

UCH-FC
MAG-B
N. 692
C. 1

ESTUDIO GENÉTICO MOLECULAR DEL GEN *crtE* INVOLUCRADO EN LA
RUTA DE BIOSÍNTESIS 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 Biológicas mención Microbiología

Facultad De Ciencias

Por

Mauricio Alejandro Niklitschek Oyarzún

Octubre, 2008.



Director de Tesis Dr.:

Víctor Hugo Cifuentes Guzmán

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

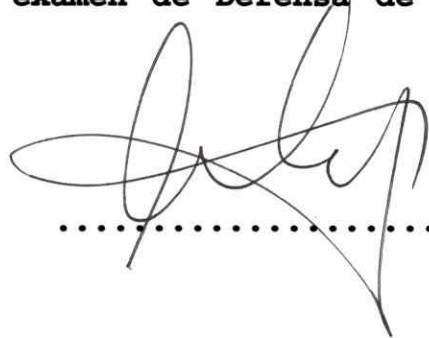
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato.

MAURICIO ALEJANDRO NIKLITSCHK OYARZÚN

Ha sido aprobado por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Microbiología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 29 de Julio de 2008.

Director de Tesis:

Dr. Víctor Cifuentes



.....


Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Margarita Carú



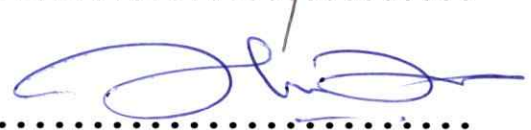
.....

Dr. Nicolás Guiliani



.....

Dr. Carlos Jerez



.....

A mi familia, que esto es nuestro.



Puertomontino de nacimiento e Ingeniero de profesión, desde siempre me he sentido atraído por el saber y conocer. La posibilidad de saciar esta inquietud de la mano del crear y descubrir, me llevó a profundizar mis estudios en el centro neurálgico de la ciencia nacional, la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Cursé parte del kínder en el colegio Ramón Ángel Jara de Los Muermos y continué con mis estudios básicos y medios en el colegio Jesuita San Francisco Javier de Puerto Montt. En el año 1999 ingresé a Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile donde me licencié 4 años después. Posteriormente, en el año 2007, continué mi formación académica con el programa de Magister en Ciencias Biológicas en esta misma universidad.

De la mano de valiosos profesores, entusiastas compañeros y familia incondicional, este trabajo se desarrolló continuando la investigación iniciada en mi memoria de tesis de pregrado y más que llegar a su fin, espero que sea una semilla más del largo e interminable camino que es el conocimiento.

“Toda la historia del progreso humano se puede reducir a la lucha de la ciencia contra la superstición.”
Gregorio Marañón

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, agradezco a mi papá Ubald y a mi mamá Toña por su esfuerzo, comprensión y apoyo. También agradezco a mis hermanos Karinne y Oscar, y a mis sobrinos Joseph y Camila por su cariño y apoyo a la distancia. Gracias a toda mi familia, por estar siempre conmigo.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio Salvador, Rafael, Carla, Jenny, Dony, Marisela, Marcelo, Andrés, Mario, Oriana, Pilar y Vicente por su amistad, apoyo y colaboración tanto dentro como fuera del laboratorio.

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

Gracias a toda mi familia, amigos y profesores.

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

Gracias.

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE MATERIAS.....	II
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN	10
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1. Cepas y plasmidios.....	28
2.2. Cultivo de microorganismos.....	28
2.2.1. Cultivo de <i>E. coli</i>	28
2.2.2. Cultivo de <i>X. dendrorhous</i>	28
2.3. Técnicas de biología molecular.....	28
2.3.1. Extracción de DNA genómico de <i>X. dendrorhous</i>	31
2.3.2. Extracción de RNA de <i>X. dendrorhous</i>	31
2.3.3. Extracción de DNA plasmidial.....	32
2.3.4. Electroforesis de DNA.....	32
2.3.5. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.....	33
2.3.6. Cuantificación de fragmentos de DNA.....	33
2.3.7. Digestiones de DNA con enzimas de restricción.....	34
2.3.8. Ligación de DNA.....	34
2.3.9. Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i>	34
2.3.10. Transformación de <i>E. coli</i> por electroporación.....	35

2.3.11. Preparación de células electrocompetentes de <i>X. dendrorhous</i>	35
2.3.12. Transformación de <i>X. dendrorhous</i> por electroporación.....	36
2.3.13. Diseño de partidores.....	36
2.3.14. Amplificación de DNA.....	36
2.3.15. Hibridación DNA-DNA.....	41
2.3.15.1. Preparación de las muestras.....	41
2.3.15.1.1. Tratamiento de las muestras.....	41
2.3.15.1.2. Montaje de la transferencia.....	42
2.3.15.1.3. Fijación del DNA a la membrana.....	42
2.3.15.2. Marcación de la sonda.....	42
2.3.15.3. Prehibridación.....	42
2.3.15.4. Hibridación.....	43
2.3.15.5. Lavados.....	43
2.4. Ensayos de complementación.....	43
2.4.1. Obtención de los clones de expresión.....	43
2.4.1.1. Obtención del gen de interés.....	43
2.4.1.2. Clonamiento en el vector de expresión.....	44
2.4.1.3. Análisis de los clones transformantes.....	44
2.4.2. Obtención de las cepas portadoras del clúster carotenogénico de <i>E. uredovora</i>	44
2.4.3. Complementación de la actividad GGPP sintasa.....	45
2.5. Extracción y análisis de pigmentos.....	45
2.5.1. Extracción de carotenoides.....	45
2.5.2. Cuantificación de pigmentos totales por espectrofotometría visible.....	46
2.5.3. Análisis de los pigmentos por HPLC.....	46
2.6. Análisis de secuencias.....	47
3. RESULTADOS.....	48
3.1. Búsqueda de los genes involucrados en la biosíntesis de GGPP a partir de IPP y DMAPP.....	49

3.1.1. Determinación de las enzimas involucradas en la síntesis de GGPP.	49
3.1.2. Búsqueda de la enzima farnesil difosfato sintasa de <i>X. dendrorhous</i>	51
3.1.3. Búsqueda de la enzima geranilgeranil difosfato sintasa.....	54
3.1.3.1. Determinación de la organización genómica del gen <i>crtE</i> en <i>X. dendrorhous</i>	56
3.1.3.2. Búsqueda del gen <i>crtE</i> de <i>X. dendrorhous</i> en la genoteca.	61
3.1.3.3. Ubicación del gen <i>crtE</i> en el plasmidio pXD-I10.	61
3.1.3.4. Análisis de restricción del plasmidio pXD-I10.....	61
3.1.3.5. Análisis de la secuencia del plasmidio pXD-I10.....	65
3.2. Clonamiento del cDNA del gen <i>crtE</i>	65
3.3. Obtención de mutantes del gen <i>crtE</i> de <i>X. dendrorhous</i>	68
3.3.1. Obtención del plasmidio de transformación.....	70
3.3.1.1. Preparación del DNA transformante.	70
3.3.2. Transformación de <i>X. dendrorhous</i>	72
3.3.2.1. Electrotransformación de <i>X. dendrorhous</i>	72
3.3.3. Análisis de pigmentos.	72
3.4. Determinación de la actividad GGPP sintasa en <i>E. coli</i>	76
3.4.1. Obtención de mutantes del gen <i>crtE</i> de <i>E. uredoavora</i>	78
3.4.2. Clonamiento del gen <i>crtE</i> de <i>X. dendrorhous</i> en un vector de expresión	78
3.4.3. Obtención de los clones para los ensayos de complementación.....	80
3.4.4. Análisis de pigmentos.	83
4. DISCUSIÓN.....	85
5. CONCLUSIONES.....	94
6. BIBLIOGRAFÍA.....	96
7. ANEXO	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo	29
Tabla 2. Plasmidios utilizados en este trabajo	30
Tabla 3. Partidores utilizados en este trabajo	37
Tabla 4. Comparación de las secuencias aminoacídicas de la enzima farnesil difosfato sintasa de hongos basidiomicetes	52
Tabla 5. Comparación de las secuencias aminoacídicas de la enzima geranilgeranil difosfato sintasa de hongos basidiomicetes	57
Tabla 6. Clones utilizados para los experimentos de complementación en <i>E. coli</i>	82
Tabla 7. Variaciones de secuencia del gen <i>crtE</i> de <i>X. dendrorhous</i>	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntesis y clasificación de los terpenos.....	16
Figura 2. Ruta de biosíntesis del IPP por la vía del ácido mevalónico.	18
Figura 3. Ruta de biosíntesis de astaxantina en <i>X. dendrorhous</i>	21
Figura 4. Biosíntesis de GGPP a partir de IPP y DMAPP.	25
Figura 5. Biosíntesis de GGPP a partir de IPP y DMAPP.	50
Figura 6. Comparación de secuencias de la enzima FPP sintasa de diferentes hongos.....	53
Figura 7. Verificación de la especificidad de los partidores del gen que codifica para la enzima FPP sintasa.	55
Figura 8. Análisis de la especificidad de los partidores del gen <i>crtE</i> de <i>X. dendrorhous</i>	58
Figura 9. Ubicación del gen <i>crtE</i> en el gDNA de <i>X. dendrorhous</i> digerido con diferentes enzimas de restricción.....	60
Figura 10. Búsqueda del gen <i>crtE</i> en la genoteca de DNA genómico de <i>X. dendrorhous</i> en <i>E. coli</i>	62
Figura 11. Determinación de la ubicación del gen <i>crtE</i> en el plasmidio pXD-I10.....	63
Figura 12. Mapa de restricción del plasmidio pXD-I10.....	64
Figura 13. Sub-clonado del gen <i>crtE</i>	66
Figura 14. Obtención del cDNA del gen <i>crtE</i>	67

