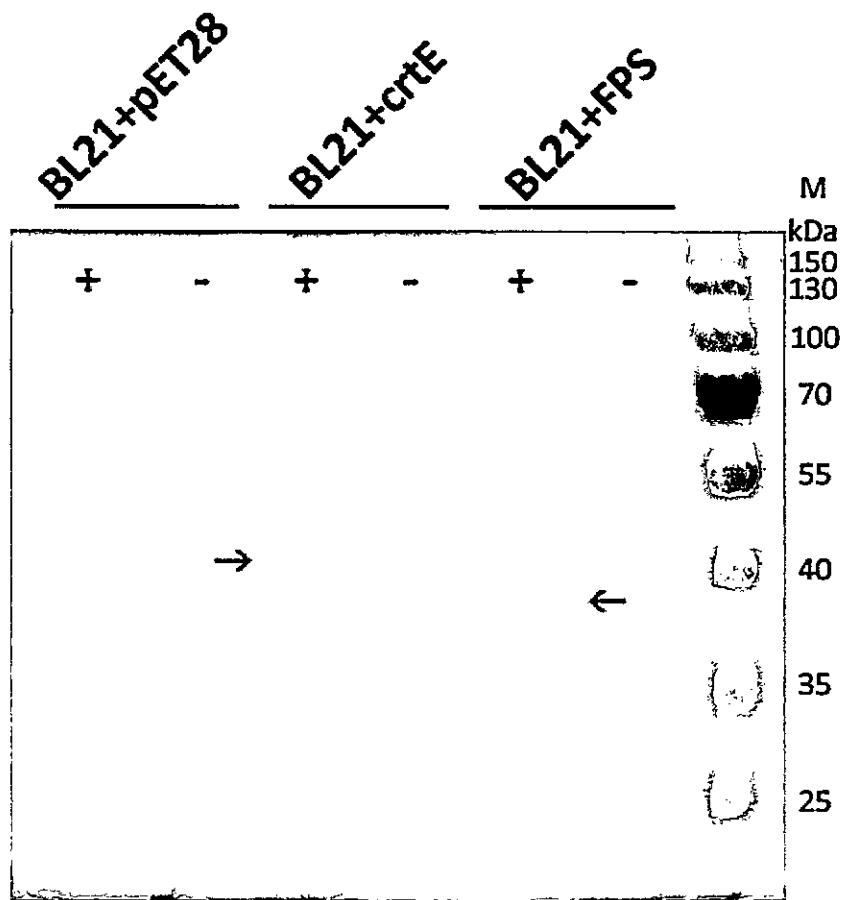


Figura 4. Electroforesis de los productos de PCR obtenidos de colonias transformantes con pET28-cFPS y pET23-ccrtE.

PCR de colonias para evaluar las colonias transformantes esperadas. Para las transformantes con pET28-cFPS (arriba, carriles 3 a 5) se utilizó la pareja de partidores FPSnewF y FPSnewR, con un amplificado esperado de 285 pb. Como control positivo (+) se amplificó el plásmido pXd-cFPS. Para las transformantes con pET28-ccrtE (abajo, carriles 1 a 6) se utilizó la pareja de partidores mcrtEF y mcrtER con un amplificado esperado de 1.131 pb. Como control positivo (+) se amplificó el plásmido pXd-ccrtE. Como control negativo (-) se utilizó una colonia azul. M: marcador de tamaño molecular DNA de fago  $\lambda$  digerido con la enzima de restricción *HindIII*: 23,1, 9,4, 6,6, 4,4, 2,3, 2,0, 0,6 kb.



**Figura 5. SDS-PAGE de extractos de proteínas de bacterias transformadas de *E. coli*.**

La fracción soluble de proteínas obtenida a partir de las cepas BL21+pET28, BL21+FPS y BL21+crtE de *E. coli* se separó mediante SDS-PAGE. Se distingue las cepas tratadas con IPTG (+) de la condición control (-). Las flechas indican las bandas de proteínas heterólogas en los cultivos inducidos con IPTG para las cepas BL21+FPS y BL21+crtE, que portan el plásmido para expresar los genes *FPS* y *crtE* de *X. dendrorhous*. M: marcador de peso molecular 150, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25 kDa.

En ensayos iniciales de electroforesis en geles de poliacrilamida se observó que ambas proteínas se encontraban en la fracción insoluble del extracto de proteínas. Esto sugiere la formación de cuerpos de inclusión o un mal plegamiento de las mismas, ya que se esperaba encontrar a ambas proteínas en la fracción soluble porque no son proteínas de membrana. Como lo anterior presentaba dificultades para los ensayos enzimáticos diseñados, se procedió a optimizar la inducción de la expresión de los genes. Para ello se probaron varias condiciones de inducción variando la concentración de IPTG (1 mM, 750  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 250  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 25  $\mu$ M y 10  $\mu$ M), la temperatura de inducción (10, 22 y 37°C) y el protocolo de sonicación (desde 5 a 15 pulsos de 10 o 15 s seguidos por 30 o 40 s de incubación en hielo a un 40%-100% de carga). Finalmente, se logró obtener ambas proteínas en la fracción soluble y enzimáticamente activas al cultivar las cepas inicialmente a 37 °C, luego inducción con 100  $\mu$ M de IPTG e incubación a 22°C por 1 h, y el siguiente protocolo de sonicación: 10 pulsos de 10 s cada uno seguidos por 30 s de incubación en hielo a una carga de 40%.

#### **Actividad prenil transferasa de cepas de *E. coli* recombinantes que expresan los genes *FPS* y *crtE* de *X. dendrorhous*.**

Se evaluó la actividad prenil transferasa de los extractos de proteínas obtenidos a partir de las cepas de *E. coli* BL21+pET28, BL21+FPS y BL21+crtE. Para ello, se obtuvo la fracción soluble de los extractos de proteínas como fue descrito y con ellos se realizó los ensayos de actividad prenil transferasa. Como sustratos se utilizó <sup>14</sup>C-IPP e IPP frío, adicionando DMAPP, GPP o FPP como sustratos adicionales según el ensayo realizado. Los resultados de estos experimentos se resumen en la Tabla 4.

Tal como se esperaba, el extracto de proteínas obtenido de la cepa BL21+pET28, portadora del vector de expresión sin inserto, no presentó actividad prenil transferasa

**Tabla 4. Actividad prenil transferasa en cepas de expresión heteróloga en *E. coli*.**

Cepa de origen del extracto proteico	Sustrato variable	Actividad prenil transferasa (U/mg x 10 <sup>6</sup> )	Porcentaje de productos*
BL21+pET28	DMAPP	-	ND
	GPP	-	ND
	FPP	-	ND
BL21+FPS	DMAPP	6.06±0.75	C <sub>10</sub> (12.9 %), C <sub>15</sub> (87.1 %)
	GPP	3.84±0.43	C <sub>15</sub> (100 %)
	FPP	-	ND
BL21+crE	DMAPP	-	ND
	GPP	-	ND
	FPP	2.44±0.16	C <sub>20</sub> (100 %)
BL21+FPS y BL21+crE	DMAPP	6.65±0.11	C <sub>10</sub> (17.4 %), C <sub>15</sub> (71.5 %), C <sub>20</sub> (11.1 %)

**Nota:** Los ensayos enzimáticos se realizaron según descritos en la sección materiales y métodos. Dos extractos proteicos de dos cultivos en replica fueron obtenidos de cada cepa. Cada ensayo se realizó por duplicado. Los valores observados corresponden al promedio observado ± el error estándar de la media.

\* Porcentaje de cada producto considerando 100% el total de la radioactividad detectada en la fase hexánica. C<sub>10</sub>, C<sub>15</sub> and C<sub>20</sub> corresponden a productos que migraron con estándares de prenil alcoholes de 10, 15 y 20 carbonos, respectivamente.

**ND:** No detectado

en ninguno de los ensayos realizados. No obstante, los extractos de las cepas BL21+FPS y BL21+crtE, si mostraron actividad prenil transferasa dependiendo del sustrato adicional utilizado. De esta manera, se observó actividad prenil transferasa en el extracto de la cepa BL21+FPS, sólo cuando se adicionó DMAPP o GPP al ensayo, pero no cuando se adicionó FPP. En el ensayo con DMAPP se detectaron productos C<sub>10</sub> (12,9%) y C<sub>15</sub> (87,1%), mientras que en el ensayo con GPP solo se encontró productos C<sub>15</sub>. Por otro lado, el extracto de la cepa BL21+crtE solo presentó actividad prenil transferasa cuando se adicionó FPP como sustrato adicional y solo se detectó productos C<sub>20</sub>. Finalmente, en el ensayo que combinó los extractos de proteínas de las cepas BL21+FPS y BL21+crtE, fue posible detectar actividad prenil transferasa y se encontraron los tres tipos de productos: C<sub>10</sub> (17,4%), C<sub>15</sub> (71,5%) y C<sub>20</sub> (11,1%) con sólo adicionar DMAPP como sustrato adicional al IPP.

### **Obtención de cepas de *X. dendrorhous* que sobreexpresan los genes *FPS* y *crtE*.**

Para obtener los vectores de sobreexpresión de *FPS* y *crtE* para *X. dendrorhous*, el cDNA de dichos genes previamente clonados en el vector pBluescript, se sub-clonaron en el vector pXdVexp2 construido en el laboratorio de Genética (datos aun no publicados) (Figura 6). El vector pXdVexp2 es un vector de integración que se caracteriza por contener un módulo de expresión formado por el promotor del gen de la ubiquitina [Genbank: KJ140285] y el terminador del gen GPD [Genbank: Y08366], ambos de *X. dendrorhous*, separados por un sitio de reconocimiento de la enzima *HpaI* para permitir la inserción de un fragmento de DNA entre ellos. Además, el vector contiene un marcador de resistencia al antibiótico higromicina B para seleccionar a los transformantes. El módulo de expresión y el marcador de resistencia están adyacentes



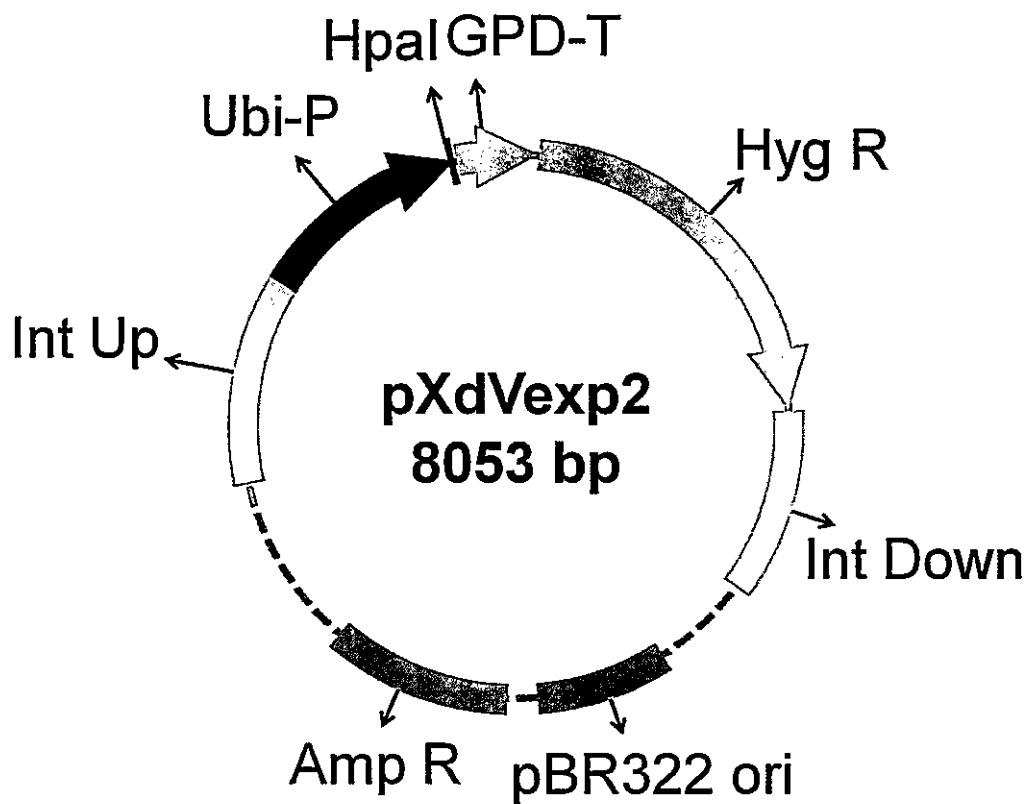


Figura 6. Vector pXdVexp2.

Vector utilizado en este trabajo para sobreexpresar genes en *X. dendrorhous*. El gen a expresar se inserta en el sitio *HpaI*, siendo controlado por el promotor del gen de ubiquitina [en naranja, GenBank: KJ140285] con el terminador GPD [en amarillo, GenBank: Y08366]. El vector posee un módulo que confiere resistencia a higromicina B (en ocre) a los transformantes, y regiones de DNA (en naranja) para dirigir la integración en el locus *int* [GenBank: KJ140286] de la levadura. El vector se construyó utilizando al plásmido pBluescript SK- como base (en gris se demarcan el origen de replicación bacteriano y gen de resistencia a ampicilina, para selección en bacterias).

y ambos están flanqueados por regiones de DNA genómico de *X. dendrorhous* para dirigir la integración en el *locus int* [Genbank: KJ140286]. Previo a la transformación, las construcciones basadas en pXdVexp2 se digirieron con *SmaI*, para liberar el DNA transformante.

El cDNA de los genes *FPS* y *crtE* se amplificó desde los vectores pXd-*crtE* y pXd-*cFPS*, respectivamente, y se ligaron a pXdVexp2 digerido con *HpaI*. Se transformó la cepa DH5α de *E. coli* mediante electroporación para la replicación de los plásmidos y los transformantes se seleccionaron en placas LB suplementadas con ampicilina. Las colonias recombinantes, portadoras de pXdVexp2 con un inserto, se seleccionaron mediante PCR de colonias utilizando parejas de partidores específicas para los cDNAs de *FPS* y *crtE* que permitían confirmar la orientación de inserción correcta (FPSnewF o crtERT-F + TEF Sec R, para *FPS* o *crtE*, respectivamente) (Tabla 1). Una vez identificadas las colonias portadoras de los plásmidos de interés, se seleccionó una de ellas con cada plásmido para realizar extracción de DNA plasmidial. Estos plásmidos se denominaron pXdVexp2-*cFPS* y pXdVexp2-*crtE* (Figura 7), respectivamente, y su correcta construcción se evaluó mediante diferentes reacciones de PCR (Figura 8).

Los plásmidos pXdVexp2-*cFPS* y pXdVexp2-*crtE* se digirieron con *SmaI* para transformar mediante electroporación la cepa silvestre UCD 67-385 y los transformantes se seleccionaron en placas con medio solido YM suplementadas con higromicina B. De esta manera se seleccionó a las cepas 385-FPS<sup>(+/+, +1)</sup> y 385-crtE<sup>(+/+, +1)</sup> (Tabla 2).

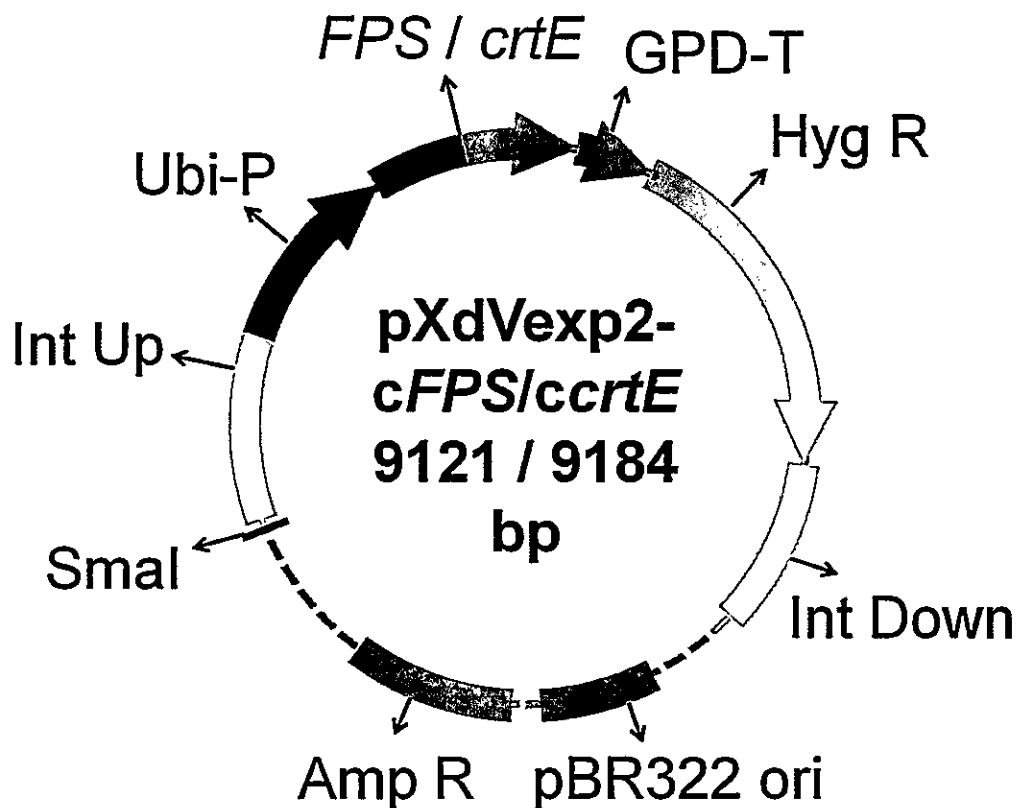


Figura 7. Vector pXdVexp2-cFPS y pXdVexp2-cCRT E.

En la figura se observa el vector pXdVex2 con el gen *FPS* o *crtE* (verde y azul, respectivamente) en el sitio de inserción. Los vectores obtenidos pXdVex2-cFPS o pXdVex2-cCRT E tienen un tamaño de 9121 y 9184 pb, respectivamente., en el que se sub-clonó el cDNA de los genes *FPS* y *crtE* de *X. dendrorhous*. Previo a la transformación de *X. dendrorhous* se linearizan los vectores mediante digestión con la enzima de restricción *SmaI*.

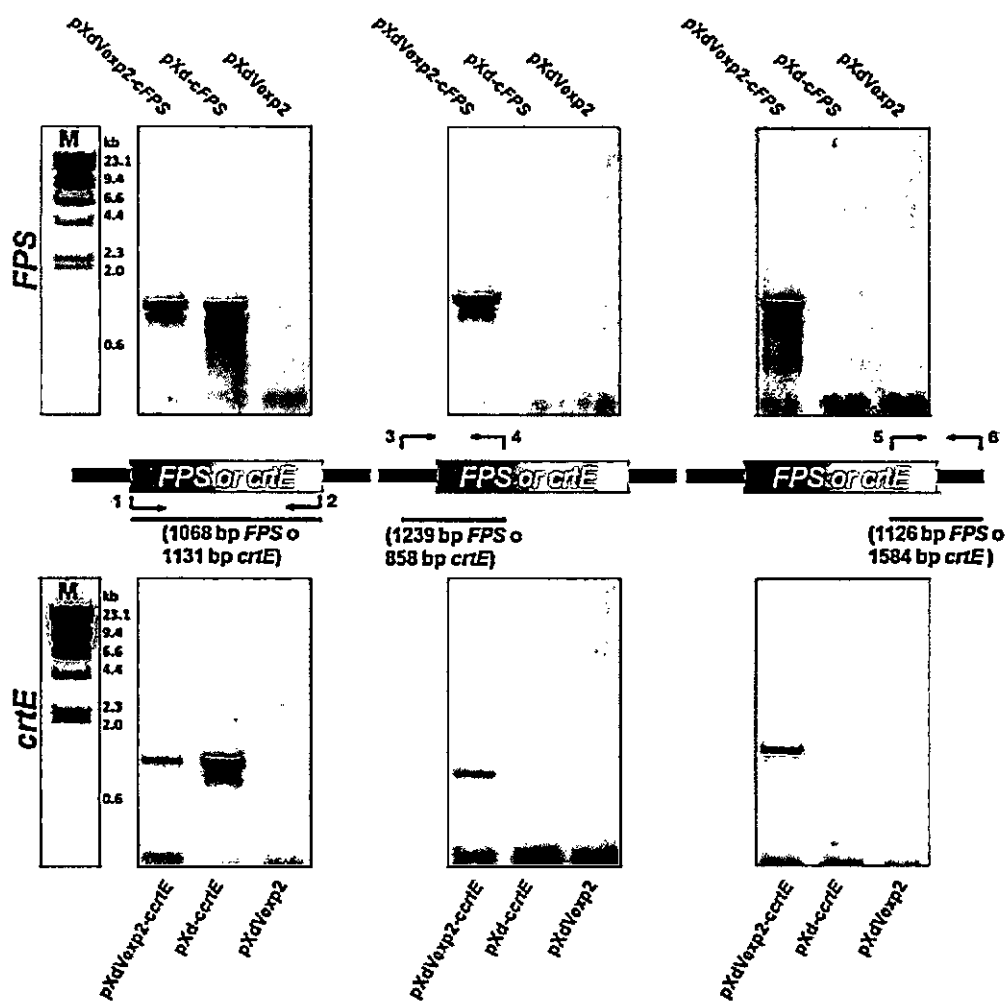


Figura 8. Confirmación de inserción de gen *FPS* o *crtE* en el vector pXdVexp2

Análisis mediante PCR para evaluar la correcta obtención de plásmidos pVexp2-cFPS (arriba) y pVexp2-crtE (abajo). Entre las imágenes superiores e inferiores se presenta un esquema de la ubicación relativa de los partidores utilizados en el análisis y el tamaño del producto esperado. Como controles se incluyó a los plásmidos pXd-cFPS o pXd-crtE, y el plásmido pXdVexp2 sin un inserto, se utilizó como control negativo. Los partidores utilizados se encuentran indicados con números y corresponden a: 1: FPS-O2F o mcrEF, 2: FPS-O1R o mcrER, 3: Ubi Fw2, 4: FPSnewR o mcrER-RT, 5: TEF Sec R, 6: FPSnewF o mcrER-RT. M: Marcador de tamaño molecular DNA de fago  $\lambda$  digerido con *Hind*III (23,1; 9,4; 6,6; 4,4; 2,3; 2,0 y 0,6 kb).