Figura 15. Análisis de la región codificante del gen <i>crtE</i>	69
Figura 16. Inserción del módulo de resistencia a higromicina B en el locus <i>crtE</i>	71
Figura 17. Cepa transformante de <i>X. dendrorhous</i> resistente a higromicina B.	73
Figura 18. Cuantificación de pigmentos de las cepas de <i>X. dendrorhous</i>	74
Figura 19. Composición de pigmentos de las diferentes cepas.	75
Figura 20. Clúster carotenogénico de <i>E. uredovora</i>	77
Figura 21. Plasmidios portadores del clúster carotenogénico de <i>E. uredovora</i>	79
Figura 22. Plasmidios de expresión del gen <i>crtE</i>	81
Figura 23. Cuantificación del β -caroteno producido.	84
Figura 24. Análisis de la secuencia del gen <i>FPS</i> de <i>X. dendrorhous</i>	87
Figura 25. Análisis del dominio Trans_IPPS_HT de la enzima GGPP sintasa de <i>X. dendrorhous</i>	89

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
aá.	Aminoácidos
Amp	Ampicilina
D.O.	Densidad óptica
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FPP	Farnesil difosfato
gDNA	DNA genómico
GGPP	Geranilgeranil difosfato
GPP	Geranil difosfato
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
Hyg	Higromicina
IPP	Isopentenil difosfato
Kan	Kanamicina
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
NA	Número de acceso a la base de datos GenBank
pBS	Plasmidio pBlueScript SK
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pET-T	Plasmidio pET101/D-TOPO
ppm	Partes por millón (μg de pigmento/g de biomasa)
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto

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

RESUMEN

Los terpenos son una amplia y variada clase de compuestos hidrocarbonados cuya unidad base es una molécula de 5 carbonos denominada isopreno. La síntesis de los terpenos comienza con la condensación del isopentenil difosfato (IPP) con su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP) para formar el geranil difosfato (GPP). La elongación de la cadena hidrocarbonada se logra por la adición secuencial del IPP a los diferentes compuestos formados. La biosíntesis de los terpenos comienza en una etapa temprana con la biosíntesis del IPP, seguido de la elongación de la cadena hidrocarbonada hasta el diterpeno geranylgeranyl difosfato (GGPP) en la etapa intermedia. La síntesis de carotenoides corresponde a la etapa tardía de síntesis de terpenos. En esta etapa, se adicionan o remueven grupos metilos y/o átomos de oxígeno a los diferentes terpenos. Algunos terpenos tienen un alto potencial biotecnológico por ser moléculas biológicamente activas, destacando dentro del grupo de los tetraterpenos los pigmentos carotenoides. Estos pigmentos son utilizados en la industria química como colorantes y en la industria farmacéutica como antioxidantes.

La levadura basidiomicete *Xanthophyllomyces dendrorhous* sintetiza astaxantina como principal pigmento carotenoides, siendo utilizada en la industria acuícola como colorante para los salmones y en la industria farmacéutica como antioxidante. La producción industrial de astaxantina natural a partir de *X. dendrorhous* se ha visto limitada por la baja cantidad de pigmento producido por la cepa silvestre y el reducido conocimiento de su ruta de biosíntesis y de los factores que la regulan. Los estudios de la ruta de biosíntesis de la astaxantina en *X. dendrorhous* se han enfocado casi exclusivamente a la etapa tardía de la síntesis de los terpenos, correspondiente a

la síntesis desde el fitoeno a la astaxantina. Sin embargo, en otros organismos se ha observado que las etapas previas tienen un rol fundamental en la cantidad final de pigmento producido.

En el presente trabajo se estudió, desde el punto de vista genético-molecular, la etapa intermedia de biosíntesis de terpenos en *X. dendrorhous*, correspondiente a la biosíntesis de GGPP a partir del IPP y DMAPP. Para esto, se determinó mediante PCR la presencia en *X. dendrorhous* de los genes *crtE* y *FPS*, los cuales codificarían a las enzimas GGPP sintasa y FPP sintasa, respectivamente. Además, se ubicó por hibridación la posición relativa del gen *crtE* en un fragmento *Bam*HI de 11.429 pb en el genoma de *X. dendrorhous*, el cual fue clonado y secuenciado completamente. El análisis de las secuencias permitió definir el tamaño del marco abierto de lectura del gen *crtE* en 2.053 pb y que éste se encontraría potencialmente ligado a los genes *UBL* y *RPL19*. Adicionalmente se clonó, por RT-PCR, un fragmento de 1.131 pb correspondiente al cDNA del gen *crtE*, definiendo mediante la comparación entre las secuencias del cDNA y el gDNA la presencia de 9 exones y 8 intrones. Además, se demostró la actividad GGPP sintasa de la enzima codificada por el gen *crtE* de *X. dendrorhous* mediante ensayos de complementación heteróloga en una cepa de *Escherichia coli* portadora del clúster carotenogénico de *Erwinia uredovora* carente de la actividad GGPP sintasa. Finalmente, se obtuvieron cepas de *X. dendrorhous* heterocigotas para el gen *crtE*, que presentaron una disminución de un 42% de la producción total de pigmento, demostrando la importancia de la etapa intermedia de la síntesis de terpenos en la producción final de astaxantina.

ABSTRACT

The terpenes are a wide and varied class of hydrocarbonated compounds whose basic unit is a 5 C molecule called isoprene. The terpenes synthesis begins with the condensation of isopentenil diphosphate (IPP) with its isomer dimethylallyl diphosphate (DMAPP) to form geranyl diphosphate (GPP). The elongation of the hydrocarbonated chain is accomplished by the sequential addition of IPP to different compounds formed. In an early stage, terpenes biosynthesis begins with the biosynthesis of IPP, followed by the elongation of the hydrocarbonated chain until the diterpene geranylgeranyl diphosphate (GGPP) is formed in the intermediate stage. Carotenoids synthesis corresponds to the late stage. In this stage, modifications are carried out by adding or removing methyl groups and/or oxygen atoms on the different terpenes. Some terpenes have a high biotechnological potential since they are biologically active molecules. The carotenoid pigments are particularly important within this group. These pigments are used in the chemical industry as colorants and the pharmaceutical industry as antioxidants.

The basidiomycetous yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* synthesizes astaxanthin as its main carotenoid pigment, which it is used in the aquaculture industry as colorant for salmon and in the pharmaceutical industry as antioxidant. The industrial production of natural astaxanthin from *X. dendrorhous* has been limited due to the low quantity of pigment produced by the wild type strain and the reduced knowledge of its biosynthesis pathway and the factors that regulate it. The studies of the astaxanthin biosynthesis pathway in *X. dendrorhous* have been focused almost exclusively to the late stage of the synthesis of terpenes, corresponding to the synthesis of phytoene to

astaxanthin. However, in other organisms it has been observed that the previous stages have a fundamental role in the final amount of pigment produced.

In the present work, the intermediate stage of the biosynthesis of terpenes corresponding to the biosynthesis of GGPP from IPP and DMAPP in *X. dendrorhous* was studied from a molecular-genetic point of view. For this, were identified by PCR the presence of the *crtE* and *FPS* genes in *X. dendrorhous* which would encode the GGPP synthase and FPP synthase enzymes, respectively. Furthermore, the *crtE* gene is in an 11.429 bp *Bam*HI fragment and its localization in the yeast genome was determined by hybridization. The *crtE* gene was cloned and sequenced completely. The sequence analysis indicated that the *crtE* gene has a 2.053 ORF and it is potentially linked to the genes *UBL* and *RPL19*. Additionally, a 1.131 bp fragment corresponding to the cDNA of the *crtE* gene was cloned by RT-PCR defining by comparison between the cDNA and gDNA sequences the presence of 9 exons and 8 introns. Moreover, the GGPP synthase activity of the enzyme encoded by the *crtE* gene of *X. dendrorhous* was shown by heterologous complementation assays in an *Escherichia coli* strain that carries the carotenogenic cluster of *Erwinia uredovora* and lacks the GGPP synthase activity. Finally, heterozygous *X. dendrorhous* strains for the *crtE* gene were obtained. These showed a 42% decrease in total pigment production, showing the importance of the intermediate stage of the synthesis of terpenes in the final production of astaxanthin.



1. INTRODUCCIÓN

Los terpenos son una amplia y variada clase de productos naturales sintetizados a partir de la unión secuencial de una molécula de 5 átomos de carbono denominada isopreno (2-metil-1,3-butadieno). Dentro del grupo de los terpenos, se encuentran los terpenoides o isoprenoides, que son terpenos modificados químicamente a los cuales se les ha reacomodado o removido grupos metilos y/o añadido átomos de oxígeno a su esqueleto carbonado (Sacchetti y Poulter, 1997). Sin embargo, de manera general se utiliza el término terpeno para ambos tipos de compuestos.

La formación de los terpenos a partir de la unión del isopreno de forma 1-4 o "cabeza-cola" y 4-4 o "cabeza-cabeza", se denominó "*regla del isopreno*" (Ruzicka, 1953). Sin embargo, el isopreno por sí mismo no participa en la elongación de la cadena hidrocarbonada, sino su forma activada el isopentenil difosfato (IPP) y su isómero el dimetilalil difosfato (DMAPP).

Los terpenos, al ser derivados biosintéticos desde unidades de isopreno, tienen una fórmula molecular general $(C_5H_8)_n$, donde n corresponde al número de isoprenos constituyentes y dependiendo de esa cantidad, son clasificados en: hemiterpenos (n=1), monoterpenos (n=2), sesquiterpenos (n=3), diterpenos (n=4), triterpenos (n=6), tetraterpenos (n=8) y politerpenos (n>8) (figura 1).

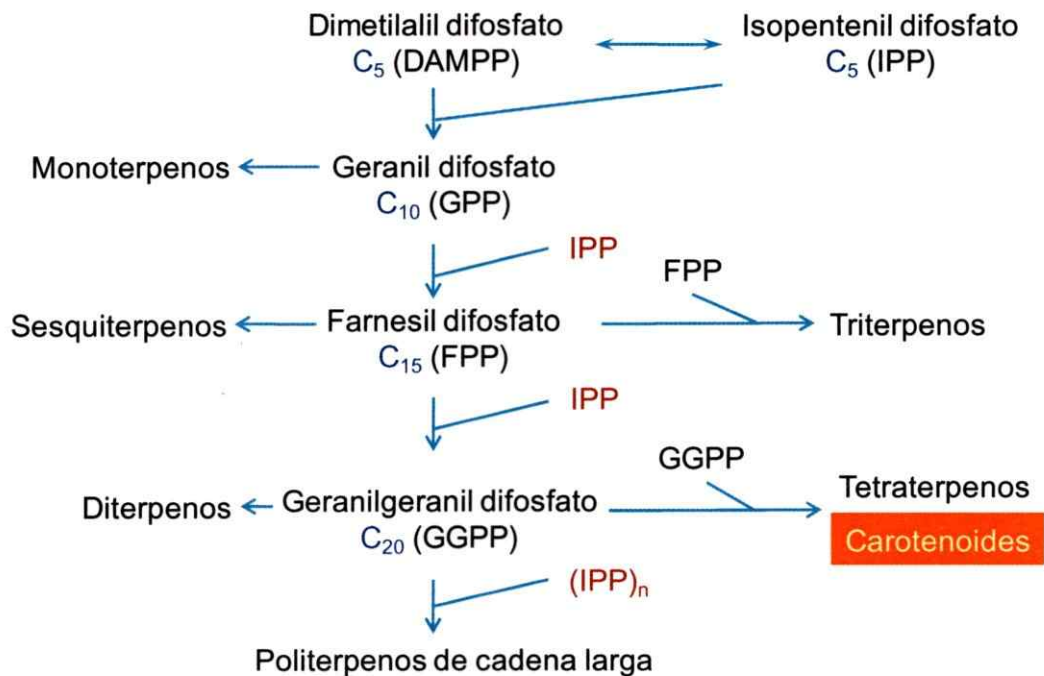


Figura 1. Síntesis y clasificación de los terpenos.

Síntesis de los diferentes terpenos por la adición secuencial del IPP a los diferentes sustratos. Se destacan los carotenoides como el grupo principal dentro de los tetraterpenos.

Si bien sus funciones son muy diversas, los terpenos están unificados en su origen biosintético común (McGarvey y Croteau, 1995). La biosíntesis de todos los terpenos a partir de metabolitos primarios puede simplificarse en 3 etapas:

1. Etapa temprana: etapa en la cual se sintetiza el precursor fundamental de todos los terpenos, el IPP.
2. Etapa intermedia: etapa en la cual se adiciona de forma secuencial el IPP, alargando el esqueleto carbonado de los diferentes terpenos.
3. Etapa tardía: etapa en la cual se realizan las modificaciones enzimáticas secundarias al esqueleto de carbono, reacomodando o removiendo grupos metilos y/o añadiendo átomos de oxígeno. Corresponde a la etapa de síntesis de los pigmentos carotenoides.

En la etapa temprana, se han descrito dos vías metabólicas para la biosíntesis del IPP, la vía del ácido mevalónico (MVA) y la vía de la xilulosa 5-fosfato o MEP/DOXP (no mevalónica) (Lange y col., 2000; Lee y Schmidt-Dannert, 2002). Ambas vías metabólicas son mutuamente excluyentes en la mayoría de los organismos, sin embargo, se ha observado la interacción entre ellas en plantas y en algunas especies de bacterias. En levaduras y hongos, la vía utilizada para la biosíntesis del IPP corresponde a la vía MVA (Tarshis y col., 1996) (figura 2) y junto al DMAPP, GPP, FPP y GGPP (etapa intermedia) son los responsables de la síntesis de todos los terpenos de cadena larga (Ogura y Koyama, 1998).

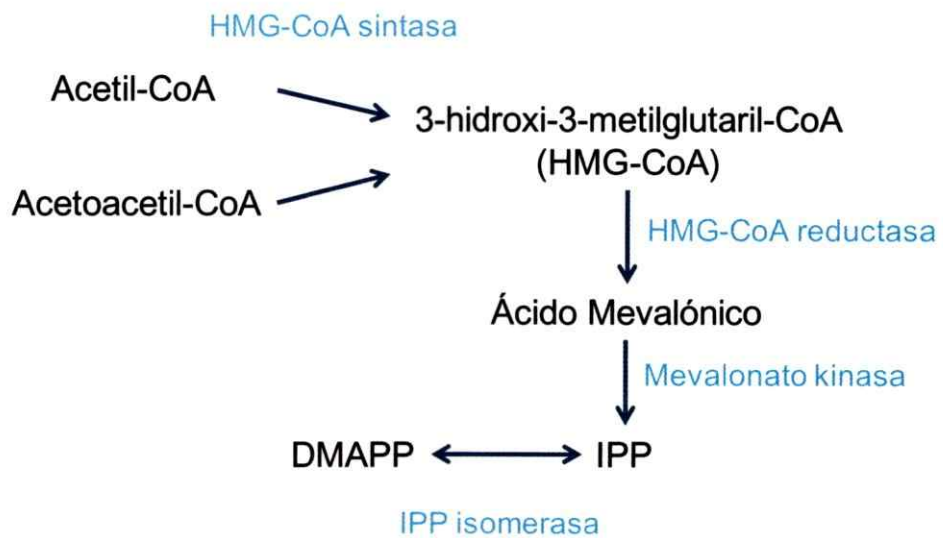


Figura 2. Ruta de biosíntesis del IPP por la vía del ácido mevalónico.

Se indican los compuestos intermediarios y las enzimas participantes en la ruta de biosíntesis del IPP a partir del Acetil-CoA y el Acetoacetil-CoA.

Un grupo de gran importancia dentro de los terpenos, específicamente los tetraterpenos, son los carotenoides. Éstos, son sintetizados a partir de la unión cabeza-cabeza de dos moléculas del diterpeno geranylgeranyl difosfato (C_{20}) para la formación del fitoeno (C_{40}) y la posterior modificación de éste. En los carotenoides, los átomos de carbono se encuentran ordenados formando cadenas poliénicas conjugadas y en algunas ocasiones presentan anillos de carbono en sus extremos. A los carotenoides que contienen átomos de oxígeno en su estructura se les denomina xantofilas y los restantes constituyen el grupo de los carotenos. Debido a la presencia de enlaces dobles conjugados, los carotenoides son compuestos coloreados, variando su color desde el amarillo pálido, pasando por anaranjado, hasta rojo oscuro (Armstrong, 1994; Britton, 1995).

La levadura basidiomicete *X. dendrorhous* destaca dentro de las levaduras por su capacidad de sintetizar pigmentos carotenoides, siendo el principal de ellos la astaxantina, pero produciendo además el fitoeno, el licopeno y el β -caroteno (Golubev, 1995; Hermosilla y col., 2003; Retamales y col., 2002). La astaxantina constituye entre el 83 - 87% del contenido total de pigmentos en la célula, generando un alto interés biotecnológico para su utilización en la industria acuícola como agente pigmentante (Canizares-Villanu y col., 1998) y farmacéutica como agente antioxidante (Higuera-Ciapara y col., 2006).