### **Evaluación del fenotipo en cepas mutantes de *X. dendrorhous* heterocigotas y que sobreexpresan a los genes *FPS* y *crtE*.**

Para comparar el fenotipo de las cepas mutantes heterocigotas y de sobreexpresión de los genes *FPS* y *crtE*, se evaluó su crecimiento, producción de carotenoides y de esteroides, expresión de algunos genes claves y la actividad prenil transferasa. Para ello, la cepa parental silvestre y las mutantes que derivan de ella: heterocigotas (385-*FPS*<sup>(+/+)</sup> y 385-*crtE*<sup>(+/+)</sup>) y de sobreexpresión (385-*FPS*<sup>(+/+, +1)</sup> y 385-*crtE*<sup>(+/+, +1)</sup>) (Tabla 2), se cultivaron por triplicado durante 5 días en medio YM con agitación constante a 22°C. El crecimiento se evaluó midiendo la absorbancia del cultivo a 600 nm y se recolectaron muestras luego de 72 y 120 h de cultivo. A las muestras de 72 h se les extrajo carotenoides, esteroides, RNA y proteínas, mientras que a las muestras de 120 h, sólo se les extrajo carotenoides y esteroides.

#### **Curvas de crecimiento**

La Figura 9 muestra las curvas de crecimiento de las 5 cepas de *X. dendrorhous* estudiadas en este trabajo. Se puede observar que la mayoría de las cepas crecen similares a la cepa parental. Sin embargo, el cultivo de la cepa 385-*crtE*<sup>(+/+, +1)</sup> alcanzó una menor densidad óptica en la fase estacionaria de crecimiento, siendo aproximadamente un 72%, respecto a las otras cepas.

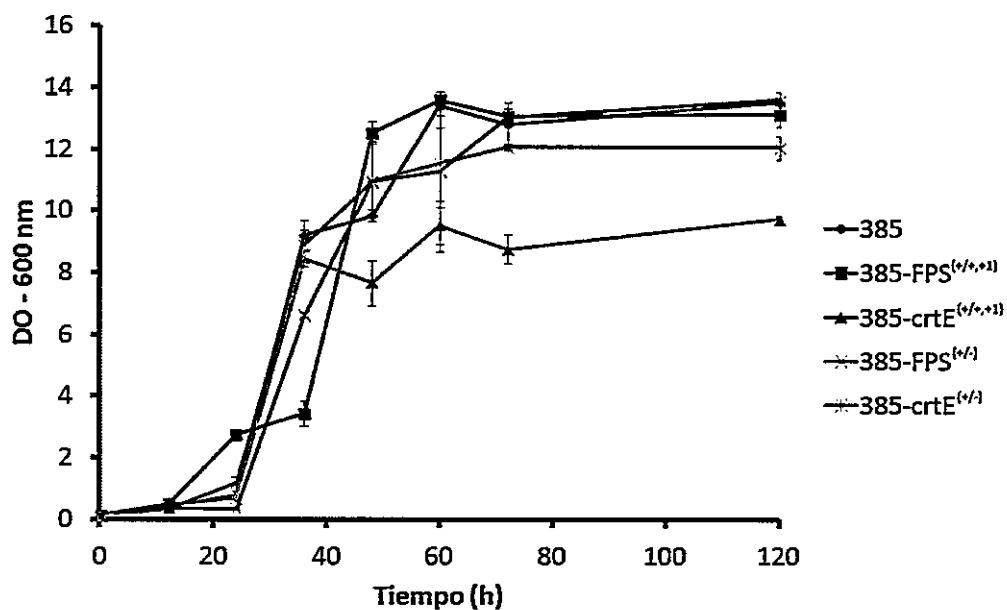


Figura 9. Curvas de crecimiento de cepas de *X. dendrorhous*.

Las cinco cepas utilizadas en este trabajo se cultivaron en medio líquido para levaduras YM y el crecimiento se determinó mediante medición de  $DO_{600}$  durante 120 horas. La cepa 385-crtE<sup>(+/+,+1)</sup> presenta una  $DO_{600}$  menor al resto de las cepas. Se representa el valor promedio de tres cultivos independientes de cada cepa y el error estándar de la media.



### **Carotenoides y esteroides**

Los carotenoides y esteroides de las 5 cepas estudiadas fueron extraídos a partir de 5 ml de cultivo luego de 72 y 120 h de cultivo. Para normalizar los datos se colectó por separado 2 ml del cultivo para determinar el peso seco de levadura de las muestras analizadas. Cada muestra se procesó de acuerdo a lo descrito anteriormente y en triplicados para cada cepa. Los pigmentos y esteroides obtenidos se cuantificaron mediante espectrofotometría y su composición se determinó mediante RP-HPLC. Los resultados se resumen en las Tablas 5 y 6 y las figuras 12 y 13. Además, la pigmentación de las colonias de cada cepa fue registrada fotográficamente luego de 1, 3 y 5 días de cultivo en placas con medio YM incubadas a 22 °C (Figura 10).

Las cepas 385-*FPS*<sup>(+/+, +1)</sup> y 385-*crE*<sup>(+/+, +1)</sup> mostraron un mayor contenido de carotenoides totales que la cepa parental silvestre: un 25 y 36% más, respectivamente luego de 120 h de cultivo. Sin embargo, la composición de pigmentos solo se vio alterada ligeramente observándose una mayor proporción de astaxantina. Por otro lado las cepas heterocigotas producen la misma cantidad de carotenoides que la cepa parental, pero su composición se vio significativamente alterada. Éstas contienen una menor proporción de astaxantina en favor de una mayor fracción de  $\beta$ -caroteno y de otros carotenoides intermediarios entre la síntesis de estos dos pigmentos.

Por otro lado los esteroides no se vieron alterados mayormente, solo se encontró una diferencia significativa entre la cepa UCD 67-385 y 385-*crE*<sup>(+/+, +1)</sup> a las 120 horas de cultivo donde esta última presenta un aumento de un 36% respecto a la cepa parental (Figura 12). La composición de esteroides no se vio alterada.

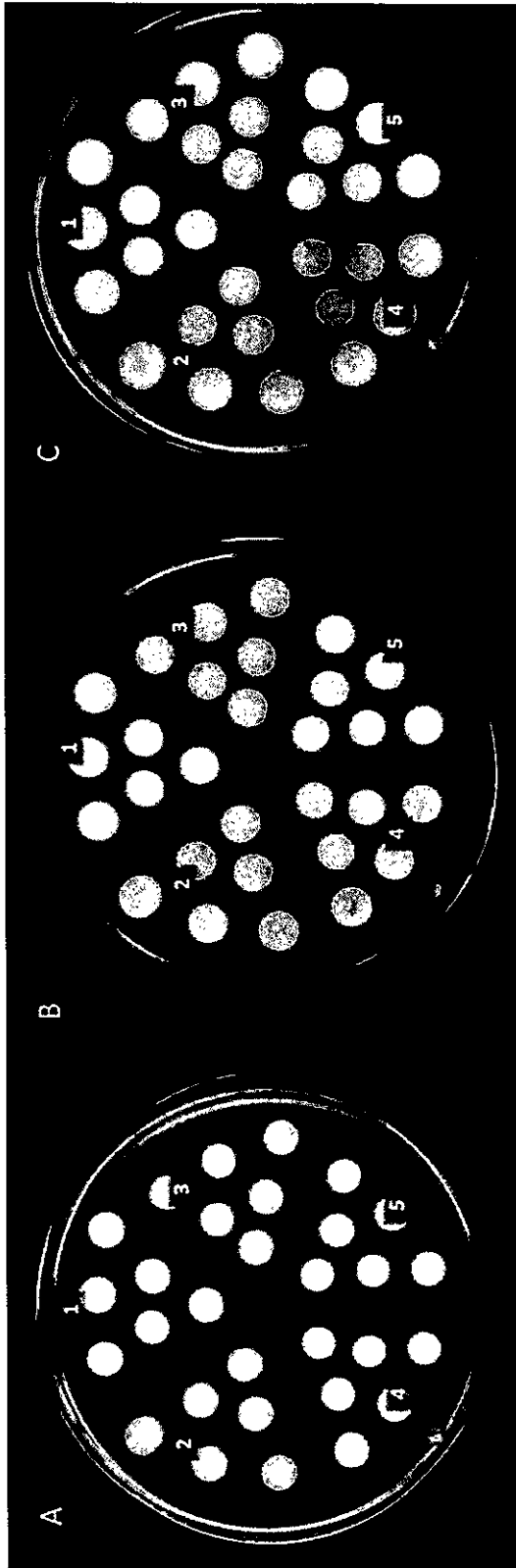


Figura 10. Cultivo en placas de cepas de *X. dendrorhous*.

Las cinco cepas estudiadas corresponden a 1) UCD 67-387 (parental), 2) 385-FPS<sup>(+/+)</sup>, 3) 385-crtE<sup>(+/+)</sup>, 4) 385-FPS<sup>(+/+)</sup>, 5) 385-FPS<sup>(+/+)</sup> cultivadas en medio YM semi-sólido e incubadas a 22°C. Se tomó registro fotográfico luego de A) 24, B) 72 y C) 120 h de cultivo. Se puede observar las diferencias en pigmentación entre las cepas.



**Tabla 5. Carotenoides en cepas de *X. dendrorrhous* (en ppm, µg de carotenoides/g de levadura seca).**

Cepas (72 h de cultivo)					
Carotenoides	UCD 67-385	385-FPS <sup>(7/2, +1)</sup>	385-crtE <sup>(7/2, +1)</sup>	385-FPS <sup>(7/2)</sup>	385-crtE <sup>(7/2)</sup>
Total	376,3 ± 5,52 (100)	472,9 ± 25,6 (100)	513,4 ± 12,9 (100)	380,8 ± 21,4 (100)	388,0 ± 5,8 (100)
Astaxantina	305,9 ± 12,9 (81,3)	428,4 ± 9,5 (90,6)	451,1 ± 12,5 (87,9)	231,0 ± 32,8 (60,7)	200,4 ± 34,9 (51,6)
Fenicoxantina	50,1 ± 4,0 (13,3)	30,0 ± 4,5 (6,3)	38,0 ± 1,9 (7,4)	60,0 ± 2,3 (15,8)	62,5 ± 1,5 (16,1)
Cantaxantina	9,0 ± 0,6 (2,4)	9,6 ± 2,0 (2,0)	10,5 ± 2,7 (2,0)	15,3 ± 2,7 (4,0)	14,6 ± 4,0 (3,8)
OH-equinenona	4,8 ± 3,0 (1,3)	ND	4,4 ± 4,0 (0,9)	10,5 ± 6,8 (2,8)	25,9 ± 9,7 (6,7)
Equinenona	1,7 ± 1,7 (0,5)	ND	3,9 ± 2,9 (0,8)	28,9 ± 8,9 (7,6)	34,0 ± 5,9 (8,8)
β-caroteno	3,1 ± 3,1 (0,8)	ND	ND	38,0 ± 18,7 (10,0)	48,0 ± 14,0 (12,4)
Cepas (120 h de cultivo)					
Carotenoides	UCD 67-385	385-FPS <sup>(7/2, +1)</sup>	385-crtE <sup>(7/2, +1)</sup>	385-FPS <sup>(7/2)</sup>	385-crtE <sup>(7/2)</sup>
Total	436,4 ± 11,5 (100)	514,9 ± 4,1 (100)	559,1 ± 30,3 (100)	437,5 ± 26,6 (100)	440,3 ± 8,82 (100)
Astaxantina	366,7 ± 22,2 (84,0)	466,6 ± 17,6 (90,6)	500,4 ± 18,7 (89,5)	237,0 ± 14,6 (54,2)	241,6 ± 15,3 (54,9)
Fenicoxantina	45,5 ± 10,8 (10,4)	36,4 ± 10,3 (7,1)	46,1 ± 10,6 (8,2)	80,2 ± 4,1 (18,3)	74,3 ± 0,3 (16,9)
Cantaxantina	7,2 ± 2,7 (1,6)	4,9 ± 2,6 (1,0)	4,0 ± 2,6 (0,7)	16,3 ± 1,6 (3,7)	13,7 ± 1,4 (3,1)
OH-equinenona	6,0 ± 0,9 (1,4)	0,9 ± 0,0 (0,2)	3,4 ± 0,9 (0,6)	28,3 ± 2,2 (6,5)	39,1 ± 4,2 (8,9)
Equinenona	1,2 ± 0,7 (0,3)	1,7 ± 0,0 (0,3)	1,5 ± 1,5 (0,3)	32,4 ± 4,4 (7,4)	31,0 ± 3,9 (7,0)
β-caroteno	5,2 ± 0,1 (1,2)	1,0 ± 0,0 (0,2)	2,1 ± 2,1 (0,4)	41,3 ± 6,7 (9,4)	40,7 ± 6,8 (9,2)

**Nota:** La tabla muestra el valor promedio ± error estándar de la media de tres cultivos independientes. El porcentaje de cada carotenoide relativo al total en cada caso se indica entre paréntesis. **ND:** No detectado.

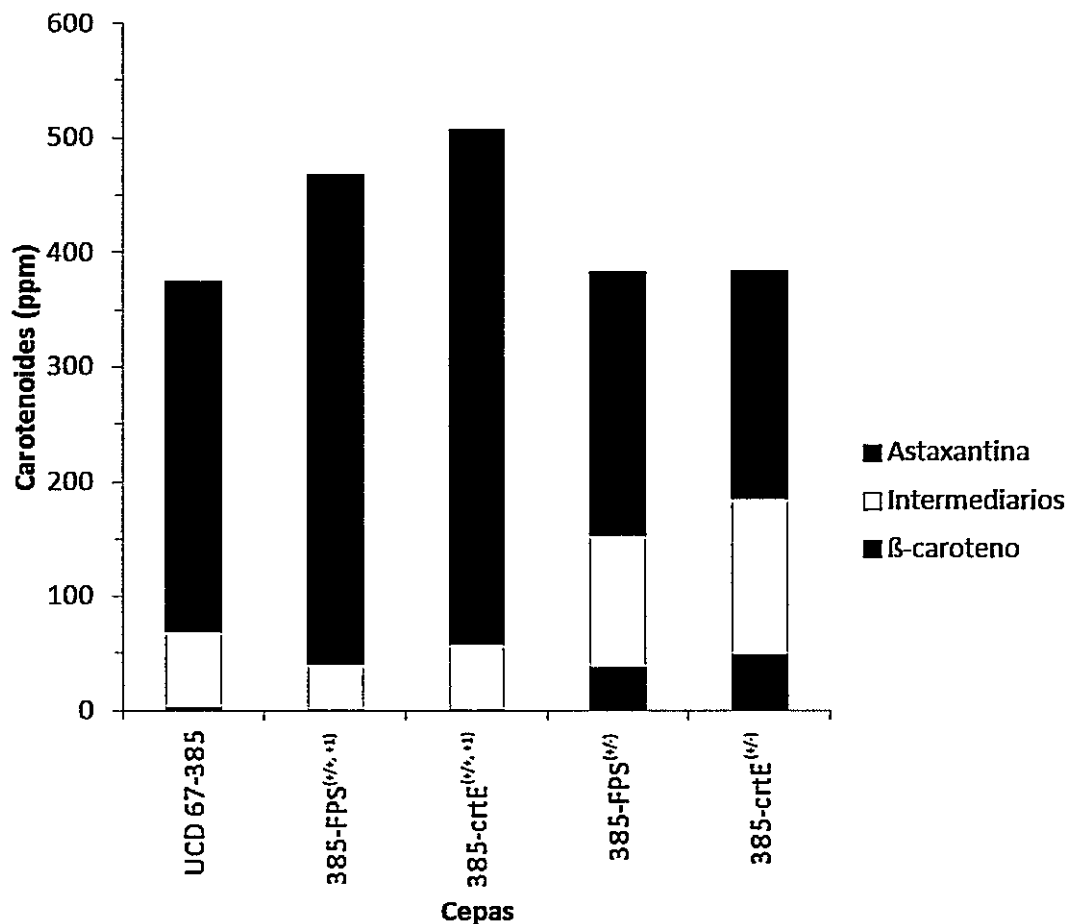


Figura 11. Composición de carotenoides en cepas de *X. dendrorhous*.

La cantidad y composición de carotenoides de las cepas de *X. dendrorhous* se determinó a las 72 horas, mediante cuantificación en espectrofotómetro y separación en un equipo de HPLC de fase reversa. Se observa un aumento en los carotenoides totales en las cepas de sobreexpresión (385-FPS<sup>(+/+ +1)</sup> y 385-crE<sup>(+/+ +1)</sup>), con un ligero aumento en la proporción de astaxantina. Las cepas de mutantes heterocigotas (385-FPS<sup>(+/-)</sup> y 385-crE<sup>(+/-)</sup>) mostraron la misma cantidad de carotenoides totales que la cepa parental (UCD 67-385), pero con una menor proporción de astaxantina, a favor de otros carotenoides e intermediarios.

Tabla 6. Esteroles en cepas de *X. dendrorhous* (en mg/gr de peso seco de levadura)

	Cepas				
	UCD 67-385	385-FPS <sup>(+/+, +1)</sup>	385-crtE <sup>(+/+, +1)</sup>	385-FPS <sup>(+/-)</sup>	385-crtE <sup>(+/-)</sup>
72 h	2,32 ± 0,01	2,27 ± 0,04	2,49 ± 0,23	2,41 ± 0,04	2,34 ± 0,13
120 h	1,76 ± 0,16	2,10 ± 0,11	2,39 ± 0,18	2,03 ± 0,10	2,10 ± 0,14

Nota: La tabla muestra el valor promedio ± error estándar de la media de tres cultivos independientes.

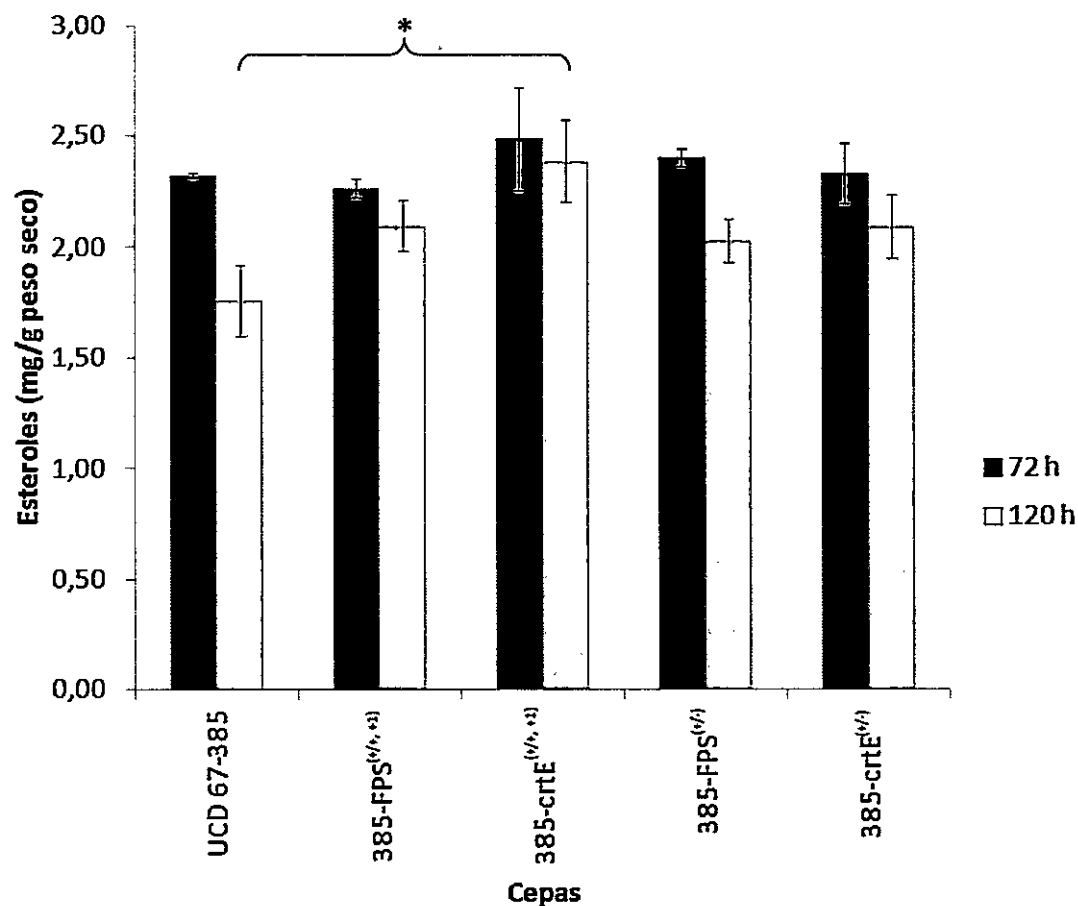


Figura 12. Esteroles en cepas utilizadas.