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

crtYB que codifica a una enzima bifuncional denominada fitoeno- β -caroteno sintasa, que tiene actividad fitoeno sintasa y licopeno ciclasa (Alcaño, 2002; Arrach y col., 2001; Verdoes y col., 1999b). La secuencia nucleotídica del gen que codifica a esta enzima tiene un tamaño de 2.386 pb y está interrumpido por 4 intrones.

El siguiente paso en la ruta de biosíntesis de astaxantina consiste en 4 desaturaciones sucesivas del fitoeno para dar licopeno, paso catalizado por la enzima fitoeno desaturasa. En *X. dendrorhous*, se ha aislado el gen *crtI* que codifica esta enzima y también su cDNA (Verdoes y col., 1999a). En esta levadura, la secuencia codificante del gen *crtI* tiene un tamaño de 2.827 pb y está interrumpida por 11 intrones (Johnson, 2003; Lodato y col., 2003; Lodato y col., 2004).

La ruta de biosíntesis continúa con la ciclación de los extremos del licopeno para dar β -caroteno, paso también catalizado por la enzima bifuncional fitoeno- β -caroteno sintasa. Finalmente, el β -caroteno es hidroxilado en las posiciones 3 y 3', y además se adicionan grupos ceto en las posiciones 4 y 4', dando lugar a la astaxantina. En *X. dendrorhous*, se ha reportado que ambas actividades estarían presentes en una enzima bifuncional codificada por el gen *crtS*, con un tamaño de 3.166 pb y que estaría interrumpido por 17 intrones (Alvarez y col., 2006; Carmona, 2007; Lodato y col., 2007; Miura y col., 1998). Sin embargo, este último paso no ha sido confirmado ya que se ha propuesto la necesidad de otra(s) enzima(s) para su biosíntesis (figura 3) (Martin y col., 2008; Ojima y col., 2006; Verwaal y col., 2007).

A

↓ Fitoeno sintasa

Fitoeno

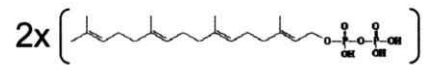
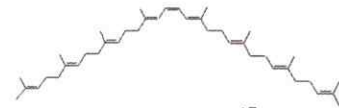
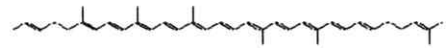
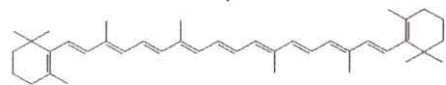
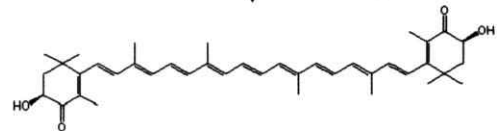
↓ Fitoeno desaturasa

Lycopeno

↓ β-caroteno sintasa

β-caroteno

↓ Astaxantina sintasa

Astaxantina**B**↓ *crtYB*↓ *crtI*↓ *crtYB*↓ *crtS* - ¿?**Figura 3. Ruta de biosíntesis de astaxantina en *X. dendrorhous*.**

A) Diferentes compuestos de la ruta de biosíntesis de astaxantina. Se indican las enzimas participantes en cada uno de los pasos. **B)** Estructura molecular de los compuestos formados y los genes de *X. dendrorhous* que codifican las enzimas participantes de la ruta. En el paso de β-caroteno a astaxantina se sugiere la posible presencia de otro(s) gen(es) aún no identificado(s).

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

La potencialidad de la utilización de *X. dendrorhous* en la industria acuícola (Nakano y col., 1999) y farmacéutica (Takimoto y col., 2007), ha motivado el estudio de la vía carotenogénica y de los genes que participan en ella para buscar potenciales alternativas de modificación y mejoras (Choi y col., 2007; Dominguez-Bocaneg y col., 2007; Echavarri-Erasun y Johnson, 2004). Sin embargo, la obtención de cepas sobreproductoras de astaxantina mediante la modificación específica de los genes participantes en la ruta de biosíntesis de ésta, no ha tenido los resultados esperados (Santopietro y Kula, 1998).

Los experimentos realizados por Verdoes (Verdoes y col., 2003), en donde se aumentó el número de copia de los genes *crtYB* (fitoeno- β -caroteno sintasa) y *crtI* (fitoeno desaturasa), permitieron obtener cepas transformantes que presentaban diferencias en su pigmentación en comparación con la cepa silvestre. Sin embargo, los análisis de estas cepas transformantes indicaron que las diferencias se debían principalmente a una modificación en la composición de los pigmentos intermediarios,

pero no a un aumento significativo en la cantidad final de astaxantina producida (An y col., 1999; Visser y col., 2003).

Alternativamente, la aplicación de técnicas tradicionales para el mejoramiento de las cepas silvestres de *X. dendrorhous*, han permitido obtener cepas sobreproductoras de pigmentos (Johnson y col., 1978). Sin embargo, las cepas obtenidas han presentado limitaciones para desarrollar procesos productivos industriales. La mutación al azar ha generado efectos no deseados en las cepas obtenidas, como inestabilidad genética, falta de reproducibilidad en fermentaciones industriales y una menor producción de biomasa de las cepas sobreproductoras en comparación con las cepas silvestres (Fang y Cheng, 1992; Lewis y col., 1990).

Debido a que la biosíntesis de astaxantina en *X. dendrorhous* corresponde a la etapa tardía de biosíntesis de terpenos, la cantidad final de este carotenoide dependerá de los terpenos intermediarios producidos en las etapas temprana e intermedia (Barkovich y Liao, 2001; Chia-Wei Wang, 1999; Dong y col., 2006; Ni y col., 2007). En este sentido, para el caso de la etapa temprana de biosíntesis de terpenos, se ha observado que la adición de ácido mevalónico a un cultivo de *X. dendrorhous* aumenta el contenido celular de astaxantina (Calo y col., 1995). Sin embargo, los altos costos de este sustrato hacen inviable su utilización a nivel industrial. También, se ha observado que el efecto inductor de la carotenogénesis mediado por el etanol en *X. dendrorhous* está estrechamente ligado a un aumento de la actividad HMG-CoA reductasa (etapa temprana) en la levadura (Gu y col., 1997). De manera similar, en el hongo *Neurospora crassa* se ha aumentado el número de copias del gen que codifica para la enzima HMG-CoA reductasa, observándose un aumento en los niveles

celulares de IPP, traduciéndose en un aumento de la cantidad de pigmentos producidos (Wang y Keasling, 2002). Estos resultados indican la gran importancia que tiene la etapa temprana de síntesis de terpenos en la biosíntesis de carotenoides (Kim y col., 2005; Martin y col., 2003).

En el caso de la etapa intermedia de biosíntesis de terpenos, no hay muchos estudios de ésta en *X. dendrorhous*. Sin embargo, en *N. crassa* se ha observado que un aumento en el número de copias del gen que codifica para enzima geranylgeranyl difosfato sintasa reduce la cantidad de terpenos de cadena más corta, principalmente triterpenos, aumentando la cantidad de terpenos de cadena más larga, principalmente los carotenoides (Carattoli y col., 1991; Narita y col., 2001).

Los estudios de la etapa intermedia de biosíntesis de terpenos en otros organismos (bacterias, hongos y plantas), específicamente la síntesis del GGPP a partir del DMAPP e IPP, distinguen dos sistemas dependiendo de la cantidad de enzimas que participan (Liang y col., 2002). Por un lado, se encuentra un sistema en el que participa una sola enzima que cataliza la adición secuencial de 3 moléculas de IPP al DMAPP para la síntesis del GGPP (Ohnuma y col., 1994) y por otro lado, se encuentra un sistema compuesto por 2 enzimas, una con actividad farnesil difosfato sintasa que cataliza la adición de 2 moléculas de IPP al DMAPP para la formación del FPP y otra enzima que utiliza el FPP como sustrato, adicionándole una molécula de IPP para la síntesis del GGPP (figura 4) (Okada y col., 2000; Ye y col., 2007).

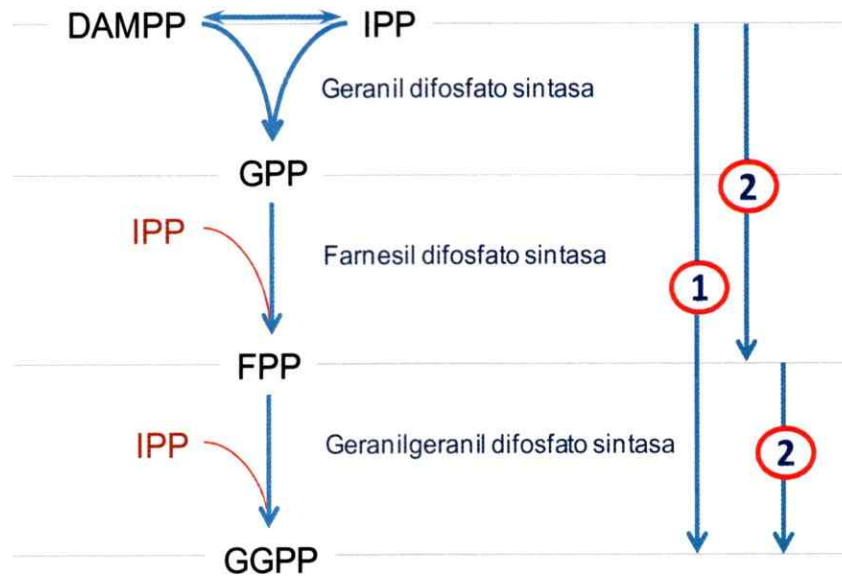


Figura 4. Biosíntesis de GGPP a partir de IPP y DMAPP.

Se esquematiza la síntesis de GGPP a partir del IPP y DMAPP. Esta se puede realizar de manera directa por la participación de una enzima con actividad GGPP sintasa que utiliza como sustratos el IPP y el DMAPP (1), o en 2 pasos por la participación de 2 enzimas, una con actividad FPP sintasa que utiliza como sustratos el IPP y el DMAPP para generar FPP y la otra con actividad GGPP sintasa que utiliza como sustratos el IPP y el FPP (2).

En *X. dendrorhous* no se sabe cuál de las 2 alternativas está presente, pero para el caso de la enzima geranylgeranyl difosfato sintasa que está presente en ambos sistemas, se ha propuesto que estaría potencialmente codificada en un gen denominado *crtE*. Sin embargo, no se ha demostrado la presencia de este potencial gen ni la participación de otros genes requeridos en la etapa intermedia de biosíntesis de terpenos en esta levadura.

Por este motivo, el objetivo general de esta tesis es: estudiar a nivel genético-molecular la estructura y función del gen *crtE* que codifica a la enzima geranylgeranyl difosfato sintasa involucrada en la ruta de biosíntesis de astaxantina en *X. dendrorhous*. Para esto se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la presencia del gen *crtE* y de otros genes potenciales involucrados en la ruta de biosíntesis del GGPP a partir del IPP y DMAPP.
- Determinar la posición relativa del gen *crtE* en el genoma de *X. dendrorhous*.
- Clonar y secuenciar el gen *crtE* a partir de DNA genómico de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*.
- Clonar el cDNA del gen *crtE* y determinar la composición exón-intrón de éste.
- Obtener cepas de *X. dendrorhous* mutantes para el gen *crtE* y determinar la cantidad y composición de los pigmentos producidos por éstas.
- Construir un sistema reportero de la actividad GGPP sintasa en *E. coli* y comprobar la funcionalidad del gen *crtE* de *X. dendrorhous* utilizando este sistema heterólogo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

I

2.1. Cepas y plasmidios.

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

2.2. Cultivo de microorganismos.

2.2.1. Cultivo de *E. coli*.

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

2.2.2. Cultivo de *X. dendrorhous*.

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

2.3. Técnicas de biología molecular.

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

Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo.

Cepas		
	Genotipo / Características relevantes	Fuente / Referencia
<i>E. coli</i> DH5 α	F ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA</i> ⁻ <i>argF</i>)U169 <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (<i>rk</i> ⁻ , <i>mk</i> ⁺) <i>phoA</i> <i>supE44</i> λ ⁻ <i>thi</i> ⁻ <i>gyrA96</i> <i>relA1</i>	GIBCO BRL.
<i>E. coli</i> TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen.
<i>E. coli</i> BL21- Gold(DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (<i>r_B</i> ⁻ <i>m_B</i> ⁻) <i>dcm</i> ⁺ <i>Tet</i> ^r <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA</i> <i>Hte</i>	Invitrogen.
DS1B	Cepa de <i>E. coli</i> BL21-Gold(DE3) portadora del plasmidio pDS1B. Cam ^R	Este trabajo.
DS1B Δ E	Cepa de <i>E. coli</i> BL21-Gold(DE3) portadora del plasmidio pDS1B Δ E. Cam ^R	Este trabajo.
<i>X. dendrorhous</i> UCD 67-385 o ATCC 24230	Silvestre (<i>crtE/crtE</i>). Hyg ^S	American Type Culture Collection. EE.UU.
<i>X. dendrorhous</i> T-EHA	Transformante heterocigoto gen <i>crtE</i> (<i>crtE/crtE</i> <i>::hph</i>), obtenido por transformación de la cepa silvestre con el plasmidio pCEH. Hyg ^R	Este trabajo.

Tabla 2. Plasmidios utilizados en este trabajo.

Plasmidios		
	Genotipo/Características relevantes	Fuente / Referencia
pBlueScript SK ⁻	Vector de clonamiento. Amp ^R	Stratagene
Ylp5	Vector usado para la construcción de la genoteca.	American Type Culture Collection. EE.UU.
pBAD33	Vector de clonamiento. Cam ^R . P15A.	American Type Culture Collection. EE.UU.
pET101/D-TOPO	Vector de expresión inducible. Amp ^R . ColE1.	Stratagene.
pMN-Hyg	pBlueScript que porta el módulo de resistencia a higromicina B de <i>X. dendrorhous</i> .	Niklitschek (2007).
pDS1B	pBAD33 que porta el clúster carotenogénico de <i>E. uredovora</i> .	Este trabajo.
pDS1BAE	Derivado de pDS1B con una delección del gen <i>crtE</i> .	Este trabajo.
pXD-I10	pBlueScript que porta el gen <i>crtE</i> de <i>X. dendrorhous</i> en un fragmento <i>Bam</i> HI de 11.429 pb.	Este trabajo.
pCE	pBlueScript que porta el gen <i>crtE</i> de <i>X. dendrorhous</i> en un fragmento <i>Eco</i> RI- <i>Dra</i> I de 3.312 pb.	Este trabajo.
pCEΔEV	Derivado de pCE que porta el gen <i>crtE</i> con una delección <i>Eco</i> RV.	Este trabajo.
pCEH	Derivado de pCEΔEV que porta el módulo de resistencia a higromicina B de <i>X. dendrorhous</i> .	Este trabajo.
pXD-mcrtE	pBlueScript que porta el cDNA del gen <i>crtE</i> .	Este trabajo.
pT-EXd	pET101/D-TOPO que porta el cDNA del gen <i>crtE</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	Este trabajo.
pT-EEu	pET101/D-TOPO que porta el gen <i>crtE</i> de <i>E. uredovora</i> .	Este trabajo.
pT-Ins	pET101/D-TOPO que porta un inserto control.	Este trabajo.

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

La extracción de gDNA se realizó mediante el uso de perlas de vidrio según Sambrook y cols. (2001), modificado para *X. dendrorhous*. El pellet celular proveniente de células colectadas desde placas de cultivo o de 30 ml de cultivo líquido, se resuspendió en 500 µl de amortiguador TE (25 mM Tris- HCl, 10 mM EDTA, pH 8) junto con un volumen de perlas de vidrio (Sigma, 425 - 600 µm) y se agitó en vórtex por 5 min. Luego, se agregaron 500 µl de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se homogenizó en vórtex por 2 min. A la fase acuosa se le agregó 500 µl de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se homogenizó en vórtex por 2 min. Se extrajo la fase acuosa y el DNA se precipitó con 1 volumen de etanol absoluto frío (-20 °C). El pellet se lavó con etanol 70% (v/v) y luego se secó a 37 °C. Posteriormente, el DNA se resuspendió en 100 µl de amortiguador TE-RNAsa (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, RNAsa A 30 µg/ml) e incubó a 37 °C por 1 h. El DNA se guardó a -20 °C hasta su utilización.

2.3.2. Extracción de RNA de *X. dendrorhous*

La extracción de RNA se realizó según el método de Chomczynski (Chomczynski y Sacchi, 1987), modificado por Lodato y cols. (2003) para *X. dendrorhous*. Al pellet celular proveniente de 40 ml de cultivo se le agregó 5 ml de solución de Chomczynski [solución D (tiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio 25mM, N-laurilsarcosina 0,5%, β-mercapto etanol 0,1M):acetato de sodio 2M pH 4:fenol ácido pH 4, 10:1:10] junto con 3 ml de perlas de vidrio (Sigma, 425 - 600 µm) y se agitó en vórtex por 5 min, incubándose posteriormente durante 10 min a temperatura ambiente. Se agregó 1 ml de cloroformo y se incubó a temperatura

ambiente por 5 min. Se centrifugó a 12.100 x g por 20 min en frío y la fase acuosa se transfirió a un tubo Eppendorf. Se lavó con 2,5 ml de fenol:cloroformo (1:1), se centrifugó a 12.100 x g por 15 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf. Se agregó 1 volumen de isopropanol y se incubó a 20° C por una hora. Posteriormente, se centrifugó a 12.100 x g durante 10 min a 4° C y el precipitado de RNA fue lavado con etanol al 75% y resuspendido en agua tratada con DEPC. Finalmente, la concentración y la calidad de RNA fueron determinadas por espectrofotometría a 260 nm y por electroforesis en gel de agarosa desnaturante, respectivamente.

2.3.3. Extracción de DNA plasmidial.

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

2.3.4. Electroforesis de DNA.

Para visualizar los DNAs plasmidial y cromosomal o los productos de PCR, se realizó electroforesis en geles de agarosa, siendo posteriormente teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Los geles de agarosa se prepararon en amortiguador TAE 1X con una concentración de agarosa entre 0,7 y 3 % según el tamaño del DNA. Como

estándares de peso molecular se utilizaron λ *Hind*III (GIBCO BRL) y 100 bp DNA Ladder (Winkler o Fermentas).