La cantidad y composición de carotenoides de las cepas de *X. dendrorhous* se determinó a las 72 y 120 horas, mediante cuantificación en espectrofotómetro y separación en un equipo de HPLC de fase reversa. Sólo se encontró diferencias significativas en los esteroles totales en la cepa 385-crtE(+/+, +1) respecto a la cepa parental UCD 67-385 (test t de student,  $p < 0,01$ ).

### **Niveles de expresión de los genes *FPS*, *crtE*, *crtS* y *crtR* en cepas de *X. dendrorhous***

Para determinar si el cambio en la pigmentación de las cepas mutantes se debe efectivamente a diferencias en los niveles de los transcritos de los genes estudiados, se midió los niveles de RNA mensajero de los genes *FPS* y *crtE*. De la misma manera se analizó los niveles de expresión de los genes *crtS* y *crtR* debido a que en ambas cepas heterocigotas se encontró una alteración en la composición de pigmentos, principalmente entre los niveles de  $\beta$ -caroteno y astaxantina, siendo estos genes los que controlan la síntesis de astaxantina desde  $\beta$ -caroteno. Para ello, se extrajo el RNA total luego de 72 h de cultivo y la expresión de dichos genes se evaluó mediante RT-qPCR, cuyos niveles de transcritos se normalizaron de acuerdo con el nivel del transcrito del gen de actina [Genbank: X89898.1]. Los resultados se muestran en la Figura 13, donde los niveles de los transcritos de cada gen se consideraron un 100 % en la cepa parental UCD 67-385. Como era esperado, los transcritos de los genes *FPS* y *crtE* presentaron un mayor nivel en las cepas de sobreexpresión 385-*FPS*<sup>(+/+, +1)</sup> y 385-*crtE*<sup>(+/+, +1)</sup>. Las cepas mutantes heterocigotas 385-*FPS*<sup>(+/-)</sup> y 385-*crtE*<sup>(+/-)</sup> mostraron un menor nivel de los respectivos transcritos. Por otro lado, los genes *crtS* y *crtR* no mostraron diferencias significativas en las cepas de sobreexpresión con respecto a la cepa parental. Sin embargo, se observó una reducción significativa en los niveles del transcrito del gen *crtR* en ambas cepas heterocigotas y en menor grado del gen *crtS* en la cepa 385-*crtE*<sup>(+/-)</sup>.

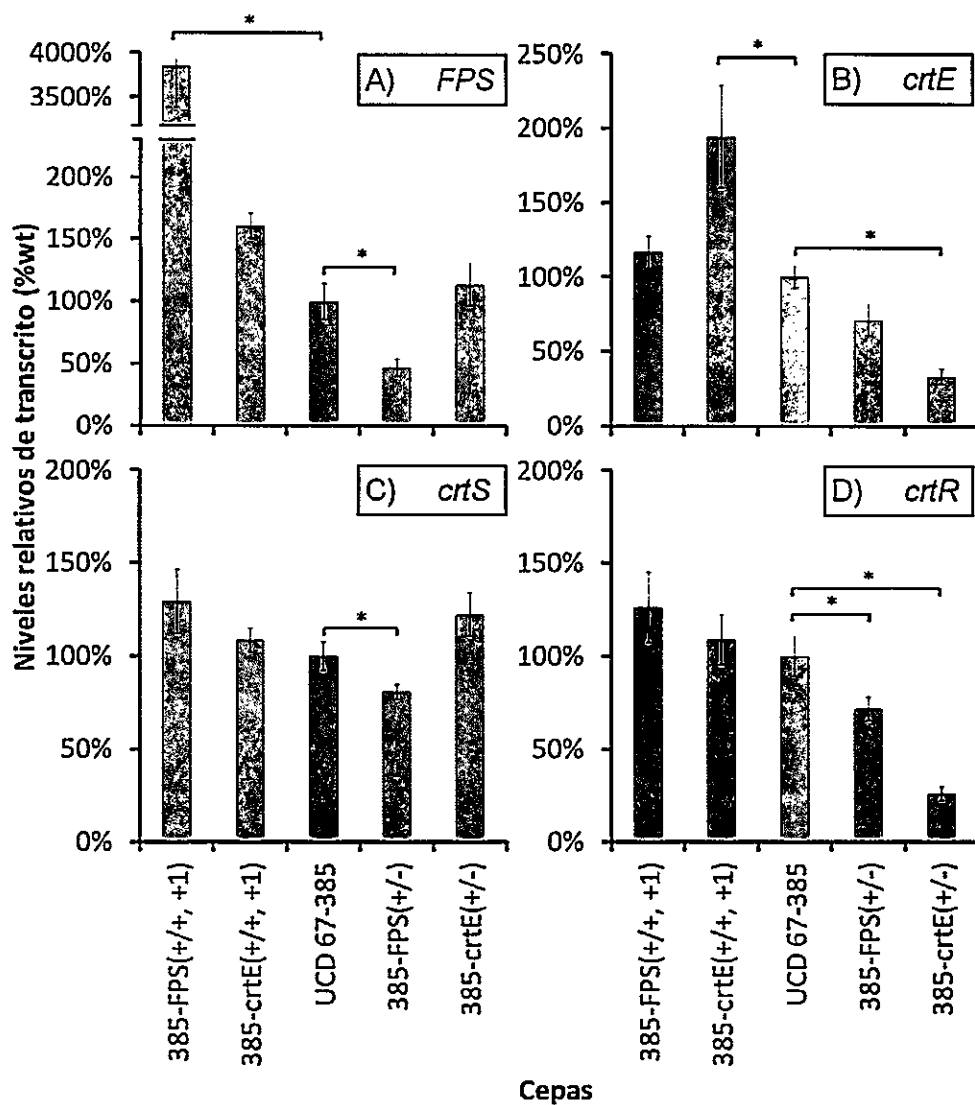


Figura 13. Expresión de genes *FPS*, *crtE*, *crtS*, *crtR* en cepas de *X. dendrorhous*.

Se evaluó los niveles de los transcritos de los genes A) *FPS*, B) *crtE*, C) *crtS* y D) *crtR*, luego de 72 h de cultivo en las cinco cepas utilizadas en este trabajo. La expresión se muestra como un porcentaje relativo a la cepa parental silvestre considerada como un 100%. Las diferencias estadísticamente significativas se encuentran señaladas con un asterisco (test t de student,  $p < 0,01$ )

### **Actividad prenil transferasa en cepas mutantes de *X. dendrorhous* heterocigotas y que sobreexpresan los genes *FPS* y *crtE*.**

Se evaluó la actividad prenil transferasa en extractos de proteínas de todas las cepas de *X. dendrorhous* estudiadas en este trabajo. Los extractos de proteínas se obtuvieron luego de 72 h de tres cultivos independientes de cada cepa. Se realizaron dos ensayos enzimáticos diferentes que contenían los extractos de proteínas y los sustratos  $^{14}\text{C}$ -IPP e IPP frío, además de DMAPP o FPP como sustratos adicionales. Los resultados se muestran en la Tabla 7. Se observó que al incluir DMAPP en el ensayo, los extractos de proteínas de la cepa 385-FPS<sup>(+/+,+1)</sup> presentan un 85% más de actividad prenil transferasa a la encontrada en los extractos de la cepa parental. Sin embargo, en las otras cepas no se observaron diferencias significativas. Por otro lado, el ensayo con FPP reveló un aumento de un 144% en la actividad prenil transferasa en la cepa 385-crtE<sup>(+/+,+1)</sup>. Las cepas heterocigotas no presentaron cambios estadísticamente significativos en cuanto a actividad enzimática. En los ensayos realizados, la composición de los productos encontrados se mantuvo relativamente constante con una relación de C<sub>10</sub> (2-3%), C<sub>15</sub> (84-86%) y C<sub>20</sub> (12-14%), independiente del sustrato o del origen del extracto de proteínas utilizado.

**Tabla 7. Ensayos de actividad prenil transferasa con extractos de proteínas de cepas de *X. dendrorhous*.**

Cepa de origen del proteico	Sustrato Extracto variable	Actividad prenil transferasa (U/mg x 10 <sup>6</sup> )	Porcentaje de productos*		
			C <sub>10</sub>	C <sub>15</sub>	C <sub>20</sub>
UCD 67-385	DMAPP	5,0 ± 0,15	2 ± 0	86 ± 4	12 ± 5
	FPP**	1,15 ± 0,35	NS	NS	NS
385-FPS <sup>(+/+, +1)</sup>	DMAPP	9,24 ± 0,45	2 ± 1	85 ± 3	13 ± 3
	FPP**	1,13 ± 0,68	NS	NS	NS
385-crE <sup>(+/+, +1)</sup>	DMAPP	4,54 ± 0,76	3 ± 1	84 ± 4	13 ± 4
	FPP	2,81 ± 0,81	15±4	74±5	11±4
385-FPS <sup>(+/-)</sup>	DMAPP	3,79 ± 0,6	2 ± 1	86 ± 3	12 ± 4
	FPP**	0,64 ± 0,15	NS	NS	NS
385-crE <sup>(+/-)</sup>	DMAPP	4,1 ± 1,06	3 ± 1	84 ± 2	14 ± 3
	FPP**	0,74 ± 0,03	Ns	NS	NS

Nota: Los ensayos enzimáticos se realizaron según descritos en la sección materiales y métodos. Dos extractos proteicos de dos cultivos en replica fueron obtenidos de cada cepa. Cada ensayo se realizó por duplicado. Los valores observados corresponden al promedio observado ± el error estándar de la media.

\* Porcentaje de cada producto considerando 100% el total de la radioactividad detectada en la fase hexánica. C<sub>10</sub>, C<sub>15</sub> and C<sub>20</sub> corresponden a productos que migraron con estándares de prenil alcoholes de 10, 15 y 20 carbonos, respectivamente.

\*\*Los ensayos realizados utilizando FPP como sustrato presentaron cantidades bajas de producto, los cuales no pudieron ser separados entre sí en la mayoría de los casos.

## Discusión

### Actividad de proteínas codificadas por los genes *FPS* y *crtE*

Trabajos anteriores describen la participación del gen *crtE*, que codifica a la enzima GGPP-sintasa, en la biosíntesis de astaxantina en *X. dendrorhous*. Sin embargo, la función del gen *FPS*, que codifica a la enzima FPP-sintasa, no ha sido descrita y los estudios respecto a esta última han sido casi nulos, salvo patentes que protegen su secuencia sin realizar mayores estudios (Hoshino y Setoguchi, 1999). En nuestro laboratorio, mediante la comparación de secuencias de genes *FPS* de otras levaduras y el diseño de partidores degenerados, se logró identificar un posible gen *FPS* de *X. dendrorhous* (Niklitschek, 2008) descrito previamente en la patente EP0955 363A2 (Hoshino y Setoguchi, 1999). La secuenciación del cDNA de dicho gen permitió deducir la secuencia de amino ácidos de la proteína codificada por *FPS*, en la que se encontró motivos conservados de enzimas FPP-sintasas mediante análisis bioinformáticos, confirmándose la obtención del gen deseado. Trabajos posteriores permitieron confirmar que el gen *FPS* también está involucrado en la carotenogénesis de esta levadura (Romero, 2010). Si bien previó a esta tesis se contaba con los antecedentes de que *FPS* y *crtE* están involucrados en la síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*, el mecanismo por el cual se sintetiza el precursor GGPP de la carotenogénesis aun no había sido descrito. Es así como en este trabajo se expresaron ambos genes en *E. coli* y se evaluó la actividad prenil transferasa que codifica cada uno de ellos.

A pesar que por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida de los extractos de proteínas de las cepas de *E. coli* que expresan *FPS* y *crtE*, ambas proteínas presentaron un tamaño menor a lo esperado y siendo más agudo en el caso de la



proteína FPP-sintasa, la identidad de ellas (FPP- y GGPP-sintasa, respectivamente) fue confirmada mediante espectrometría de masa MALDI-TOF. Adicionalmente, la secuenciación de los vectores de expresión portadores de ambos cDNAs, confirmó que no existen mutaciones en ellos, por lo que la diferencia en la migración de las proteínas podría deberse a otros factores aun no conocidos.

Teniendo la certeza de la identidad de cada proteína se procedió a realizar ensayos para evaluar la actividad prenil transferasa de cada una. Debido a que en los ensayos se realizaron con extractos de proteínas de las cepas recombinantes, y no con las proteínas purificadas, como control se incluyó los extractos de proteínas de una cepa portadora del vector de expresión sin un inserto. Lo anterior demostró que no hay actividad prenil transferasa detectable bajo las condiciones utilizadas de los ensayos en la cepa de *E. coli* utilizada como hospedero para la expresión heteróloga, aun en presencia del vector de expresión vacío. De esta manera, los resultados de los ensayos enzimáticos realizados en este trabajo demostraron que la proteína codificada por el gen *FPS* presenta actividad prenil transferasa y que sus sustratos serían IPP + DMAPP e IPP + GPP, y no IPP + FPP. Los productos para ambas reacciones concordaron con lo esperado, encontrándose prenil alcoholes C<sub>10</sub> y C<sub>15</sub> con los sustratos IPP + DMAPP y C<sub>20</sub> con los sustratos IPP + GPP. Por otro lado, la proteína codificada por el gen *prtE* solo presentó actividad prenil transferasa en presencia de los sustratos IPP + FPP, generando un prenil alcohol C<sub>20</sub> como único producto. Estos resultados demuestran que ambas proteínas participan secuencialmente en la formación de GGPP a partir de IPP y DMAPP. Comparando las actividades enzimáticas de ambas proteínas se observó que la enzima FPP-sintasa posee una actividad enzimática mayor que la enzima GGPP-sintasa. Esta observación se ve

apoyada con la disminución en el crecimiento de la cepa 385-*crtE*<sup>(+/+, +1)</sup> de *X. dendrorhous* que alcanza una menor DO<sub>600</sub> al final del cultivo (discutido más adelante). Finalmente, con la intención de completar el sistema, el ensayo enzimático se realizó con una mezcla de los extractos de proteínas de las cepas de *E. coli* que expresan *FPS* y *crtE*. De esta manera se logró obtener los tres tipos de productos: C<sub>10</sub>, C<sub>15</sub> y C<sub>20</sub>, utilizando solo IPP + DMAPP como sustratos. En este caso, el mayor producto encontrado correspondió a C<sub>15</sub> en tanto que C<sub>20</sub> fue el que presentó menores cantidades. De acuerdo a los resultados obtenidos, esto es de esperarse dado que la enzima FPP-sintasa posee una mayor actividad en relación a GGPP-sintasa. Estos resultados, junto con los antecedentes que se contaba, nos permiten afirmar que los genes *FPS* y *crtE* codifican proteínas con actividad prenil transferasa siendo efectivamente la primera una FPP-sintasa y la segunda una GGPP-sintasa. Además, se determinó que probablemente en *X. dendrorhous* la síntesis de GGPP desde IPP y DMAPP ocurre por medio de un sistema que involucra a dos proteínas que actúan secuencialmente: en primer lugar se sintetiza FPP en dos etapas (IPP + DMAPP → GPP e IPP + GPP → FPP) catalizadas por FPP-sintasa (gen *FPS*) y luego se produce GGPP (IPP + FPP → GGPP) por GGPP-sintasa (gen *crtE*). La obtención de este resultado está de acuerdo con lo descrito para otros organismos relacionados. Las prenil transferasas pueden dividirse en varios tipos, generalmente asociadas a grupos de organismos diferentes (Vandermoten y cols., 2009) donde el sistema de biosíntesis de FPP/GGPP se encuentra relacionado directamente con el tipo de prenil transferasa presente. Para el caso de hongos se espera la presencia de FPP-sintasa tipo I y GGPP-sintasa tipo III. Esto ha sido descrito en levaduras como *S. cerevisiae*, la cual también realiza la síntesis de GGPP mediante un sistema de dos enzimas que actúan

de manera secuencial (Caplin y cols., 1994). Muy pocos trabajos han sido realizados enfocados a este proceso en levaduras más estrechamente relacionadas filogenéticamente a *X. dendrorhous*, lo cual resalta la importancia de este trabajo en el intento de dilucidar el mecanismo a través del cual se sintetiza el GGPP, no solo en *X. dendrorhous*, sino también en otras levaduras basidiomicetes.

### **Participación de los genes *FPS* y *crtE* en la carotenogénesis en *X. dendrorhous***

Con la intención de evaluar la función de los genes *FPS* y *crtE* en *X. dendrorhous*, se optó por sobreexpresar dichos genes y estudiar el fenotipo resultante. Para ello, se utilizó a la cepa silvestre UCD 67-385 como parental para sobreexpresar los genes en estudio, ya que se contaba con mutantes heterocigotos de ambos genes que derivan de esta cepa. Así, junto con evaluar el resultado de la sobreexpresión de ambos genes, fue posible comparar con el fenotipo de los mutantes que carecen de un alelo de ellos. A simple vista se observó diferencias en la pigmentación entre todas las cepas estudiadas (Figura 10), teniendo un color rojo más intenso las cepas que contienen una copia adicional de los genes *FPS* o *crtE*, y más pálidas aquellas cepas heterocigotas de ambos genes, en comparación con la cepa parental.

En primer lugar, se evaluó el crecimiento de las cinco cepas que no mostró diferencias significativas, salvo la cepa 385-*crtE*<sup>(+/+, +1)</sup> que alcanzó una DO<sub>600</sub> bastante menor al resto de las cepas en la fase estacionaria bajo las condiciones de estudio. No existen estudios que aborden el efecto de la sobreexpresión de la enzima FPP-sintasa en organismos filogenéticamente cercanos a esta levadura y aquellos realizados en otros organismos no consideraron el impacto sobre la tasa de crecimiento como tal, si no otros parámetros como el impacto sobre la síntesis de esteroides (Chambon y cols.,

1991). En estos trabajos se reportó como máximo un aumento de un 28% en la síntesis de esteroides respecto a la cepa parental. Sin embargo, debido a que FPP es el precursor de los esteroides y ambos genes estudiados se encuentran involucrados en el metabolismo de FPP (FPP es el producto de FPP-sintasa y el sustrato de GGPP-sintasa), se consideró la posibilidad de observar cambios en el crecimiento de la levadura. Los resultados obtenidos indican que la sobreexpresión del gen *FPS* en la cepa 385-FPS<sup>(+/+, +1)</sup> no afecta el crecimiento de *X. dendrorhous*, pero se observa un cambio morfológico en las colonias, las cuales tienen un aspecto más brillante que las de la cepa parental que poseen un aspecto cremoso. Por otro lado, la menor DO<sub>600</sub> alcanzada al final del cultivo de la cepa 385-crtE<sup>(+/+, +1)</sup>, sugiere que la sobreexpresión del gen *crtE* podría estar drenando precursores necesarios para la síntesis de esteroides, afectando el desarrollo normal de la levadura. Los resultados obtenidos indican que la sobreexpresión de ambos genes afecta en cierta medida el crecimiento de la levadura. Por un lado, el cambio observado en las colonias de la cepa 385-FPS<sup>(+/+, +1)</sup> sugiere que la abundancia de sustrato altera de alguna manera la composición de la membrana, presuntamente a nivel de los esteroides. Sin embargo, los análisis de esteroides realizados (discutido más adelante) no mostró alteración alguna, sugiriendo que el método utilizado no es lo suficientemente sensible para detectar la diferencia o esta se encuentra relacionada a otro proceso no determinado. Por otro lado, la disminución en la DO<sub>600</sub> final de la cepa 385-crtE<sup>(+/+, +1)</sup> indica una alteración en el crecimiento de la cepa, siendo el drenaje del precursor FPP la causa más probable de esta alteración, debido a que éste es precursor del escualeno que a su vez es el primer precursor de la vía de síntesis de los esteroides. Estudios realizados en *S. cerevisiae* han demostrado que la eliminación del gen *ERG9*, que codifica la enzima escualeno sintasa, resulta letal para la levadura (Jennings y cols., 1991). De la misma

manera se ha observado que una disminución en los niveles de FPP, en la misma levadura, llevan a una disminución en el crecimiento de la levadura (Chambon y cols., 1990), en tanto que otros estudios sugieren que es posible disminuir el flujo hacia la vía de síntesis de esteroides hasta cierto límite sin afectar el crecimiento de la célula (Paradise y cols., 2008). Esto no se observó en la cepa mutante heterocigota para el gen *FPS* obtenida en *X. dendrorhous*, presuntamente debido a que la disminución en actividad FPP-sintasa puede ser compensada con una disminución del flujo de precursores hacia la síntesis de carotenoides, en tanto que en *S. cerevisiae* no existe esta vía para contrarrestar la falta de FPP. Debido a lo anterior, se analizó la cantidad y composición de esteroides en las cinco cepas de estudio y en todas ellas se encontró a ergosterol como el esteroide principal (cerca de un 100%). Interesantemente, no se encontraron diferencias significativas entre las cepas analizadas en cuanto al contenido de ergosterol, salvo la cepa 385-*crtE*<sup>(+/+, +1)</sup> que luego de 120 h de cultivo presentó más ergosterol que la cepa silvestre (1,76 vs 2,39 mg/g peso seco). Estos resultados llaman la atención, ya que se esperaba que mutaciones en los genes *FPS* o *crtE* afectaran la síntesis de ergosterol, ya que estarían involucrados en su síntesis y consumo del precursor FPP. Es posible que el aumento de ergosterol específico en la cepa 385-*crtE*<sup>(+/+, +1)</sup> se relacione con la disminución de la biomasa alcanzada (reflejado por la menor  $DO_{600}$  alcanzada al final del cultivo); sin embargo, se carece de mayor información para llegar a una conclusión. Otro punto, mencionado anteriormente, es la ausencia de cambios en la cepa 385-*FPS*<sup>(+/+, +1)</sup>. Dado que la inspección visual permitió observar cambios en el aspecto de las colonias (brillantes contra cremosas), se esperaba cambios a nivel de los esteroides de la levadura. Sin embargo, éstos no se detectaron con la aproximación experimental utilizada en este trabajo.