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

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

2.3.6. Cuantificación de fragmentos de DNA.

La cuantificación de los fragmentos de DNA se realizó por comparación de la intensidad de las bandas de DNA en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, entre la muestra a cuantificar y un estándar de peso molecular de concentración conocida. Para esto, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0,7% y la fotografía de éste se analizó con el programa "Kodak® 1D Image Analysis Software" permitiendo obtener el tamaño de fragmento y su concentración.

2.3.7. Digestiones de DNA con enzimas de restricción.

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

2.3.8. Ligación de DNA.

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

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

Se inoculó 500 ml de medio LB con 5 ml de un cultivo de 12 h y se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar una D.O._{560nm} entre 0,5 - 0,8 (fase exponencial temprana-media). Todos los procedimientos siguientes se realizaron a 4 °C, manteniendo las soluciones y las células en hielo. Las células se colectaron centrifugando a 4.000 x g durante 15 min. El sobrenadante se removió y las células se lavaron dos veces con agua destilada estéril, el primer lavado con 500 ml y el segundo con 250 ml. Luego, las células se resuspendieron en 20 ml de glicerol 10 % (v/v), se centrifugaron y resuspendieron nuevamente en un volumen final de 2 a 3 ml de glicerol 10 % (v/v). Esta suspensión, con una concentración celular de aproximadamente 1×10^{10} células/ml, se fraccionó en alícuotas de 40 µl las cuales se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

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

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

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

La transformación de *X. dendrorhous* se basó en los protocolos descritos por Adrio (Adrio y col., 1995). Para ello, se inoculó 200 ml de medio YM con 1 - 2 ml de un cultivo de *X. dendrorhous* de 48 h. Se incubó con agitación (200 rpm) a 22 °C hasta alcanzar una D.O._{560nm} entre 4,5 - 5 (fase exponencial temprana-media). Las células se centrifugaron a 5.090 x g durante 5 min, se resuspendieron en 25 ml de amortiguador BD (50 mM amortiguador fosfato de potasio, pH 7, 25 mM ditioneitol [DTT]) e incubaron a 22 °C por 15 min. Las células se lavaron dos veces con 25 ml de amortiguador STM (270 mM sacarosa, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl₂) frío y se resuspendieron en 1 ml de amortiguador STM. Esta suspensión, con una concentración celular aproximada de 1x10⁹ células/ml, se fraccionó en alícuotas de 60 μ l que se utilizaron inmediatamente.

2.3.12. Transformación de *X. dendrorhous* por electroporación

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

2.3.13. Diseño de partidores.

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

2.3.14. Amplificación de DNA.

Las reacciones de PCR realizadas para el análisis de clones y partidores, se hicieron con la enzima DNA polimerasa *Taq*. En el caso que los productos de PCR se requiriesen para su posterior clonamiento, se utilizó la enzima DNA polimerasa *Pfu*. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl, que contenía amortiguador de PCR 1X pH 8,4 (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM), 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos, 1 µM de cada partidor, entre 10 y 100 ng de DNA molde y 1 U de DNA polimerasa. Para las reacciones de PCR se utilizó un termociclador Applied Biosystem 2720, con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineación de los partidores a 55 °C por 30 segundos y elongación a 72 °C

Tabla 3. Partidores utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia 5'→3'	DNA blanco y/o función.	Posición
Clonación			
mcrEEuF-TOPO	<u>CACCATGACGGTCTGCGCAAAA</u> AA	<i>crtE</i> <i>E. uredovora</i> con <u>adaptador TOPO</u>	1-20→
mcrEEuR	TTAACTGACGGCAGCGAGTT	<i>crtE</i> <i>E. uredovora</i>	←890-909
mcrEXdF-TOPO	<u>CACCATGGATTACGCGAACATC</u> CTC	cDNA <i>crtE</i> <i>X. dendrorhous</i> con <u>adaptador TOPO</u>	1-21→
mcrEXdR	TCACAGAGGGATATCGGCTAG	cDNA <i>crtE</i> <i>X. dendrorhous</i>	←1.111-1.131
Oligo(dT) ₁₈	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	Transcripción reversa.	-
Análisis de Clones			
mcrEF	ATGGATTACGCGAACATCCTC	ORF <i>crtE</i>	764-784→
mcrER	TCACAGAGGGATATCGGCTAG	ORF <i>crtE</i>	←2.796-2.816
PEF-F-EV	GATATCGGCTCATCAGCCGAC	Promotor <i>TEF-1α</i> directo.	1-21→
gpdT-R-EV	GATATCATGAGAGATGACGGAG ATG	Terminador <i>GPD</i> reverso.	←1.894-1.918
Secuenciación			
T3	ATTAACCCTCACTAAAG	Secuenciar Inserto de pBS	←774-790
T7	AATACGACTCACTATAG	Secuenciar Inserto de pBS	627-643→
FPSF	CATCGCCATTAACGACGC	Secuenciar <i>crtE</i>	1.690-1.707→
FPSR	CCAGGAGCACTTGTTGTC	Secuenciar <i>crtE</i>	←2.502-2.519
FPSF2	CTATGTCGATCTGCTAGAGC	Secuenciar <i>crtE</i>	1.766-1.785→

FPSR2	TCGAGCACATCATCCTGAAC	Secuenciar <i>crtE</i>	←2.325-2.344
CCF5	CATCCTCACAGCAATTCCAC	Secuenciar <i>crtE</i>	4.798-4.817→
CCR5	ACCCTGATAGAAACGGACAG	Secuenciar <i>crtE</i>	←6.857-6.876
crtE31	AGAAAAGGGATGGCAGTCTC	Secuenciar <i>crtE</i>	322-341→
crtE32	CAGTGAGAACGAGCAGTATG	Secuenciar <i>crtE</i>	928-947→
crtE71	TGATGAGAATGCCGCTGTTC	Secuenciar <i>crtE</i>	←11.002-11.021
crtE72	GTGCTTCCGAACATTCTGTC	Secuenciar <i>crtE</i>	←10.513-10.532
crtECR	TCACAGAGGGATATCGGCTAG	Secuenciar <i>crtE</i>	←6.816-6.836
crtED1	AGATCAAAGACAGTGCTTCAG	Secuenciar <i>crtE</i>	4.259-4.279→
crtED11	ACACAAATATCCCGTCTAAC	Secuenciar <i>crtE</i>	9.208-9.227→
crtED12	AAAGTCTCTCCGATCAGCTC	Secuenciar <i>crtE</i>	9.753-9.772→
crtED13	GACGTTCGAAGTACGAGATC	Secuenciar <i>crtE</i>	10.176-10.195→
crtED14	ATTACGATGCCTGGGTCCGA	Secuenciar <i>crtE</i>	2034-2.053→
crtED15	AACTCGGATAAGAGGACCAG	Secuenciar <i>crtE</i>	10.121-10.140→
crtED16	GACAGAATGTTCGGAAGCAC	Secuenciar <i>crtE</i>	10.513-10.532→
crtED17	AACCACACTTTCCTAGGAC	Secuenciar <i>crtE</i>	748-767→
crtED18	TTACTCAAACACTGGCTGGG	Secuenciar <i>crtE</i>	9.531-9.580→
crtED19	CTAGGAACCGAAAGGATAGC	Secuenciar <i>crtE</i>	8.861-8.880→
crtED2	GCATGCTACATACCGCTAGC	Secuenciar <i>crtE</i>	5.191-5.210→
crtED3	AGGGTTTGTGATGATTGG	Secuenciar <i>crtE</i>	6.902-6.921→
crtED4	GCCGAGTTGAAGAGGTTGG	Secuenciar <i>crtE</i>	8.317-8.335→
crtED5	ATGTGGAGGATTCATCGGTC	Secuenciar <i>crtE</i>	5.395-5.414→
crtED6	TCCACTCGATTCATGCCAAC	Secuenciar <i>crtE</i>	6.437-6.456→
crtED7	TCAGTACCATCGAATGGGTC	Secuenciar <i>crtE</i>	8.398-8.417→
crtED8	ATGAACGAACCATCGGAAGC	Secuenciar <i>crtE</i>	8.689-8.708→