Debido a las diferencias fenotípicas evidentes a simple vista en la pigmentación de las cinco cepas estudiadas, se cuantificó los carotenoides producidos y se evaluó la composición de ellos. De esta manera fue posible confirmar que efectivamente las cepas que sobreexpresan a los genes *FPS* y *crtE*, producen más pigmentos que la cepa parental. Incluso se observó una alteración en la composición de éstos, aumentando levemente la fracción de astaxantina. Estos resultados concuerdan parcialmente con datos observados previamente (Breitenbach y cols., 2011) donde se observa un incremento en la cantidad total de carotenoides respecto de la cepa parental al sobreexpresar el gen *crtE*. Sin embargo, en el trabajo se reporta una disminución en la proporción total de astaxantina, que es lo contrario a lo observado en este trabajo (44% vs 89%). Esta diferencia se puede deber a que las cepas y condiciones de cultivo reportadas difieren de las utilizadas en esta tesis. Otros trabajos también han corroborado que la sobreexpresión de genes de GGPP-sintasas en otros organismos. Por ejemplo, la expresión del gen que codifica una GGPP-sintasa de *Gentiana lutea* en *Nicotiana tabacum*, produjo un aumento de un 18% en la producción de carotenoides en la hoja de la planta (Ji y cols., 2009). Por otro lado, no existen trabajos previos que relacionen la sobreexpresión o escisión del gen *FPS* con cambios en la cantidad o proporción de astaxantina en otros organismos, pero sí respecto a los carotenoides en términos generales. En estos trabajos se ha reportado que la sobreexpresión del gen de FPP-sintasa en *Mucor circinelloides* se corresponde con un aumento en la cantidad de carotenoides totales (Csernetics y cols., 2011), coincidente con los resultados observados en este trabajo. En aquel trabajo se integraron distintos números de copias de este gen, demostrando un efecto de dosis génica donde el aumento del número de copias tiene como consecuencia un aumento en los carotenoides totales (Csernetics y cols., 2011). Si bien el análisis de carotenoides ya se

había realizado previamente en las cepas mutantes heterocigotas 385-FPS<sup>(+/-)</sup> (Romero, 2010) y 385-crtE<sup>(+/-)</sup> (Niklitschek, 2008), se las incluyó en esta tesis por motivos comparativos bajo las mismas condiciones de cultivo. De esta manera se confirmó que no hay diferencias en la cantidad de carotenoides producidos por las cepas heterocigotas en comparación con la cepa parental, pero su composición es distinta encontrándose una menor proporción de astaxantina a favor de  $\beta$ -caroteno y de otros carotenoides intermediarios entre ambos metabolitos en la vía de síntesis.

Con la intención de evaluar si efectivamente el introducir una copia adicional o eliminar un alelo de los genes estudiados implica cambios en los niveles de sus transcritos, lo que podría ser responsable del cambio en los fenotipos observados, éstos se midieron por RT-qPCR en un punto de la curva de crecimiento. Como se esperaba, se observó un mayor nivel de los transcritos de *FPS* y *crtE* en las cepas 385-FPS<sup>(+/+, +1)</sup> y 385-crtE<sup>(+/+, +1)</sup>, respectivamente. Por otro lado, las cepas 385-FPS<sup>(+/-)</sup> y 385-crtE<sup>(+/-)</sup> mostraron una expresión reducida de los respectivos genes. Esto nos indica que, al menos parte, las alteraciones en el fenotipo se deben a un efecto de dosis génica de *FPS* y *crtE*. Sin embargo, llama la atención el cambio de composición de carotenoides en las cepas heterocigotas, particularmente por la diferencia en la proporción de astaxantina y  $\beta$ -caroteno. Por este motivo, adicionalmente se midió los niveles de mRNAs de los genes *crtS* y *crtR*, ya que estudios previos han demostrado que al menos estos dos genes controlan la síntesis de astaxantina desde  $\beta$ -caroteno (Ojima y cols., 2006, Alcaino y cols., 2008). Interesantemente se encontró una menor expresión del gen *crtS* en la cepa 385-crtE<sup>(+/-)</sup>, y del gen *crtR* en ambas cepas heterocigotas, no así en las cepas que sobreexpresan ambos genes. Estudios anteriores (Alcaino y cols., 2008) demostraron que la mutación de uno de los alelos del gen *crtR*, que codifica una

citocromo P450 reductasa en la cepa UCD 67-385, afecta la composición de pigmentos, disminuyendo la proporción de astaxantina a favor del  $\beta$ -caroteno y otros intermediarios, similar a lo que encontramos en este trabajo. De esta manera, los resultados de esta tesis sugieren que el cambio de la expresión de *crtR* observado, podría ser responsable de los cambios en la composición de carotenoides en las cepas 385-FPS<sup>(+/+)</sup> y 385-crtE<sup>(+/+)</sup>. Sin embargo, tomando en cuenta el amplio número de reacciones en los cuales los sistemas P450s están involucrados y que la regulación de su expresión depende de variados factores (Estabrook y cols., 1991, Fulco, 1991, Honkakoski y Negishi, 2000, Porter, 2002), es difícil determinar la causa particular por la cual la expresión de *crtR* se ve modificada en estas cepas por lo que se requieren mayores estudios.

Si bien conocer los niveles de transcritos de un gen en particular nos ofrece información sobre el impacto que ocurre al sobreexpresar, eliminar un alelo o eliminar completamente a un gen, no necesariamente se correlaciona proporcionalmente con la concentración de la proteína que dicho gen codifica o de su actividad. Por ello, se evaluó la actividad prenil transferasa en extractos de proteínas de las cinco cepas de *X. dendrorhous* estudiadas en este trabajo. Los ensayos realizados fueron similares a los realizados con extractos de proteínas de *E. coli*, pero con una diferencia fundamental. El extracto de *E. coli* no presentaba actividad prenil transferasa intrínseca en las condiciones en las que se trabajó; sin embargo, los extractos de proteínas de *X. dendrorhous* si poseen esta actividad. Trabajos preliminares mostraron que la preparación enzimática de la levadura es capaz de sintetizar prenil fosfatos C<sub>10</sub>, C<sub>15</sub> y C<sub>20</sub> en presencia de IPP como único sustrato. Esto se puede explicar porque *X. dendrorhous* posee el gen *idi* que codifica la proteína IPP-isomerasa, enzima capaz de



formar DMAPP a partir de IPP (Agranoff y cols., 1960). Los requerimientos necesarios para la actividad de esta enzima son los mismos que los necesarios para las enzimas FPP-sintasa y GPP-sintasa (Sagami y cols., 1994, Hahn y cols., 1999), por esta razón y de acuerdo a los resultados observados en los ensayos preliminares, es de esperarse una actividad IPP-isomerasa basal. Esta resultaría relevante solo en el caso del ensayo con FPP, debido a que la actividad enzimática que se desea medir, el paso de FPP a GGPP, se vería interferida por la disponibilidad de DMAPP producto de la IPP-isomerasa. Por otro lado, los ensayos con DMAPP no se verían afectados en absoluto, ya que tanto el IPP como DMAPP adicionados al ensayo se encuentran en concentraciones saturadas.

Los extractos de proteínas de las cepas 385-FPS<sup>(+/+, +1)</sup> y 385-crtE<sup>(+/+, +1)</sup> presentaron un aumento de un 84% y 144% en la actividad prenil transferasa cuando los ensayos se realizaron con los sustratos adicionales DMAPP y FPP, respectivamente. Lo anterior indica que probablemente el aumento en la producción de carotenoides en estas cepas se debe a una mayor actividad prenil transferasa correspondiente a las enzimas FPP- y GGPP- sintasa, respectivamente. Por otro lado las cepas mutantes heterocigotas no mostraron cambios significativos en los ensayos enzimáticos con ninguno de los sustratos. La razón de esto se puede deber a que la sensibilidad del método utilizado no es lo suficiente para detectar la magnitud del cambio ocurrido al eliminar un alelo de uno de estos genes. Esto no significa necesariamente que no exista un cambio en la actividad prenil transferasa, si no que este es pequeño. También es interesante que la proporción de prenil alcoholes producidos se mantuvo relativamente constante, independiente de la cepa utilizada. Esto se debería probablemente a que la enzima FPP-sintasa posee una mayor actividad enzimática que GGPP-sintasa. Por otro lado, a

pesar de que existen pocos trabajos al respecto, se ha reportado que GGPP-sintasas presentan mecanismos de inhibición de sustrato y producto, siendo inhibida en forma competitiva por GGPP y presentando una actividad reducida en presencia de altas concentraciones de FPP y bajas de IPP (Barbar y cols., 2013). En el trabajo se sugiere que esto puede ser una medida para evitar el agotamiento de FPP, el cual es precursor de una serie de procesos de importancia biológica. De acuerdo a esto, es posible que se esté observando el mismo fenómeno en esta levadura, existiendo una proporción determinada de sustrato-producto dada por este mecanismo de inhibición. Sin embargo, más estudios son necesarios para afirmar esto en forma más certera.

En este trabajo se estudió la ruta de biosíntesis del GGPP, determinándose que éste se sintetiza por la acción secuencial de dos enzimas: FPP-sintasa y GGPP-sintasa, respectivamente. La alteración en el número de copias de los genes que las codifican, llevó a un cambio en la composición de pigmentos en las cepas mutantes heterocigotas o un aumento en la cantidad de carotenoides en las cepas de sobreexpresión de *X. dendrorhous*. Por un lado, es claro a simple vista que la escisión de un alelo del gen *crtE* tiene un mayor impacto en la carotenogénesis que la escisión de *FPS*. Por otro lado, esto no es tan claro en el caso de la sobreexpresión de cada gen por separado. Debido a lo mencionado previamente es posible que la actividad GGPP-sintasa constituya un paso limitante, en términos de velocidad de reacción, en la obtención de precursores para la carotenogénesis (Wang y cols., 1999), pero su aumento desregulado conlleva una disminución en la densidad del cultivo final, probablemente a causa del drenaje de FPP necesario para otros procesos como la síntesis de esteroides. Comparativamente la sobreexpresión del gen *FPS* lleva a un aumento un poco menor de los carotenoides, pero sin pérdida de biomasa. Por ello, el

paso lógico a seguir constituye la sobreexpresión de ambos genes en conjunto, esperando que de esta manera no exista un impacto sobre el crecimiento de la célula.

## Conclusiones

- La vía de síntesis de GGPP es realizada mediante un sistema de dos enzimas prenil transferasas que actúan secuencialmente: en primer lugar la enzima FPP sintasa y luego la enzima GGPP sintasa.
- La enzima FPP-sintasa utiliza IPP+DMAPP e IPP+GPP como sustratos, en tanto que la enzima GGPP-sintasa solo acepta IPP+FPP como sustratos.
- Las proporciones de productos observados en las reacciones de actividad prenil transferasa sugiere alguna regulación para mantener la proporción constante. Sin embargo, se requieren más estudios para determinarlo con certeza.
- La sobreexpresión de los genes *FPS* y *crtE* favorece la producción de carotenoides en *X. dendrorhous*.
- La síntesis de ergosterol sólo se afecta al sobreexpresar el gen *crtE*, aumentando levemente respecto a la cepa parental.
- El aumento o disminución de la dosis génica de *FPS* y *crtE* en *X. dendrorhous*, afecta los niveles de dichos transcritos y de los genes *crtS* y *crtR*, lo que en parte contribuye al nuevo fenotipo de las cepas mutantes que derivan de ella.

## Proyecciones

Los genes *FPS* y *crtE* son indispensables en la síntesis de FPP y GGPP en *X. dendrorhous*. Se ha demostrado en este trabajo, y en otros realizados previamente, que su manipulación genética influye sobre la síntesis de carotenoides. Por este motivo, ambos genes constituyen blancos atractivos para ser considerados en programas de mejoramiento genético para en un intento futuro lograr una cepa de *X. dendrorhous* sobreproductora de pigmentos mediante ingeniería metabólica.

## Referencias

- Adrio J. L., Lopez M., Casqueiro J., Fernandez C. y Veiga M. (1995). "Electrophoretic karyotype of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*." *Curr Genet* **27**(5): 447-450.
- Agranoff B. W., Eggerer H., Henning U. y Lynen F. (1960). "Biosynthesis of Terpenes. VII. Isopentenyl pyrophosphate isomerase." *J Biol Chem* **235**: 326-332.
- Alcaíno J. (2002). Organización estructural del gen de la fitoeno sintasa en el genoma de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Ex. *Phaffia rhodozyma*). Tesis para optar al grado de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile.
- Alcaino J., Barahona S., Carmona M., Lozano C., Marcoleta A., Niklitschek M., Sepulveda D., Baeza M. y Cifuentes V. (2008). "Cloning of the cytochrome P450 reductase (*crtR*) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *BMC Microbiol* **8**: 169.
- Alvarez V., Rodriguez-Saiz M., de la Fuente J. L., Gudina E. J., Godio R. P., Martin J. F. y Barredo J. L. (2006). "The *crtS* gene of *Xanthophyllomyces dendrorhous* encodes a novel cytochrome-P450 hydroxylase involved in the conversion of beta-carotene into astaxanthin and other xanthophylls." *Fungal Genet Biol* **43**(4): 261-272.
- An G. H. Schuman D. B., Johnson E. A. (1989). Isolation of *Phaffia rhodozyma* Mutants with Increased Astaxanthin Content. *Appl Environ Microbiol.* **55**(1):116-24.
- An, G. H. y E. A. Johnson (1990). "Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*." *Antonie Van Leeuwenhoek* **57**(4): 191-203.

**An G.H., Bielich J., Auerbach R., Johnson E.A., (1991).** Isolation and characterisation of carotenoid hyperproducing mutants of yeast by flow cytometry and cell sorting. *Biotechnology* 9, 70– 73.

**Anderson M. S., Muehlbacher M., Street I. P, Proffitt J. y Poulter C. D. (1989).** "Isopentenyl diphosphate: Dimethylallyl diphosphate isomerase. An improved purification of the enzyme and isolation of the gene from *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 264(32): 19169-19175.

**Baeza M., Retamales P., Sepulveda D., Lodato P., Jimenez A. y Cifuentes V. (2009).** "Isolation, characterization and long term preservation of mutant strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *J Basic Microbiol* 49(2): 135-141.

**Barbar A., Couture M., Sen S. E., Beliveau C., Nisole A., Bipfubusa M. y Cusson M. (2013).** "Cloning, expression and characterization of an insect geranylgeranyl diphosphate synthase from *Choristoneura fumiferana*." *Insect Biochem Mol Biol* 43(10): 947-958.

**BCCResearch. (2011).** from <http://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/carotenoids-global-market-fod025d.html>.

**Bjerkeng B., Føllingb M., Lagockia S., Storebakkena T., Ollic J. J. y Alstedd N. (1995).** "Bioavailability of all-E astaxanthin and Z-isomers of astaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Aquaculture* 157(1-2): 63-82.

**Bloch K. (1981).** "Sterol structure and membrane function." *Curr Top Cell Regul* 18: 289-299.

**Bloch K. (1992).** "Sterol molecule: Structure, biosynthesis, and function." *Steroids* 57(8): 378-383.

**Borenstein B. y Bunnell R. H. (1966).** "Carotenoids: Properties, occurrence, and utilization in foods." *Adv Food Res* 15: 195-276.

**Bouvier F., Rahier A. y Camara B. (2005).** "Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids." *Prog Lipid Res* 44(6): 357-429.

**Breitenbach J., Visser H., Verdoes J. C., van Ooyen A. J. y Sandmann G. (2011).** "Engineering of geranylgeranyl pyrophosphate synthase levels and physiological conditions for enhanced carotenoid and astaxanthin synthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *Biotechnol Lett* 33(4): 755-761.

**Caplin B. E., Hettich L. A. y Marshall M. S. (1994).** "Substrate characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* protein farnesyltransferase and type-I protein geranylgeranyltransferase." *Biochim Biophys Acta* 1205(1): 39-48.

**Csernetics A., Nagy G., Iturriaga E. A., Szekeres A., Eslava A. P., Vagvolgyi C. y Papp T. (2011).** "Expression of three isoprenoid biosynthesis genes and their effects on the carotenoid production of the zygomycete *Mucor circinelloides*." *Fungal Genet Biol* 48(7): 696-703.

**Chambon C., Ladeveze V., Oulmouden A., Servouse M. y Karst F. (1990).** "Isolation and properties of yeast mutants affected in farnesyl diphosphate synthetase." *Curr Genet* 18(1): 41-46.

**Chambon C., Ladeveze V., Servouse M., Blanchard L., Javelot C., Vladescu B. y Karst F. (1991).** "Sterol pathway in yeast. identification and properties of mutant strains



defective in mevalonate diphosphate decarboxylase and farnesyl diphosphate synthetase." *Lipids* **26**(8): 633-636.

**Chomczynski P. y Sacchi N. (1987).** "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". *Analytical Biochemistry* **162**: 156-159.

**Choubert G., Mendes-Pinto M. M. y Morais R. (2006).** "Pigmenting efficacy of astaxanthin fed to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: effect of dietary astaxanthin and lipid sources." *Aquaculture* **257**: 429-436.

**Della Negra F., Santoni G., Stivanello M., Soukup M. y Fachini M. (2007).** Process for the synthesis of intermediates for the preparation of astaxanthin. USA.

**Estabrook R., Mason J., Simpson E., Peterson J. y Waterman M. (1991).** "The heterologous expression of the cytochromes P450: a new approach for the study of enzyme activities and regulation." *Adv Enzyme Regul* **31**: 365-383.

**Fell J. M. y Blatt G. M. (1999).** "Separation of strains of the yeasts *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Phaffia rhodozyma* based on rDNA IGS and ITS sequence analysis." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **23**(677-681).

**Fulco A. J. (1991).** "P450<sub>bm-3</sub> and other inducible bacterial P450 cytochromes: biochemistry and regulation." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **31**: 177-203.

**Goodwin T. W. (1971).** "Biosynthesis of carotenoids and plant triterpenes." *Biochem J* **123**(3): 293-329.

**Goodwin T. W. (1980).** The biochemistry of the carotenoids, Vol. 1: Plants. New York, Chapman and Hall: 1-377.

**Hahn F. M., Hurlburt A. P. y Poulter C. D. (1999).** "*Escherichia coli* open reading frame 696 is *idi*, a nonessential gene encoding isopentenyl diphosphate isomerase." J Bacteriol **181**(15): 4499-4504.

**Hermosilla G., Martinez C., Retamales P., Leon R. y Cifuentes V. (2003).** "Genetic determination of ploidy level in *Xanthophyllomyces dendrorhous*." Antonie Van Leeuwenhoek **84**(4): 279-287.

**Higuera-Ciapara I., Felix-Valenzuela L. y Goycoolea F. M. (2006).** "Astaxanthin: A review of its chemistry and applications." Crit Rev Food Sci Nutr **46**(2): 185-196.

**Honkakoski P. y Negishi M. (2000).** "Regulation of cytochrome P450 (*CYP*) genes by nuclear receptors." Biochem J **347**(Pt 2): 321-337.

**Hoshino T. O. y Setoguchi Y. (1999).** DNA sequences encoding enzymes involved in production of isoprenoids. European Patent Application.: F. H.-L. R. AG. EP 0 955 363 A2.

**Hussein G., Sankawa U., Goto H., Matsumoto K. y Watanabe H. (2006).** "Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition." J Nat Prod **69**(3): 443-449.

Ingle de la Mora G., Arredondo-Figueroa J. L., Ponce-Palafox J. T., de los Angeles Barriga-Soca I. y Vernon-Carter J. E. (2006). "comparison of red chilli (*Capsicum annuum*) oleoresin and astaxanthin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet pigmentation." Aquaculture **258**(1-4): 490-495.

**Jacobson G. K., Jolly S. O., Sedmak J. J., Skatrud T. J. y Wasileski J. M. (1999).** Astaxanthin over-producing strains of *Phaffia rhodozyma*, methods for their cultivation, and their use in animal feeds. U. S. Patent.

**Jennings S. M., Tsay Y. H., Fisch T. M. y Robinson G. W. (1991).** "Molecular cloning and characterization of the yeast gene for squalene synthetase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(14): 6038-6042.

**Ji J., Wang G., Wang J. y Wang P. (2009).** "Functional analysis of multiple carotenogenic genes from *Lycium barbarum* and *Gentiana lutea* L. for their effects on beta-carotene production in transgenic tobacco." *Biotechnol Lett* **31**(2): 305-312.

**Katsuki H. y Bloch K. (1967).** "Studies on the biosynthesis of ergosterol in yeast. Formation of methylated intermediates." *J Biol Chem* **242**(2): 222-227.

**Lee P. C. y Schmidt-Dannert C. (2002).** "Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms." *Appl Microbiol Biotechnol* **60**(1-2): 1-11.

**Lewis M. J., Ragot N., Berlant M. C. y Miranda M. (1990).** "Selection of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma* with beta-ionone." *Appl Environ Microbiol* **56**(9): 2944-2945.

**Lichtenthaler H. K. (2000).** "Non-mevalonate isoprenoid biosynthesis: Enzymes, genes and inhibitors." *Biochem Soc Trans* **28**(6): 785-789.

**Lodato P., Alcaino J., Barahona S., Retamales P. y Cifuentes V. (2003).** "Alternative splicing of transcripts from *crtI* and *crtYB* genes of *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *Appl Environ Microbiol* **69**(8): 4676-4682.

**Lodato P., Alcaino J., Barahona S., Retamales P., Jimenez A. y Cifuentes V. (2004).** Study of the expression of carotenoid biosynthesis genes in wild-type and deregulated strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Ex.: *Phaffia rhodozyma*). *Biological Research* 83–94

**Lorenz R. T. y Cysewski G. R. (2000).** "Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin." *Trends Biotechnol* 18(4): 160-167.

**Marcoleta A., Niklitschek M., Wozniak A., Lozano C., Alcaino J., Baeza M. y Cifuentes V. (2011).** "Glucose and ethanol-dependent transcriptional regulation of the astaxanthin biosynthesis pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *BMC Microbiol* 11: 190.

**Misawa N. (2011).** "Pathway engineering for functional isoprenoids." *Curr Opin Biotechnol* 22(5): 627-633.

**Niklitschek M. (2008).** Estudio genético molecular del gen *crtE* involucrado en la ruta de biosíntesis de astaxantina en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis para optar al grado de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile.

**Ohnuma S., Suzuki M. y Nishino T. (1994).** "Archaeobacterial ether-linked lipid biosynthetic gene. expression cloning, sequencing, and characterization of geranylgeranyl-diphosphate synthase." *J Biol Chem* 269(20): 14792-14797.

**Ojima K., Breitenbach J., Visser H., Setoguchi Y., Tabata K., Hoshino T., van den Berg J. y Sandmann G. (2006).** "Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a beta-carotene 3-hydroxylase/4-ketolase." *Mol Genet Genomics* 275(2): 148-158.

**Olson J. A. (1993).** "Vitamin a and carotenoids as antioxidants in a physiological context." *J. Nutr. Sci. Vitaminol* **39**: 57-67.

**Paradise E. M., Kirby J., Chan R. y Keasling J. D. (2008).** "Redirection of flux through the FPP branch-point in *Saccharomyces cerevisiae* by down-regulating squalene synthase." *Biotechnol Bioeng* **100**(2): 371-378.

**Porter T. D. (2002).** "The roles of cytochrome B5 in cytochrome P450 reactions." *J Biochem Mol Toxicol* **16**(6): 311-316.

**Retamales P., Leon R., Martinez C., Hermosilla G., Pincheira G. y Cifuentes V. (1998).** "Complementation analysis with new genetic markers in *Phaffia rhodozyma*." *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**(3): 229-236.

**Romero I. (2010).** Análisis de los genes de la carotenogénesis temprana: Participación del gen FPS en la biosíntesis de astaxantina en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis para optar al grado de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile.

**Sagami H., Morita Y. y Ogura K. (1994).** "Purification and properties of geranylgeranyl-diphosphate synthase from bovine brain." *J Biol Chem* **269**(32): 20561-20566.

**Saito K., Fujisaki S. y Nishino T. (2007).** "Short-chain prenyl diphosphate synthase that condenses isopentenyl diphosphate with dimethylallyl diphosphate in *ispA* null *Escherichia coli* strain lacking farnesyl diphosphate synthase." *J Biosci Bioeng* **103**: 575-577.

**Sambrook J. y Russell D. W. (2001).** Molecular cloning : A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Schroeder W. A. y Johnson E. A. (1993).** "Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*." J Gen Microbiol **139**: 907–912.

**Shang F., Wen S., Wang X., Tan T. (2006).** Effect of nitrogen limitation on the ergosterol production by fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. J Biotechnol. **122**(3):285-92.

**Schroeder W. A. y Johnson E. A. (1995).** "Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*." J Biol Chem **270**(31): 18374-18379.

**Tognetti C., Moline M., van Broock M. y Libkind D. (2013).** "Favored isolation and rapid identification of the astaxanthin-producing yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*(*Phaffia rhodozyma*) from environmental samples." J Basic Microbiol **53**(9): 766-772.

**Vandermoten S., Santini S., Haubruge E., Heuze F., Francis F., Brasseur R., Cusson M. y Charlotiaux B. (2009).** "Structural features conferring dual geranyl/farnesyl diphosphate synthase activity to an aphid prenyltransferase." Insect Biochem Mol Biol **39**(10): 707-716.

**Verdoes J. C., Krubasik K. P., Sandmann G. y van Ooyen A. J. (1999).** "Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*." Mol Gen Genet **262**(3): 453-461.

**Verdoes J. C., Misawa N. y van Ooyen A. J. (1999).** "Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *Biotechnol Bioeng* **63**(6): 750-755.

**Verdoes J. C., Sandmann G., Visser H., Diaz M., van Mossel M. y van Ooyen A. J. (2003).** "Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*)." *Appl Environ Microbiol* **69**(7): 3728-3738.

**Wang C. W., Oh M. K. y Liao J. C. (1999).** "Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli*." *Biotechnol Bioeng* **62**(2): 235-241.

**Wanke M., Skorupinska-Tudek K. y Swiezewska E. (2001).** "Isoprenoid biosynthesis via 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate/2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (DOXP/MEP) pathway." *Acta Biochim Pol* **48**(3): 663-672.

**White D. A., Page G. I., Swaile J., Moody A. J. y Davies S. J. (2002).** "Effect of esterification on the absorption of astaxanthin in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (walbaum)" *Aquaculture Research* **33**(5): 343-350.

**Withers S. T. y Keasling J. D. (2007).** "Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules." *Appl Microbiol Biotechnol* **73**: 980-990.

**Wozniak A., Lozano C., Barahona S., Niklitschek M., Marcoleta A., Alcaino J., Sepulveda D., Baeza M. y Cifuentes V. (2011).** "Differential carotenoid production and gene expression in *Xanthophyllomyces dendrorhous* grown in a nonfermentable carbon source." *FEMS Yeast Res* **11**(3): 252-262.

**Wu T. H., Liao J. H., Hou W. C., Huang F. Y., Maher T. J. y Hu C. C. (2006).**  
"Astaxanthin protects against oxidative stress and calcium-induced porcine lens protein degradation." *J Agric Food Chem* **54**(6): 2418-2423.

**Zverina E. A., Lamphear C. L., Wright E. N. y Fierke C. A. (2012).** "Recent advances in protein prenyltransferases: Substrate identification, regulation, and disease interventions." *Curr Opin Chem Biol* **16**(5-6): 544-552.



## **Anexo 1: Publicación de Resultados**



# Functional Characterization of the *Xanthophyllomyces dendrorhous* Farnesyl Pyrophosphate Synthase and Geranylgeranyl Pyrophosphate Synthase Encoding Genes That Are Involved in the Synthesis of Isoprenoid Precursors

Jennifer Alcaíno<sup>1</sup>\*, Ignacio Romero<sup>1</sup>\*, Mauricio Niklitschek<sup>1</sup>, Dionisia Sepúlveda<sup>1</sup>, María Cecilia Rojas<sup>2</sup>, Marcelo Baeza<sup>1</sup>, Víctor Cifuentes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile, <sup>2</sup> Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile

## Abstract

The yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* synthesizes the carotenoid astaxanthin, which has applications in biotechnology because of its antioxidant and pigmentation properties. However, wild-type strains produce too low amounts of carotenoids to be industrially competitive. Considering this background, it is indispensable to understand how the synthesis of astaxanthin is controlled and regulated in this yeast. In this work, the steps leading to the synthesis of the carotenoid precursor geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP, C<sub>20</sub>) in *X. dendrorhous* from isopentenyl pyrophosphate (IPP, C<sub>5</sub>) and dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP, C<sub>3</sub>) was characterized. Two prenyl transferase encoding genes, *FPS* and *crtE*, were expressed in *E. coli*. The enzymatic assays using recombinant *E. coli* protein extracts demonstrated that *FPS* and *crtE* encode a farnesyl pyrophosphate (FPP, C<sub>15</sub>) synthase and a GGPP-synthase, respectively. *X. dendrorhous* FPP-synthase produces geranyl pyrophosphate (GPP, C<sub>10</sub>) from IPP and DMAPP and FPP from IPP and GPP, while the *X. dendrorhous* GGPP-synthase utilizes only FPP and IPP as substrates to produce GGPP. Additionally, the *FPS* and *crtE* genes were over-expressed in *X. dendrorhous*, resulting in an increase of the total carotenoid production. Because the parental strain is diploid, the deletion of one of the alleles of these genes did not affect the total carotenoid production, but the composition was significantly altered. These results suggest that the over-expression of these genes might provoke a higher carbon flux towards carotenogenesis, most likely involving an earlier formation of a carotenogenic enzyme complex. Conversely, the lower carbon flux towards carotenogenesis in the deletion mutants might delay or lead to a partial formation of a carotenogenic enzyme complex, which could explain the accumulation of astaxanthin carotenoid precursors in these mutants. In conclusion, the *FPS* and the *crtE* genes represent good candidates to manipulate to favor carotenoid biosynthesis in *X. dendrorhous*.

**Citation:** Alcaíno J, Romero I, Niklitschek M, Sepúlveda D, Rojas MC, et al. (2014) Functional Characterization of the *Xanthophyllomyces dendrorhous* Farnesyl Pyrophosphate Synthase and Geranylgeranyl Pyrophosphate Synthase Encoding Genes That Are Involved in the Synthesis of Isoprenoid Precursors. PLoS ONE 9(5): e96626. doi:10.1371/journal.pone.0096626

**Editor:** Marie-Joelle Virolle, University Paris South, France

**Received:** January 10, 2014; **Accepted:** April 9, 2014; **Published:** May 5, 2014

**Copyright:** © 2014 Alcaíno et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Funding by Fondecyt 1100324. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: vcifuentes@uchile.cl

☞ These authors contributed equally to this work.

## Introduction

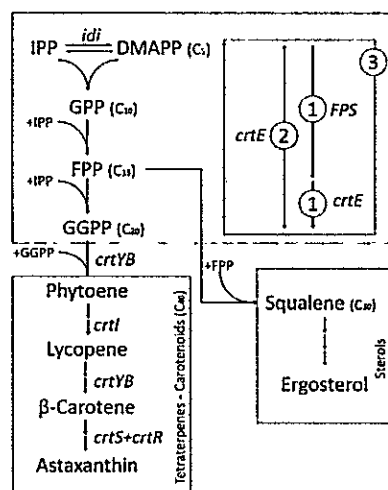
Isoprenoids, also known as terpenoids, are one of the largest and most diverse families of natural products, consisting of over 40,000 structurally different compounds isolated from animals, plants and microorganisms [1]. Many biological functions have been attributed to them, including their roles as defensive and photoprotective agents, important components of cell membranes and both pigments and reproductive hormones, making them very attractive biotechnological metabolites [2]. These roles and structural diversity have attracted the attention of researchers

from various fields of science to study isoprenoids function, biosynthesis and synthesis regulation.

Despite the enormous structural diversity of isoprenoids, their biosynthesis shares the same initial steps. These steps correspond to the sequential union of a C<sub>5</sub>-isoprene unit by prenyl transferase enzymes [3]. The basic isoprene building blocks are the isopentenyl pyrophosphate (IPP) and its isomer dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP). Generally, in eukaryotes and archaea, IPP derives from the mevalonate pathway [4,5], while in most bacteria and plant plastids IPP is synthesized via the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate, DOXP/MEP, non-mevalonate pathway [6]. In the first step of isoprenoid biosynthesis (Fig. 1), IPP is

converted into DMAPP, a reaction that is catalyzed by the isopentenyl pyrophosphate isomerase (encoded by *idi*). Then, a molecule of IPP is condensed with a molecule of DMAPP to form geranyl pyrophosphate (GPP; C<sub>10</sub>), the precursor of monoterpenes. The addition of a second IPP unit to GPP generates farnesyl pyrophosphate (FPP; C<sub>15</sub>), which is precursor of sesquiterpenes. The further addition of IPP to FPP results in geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP; C<sub>20</sub>), the precursor of diterpenes. The later condensation of two molecules of GGPP yields phytoene, and that of two units of FPP gives squalene, which are the precursors of carotenoids and triterpenes (including sterols), respectively. In the synthesis of GGPP from DMAPP (DMAPP to GPP to FPP to GGPP), three different systems have been described, depending on the number of enzymes involved. In the first system, only one enzyme, a GGPP-synthase encoded by the *crtE* gene, produces GGPP from DMAPP [7]. In the second system, two enzymes are involved: a FPP-synthase (*FPS* gene) that forms FPP, followed by the GGPP-synthase to form GGPP [8]. The third system is a hybrid, where the first two systems act in parallel to give GGPP [9].

Carotenoids are natural pigments, fulfilling important physiological roles in a wide range of organisms. More than 750 chemical structures have been described to date [10], and plants, algae and some fungi and bacteria synthesize carotenoids. In general, animals are unable to biosynthesize carotenoids *de novo*, so they must obtain them through their diet [11]. Carotenoids are attractive from an industrial point of view because they are widely used as food colorants, antioxidants and nutraceutical agents [12].



**Figure 1. Synthesis of isoprenoids in *X. dendrorhous*.** Metabolite abbreviations: IPP (isopentenyl pyrophosphate), DMAPP (dimethylallyl pyrophosphate), GPP (geranyl pyrophosphate), FPP (farnesyl pyrophosphate) and GGPP (geranylgeranyl pyrophosphate). The arrows represent the catalytic step with the respective enzyme-encoding gene. Genes controlling the steps shown in the figure are written in italics: *idi* [Genbank: DQ235686, IPP-isomerase], *crtE* [Genbank: DQ012943, GGPP-synthase], *FPS* [Genbank: KJ140284, FPP-synthase], *crtYB* [Genbank: DQ016503, Phytoene-β-carotene synthase], *crtI* [Genbank: Y15007, Phytoene desaturase], *crtS* [Genbank: EU713462, astaxanthin synthase] and *crtR* [Genbank: EU884133, Cytochrome P450 reductase]. The three proposed model systems to achieve the synthesis of GGPP are shown: 1) first system, a FPP- and a GGPP- synthase are involved and act sequentially, 2) second system, only one GGPP synthase is involved and 3) third system, participation of the first and second system simultaneously.

doi:10.1371/journal.pone.0096626.g001

Among the carotenoids, astaxanthin (3,3'-dihydroxy-β,β-carotene-4,4'-dione) stands out for its commercial potential, as it is currently being used as an antioxidant and as feed additive in aquaculture for salmon fish pigmentation [13,14]. The biosynthesis of astaxanthin is limited to only a few organisms, including the basidiomycete yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* [15].

The astaxanthin biosynthesis in *X. dendrorhous* has been investigated, and the genes involved in the synthesis of astaxanthin from phytoene have been described. However, the early steps of carotenogenesis in this yeast are less known.

The *X. dendrorhous idi* [16] and *crtE* [17] genes have been described, but no *FPS* gene has been formally reported. This is interesting, as several metabolic engineering strategies have been attempted to increase carotenoid production in *X. dendrorhous*. To increase carotenoid precursors, the *idi* gene was over-expressed. However, that over-expression decreased the total amount of carotenoids [18]. Conversely, when the *crtE* gene was over-expressed, there was only a slight increase in the total carotenoid content [19]. An explanation for this result could be that the GGPP-synthase activity in *X. dendrorhous* is limited by the amount of FPP, if this is its only substrate.

In this work, we report the isolation of the *FPS* gene from *X. dendrorhous*. Through functional studies, we conclude that *FPS* is involved in the synthesis of FPP and that its gene product uses IPP and DMAPP, or IPP and GPP, as substrates, while the GGPP-synthase utilizes exclusively IPP and FPP as substrates to produce GGPP.

## Materials and Methods

### Microorganisms, growth conditions and enzymes

All strains used and/or created in this work are listed in Table 1. The wild-type UCD 67-385 (ATCC 24230) *X. dendrorhous* strain was used for the genomic and cDNA library construction [17] and as the parental strain for genetic modifications. The yeast strains were grown at 22°C with constant agitation in YM rich medium (1% glucose, 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract and 0.5% peptone). Yeast transformants were selected on YM-agar plates (1.5% agar) that were supplemented with 12.5 μg/mL hygromycin-B.

*E. coli* DH-5α was used for plasmid propagation and was grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium, supplemented with 100 μg/mL ampicillin for plasmid selection and 20 μg/mL of X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) for recombinant clone selection by blue-white screening [20]. When necessary, recombinant clones were selected by direct colony PCR with a comprehensive set of primers. For the *E. coli* heterologous expression of the *FPS* and *crtE* genes, the BL21 strain was used and grown at 37°C in LB medium supplemented with 50 μg/mL kanamycin.

*Taq* DNA polymerase (pol), restriction enzymes, Klenow polymerase and M-MLV reverse transcriptase were purchased from Promega, and the *Pfu* DNA polymerase was purchased from Invitrogen.

### Nucleic acids extraction

DNA extraction was performed from protoplasts of *X. dendrorhous* according to [21], and total RNA extraction was performed according to a modified protocol of Chomczynski and Sacchi [22,23]. Briefly, cell pellets were suspended in 200 μL of lysis buffer (0.5 M Sodium acetate pH 5.5, 5% SDS, 1 mM EDTA) and broken through mechanical rupture with 0.5 mm glass beads (BioSpec) and shaking in a mini bead beater-16 (BioSpec) for 1 min. Then, 800 μL of Tri-Reagent (Ambion) was

**Table 1.** Strains used and/or constructed in this work.

Strains	Genotype or Relevant Features	Reference or Source
<i>E. coli</i>		
DH-5alpha	F- $\phi$ 80d lacZAM15A (lacZY-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk- mk+) phoA supE44l- thi-1 gyrA96 relA1	[20]
BL21-Gold (DE3)	B F ompT hsdS(r <sub>a</sub> <sup>-</sup> m <sub>a</sub> <sup>-</sup> ) dcm <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> gal $\lambda$ (DE3) endA Hte	Stratagene
BL21+pET28	BL21-Gold (DE3) strain bearing plasmid pET28.	This work
BL21+FPS	BL21-Gold (DE3) strain bearing plasmid pET28-FPS.	This work
BL21+crtE	BL21-Gold (DE3) strain bearing plasmid pET28-crtE.	This work
<i>X. dendrorhous</i>		
UCD 67-385	ATCC 24230, wild-type. Diploid strain [42].	ATCC
385-FPS <sup>(+/+)</sup>	(FPS <sup>+</sup> /FPS <sup>Δppb</sup> ), Heterozygote transformant derived from UCD 67-385 with a portion of one of the FPS alleles replaced by a hygromycin B resistance cassette.	This work
385-crtE <sup>(+/+)</sup>	(crtE <sup>+</sup> /crtE <sup>Δppb</sup> ), Heterozygote transformant derived from UCD 67-385 with a portion of one of the crtE alleles replaced by a hygromycin B resistance cassette.	This work
385-XdVexp2 <sup>(+/+)</sup>	(int <sup>+</sup> /int <sup>Δppb</sup> ), Heterozygote transformant derived from UCD 67-385 with a non-coding genomic region (locus int) replaced by an empty over-expressing cassette (without an inserted ORF) and a hygromycin B resistance cassette.	This work
385-FPS <sup>(+/+, +)</sup>	(int <sup>+</sup> /int <sup>Δppb+FPS</sup> ), Transformant derived from UCD 67-385 containing an additional FPS allele and a hygromycin B resistance cassette integrated at locus int.	This work
385-crtE <sup>(+/+, +)</sup>	(int <sup>+</sup> /int <sup>Δppb+crtE</sup> ), Transformant derived from UCD 67-385 containing an additional crtE allele and a hygromycin B resistance cassette integrated at locus int.	This work

ATCC: American Type Culture Collection.

Locus int [Genbank: KJ140286].

doi:10.1371/journal.pone.0096626.t001

added, followed by shaking in the bead beater for 1 min and incubation for 10 min at room temperature. Then, 200  $\mu$ L of chloroform was added, followed by mixing and incubation for 6 min and centrifugation for 10 min at 14,000  $\times$ g. RNA was extracted from the recovered aqueous phase by precipitation with 1 volume of isopropanol and 0.5 volume of precipitation buffer (1.2 M NaCl, 0.8 M sodium citrate) for 1 h at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The RNA was washed with 70% ethanol, suspended in RNase-free H<sub>2</sub>O and quantified spectrophotometrically at 260 nm according to [20] in a V-630 UV-Vis Spectrophotometer from JASCO.

### DNA amplification and sequence analyses

The oligonucleotides that were designed and used in this study were synthesized by Integrated DNA Technologies and are listed in Table S1. The DNA amplification reactions were performed in a final volume of 25  $\mu$ L containing 2 U of *Taq* DNA pol, 2.5  $\mu$ L of 10X *Taq* buffer, 0.5  $\mu$ L of 10 mM dNTPs, 1  $\mu$ L of 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ L of 25  $\mu$ M of each primer and 10–20 ng of template DNA. In general, the PCR reactions were performed in a 2720 Applied Biosystems thermal cycler with the following program: initial denaturation at 95°C for 3 min; 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s, synthesis at 72°C for 3 min and a final extension step at 72°C for 10 min. The samples were kept at 4°C until analyzed by 0.8% agarose gel electrophoresis in TAE buffer containing 0.5  $\mu$ g/mL ethidium bromide [20]. DNA for sequencing or plasmid construction was purified from gels using the glass milk method [24]. The nucleotide sequences were obtained from an ABI 3100 Avant genetic analyzer using the BigDye terminator v3.1 kit (Applied Biosystems). DNA sequences were analyzed using Genecious 6.0.4, CLUSTAL W 1.8 and programs that are available at the NCBI web site.