crtED9	CAGGGATGACTATATGAACC	Secuenciar <i>crtE</i>	6.260-6.279→
crtER1	AAGCTGGACAAAGTCTCTAC	Secuenciar <i>crtE</i>	←6.211-6.230
crtER10	GTCAGCGATAGTGCATGATG	Secuenciar <i>crtE</i>	←3.233-3.252
crtER11	GAATATCTAATGTAGACGCG	Secuenciar <i>crtE</i>	←2.875-2.894
crtER12	TAATCGTTCTCGACGGACTC	Secuenciar <i>crtE</i>	←2.300-2.319
crtER13	GAGAGAGTACAAGAGTCAGC	Secuenciar <i>crtE</i>	←1.802-1.821
crtER14	AAGAACCAACTAACCAGCGG	Secuenciar <i>crtE</i>	←662-681
crtER15	CATCAAGGAGAGTACTCTCG	Secuenciar <i>crtE</i>	←1.932-1.951
crtER16	AGATGGATGAGTCCGAGTAG	Secuenciar <i>crtE</i>	←1.204-1.223
crtER2	CTGACCAAAGCACAATCGTTC	Secuenciar <i>crtE</i>	←7.861-7.881
crtER3	GAGGAGGGAAGTGATCATAG	Secuenciar <i>crtE</i>	←4.193-4.212
crtER4	ACTCCGTTCTGCTCCAAGC	Secuenciar <i>crtE</i>	←5.015-5.033
crtER5	TGACATGAGACCCTAGAGAG	Secuenciar <i>crtE</i>	←7.295-7.314
crtER6	TTGTTGTTGTTCCGGTCGACC	Secuenciar <i>crtE</i>	←3.920-3.939
crtER7	GGTAGTGATACGGTTCAAGG	Secuenciar <i>crtE</i>	←4.849-4.868
crtER8	AAGAAGGCAAGGTCGAAGAG	Secuenciar <i>crtE</i>	←3.820-3.839
crtER9	TCACTCACCTGAGCTACATC	Secuenciar <i>crtE</i>	←3.643-3.662
crtER91	CCTACTTTACCCTGTCTGAC	Secuenciar <i>crtE</i>	←8.478-8.497
gppu3	TTCGAAGAAATCTCGTGACTTG	Secuenciar <i>crtE</i>	7.056-7.077→
gppu3F	AACTCGACGGGTGCAATATAGC	Secuenciar <i>crtE</i>	7.629-7.650→
gpdR1	AGCATGCTACATACCGCTAG	Secuenciar <i>crtE</i>	5.190-5.209→
gpnu1	CTCATCGAGACTCGTCATCA	Secuenciar <i>crtE</i>	6.459-6.478→
gpnu1R2	AAGGTGTTGAGGACTTCCTGAG	Secuenciar <i>crtE</i>	←6.658-6.679
gppu3F1	ACTCTCGAATCCACAGAACG	Secuenciar <i>crtE</i>	8.082-8.101→
gprc1	GCCTGAGGACCGATGAATC	Secuenciar <i>crtE</i>	←5.403-5.421

gprc1r2	ATCCTATGTGTTCCGGATGAG	Secuenciar <i>crtE</i>	←4.765-4.785
gprc1r3	GACATGTATGAACAGTCTGG	Secuenciar <i>crtE</i>	←4.402-4.421
gpm1	ATCAAGTTGACAAGCTGGACA	Secuenciar <i>crtE</i>	←6.221-6.241
gpm1r2	AGAGGAGACGGATGATTGAAGC	Secuenciar <i>crtE</i>	←5.659-5.680
mcrtEF	ATGGATTACGCGAACATCCTC	Secuenciar <i>crtE</i>	4.754-4.804→
mcrtER	TCACAGAGGGATATCGGCTAG	Secuenciar <i>crtE</i>	←6.816-6.836

→: Partidor dirección río abajo.

←: Partidor dirección río arriba.

por 3 min. Finalmente, se dejó por 10 min a 72 °C para una elongación final y luego la reacción se mantuvo a 4 °C. En algunos casos, la temperatura de alineación de los partidores se modificó para aumentar la especificidad de la reacción.

2.3.15. Hibridación DNA-DNA.

Los experimentos de hibridación se basaron en la técnica desarrollada por Southern (Southern, 1975) y descritas por Sambrook y cols. (2001).

2.3.15.1. Preparación de las muestras.

La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 0,7% preparados con amortiguador TAE 1X y posteriormente teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Se utilizó entre 3 a 5 µg de gDNA de *X. dendrorhous* digerido con distintas enzimas de restricción. Al finalizar la electroforesis se fotografió el gel junto a una regla como registro de migración.

2.3.15.1.1. Tratamiento de las muestras.

El gel fue sumergido en una solución de depuración (HCl 0,2 N) durante 10 min. Transcurrido este tiempo, el gel se lavó con agua desionizada, se sumergió en 500 ml de solución de desnaturación (NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 N) por 45 min a temperatura ambiente y posteriormente se lavó con agua desionizada. La neutralización se realizó sumergiendo el gel durante 30 min en 500 ml de una solución de Tris-HCl 1 M pH 7,4 y NaCl 1,5 M a temperatura ambiente. Finalmente, se repitió este paso con solución de neutralización nueva durante 15 min y se lavó nuevamente con agua desionizada.

2.3.15.1.2. Montaje de la transferencia.

Para realizar la transferencia del DNA a la membrana, se colocó el gel sobre el soporte de una cámara de electroforesis con los pocillos hacia abajo y rodeado por parafilm sobre un papel filtro de 3 mm. Sobre el gel se colocó una membrana de Nylon Biotodyne B (Pall) y sobre ésta, otro filtro de 3 mm. Luego, se colocó abundante papel absorbente y encima un matraz con 500 ml de agua sujeto a un soporte universal. La transferencia se realizó durante 12 a 14 h en amortiguador de transferencia SSC 10X (NaCl 1,5 M, Citrato de Sodio 0,15 M pH 7,0).

2.3.15.1.3. Fijación del DNA a la membrana.

El DNA se fijó a la membrana de Nylon en un horno a 80 °C durante 30 min y posteriormente radiación U.V. (254 nm) durante 5 min.

2.3.15.2. Marcación de la sonda.

Para la marcación de la sonda, primero se desnaturó 30 ng de ésta hirviéndola en un baño de agua por 5 min y transfiriéndola inmediatamente a hielo. Luego, se le agregó 2 µl de dATP (10 mM), 2 µl de dGTP (10 mM), 2 µl de dTTP (10 mM), 5 µl de [α -³²P]dCTP (50 µCi), 15 µl de mezcla de partidores y 3 µl de agua destilada. Posteriormente, se adicionó 1 µl de DNA polimerasa I (fragmento Klenow) y se incubó a 25 °C durante 1 a 3 h.

2.3.15.3. Prehibridación.

La membrana se lavó con la solución SSC 2X y se depositó en una botella de hibridación con 10 ml de solución de hibridación (Na₂HPO₄ 0,5 M pH 7,2, SDS 7%). Luego, se incubó por 5 min a 65 °C en un horno de hibridación.

2.3.15.4. Hibridación.

Se agregó la sonda marcada a la botella de hibridación que contenía la membrana y se incubó por 16 horas a 65 °C con agitación suave en el horno de hibridación.

2.3.15.5. Lavados.

La membrana se lavó dos veces con 10 ml de una solución de Na₂HPO₄ 40 mM pH 7,2, SDS 5%, y dos veces con 10 ml de una solución de Na₂HPO₄ 40 mM pH 7,2, SDS 1%, incubándose entre 30 a 60 min a 65 °C con agitación suave en cada uno de los lavados. Después de los lavados, la membrana se retiró de la botella y se depositó sobre una placa radiográfica, se cubrió con plástico y sobre este se colocó una hoja de papel. Luego, se depositó en una placa de revelado y se puso sobre ella varias placas autoradiográficas en oscuridad. Esto se mantuvo a -80 °C por tiempos variables (entre 24 y 72 h) antes de ser reveladas.

2.4. Ensayos de complementación.

2.4.1. Obtención de los clones de expresión.

2.4.1.1. Obtención del gen de interés.

La clonación del gen de interés en el vector de expresión pET101/D-TOPO (Invitrogen) se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor. Para esto, se amplificó mediante PCR la región codificante del gen *crtE* de *E. uredovora* y el cDNA del gen *crtE* de *X. dendrorhous* utilizando un partidor directo diseñado desde el codón de inicio de la traducción y un partidor reverso que incluía el codón de término de la traducción. Además, al partidor directo se le agregó una secuencia adaptadora CACC

que permite el reconocimiento de la enzima Topoisomerasa I del virus *Vaccinia* que está asociada al vector, permitiendo el clonado direccional eficiente de los fragmentos de PCR.

Los productos de amplificado fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,7% desde donde fueron purificados y posteriormente cuantificados.

2.4.1.2. Clonación en el vector de expresión.

La reacción de clonación se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor (Invitrogen). Para esto, se mezcló el fragmento de interés junto con 10 ng de vector en una razón molar de 2:1 en un volumen final de 5 μ l y a esta mezcla se le agregó 1 μ l de una solución salina (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂). La mezcla de reacción se incubó a 22 °C por 30 min y posteriormente se transfirió a hielo. Se utilizaron 3 μ l de esta mezcla de reacción para transformar *E. coli*.

2.4.1.3. Análisis de los clones transformantes.

Los clones transformantes obtenidos se analizaron mediante PCR de colonia utilizando el partidor directo T7 del vector y el partidor reverso del gen de interés. A aquellos clones positivos para la reacción de PCR se les extrajo DNA plasmidial y su inserto se secuenció completamente.