### Single-strand DNA synthesis and quantitative RT-PCR (RT-qPCR)

The cDNA was synthesized using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) with 5  $\mu$ g of total RNA in a final volume of 20  $\mu$ L, according to the manufacturer's protocol. The relative transcript level analyses for each gene were performed in an Mx3000P quantitative PCR system (Stratagene) using 1  $\mu$ L of the reverse transcription reaction, 0.25  $\mu$ M of each primer (Table S1) and 10  $\mu$ L of the SensiMix SYBR Green I (Quantace) kit in a final volume of 20  $\mu$ L. The pairs of primers used had efficiencies greater than 95%, as determined by standard curves with a correlation coefficient of R<sup>2</sup>  $\geq$  0.996. The Ct values obtained were normalized to the respective value of the *X. dendrorhous* actin gene [Genbank: X89898.1] [25] and were later expressed as a function of the control conditions using the  $\Delta\Delta\text{Ct}$  algorithm [26].

### Obtaining the genes controlling the GGPP synthesis from IPP in *X. dendrorhous*

According to the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [27], three enzymatic activities, EC 2.5.1.1 (dimethylallyl transferase), EC 2.5.1.10 (geranyl transferase) and EC 2.5.1.29 (GGPP-synthase) are involved in the synthesis of GGPP from IPP and DMAPP. In *S. cerevisiae*, the dimethylallyl- and the geranyl-transferase activities are performed by the FPP-synthase encoded by the *ERG20* gene [28], and the *BTS1* gene, which is homologous to the *crtE* gene described in other organisms, encodes the GGPP-synthase activity [29]. Only the *X. dendrorhous crtE* gene has been previously described [17]. To find the *X. dendrorhous FPS* gene, a BLASTp analysis was performed using the deduced amino acid sequences from *ERG20* as a query. By this way, the homologous genes from the basidiomycetes *Coprinopsis cinerea*, *Cryptococcus neoformans*, *Laccaria bicolor* and *Ustilago maydis* were obtained [Genbank: EAU81564.1, XP\_571137, DS547151

and XP\_757593, respectively], and the deduced amino acid sequences were aligned. From the conserved regions, primers were designed to amplify by PCR the *X. dendrorhous* *FPS* gene. By this way, a *X. dendrorhous* genomic PCR amplification product of approximately 800 bp (using primers FPSF and FPSR) was obtained, which was completely sequenced. BLAST analyses of the obtained nucleotide sequence against the patent database available at the National Center of Biotechnology Information (NCBI), showed 100% identity with the *X. dendrorhous* *FPS* gene sequence from patent EP0955 363A2 [30]. This patent described the *X. dendrorhous* *FPS* gene isolation and reported its sequence [Genbank: AR349868.1], but it did not analyze the gene functionality nor its impact on the yeast carotenogenesis. Nevertheless, primers were designed from this sequence to amplify the *X. dendrorhous* *FPS* gene.

### Plasmid construction for *E. coli* and *X. dendrorhous* transformations

All plasmids used and constructed in this work are listed in Table 2.

A 3,312 bp *EcoRI/DraI* DNA fragment containing the *X. dendrorhous* *crE* gene was sub-cloned from plasmid pXD-I10 [17] into the pBluescript SK- vector, giving rise to pXd-*gcrE*. The plasmid pXd-*gFPS* was constructed by inserting a 2,627 bp PCR-amplified DNA fragment encoding the *FPS* gene into the *EcoRV* site of the pBluescript SK-. This last DNA fragment was amplified using primers FPSORF1F and FPSORF1R (Table S1) and genomic DNA of the UCD 67–385 wild-type strain as template. The genomic versions of both genes from the wild-type strain UCD 67–385 were uploaded at the Genbank database as follows: *crE* [Genbank: DQ012943.1] and *FPS* [Genbank: KJ140284].

Next, from the genomic *crE* and *FPS* gene versions, primers were designed to amplify their cDNA obtained by reverse transcription (RT) of total RNA from the wild-type strain UCD 67–385. The amplified products were also cloned into the pBluescript SK- vector, resulting in the plasmids pXd-*crE* and

pXd-*cFPS*, whose inserts were completely sequenced. The plasmids pET28-*crE* and pET28-*cFPS* for heterologous expression in *E. coli* were constructed by PCR amplification of the cDNA of each gene from plasmids pXd-*crE* and pXd-*cFPS*, respectively, and using primers with restriction sites (Table S1) for an in-frame ligation into the *NcoI+NdeI* digested plasmid pET28a.

The plasmids pXd-*gcrE::hph* and pXd-*gFPS::hph* were constructed as shown in Figure S1. For pXd-*gcrE::hph*, a 1,984 bp *EcoRV* DNA fragment in pXD-*gcrE* was replaced by the hygromycin B resistance cassette obtained from the digestion of pMN-*hph* with *EcoRV*; in the case of pXd-*gFPS::hph*, a 2,038 bp *EcoRV/BglII* DNA fragment in pXd-*gFPS* was replaced by the hygromycin B cassette.

To over-express the *crE* and *FPS* genes in *X. dendrorhous*, plasmids pXdVexp2-*crE* and pXdVexp2-*cFPS* were constructed as shown in Figure S1. Briefly, the *crE* and the *FPS* cDNAs were amplified from plasmids pXd-*crE* and pXd-*cFPS*, respectively, and were then independently inserted at the *HpaI* site of pXdVexp2. In this approach, after transformation, the gene to be over-expressed is integrated into the yeast genome at *locus int* [Genbank: KJ140286], which represents a non-coding DNA region that does not reveal an evident new phenotype when it is interrupted. Each cDNA is regulated by the promoter of the ubiquitin gene [Genbank: KJ140285] and the terminator from the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Genbank: Y08366] gene of *X. dendrorhous*.

For transformant DNA preparation, plasmids pXd-*gcrE::hph*, pXd-*gFPS::hph*, pXdVexp2-*cFPS* and pXdVexp2-*crE*, were linearized by digestion with *KpnI+SmaI*, *AvaI*, *NoI* and *NoII*, respectively (Fig. S1).

### Transformation of *X. dendrorhous*

*X. dendrorhous* was transformed by electroporation [31] using a BioRad gene pulser X cell with PC and CE cassettes under the following conditions: 125 mF, 600  $\Omega$  and 0.45 kV [32]. The electrocompetent cells were prepared from an exponential culture

**Table 2.** Plasmids used and/or constructed in this work.

Plasmid	Genotype or Relevant Features	Source or Reference
pBluescript SK- (pBS)	ColE1 ori; Amp <sup>R</sup> ; cloning vector with blue-white selection	Stratagene
pMN- <i>hph</i>	pBS bearing the hygromycin B ( <i>hph</i> ) resistance cassette at the <i>EcoRV</i> site.	[17]
pXd- <i>gcrE</i>	pBS containing a 3.3 kb DNA fragment carrying the <i>crE</i> gene of <i>X. dendrorhous</i> .	[17]
pXd- <i>gcrE::hph</i>	pXD- <i>crE</i> with a 1,984 bp <i>EcoRV</i> fragment deletion of the <i>crE</i> gene of <i>X. dendrorhous</i> and replaced by the <i>hph</i> cassette from pMN- <i>hph</i> .	[17]
pXd- <i>gFPS</i>	pBS containing a 2.5 kb DNA fragment carrying the <i>FPS</i> gene of <i>X. dendrorhous</i> .	This work
pXd- <i>gFPS::hph</i>	pXD- <i>FPS</i> with a 2,038 bp <i>EcoRV-BglII</i> fragment deletion of the <i>FPS</i> gene of <i>X. dendrorhous</i> and replaced by the <i>hph</i> cassette from pMN- <i>hph</i> .	This work
pXd- <i>crE</i>	pBS containing the cDNA version of the <i>crE</i> gene from <i>X. dendrorhous</i>	This work
pXd- <i>cFPS</i>	pBS containing the cDNA version of the <i>FPS</i> gene from <i>X. dendrorhous</i>	This work
pXdVexp2	<i>X. dendrorhous</i> expression vector: pBS bearing the <i>X. dendrorhous</i> ubiquitin promoter [Genbank: KJ140285] and GPD terminator [Genbank: Y08366] with a <i>BamHI</i> site between them to insert the gene to express and the hygromycin B cassette for selection, flanked by non-coding genomic [Genbank: KJ140286] regions to target the construction integration in the genome.	This work
pXdVexp2- <i>crE</i>	pXdVexp2 bearing the cDNA version of the <i>crE</i> gene from <i>X. dendrorhous</i> .	This work
pXdVexp2- <i>cFPS</i>	pXdVexp2 bearing the cDNA version of the <i>FPS</i> gene from <i>X. dendrorhous</i> .	This work
pET28a(+)	<i>E. coli</i> expression vector. pBR322 ori; Kan <sup>R</sup> ; LacI repressor.	Novagen
pET28- <i>crE</i>	pET28a(+) bearing the cDNA version of the <i>X. dendrorhous</i> <i>crE</i> gene.	This work
pET28- <i>cFPS</i>	pET28a(+) bearing the cDNA version of the <i>X. dendrorhous</i> <i>FPS</i> gene.	This work

doi:10.1371/journal.pone.0096626.t002

at  $OD_{600nm} = 1.2$ , grown in YM medium and transformed with 1 to 5  $\mu\text{g}$  of linear donor DNA. The resulting transformant strains were confirmed as *X. dendrorhous* through an analysis of the ITS1, 5.8 rRNA gene and ITS2 DNA sequences [33].

#### Carotenoid and sterol extraction and RP-HPLC analyses

The acetone extraction method [34] was used for carotenoid extraction from cellular pellets. Total carotenoids were quantified spectrophotometrically at 465 nm using an absorption coefficient of  $A1\% = 2,100$  and normalized to the dry weight of the yeast. The extracted carotenoids were separated by RP-HPLC using a RP-18 Lichrocart 125-4 (Merck) column with acetonitrile:methanol:isopropanol (85:10:5, v/v) as the mobile phase, with a 1 mL/min flux under isocratic conditions, and the elution spectra were recovered using a diode array detector. Carotenoids were identified according to their spectra and retention time in comparison to standards.

Sterols were extracted according to [35]. For this extraction, cell pellets were mixed with 4 g of KOH and 16 mL of 60% (v/v) ethanol/water and incubated at  $80 \pm 2^\circ\text{C}$  for 2 h. Non-saponifiable sterols were extracted with 10 mL of petroleum ether, quantified spectrophotometrically at 280 nm using an absorption coefficient of  $A1\% = 11.500$  and normalized to the dry weight of the yeast. Sterols were separated by RP-HPLC with a C-18 column, using methanol:water (97:3, v/v) as the mobile phase at 1 mL/min under isocratic conditions. The elution spectra were recovered using a diode array detector, and sterols were visualized in the 280 nm channel and compared to ergosterol standard purchased from Sigma-Aldrich.

#### Protein extraction

Soluble proteins from *E. coli* were obtained by sonication of cell pellets (5 mL from a culture with a  $DO_{600}$  0.5–0.7) suspended in 1 mL of extraction buffer, 50 mM MOPS pH 7.5 and protease inhibitor cocktail (Complete, Roche Biomedicals), using a Cole Parmer 4710 ultrasonic homogenizer. Twelve sonication pulses of 10 s at 40% duty, followed by 30 s of incubation in ice, showed the best protein yield from the soluble fraction. The lysate was centrifuged at  $14,000 \times g$ , and the supernatant was recovered and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until its use.

Soluble proteins from *X. dendrorhous* were also obtained by sonication of cell pellets from 10 mL of a stationary phase culture. Each pellet was suspended in 5 mL of extraction buffer (50 mM MOPS, 5 mM EDTA, 0.5 M sorbitol and protease inhibitor cocktail) and ruptured by 15 pulses of sonication of 30 s at 90% duty followed by 1.5 min of incubation in ice. The lysate was sequentially centrifuged at  $4,000 \times g$  for 5 min,  $10,000 \times g$  for 20 min and  $100,000 \times g$  for 1 h, recovering the supernatant from each step. The recovered supernatants were purified from endogenous metabolites through a PD-10 exclusion column (GE Healthcare). The recovered proteins were stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

#### Prenyl transferase activity assays

Prenyl transferase activity assays were adapted from [36]. Two protein extract samples were obtained from two replicate cultures of each of the *X. dendrorhous* or *E. coli* strains that were assayed. The enzymatic assays were performed in duplicates in a final volume of 500  $\mu\text{L}$  containing 12  $\mu\text{g}$  of protein extract ( $14,000 \times g$  or  $100,000 \times g$  supernatants), 50 mM MOPS, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 6 mM DTT, 100,000 dpm  $^{14}\text{C}$ -IPP (56.6 mCi/mmol; 0.81 nmol), 20.2  $\mu\text{M}$  IPP and saturating concentrations of alternative allylic substrates (20.2  $\mu\text{M}$  DMAPP, 16.4  $\mu\text{M}$  GPP or 13.8  $\mu\text{M}$  FPP). Incubations were performed at  $22^\circ\text{C}$  for 1 h.  $^{14}\text{C}$ -GPP,  $^{14}\text{C}$ -FPP and/or  $^{14}\text{C}$ -GGPP were expected as products, as was  $^{14}\text{C}$ -

DMAPP possibly formed by an IPP isomerase present in the protein extracts. The corresponding  $^{14}\text{C}$ -prenyl alcohols, which are formed by phosphatase activities on the prenyl transferase products, may also be obtained, though the amount produced in most cases was negligible and thus not considered. Reactions were stopped by adding 500  $\mu\text{L}$  of hexane to extract the  $^{14}\text{C}$ -prenyl alcohol phosphatase products. After extraction, the organic phase was separated and removed. The remaining aqueous phase was acidified with HCl to a final concentration of 0.66 N and incubated for 1 h at  $37^\circ\text{C}$  to hydrolyze allylic  $^{14}\text{C}$ -prenyl phosphates formed by prenyl transferases. The resulting labeled, rearranged prenyl alcohols were extracted with 500  $\mu\text{L}$  of hexane and the organic phase (allylic hexane phase) was stored at  $-20^\circ\text{C}$  for quantification and further thin layer chromatography (TLC) analysis. One enzyme unit (U) was defined as 1  $\mu\text{mol}$  of product formed per min under the assay conditions. Prenyl transferase specific activity was expressed in U/mg of protein. A representative chromatogram prenyl product analysis by TLC is shown in Figure S2.

#### Product quantification and analysis

$^{14}\text{C}$ -labelled products, as well as the remaining substrate, were quantified in the organic and aqueous phases, respectively, by liquid scintillation counting in a Perkin Elmer Tri-Carb 2810TR instrument.  $^{14}\text{C}$ -Prenyl alcohols in the allylic hexane phase ( $\text{C}_5$ ,  $\text{C}_{10}$ ,  $\text{C}_{15}$  and/or  $\text{C}_{20}$ ), which are formed from allylic prenyl phosphate products, were analyzed by TLC in 60 mm silica gel plates (TLC Silica gel 60 RP-18, Merck) developed with acetone/ $\text{H}_2\text{O}$  (9:1, v/v) as mobile phase. Standard dimethyl allyl alcohol ( $\text{C}_5$ ), linalool ( $\text{C}_{10}$ ), trans-nerolidol ( $\text{C}_{15}$ ) and geranylgeraniol ( $\text{C}_{20}$ ) (4  $\mu\text{g}$ , 8  $\mu\text{g}$ , 2  $\mu\text{g}$  and 0.5  $\mu\text{g}$ , respectively) were added to the samples that were concentrated under  $\text{N}_2$  up to 10–15  $\mu\text{L}$  and loaded into the plates. The plates were sprayed with Libermann-Burchard solution ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ :acetic anhydride:ethanol (1:1:8, v/v) and heated gently on a heating plate to reveal the standards (R<sub>f</sub> values were 0.9, 0.8, 0.71 or 0.62 for the  $\text{C}_5$ ,  $\text{C}_{10}$ ,  $\text{C}_{15}$  or  $\text{C}_{20}$  standards, respectively). Segments of 2.5 mm were cut from the origin to the solvent front, and radioactivity was quantified in each fraction by liquid scintillation counting.

## Results and Discussion

#### Sequence analysis of genes controlling the GGPP synthesis from IPP in *X. dendrorhous*

The *X. dendrorhous* *critE* gene has been previously isolated and described [17], which encodes a 376 amino acid protein with a predicted molecular weight of 42.16 kDa. The *FPS* gene has 9 exons (of 135, 144, 81, 123, 89, 73, 141, 164, 118 pb) and 8 introns (of 189, 151, 122, 96, 113, 85, 97, 132 pb). The *FPS* gene encodes a 355 amino acid protein with a predicted molecular weight of 40.24 kDa.

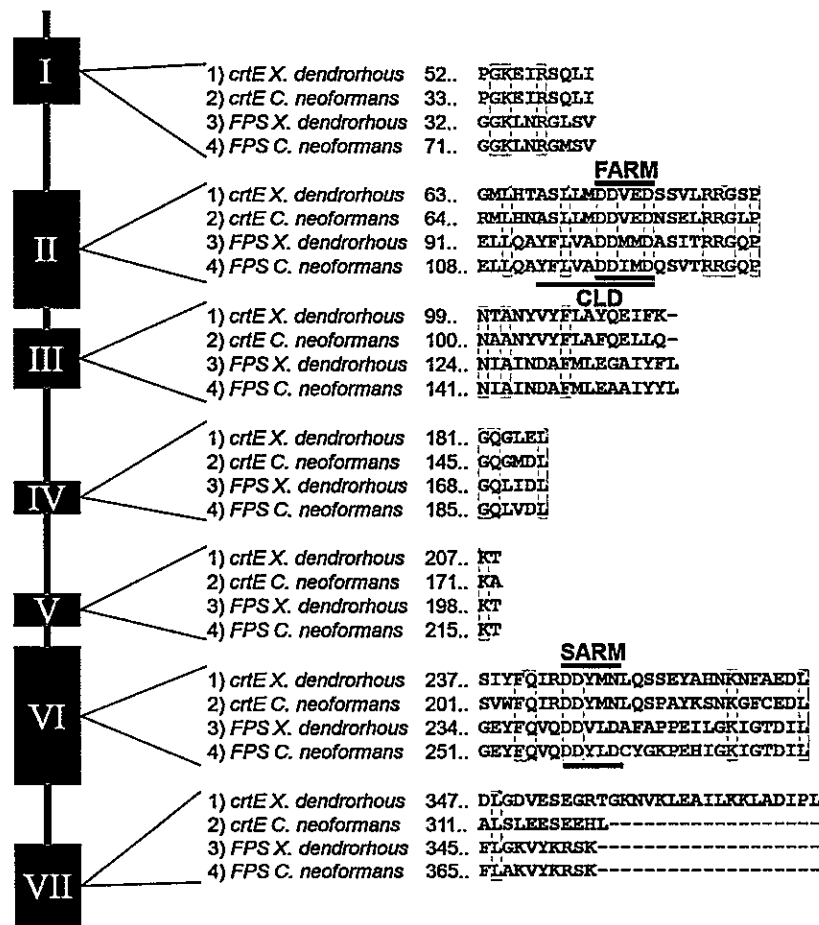
Because the *critE* and the *FPS* genes encode prenyl transferase enzymes, their deduced amino acid sequences were compared, including the amino acid sequences from *C. neofornans* (*critE* [Genbank: XP\_572774.1] and *FPS* [Genbank: XP\_571137.1]) to increase the robustness of the analysis (Fig. 2). The amino acid identity between the homologous enzymes was 47% and 63% for the *critE* and *FPS* gene products, respectively. As expected, the identity among the four enzymes decreased dramatically. Even though the sequence identity among the prenyl transferase enzymes encoded by the analyzed *critE* and *FPS* genes is low, the previously reported conserved regions in these enzymes [37,38] could be distinguished (Fig. 2). This was the case for the two-aspartic acid-rich motifs (DDxxD) that were recognized: i) the First

Aspartic acid-Rich Motif (FARM; DDxxDxxxxRRG), and ii) the Second Aspartic acid-Rich Motif (SARM; GxxFQxxDDxxD). Moreover, the chain length domain (CLD) proposed by Ohtsuma and co-workers [39] could be distinguished in the GGPP- and FPP-synthase deduced sequences. The *X. dendrorhous* GGPP-synthase contains a small amino acid and a serine at the fourth and fifth positions before the FARM motif, while FPP-synthase has a tyrosine and phenylalanine at these positions, which is consistent with the chain length determination of these two types of prenyl transferases [40,41]. Although the predicted *X. dendrorhous* FPP-synthase shows the seven conserved regions (I to VII) described for this type of enzyme, the predicted GGPP-synthase from *X. dendrorhous* lacks any distinctive aminoacids from this last conserved region.

**Heterologous expression of FPS and crtE genes from *X. dendrorhous* in *E. coli***

To study the enzymatic activities encoded by the *FPS* and *crtE* genes from *X. dendrorhous*, the genes were independently expressed

in *E. coli*. The synthesis of FPP-synthase and GGPP-synthase in the transformant strains (BL21+FPS and BL21+crtE) was confirmed by SDS-PAGE analyses (Fig. S3), which showed protein bands of the expected size (40.24 and 42.16 kDa, respectively) only when cultures were induced by IPTG. Moreover, the protein bands were excised from gels and analyzed by MALDI-TOF to confirm the identity of the proteins. Prenyl transferase assays were performed with protein extracts from transformant strains BL21+pET28, BL21+FPS and BL21+crtE (Table 1), using induced and non-induced cultures as controls. The results are summarized in Table 3. Prenyl transferase activity was not detected with any of the substrates in the extracts of non-induced cultures or in extracts from BL21+pET28. In contrast, <sup>14</sup>C-labeled products were found in the allylic fraction from incubations with induced BL21+FPS and BL21+crtE extracts. The extracts from BL21+FPS formed C<sub>10</sub> and C<sub>15</sub> <sup>14</sup>C-allylic pyrophosphates from DMAPP plus <sup>14</sup>C-IPP, as evidenced by the C<sub>10</sub> and C<sub>15</sub> <sup>14</sup>C-alcohols detected in the allylic hexamic phase (Table 3), while GPP was converted by BL21+FPS extracts into a C<sub>15</sub> allyl pyrophosphate that was detected as a C<sub>15</sub> alcohol after acid hydrolysis. Interestingly, no



**Figure 2. *X. dendrorhous* and *C. neoformans* FPS and crtE deduced amino acid sequence analysis.** Seven conserved regions have been previously reported in prenyl transferase enzymes; among these are the two aspartic acid-rich motifs, FARM and SARM, and the CLD chain length domain, which is responsible for determining the resulting isoprene chain length. The sequence alignment shows similarity between the compared proteins, particularly for the aforementioned motifs. However, the seventh reported conserved region shows little or no agreement between the *crtE* and the *FPS* translated sequences. This was consistent for geranylgeranyl pyrophosphate synthases from other related organisms. Amino acid sequences were deduced from: *X. dendrorhous* FPS [Genbank: KJ140284], and *crtE* [Genbank: DQ012943.1]; *C. neoformans* FPS [Genbank: XP\_571137] and *crtE* [Genbank: XP\_572774]. doi:10.1371/journal.pone.0096626.g002

products were found in the allylic fraction when FPP plus  $^{14}\text{C}$ -IPP were utilized as substrates. In contrast, the extracts from BL21+*crE* did not utilize DMAPP or GPP as substrates but were able to convert FPP in the presence of  $^{14}\text{C}$ -IPP to give  $\text{C}_{20}$   $^{14}\text{C}$ -alcohols in the allylic fraction, which is evidence of  $^{14}\text{C}$ -GGPP synthesis. These results demonstrate that the prenyl transferases encoded by *FPS* or *crE* differ strongly in their substrate specificity, in agreement with their sequence homology to the FPP- and GGPP-synthase encoding genes from other organisms. Thus, GGPP production for astaxanthin biosynthesis by *X. dendrorhous* would result from the combined action of both prenyl transferases, i.e., the FPP- and GGPP-synthases, with the latter providing a link to the central metabolism essential for astaxanthin production. This was demonstrated by the conversion of DMAPP plus  $^{14}\text{C}$ -IPP into  $\text{C}_{20}$   $^{14}\text{C}$ -products by the combined BL21+*FPS* and BL21+*crE* protein extracts, in addition to the  $\text{C}_{15}$  and  $\text{C}_{10}$  labeled products found in the hexane phase after acid hydrolysis (Table 3). However, the  $\text{C}_{20}$  labeled products fraction was lower than the other fractions, which would result from a low geranylgeranyl-pyrophosphate synthase (*crE* gene) activity compared to farnesyl-pyrophosphate synthase (*FPS* gene) activity in the protein extracts from *E. coli* (Table 3). Thus, FPP accumulates and is only partially converted into GGPP. Product distribution in *E. coli* combined extracts is consistent with results found in the *X. dendrorhous* enzymatic assays with DMAPP as substrate in which 86% of the product corresponded to FPP and only 12% to GGPP (see below, Table 4). The geranylgeranyl-pyrophosphate synthase activity in *X. dendrorhous* is much lower than the farnesyl-pyrophosphate synthase activity (Table 4), thus FPP conversion to GGPP is a slow reaction.

#### FPS and crE gene mutations and over-expression in *X. dendrorhous*

To study the involvement of the *FPS* and *crE* genes in the astaxanthin and ergosterol biosynthetic pathways of *X. dendrorhous*, *FPS* and *crE* deletion and over-expressing mutant strains were constructed.

To generate deletion mutants, the wild-type strain UCD 67–385 was independently transformed using the linearized plasmids

pXd-*gcrE::hph* and pXd-*gFPS::hph*. In this way, the wild-type genes (*FPS* or *crE*) were replaced by the DNA fragment containing the resistance marker for transformant strain selection, flanked by DNA sequences that allowed homologous recombination between the transforming DNA and the corresponding target locus. Several transformants were selected from each transformation event, and the modified genotype was confirmed by PCR reactions using comprehensive sets of primers (Table S1). Figure S4 shows the genotype analysis of one transformant of each kind, indicating that they are heterozygotes for the *FPS* or the *crE* genes because they have a mutant allele and still have a wild-type allele. For this reason, these transformants were named 385-*FPS*<sup>(+/-)</sup> and 385-*crE*<sup>(+/-)</sup>, respectively. This result was expected because the experimental evidence suggests that the UCD 67–385 strain is diploid [42]. Although several attempts at transformant homozygotization using the Double Recombinant Method (DRM) [43] were made, it was not possible to obtain *crE* [17] and *FPS* homozygous mutants, suggesting that these genes are essential and that their homozygote mutant condition could be lethal. Nevertheless, a different color phenotype is apparent to the naked eye between the parental and the heterozygous strains (Fig. 3). This observation suggests that under substrate limiting conditions, the carbon flux may be preferentially directed towards vital functions instead of carotenogenesis, as the growth curves of both heterozygous strains were not significantly altered (Fig. S5). Additionally, the heterozygous condition supports the gene dose effect in the production of carotenoids in *X. dendrorhous*, which has been described in other carotenogenic heterozygous mutants [17,44].

Similarly, the *FPS* and *crE* genes were over-expressed in the wild-type strain UCD 67–385 by transforming with linearized plasmids pXdVexp2-*cFPS* and pXdVexp2-*ccrE*; a transformant strain of each type was selected and named 385-*FPS*<sup>(+/+, +1)</sup> and 385-*crE*<sup>(+/+, +1)</sup>, respectively. In the same way as the heterozygous mutant strains (Fig. S4), PCR-based genotype analyses of the transformant strains confirmed that the over-expression cassettes were integrated at one of the *int* locus alleles. Under visual inspection, the colonies of both over-expressing mutants have a more intense red color than the parental strain (Fig. 3). Additionally, the 385-*FPS*<sup>(+/+, +1)</sup> colonies have a glossy

**Table 3.** Prenyl transferase enzymatic assays with recombinant *E. coli* protein extracts.

Strain Protein Extract	Variable Substrate	Prenyl Transferase Activity (U/mg×10 <sup>6</sup> )	Percentage of each Product*
BL21pET28	DMAPP	-	ND
	GPP	-	ND
	FPP	-	ND
BL21+ <i>FPS</i>	DMAPP	6.06±0.75	C <sub>10</sub> (12.9%), C <sub>15</sub> (87.1%)
	GPP	3.84±0.43	C <sub>15</sub> (100%)
	FPP	-	ND
BL21+ <i>crE</i>	DMAPP	-	ND
	GPP	-	ND
	FPP	2.44±0.16	C <sub>20</sub> (100%)
BL21+ <i>FPS</i> and BL21+ <i>crE</i>	DMAPP	6.65±0.11	C <sub>10</sub> (17.4%), C <sub>15</sub> (71.5%), C <sub>20</sub> (11.1%)

Enzymatic assays were performed as described in the Materials and Methods section. Two protein extract samples from two replicate cultures were obtained for each strain, and then two enzymatic assays were performed with each protein extract. The table values are the mean values of prenyl transferase activity and percentage of product ± standard error of the mean.

\*Percentage of each product considering 100% the total radioactivity found in the hexanic phase.

ND: Product not detected. C<sub>10</sub>, C<sub>15</sub> and C<sub>20</sub> correspond to products containing 10, 15 and 20 carbon atoms, respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0096626.t003



**Table 4.** Prenyl transferase enzymatic assays with *X. dendrorhous* protein extracts.

Strain	Protein Extract	Variable Substrate	Prenyl Transferase Activity (U/mg×10 <sup>6</sup> )	Percentage of each Product*		
				C <sub>10</sub>	C <sub>15</sub>	C <sub>20</sub>
UCD 67–385		DMAPP	5.0±0.15	2±0	86±4	12±5
		FPP**	1.15±0.35	ND	ND	ND
385-FPS <sup>(+/+, +1)</sup>		DMAPP	9.24±0.45	2±1	85±3	13±3
		FPP**	1.13±0.68	ND	ND	ND
385-crtE <sup>(+/+, +1)</sup>		DMAPP	4.54±0.76	3±1	84±4	13±4
		FPP	2.81±0.81	15±4	74±5	11±4
385-FPS <sup>(+/-)</sup>		DMAPP	3.79±0.6	2±1	86±3	12±4
		FPP**	0.64±0.15	ND	ND	ND
385-crtE <sup>(+/-)</sup>		DMAPP	4.1±1.06	3±1	84±2	14±3
		FPP**	0.74±0.03	ND	ND	ND

Enzymatic assays were performed as described in the Materials and Methods Section. Two protein extract samples from two replicate cultures were obtained for each strain, and then two enzymatic assays were performed with each protein extract. The table values are the mean values of prenyl transferase activity and percentage of product ± standard error of the mean.

\*Percentage of each product considering 100% the total radioactivity found in the hexanic phase.

ND: Product not detected in TLC analysis. C<sub>10</sub>, C<sub>15</sub> and C<sub>20</sub> correspond to products containing 10, 15 and 20 carbon atoms, respectively.

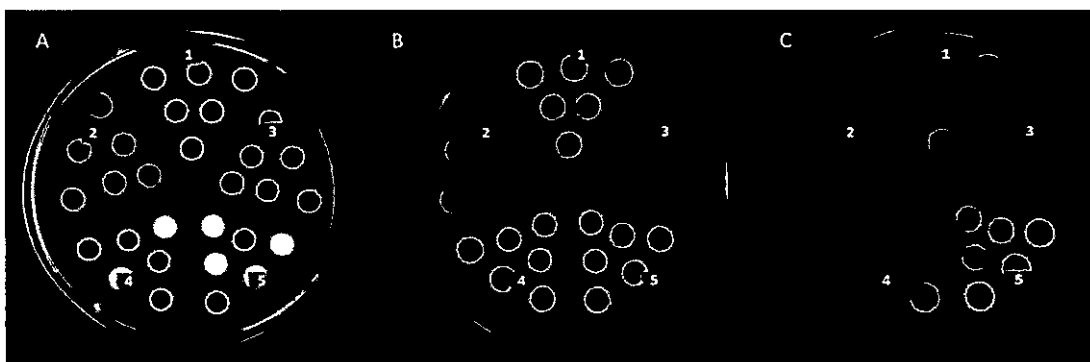
\*\*The assays conducted using FPP as a substrate yielded low amounts of products, which could not be detected under the experimental conditions.

doi:10.1371/journal.pone.0096626.t004

appearance, in contrast to the *X. dendrorhous* wild-type colonies, which are usually opaque. The *crtE* over-expression affected the biomass production, as 385-*crtE*<sup>(+/+, +1)</sup> cultures reached a lower OD<sub>600</sub> than did the parental strain (8.76±0.62 versus 12.8±0.93) after 120 h of culture at 22°C in YM media with constant agitation (Fig. S5). This fact suggests that *crtE* over-expression favors the carbon flux towards carotenogenesis at the expense of other metabolic pathways, negatively impacting the strain growth. Conversely, *FPS* over-expression does not affect strain growth, most likely because this condition would favor FPP production, which is also a sterol biosynthetic pathway precursor. Finally, in both over-expressing strains, pigmentation is apparent to the naked eye earlier than in the parental strain and in both heterozygote mutant strains, suggesting that carotenogenesis begins earlier in the *FPS* and *crtE* over-expressing strains (Fig. 3).

#### Carotenoids and sterols in *X. dendrorhous* wild-type, *FPS* and *crtE* mutant strains

To confirm the visual inspection observations, total carotenoids and sterols were extracted from the wild-type and 385-*FPS*<sup>(+/-)</sup>, 385-*crtE*<sup>(+/-)</sup>, 385-*FPS*<sup>(+/+, +1)</sup> and 385-*crtE*<sup>(+/+, +1)</sup> mutant strains after 72 and 120 h of culture in YM media with constant agitation (Table 5). As expected, the total carotenoid content and/or composition were different in the mutant strains with respect to the wild-type strain. Statistical analysis (Student's t test, p<0.01) confirmed that the *FPS* and *crtE* over-expressing strains have a higher carotenoid content and a slight increase in the astaxanthin fraction compared with the parental strain after 72 h of incubation. Previously, a similar carotenoid content increment (approximately 1.4-fold) was reported by over-expressing the *crtE* gene in *X. dendrorhous* [19]. Conversely, the total carotenoid content in the heterozygote *FPS* and *crtE* mutant strains was not



**Figure 3.** Colony pigmentation of the *X. dendrorhous* wild-type strain and the *FPS* and *crtE* deletion and over-expressing transformants over time. Micro-drops of strains UCD 67–385 wild-type (1), 385-*FPS*<sup>(+/+, +1)</sup> (2), 385-*crtE*<sup>(+/+, +1)</sup> (3), 385-*FPS*<sup>(+/-)</sup> (4) and 385-*crtE*<sup>(+/-)</sup> (5), were seeded on YM-agar plates and incubated at 22°C. Pictures were taken after 1 (Panel A), 3 (Panel B) and 5 (Panel C) days of cultivation. Pigmentation is apparent earlier in both of the gene over-expressing strains (2 and 3). The deletion mutant strains (4 and 5) showed similar pigmentation as the wild-type (1) strain after 3 days of cultivation, but at day 5, the 385-*crtE*<sup>(+/-)</sup> strain was paler than the wild-type strain.

doi:10.1371/journal.pone.0096626.g003

**Table 5.** Carotenoid composition in *FPS* and *crtE* mutants and wild-type *X. dendrorhous* strains (in ppm,  $\mu\text{g}$  per g of dry yeast weight).

Carotenoids	Strains (72 h of cultivation)				
	UCD 67-385	385-FPS <sup>(+/+, +1)</sup>	385-crtE <sup>(+/+, +1)</sup>	385-FPS <sup>(+/-)</sup>	385-crtE <sup>(+/-)</sup>
<b>Total</b>	<b>376.3±5.52 (100)</b>	<b>472.9±25.6 (100)</b>	<b>513.4±12.9 (100)</b>	<b>380.8±21.4 (100)</b>	<b>388.0±5.8 (100)</b>
Astaxanthin	305.9±12.9 (81.3)	428.4±9.5 (90.6)	451.1±12.5 (87.9)	231.0±32.8 (60.7)	200.4±34.9 (51.6)
Phoenicoxanthin	50.1±4.0 (13.3)	30.0±4.5 (6.3)	38.0±1.9 (7.4)	60.0±2.3 (15.8)	62.5±1.5 (16.1)
Cantaxanthin	9.0±0.6 (2.4)	9.6±2.0 (2.0)	10.5±2.7 (2.0)	15.3±2.7 (4.0)	14.6±4.0 (3.8)
OH-echinenone	4.8±3.0 (1.3)	ND	4.4±4.0 (0.9)	10.5±6.8 (2.8)	25.9±9.7 (6.7)
Echinenone	1.7±1.7 (0.5)	ND	3.9±2.9 (0.8)	28.9±8.9 (7.6)	34.0±5.9 (8.8)
$\beta$ -carotene	3.1±3.1 (0.8)	ND	ND	38.0±18.7(10.0)	48.0±14.0 (12.4)
Carotenoids	Strains (120 h of cultivation)				
	UCD 67-385	385-FPS <sup>(+/+, +1)</sup>	385-crtE <sup>(+/+, +1)</sup>	385-FPS <sup>(+/-)</sup>	385-crtE <sup>(+/-)</sup>
<b>Total</b>	<b>436.4±11.5(100)</b>	<b>514.9±4.1 (100)</b>	<b>559.1±30.3 (100)</b>	<b>437.5±26.6 (100)</b>	<b>440.3±8.82 (100)</b>
Astaxanthin	366.7±22.2 (84.0)	466.6±17.6 (90.6)	500.4±18.7 (89.5)	237.0±14.6 (54.2)	241.6±15.3 (54.9)
Phoenicoxanthin	45.5±10.8 (10.4)	36.4±10.3 (7.1)	46.1±10.6 (8.2)	80.2±4.1 (18.3)	74.3±0.3 (16.9)
Cantaxanthin	7.2±2.7 (1.6)	4.9±2.6 (1.0)	4.0±2.6 (0.7)	16.3±1.6 (3.7)	13.7±1.4 (3.1)
OH-echinenone	6.0±0.9 (1.4)	0.9±0.0 (0.2)	3.4±0.9 (0.6)	28.3±2.2 (6.5)	39.1±4.2 (8.9)
Echinenone	1.2±0.7 (0.3)	1.7±0.0 (0.3)	1.5±1.5 (0.3)	32.4±4.4 (7.4)	31.0±3.9 (7.0)
$\beta$ -carotene	5.2±0.1 (1.2)	1.0±0.0 (0.2)	2.1±2.1 (0.4)	41.3±6.7 (9.4)	40.7±6.8 (9.2)

Table shows the mean values  $\pm$  standard error of the mean of the results of three independent cultures. Percentage relative to total carotenoids is indicated in parentheses.

ND: Not detected.

doi:10.1371/journal.pone.0096626.t005

significantly different from the wild-type strain (Student's *t* test,  $p < 0.01$ ), but the composition was altered, mainly by an increase of beta-carotene, echinenone, OH-echinenone, cantaxanthin and phoenicoxanthin at the expense of the astaxanthin fraction.

As mentioned above, the fundamental phenotypic differences between the five strains analyzed in this work can most likely be explained by carbon flux distribution. Thus, the *FPS* and *crtE* over-expressing strains produce more of the carotenogenic pathway precursors, such as FPP and GGPP, while their production should be reduced in the heterozygous mutants. In *X. dendrorhous*, carotenogenesis is induced when glucose in the medium is depleted [25,45,46], which occurs close to the stationary phase of growth. Thus, carotenogenesis begins when cultures stop growing and the carbon flux is directed towards carotenoid biosynthesis. However, the *FPS* and *crtE* over-expressing strains might provide an excess of substrate, which might favor an early start for carotenogenesis. This result contrasts with the heterozygous *FPS* and *crtE* mutant strains, in which the growth is not altered (Fig. S5) and the limited carotenogenic substrates may be directed towards biomass formation, thus delaying carotenogenesis (Fig. 3).

Conversely, the altered carotenoid composition in the heterozygous *FPS* and *crtE* mutants may support the hypothesis of the formation of a carotenogenic complex in *X. dendrorhous* [47]. Under this hypothesis, a varying level of one of the protein components of the complex might affect the sequence of the reactions, thus affecting the end products that are formed [47]. In this sense, the carotenogenic complex assembly may possibly be driven, at least in part, by the availability of carotenogenic substrates. Then, under limited substrate concentrations (this would be the case of the heterozygous *FPS* and *crtE* mutants), an incomplete carotenogenic complex might be assembled, favoring the formation of

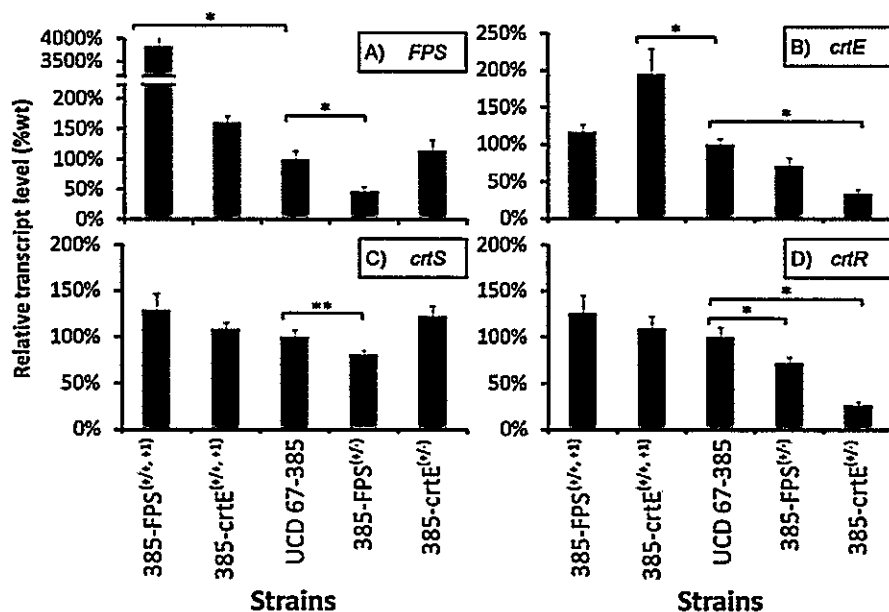
intermediary carotenoids other than astaxanthin. This would not be the case in the *FPS* and *crtE* over-expressing strains, in which a higher amount of carotenogenic substrates might favor an earlier assembly of a carotenogenic complex, leading to an earlier and a higher carotenoid production.

Finally, in contrast to what we expected, no significant differences regarding the ergosterol production among the *X. dendrorhous* transformants and the wild-type parental strain were observed. However, after 120 h of cultivation, there was a small reduction of the ergosterol content in the wild-type strain, which was only statistically significant when compared with the strain 385-crtE<sup>(+/+, +1)</sup> that had an ergosterol content increment (about 36% more).

#### *FPS* and *crtE* relative transcript levels and prenyl transferase activity in *X. dendrorhous* deletion and over-expressing transformants

To assess whether the decrease or increase of the *FPS* and *crtE* gene dose effectively changes mRNA levels, RT-qPCR analyses were performed for wild-type, heterozygous and over-expressing strains grown under the same conditions. Total RNA was extracted after 72 h of culture to determine the relative *FPS* and *crtE* transcript levels, which were normalized to the transcript levels of the actin gene [25]. The RT-qPCR analyses revealed that the relative transcript levels of the *FPS* gene in the 385-FPS<sup>(+/+, +1)</sup> strain was significantly increased with respect to the wild-type and it was reduced to about half of the wild-type value under the heterozygous condition. However, the relative transcript levels of the *crtE* gene in the 385-crtE<sup>(+/+, +1)</sup> strain was slightly increased and it was decreased in the 385-crtE<sup>(+/-)</sup> strain (Fig. 4).

Unlike other astaxanthin-producing organisms, the synthesis of astaxanthin from  $\beta$ -carotene in *X. dendrorhous* is catalyzed by a



**Figure 4. Transcript level changes in the over-expressing and deletion mutant strains versus the parental wild-type strain.** The *FPS* (A), *crtE* (B), *crtS* (C) and *crtR* (D) genes expression in transformant and wild-type strains was determined by RT-qPCR and normalized to the actin gene expression after 72 h of cultivation. The respective gene transcript level in the control (wild-type strain) was considered to be 100%. Values are the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of three independent experiments. (\* $p \leq 0,01$ , \*\* $p \leq 0,05$ ; Student's t test). doi:10.1371/journal.pone.0096626.g004

cytochrome P450 system [48] composed of the cytochrome P450 enzyme (astaxanthin synthase, encoded by the *crtS* gene [49,50]) and the cytochrome P450 reductase (CPR, encoded by the *crtR* gene [44]). Given that carotenoid composition in both heterozygous mutant strains, 385-FPS<sup>(+/-)</sup> and 385-crtE<sup>(+/-)</sup>, was different with respect to the wild-type strain, mainly by the reduction of the astaxanthin fraction and an increase of intermediary carotenoids between  $\beta$ -carotene and astaxanthin, the expression of the genes involved at this step, was analyzed (Fig. 4). The relative *crtS* transcript levels showed only a slight reduction in the 385-FPS<sup>(+/-)</sup> strain. However, the relative *crtR* transcript levels were significantly reduced in both heterozygous strains, while the *FPS* and *crtE* over-expressing strains showed no significant changes. Previous studies have shown that mutation of one of the *crtR* alleles in the diploid UCD 67–385 strain affects the carotenoid composition, decreasing the astaxanthin fraction in favor of  $\beta$ -carotene and other intermediary carotenoids [44]. Thus, our results suggest that the relative *crtR* transcript levels reduction in strains 385-FPS<sup>(+/-)</sup> and 385-crtE<sup>(+/-)</sup> could also be responsible for their altered phenotypes. Considering the vast number of reactions in which CPR enzymes are involved, the expression and activity regulation of CPR is generally a complex process that involves several mechanisms [51] that act at different levels. The mechanism by which the *crtE* and *FPS* gene deletions affect the *crtR* transcript levels requires further investigation.

Finally, prenyl transferase activities were determined in soluble protein extracts from the five analyzed *X. dendrorhous* strains, which were obtained after 72 h of cultivation under the conditions described in Materials and Methods (Table 4). Prenyl transferase activity, mainly FPP-synthase, was increased by 85% in the *FPS* over-expressing strain while prenyl transferase activity, measured with FPP, remained unchanged compared to the wild-type strain UCD 67-385. Conversely, the prenyl transferase activity with FPP was increased in 144% in the *crtE* over-expressing mutant, while

the activity measured with DMAPP remained unchanged. However, C<sub>20</sub> <sup>14</sup>C-products are a minor fraction in all cases. Also, C<sub>10</sub> and C<sub>15</sub> <sup>14</sup>C-products can be formed in the presence of FPP as a consequence of IPP isomerase activity that achieves the isomerization of IPP to DMAPP. In enzymatic assays with UCD 67–385 protein extracts and only including IPP as substrate, C<sub>10</sub>, C<sub>15</sub> and C<sub>20</sub> were obtained, which evidences IPP isomerase activity in these extracts. However, this endogenous IPP isomerase activity would only affect the enzymatic assays including FPP as substrate, since no DMAPP is added to the assay. On the other hand, the enzymatic assays including DMAPP as substrate, should not be affected as substrates were used at saturated concentrations, so the IPP isomerase activity would be insignificant.

The prenyl transferase activity in heterozygous strain extracts using DMAPP or FPP as a substrate showed no significant differences compared to the wild-type strain (Table 4). Probably, the methodology that we used might not be sensitive enough to detect variations in the prenyl transferase activity in the protein extracts from the strains that we assayed. Also, a transcript level reduction, which we observed for the respective gene in the heterozygous strains, does not necessarily lead to a reduction of the enzymatic activity with the same magnitude.

The results reported here demonstrate that in *X. dendrorhous*, two prenyl transferases act sequentially to synthesize GGPP from DMAPP and IPP precursors: an FPP-synthase (encoded by *FPS*) that produces FPP and an GGPP-synthase (encoded by *crtE*) that transforms the C<sub>15</sub> prenyl pyrophosphate into GGPP. The accumulation of <sup>14</sup>C-FPP (detected as C<sub>15</sub> alcohol in the allylic fraction) in the above assays indicates that the reaction catalyzed by the *crtE* gene product would be rate-limiting in the biosynthetic pathway, which thus represents a possible target for astaxanthin production improvement. Considering that the DNA assembler methodology, which allows integration in the genome of several DNA fragments during one transformation event, was proven to

be effective and successful in *X. dendrorhous* [52], *crE* could be simultaneously over-expressed together with other rate-limiting astaxanthin production genes to favor the synthesis of carotenoids in *X. dendrorhous*.

## Conclusions

In *X. dendrorhous*, GGPP is synthesized from IPP and DMAPP by two prenyl transferase enzymes that act sequentially. In the first stage, an FPP-synthase (encoded by the *FPS* gene) produces FPP in two steps: GPP is first produced by the condensation of IPP and DMAPP, and the addition of a second IPP molecule to GPP then produces FPP. In the second stage, a GGPP-synthase (encoded by the *crE* gene) produces GGPP by adding a third molecule of IPP to FPP. Both of the genes described in this work, *FPS* and *crE*, represent good target candidates to enhance the astaxanthin production in *X. dendrorhous* by metabolic engineering approaches.

## Supporting Information

**Figure S1 Plasmids constructed in this work.** In each plasmid illustration, the relevant features such as endonuclease recognition sites and primer binding sites (thin arrows) are shown. Some elements of the original plasmid (pBluescript SK-) were kept in the figure and are shown in gray. The pBluescript SK- skeleton was kept as light gray. Plasmids: A) pXd-gFPS harbors a 2.5 kb DNA fragment carrying the *X. dendrorhous* *FPS* gene. Green, thick arrows represent the nine exons of the *FPS* gene. B) pXd-gFPS::hph was constructed from pXd-gFPS, which was digested with *EcoRV* and *BglII* to release a 2.0 kb DNA fragment that contained the *FPS* gene that was replaced by a hygromycin B resistance cassette (HygR, represented by an ochre, thick arrow). For transformation purposes, pXd-gFPS::hph was linearized with *AvaI*. C) pXd-gcrE harbors a 3.3 kb DNA fragment carrying the *X. dendrorhous* *crE* gene. Light blue, thick arrows represent the nine exons of the *crE* gene. D) pXd-gcrE::hph was constructed from pXd-gcrE, which was digested with *EcoRV* to release a 2.0 kb DNA fragment that contained the *crE* gene that was replaced by a hygromycin B resistance cassette (HygR, represented by an ochre, thick arrow). For transformation purposes, pXd-gcrE::hph was linearized with *KpnI* and *SmaI*. E) The pXdVexp2 expression vector was constructed by cloning an *X. dendrorhous* non-coding genomic region (Int, represented by a light orange, thick arrow) to target the integration into the *X. dendrorhous* genome. The Int region was interrupted by inserting the *X. dendrorhous* ubiquitin promoter (Ubi-P, represented by a light purple, thick arrow) and the GPD terminator (GPDt, represented by a dark purple, thick arrow), with a *HpaI* site between them to insert the gene being expressed. The hygromycin B cassette for transformant selection (HygR, represented by an ochre, thick arrow) was also included. F) The insertion of *FPS* or *crE* cDNA at the *HpaI* site of pXdVexp2, yielded pXdVexp2-cFPS and pXdVexp2-ccrE, respectively. (TIF)

**Figure S2 Representative chromatogram from prenyl product analysis by TLC.** The prenyl alcohol products that

were obtained in the prenyl transferase activity assays were resolved by TLC. The radioactivity detected on each of the TLC-plate fragments is displayed in each graph. The peaks corresponding to the C<sub>10</sub>, C<sub>15</sub> and C<sub>20</sub> products are indicated. Graphs correspond to the following enzymatic assay: A) protein extracts from wild-type *X. dendrorhous* strain with DMAPP as additional substrate, B) protein extracts from *E. coli* BL21+FPS strain with DMAPP as additional substrate, C) protein extracts from *E. coli* BL21+crE strain with FPP as additional substrate and D) a mixture of protein extracts from *E. coli* strains BL21+FPS and BL21+crE with DMAPP as additional substrate. (TIF)

**Figure S3 SDS-PAGE analysis of recombinant *E. coli* protein extracts.** The SDS-PAGE analysis of the protein extracts from induced (+) or not induced (-) recombinant *E. coli* cultures: BL21+pET28 (negative control), BL21+crE and BL21+FPS is shown. Arrows indicate the recombinant protein band. M: Molecular marker PageRuler™ Thermos (170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15, 10 kDa). (TIF)

**Figure S4 PCR-based analysis of the *FPS* and *crE* gene deletion in *X. dendrorhous*.** PCR analyses to confirm the insertion of the Hygromycin B resistance cassette and the replacement of the target gene of the parental wild-type UCD 67-385 strain (wt). The resulting heterozygous strains (+/-) are 385-FPS<sup>(+/-)</sup> (upper gel photographs) and 385-crE<sup>(+/-)</sup> (lower gel photographs), including the PCR negative control without DNA (-). Between the upper and lower gel photographs, a scheme is included to represent the primer sets (shown in arrows) that were used, the expected PCR-product size and the target DNA. The primers used in the analyses depended on the gene deletion that was studied (*crE* or *FPS* gene) and were: 1: FPSnewF or crE\_CDS\_F1, 2: FPSnewR or crE\_CDS\_R1, 3: FPS\_Out\_F7 or crE\_Out\_F1, 4: TEF Antisense, 5: GPDT Sec F and 6: FPS\_Out\_R1 or crER2 (Table S1). The scheme shading is in accordance with Figure S1. M: Molecular marker: lambda DNA digested with *HindIII* (23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0 and 0.6 kb). (TIF)

**Figure S5 Growth curves of the *X. dendrorhous* strains analyzed in this work.** The yeast strains were grown in YM rich medium at 22°C with constant agitation. Growth curve values correspond to the mean ± standard error of the mean from three independent cultures. (TIF)

**Table S1 Primers designed and used in this work.** (DOCX)

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JA VC. Performed the experiments: IR MN DS. Analyzed the data: JA VC MCR MB. Contributed reagents/materials/analysis tools: JA VC MCR MB. Wrote the paper: JA VC.

## References

- Misawa N (2011) Pathway engineering for functional isoprenoids. *Current Opinion in Biotechnology* 22: 627–633.
- Sacchetti JC, Poulter CD (1997) Creating isoprenoid diversity. *Science* 277: 1788–1789.
- Liang P, Ko T, Wang AH (2002) Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *European Journal of Biochemistry* 269: 3339–3354.
- Lange BM, Rujan T, Martin W, Croteau R (2000) Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13172–13177.
- Lee P, Schmidt-Dammert C (2002) Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 1–11.
- Lichtenthaler HK (2000) Non-mevalonate isoprenoid biosynthesis: enzymes, genes and inhibitors. *Biochemical Society Transactions* 28: 785–789.
- Ohnuma S, Suzuki M, Nishino T (1994) Archaeobacterial ether-linked lipid biosynthetic gene. Expression cloning, sequencing, and characterization of geranylgeranyl-diphosphate synthase. *Journal of Biological Chemistry* 269: 14792–14797.

8. Caplin BE, Hettich IA, Marshall MS (1994) Substrate characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* protein farnesyltransferase and type-I protein geranylgeranyltransferase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1205: 39–48.
9. Saito K, Fujisaki S, Nishino T (2007) Short-chain prenyl diphosphate synthase that condenses isopentenyl diphosphate with dimethylallyl diphosphate in *ispA* null *Escherichia coli* strain lacking farnesyl diphosphate synthase. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 103: 575–577.
10. Takaichi S (2011) Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. *Marine Drugs* 9: 1101–1118.
11. Goodwin TW (1984) The Biochemistry of Carotenoids, vol. II. Animals, Chapman Hall, London
12. Gaziano JM, Hennekens CH (1993) The Role of Beta-Carotene in the Prevention of Cardiovascular Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 691: 148–155.
13. Schiedt K, Leuenberger FJ, Vecchi M, Glinz E (1985) Absorption, retention and metabolic transformations of carotenoids in rainbow trout, salmon and chicken. *Pure and Applied Chemistry* 57: 685–692.
14. Guerin M, Huntley ME, Olazola M (2003) *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology* 21: 210–216.
15. Andrewes AG, Phaff HJ, Starr MP (1976) Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast. *Phytochemistry* 15: 1003–1007.
16. Kajiwara S, Fraser PD, Kondo K, Misawa N (1997) Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* 324: 421.
17. Niklitschek M, Alcaïno J, Barahona S, Sepúlveda D, Lozano C et al. (2008) Genomic organization of the structural genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biological Research* 41: 93–108.
18. Visser H, Sandmann G, Verdoes JC (2005) Xanthophylls in fungi. editors. *Microbial Processes and Products*. Springer. pp. 257–272.
19. Breitenbach J, Visser H, Verdoes JC, van Ooyen AJJ, Sandmann G (2011) Engineering of geranylgeranyl pyrophosphate synthase levels and physiological conditions for enhanced carotenoid and astaxanthin synthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnology Letters* 33: 755–761.
20. Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Volume 1–3.
21. Cifuentes V, Hermosilla G, Martínez C, León R, Pincheira G, et al. (1997) Genetics and electrophoretic karyotyping of wild-type and astaxanthin mutant strains of *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek* 72: 111–117.
22. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156–159.
23. Lodato P, Alcaïno J, Barahona S, Retamales P, Jimenez A, et al. (2004) Study of the expression of carotenoid biosynthesis genes in wild-type and deregulated strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Ex.: *Phaffia rhodozyma*). *Biological Research* 37: 83–94.
24. Boyle JS, Lew AM (1995) An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends in Genetics* 11: 8.
25. Lodato P, Alcaïno J, Barahona S, Niklitschek M, Carmona M, et al. (2007) Expression of the carotenoid biosynthesis genes in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biological Research* 40: 73.
26. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>ΔΔCT Method. *Methods* 25: 402–408.
27. Kanehisa M, Goto S (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research* 28: 27–30.
28. Plochocka D, Karst F, Šveticzka E, Szkopieńska A (2000) The role of *ERG20* gene (encoding yeast farnesyl diphosphate synthase) mutation in long dolichol formation. *Molecular modeling of FPP synthase*. *Biochimie* 82: 733–738.
29. Jiang Y, Proteau P, Poulter D, Ferro-Novick S (1995) *BTS1* encodes a geranylgeranyl diphosphate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 270: 21793–21799.
30. Hoshino TO, K; Setoguchi Y (1999) DNA sequences encoding enzymes involved in production of isoprenoids. F. HOFFMANN-LA ROCHE AG European Patent Application: EP 0 955 363 A2.
31. Adrio JL, Veiga M (1995) Transformation of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnology Techniques* 9: 509–512.
32. Loto I, Gutiérrez MS, Barahona S, Sepúlveda D, Martínez-Moya P, et al. (2012) Enhancement of carotenoid production by disrupting the C22-sterol desaturase gene (*CYP61*) in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiology* 12: 235.
33. Fell JW, Blatt GM (1999) Separation of strains of the yeasts *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Phaffia rhodozyma* based on rDNA IGS and ITS sequence analysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 23: 677–681.
34. An G-H, Schuman DB, Johnson EA (1989) Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 116–124.
35. Shang F, Wen S, Wang X, Tan T (2006) Effect of nitrogen limitation on the ergosterol production by fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology* 122: 285–292.
36. Mekriekraai D, Sando T, Hirooka K, Sakdapianich J, Tanaka Y, et al. (2004) Cloning and characterization of farnesyl diphosphate synthase from the rubber-producing mushroom *Lactarius chrysorheus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 68: 2360–2368.
37. Koike-Takeshita A, Koyama T, Obata S, Ogura K (1995) Molecular cloning and nucleotide sequences of the genes for two essential proteins constituting a novel enzyme system for heptaprenyl diphosphate synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 270: 18396–18400.
38. Cañtera JLL, Kawasaki H, Seki T (2002) Farnesyl diphosphate synthase gene of three phototrophic bacteria and its use as a phylogenetic marker. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 1953–1960.
39. Ohnuma Si HK, Ohto C, Nishino T (1997) Conversion from Archaeal Geranylgeranyl Diphosphate Synthase to Farnesyl Diphosphate Synthase. Two amino acids before the first aspartate-rich motif solely determine eukaryotic farnesyl diphosphate synthase activity. *Journal of Biological Chemistry* 272: 5192–5198.
40. Sitthithaworn W, Kojima N, Viroochatapan E, Suh D-Y, Iwanami N, et al. (2001) Geranylgeranyl diphosphate synthase from *Strepptaria dulcis* and *Croton sublyratus*. Plastid localization and conversion to a farnesyl diphosphate synthase by mutagenesis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 49: 197–202.
41. Gao Y, Honzatko RB, Peters RJ (2012) Terpenoid synthase structures: a so far incomplete view of complex catalysis. *Natural Product Reports* 29: 1153–1175.
42. Hermosilla G, Martínez C, Retamales P, León R, Cifuentes V (2003) Genetic determination of ploidy level in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Antonie van Leeuwenhoek* 84: 279–287.
43. Niklitschek M, Baeza M, Fernández-Lobato M, Cifuentes V (2012) Generation of astaxanthin mutants in *Xanthophyllomyces dendrorhous* using a Double Recombination Method based on Hygromycin Resistance. editors. *Microbial Carotenoids From Fungi*. Springer. pp. 219–234.
44. Alcaïno J, Barahona S, Carmona M, Lozano C, Marcoleta A, et al. (2008) Cloning of the cytochrome p450 reductase (*crf8*) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiology* 8: 169.
45. Marcoleta A, Niklitschek M, Wozniak A, Lozano C, Alcaïno J, et al. (2011) Glucose and ethanol-dependent transcriptional regulation of the astaxanthin biosynthesis pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiology* 11: 1–11.
46. Wozniak A, Lozano C, Barahona S, Niklitschek M, Marcoleta A, et al. (2011) Differential carotenoid production and gene expression in *Xanthophyllomyces dendrorhous* grown in a nonfermentable carbon source. *FEMS Yeast Research* 11: 252–262.
47. Verdoes JC, Sandmann G, Visser H, Diaz M, van Mossel M, et al. (2003) Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3728–3738.
48. Alcaïno J, Fuentesalba M, Cabrera R, Baeza M, Cifuentes V (2012) Modeling the Interfacial Interactions between CrtS and CrtR from *Xanthophyllomyces dendrorhous*, a P450 System Involved in Astaxanthin Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 8640–8647.
49. Álvarez V, Rodríguez-Sáiz M, de la Fuente JL, Gudiña FJ, Godio RP, et al. (2006) The *crf5* gene of *Xanthophyllomyces dendrorhous* encodes a novel cytochrome-P450 hydroxylase involved in the conversion of β-carotene into astaxanthin and other xanthophylls. *Fungal Genetics and Biology* 43: 261–272.
50. Ojima K, Breitenbach J, Visser H, Setoguchi Y, Tabata K, et al. (2006) Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a β-carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. *Molecular Genetics and Genomics* 275: 148–158.
51. van den Brink JM, Punt PJ, van Gorcom RFM, van Den Hondel CAMJJ (2000) Regulation of expression of the *Aspergillus niger* benzoate para-hydroxylase cytochrome P450 system. *Molecular and General Genetics* 263: 601–609.
52. Contreras G, Barahona S, Rojas MC, Baeza M, Cifuentes V, et al. (2013) Increase in the astaxanthin synthase gene (*crf5*) dose by *in vivo* DNA fragment assembly in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Biotechnology* 13: 84.