2.4.2. Obtención de las cepas portadoras del clúster carotenogénico de *E. uredo* *vora*.

Para obtener los clones necesarios para los ensayos de complementación, se transformó la cepa de *E. coli* BL21-Gold(DE3) con los plasmidios pDS1B y pDS1B Δ E

obteniéndose las cepas DS1B y DS1BΔE, respectivamente. Estas cepas se utilizaron como cepas receptoras de transformación de los plasmidios pT-EEu, pT-EXd y pT-Ins para los ensayos de complementación.

2.4.3. Complementación de la actividad GGPP sintasa.

Las cepas que portaban ambos plasmidios derivados de pBAD33 y pET101/D-TOPO se crecieron en tubos de 12 ml con 5 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) y cloranfenicol (34 µg/ml) durante toda la noche (12 a 15 h) con agitación (200 rpm) y 37 °C. Estos cultivos se utilizaron para inocular 150 ml de medio LB con una dilución 1:100 y se creció hasta una D.O._{560nm} entre 0,5 - 0,8 (fase exponencial temprana-media). Luego, el cultivo se dividió en 2 matraces con 75 ml de cultivo cada uno. A uno de estos matraces se le agregó IPTG a una concentración final de 1 mM, siendo éste el cultivo inducido y el otro matraz correspondió al cultivo control. Ambos cultivos se crecieron a 28 °C con agitación constante durante 72 h, al término de las cuales se colectaron 50 ml de cultivo para la extracción de pigmentos y 5 ml de cultivo por triplicado para la determinación de su peso seco.

2.5. Extracción y análisis de pigmentos.

2.5.1. Extracción de carotenoides.

Para la extracción de los carotenoides se utilizó el método descrito por An y cols. (1989) con algunas modificaciones. El pellet de células proveniente de 50 ml de cultivo se lavó con 1 ml de agua y posteriormente se resuspendió en 1 ml de agua. Se le agregó 1/2 volumen de perlas de vidrio (Sigma, 425 - 600 µm) y se realizó la ruptura celular por agitación en vórtex por 2 min. Se incubó en hielo por 2 min y se le agregó 1

ml de acetona. Se homogenizó en vórtex por 2 min y posteriormente se centrifugó por 10 min a 12.100 x g a 4 °C. La fase orgánica obtenida se transfirió a otro tubo.

Al pellet celular resultante se le realizó una nueva extracción de pigmentos con 2 ml de acetona, agitándose en vórtex por 2 min. Este procedimiento se repitió hasta que los restos celulares quedaron blancos.

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

2.5.2. Cuantificación de pigmentos totales por espectrofotometría visible.

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

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

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

Donde:

A_{450} = Absorbancia a 450 nanómetros.

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

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

2.5.3. Análisis de los pigmentos por HPLC.

Los pigmentos disueltos en éter de petróleo se secaron con nitrógeno gaseoso y posteriormente se resuspendieron en 100 μl de acetona. Los pigmentos se

separaron por HPLC (Nelis y De Leenheer, 1989) con una columna de fase reversa RP-18 Lichrocart 125-4 (Merck), utilizando una solución de acetonitrilo:metanol:isopropanol (85:10:5 v/v) como fase móvil con un flujo de 1 ml/min a temperatura ambiente, en condiciones isocráticas. Los espectros de cada máximo de elución fueron obtenidos utilizando un detector con arreglo de diodos. Los carotenoides fueron identificados de acuerdo a sus espectros de absorción, tiempos de retención y comparación con estándares específicos.

2.6. Análisis de secuencias.

Las secuencias nucleotídicas se determinaron en nuestro laboratorio con el kit de GE Healthcare "DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit" y se analizaron con los programas Chromas versión 1.43, Sequencing Analysis V3.7 y ContigExpress 2003. Las secuencias nucleotídicas se alinearon con el programa CLUSTAL W, versión 1.8 y AlignX 2003, ajustadas manualmente para incrementar la identidad. Además, todas estas herramientas se complementaron con el uso del paquete de programas Vector NTI 10.3.

3. RESULTADOS

3.1. Búsqueda de los genes involucrados en la biosíntesis de GGPP a partir de IPP y DMAPP.

3.1.1. Determinación de las enzimas involucradas en la síntesis de GGPP.

Para poder ubicar todos los potenciales genes involucrados en la ruta de biosíntesis del GGPP, se buscó en la base de datos "*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*" (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/>) (Kanehisa, 2002) todas las actividades enzimáticas requeridas para su formación a partir de IPP y DMAPP. Se encontró que esta vía es similar en muchos organismos, incluidos bacterias y hongos, siendo requeridas 3 actividades enzimáticas para su biosíntesis: EC 2.5.1.1 (dimetilalil transtferasa), EC 2.5.1.10 (geranil transtferasa) y EC 2.5.1.29 (geranilgeranil difosfato sintasa) (figura 5).

Utilizando *S. cerevisiae* como organismo modelo, se buscaron todas las enzimas descritas en esta levadura que presentaban estas actividades. Para el caso de las actividades dimetilalil transtferasa y geranil transtferasa, una única enzima denominada farnesil difosfato sintasa realiza ambas reacciones. En el caso de la actividad geranilgeranil difosfato sintasa, sólo una enzima de igual nombre presenta esta actividad. La enzima farnesil difosfato sintasa está codificada en el genoma *S. cerevisiae* por el gen *ERG20* (Plochocka y col., 2000) y la enzima geranilgeranil difosfato sintasa por el gen *BST1* (Jiang y col., 1995).

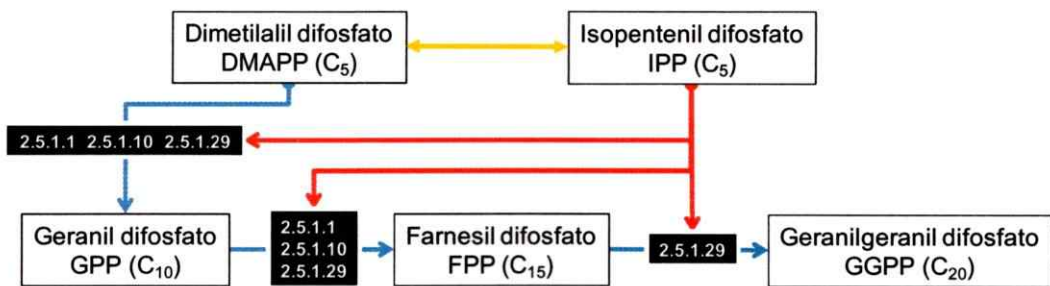


Figura 5. Biosíntesis de GGPP a partir de IPP y DMAPP.

Actividades enzimáticas requeridas para la biosíntesis de GGPP a partir de IPP y DMAPP, teniendo como compuestos intermediarios el geranil difosfato y el farnesil difosfato. EC 2.5.1.1= dimetilalil transtransferasa. EC 2.5.1.10= geranil transtransferasa. EC 2.5.1.29= geranilgeranil difosfato sintasa. Se indica el número de átomos de carbono (C) de la molécula.

3.1.2. Búsqueda de la enzima farnesil difosfato sintasa de *X. dendrorhous*.

Utilizando la secuencia aminoacídica de la enzima farnesil difosfato sintasa de *S. cerevisiae* [Erg20p, número de acceso a GenBank (NA): CAA89462], se buscaron en la base de datos no redundante sus ortólogos en otras levaduras y hongos. Se seleccionó la secuencia de los hongos basidiomicetes filogenéticamente relacionados con *X. dendrorhous* tales como: *Coprinopsis cinerea* (NA: EAU81564), *Cryptococcus neoformans* (NA: XP_571137), *Laccaria bicolor* (NA: EDR00326), *Lactarius chrysorrheus* (NA: BAD15361), *Malassezia globosa* (NA: XP_001732045) y *Ustilago maydis* (NA: XP_757593). Se comparó las secuencias aminoacídicas de la enzima farnesil difosfato sintasa de estos 6 hongos permitiendo definir una secuencia consenso de 322 aminoácidos. Utilizando esta secuencia consenso, se realizó una nueva búsqueda en la base de datos no redundante y en la base de datos de patentes. Para ambos casos, se aumentó la identidad entre las secuencias (tabla 4) pero no se encontró la secuencia de otros hongos basidiomicetes.

A partir de la secuencia aminoacídica de estas proteínas se obtuvo la secuencia nucleotídica del gen que las codificaban (NA: AACs0100030, XM_571137, DS547151, AB176846, XM_001731993 y XM_752500). Estas secuencias se alinearon para encontrar regiones conservadas dentro de ella permitiendo, junto con la comparación de sus secuencias aminoacídicas, diseñar los partidores FPSF, FPSF2, FPSR y FPSR2 para buscar el gen que codificaría para la enzima FPP sintasa de *X. dendrorhous* (figura 6).

Tabla 4. Comparación de las secuencias aminoacídicas de la enzima farnesil difosfato sintasa de hongos basidiomicetes.

	Identidad		Similitud		<i>e-value</i>	
	Erg20p	Consenso	Erg20p	Consenso	Erg20p	Consenso
<i>C. cinerea</i>	50%	63%	64%	72%	1e ⁻¹⁰⁹	7e ⁻¹²⁸
<i>C. neoformans</i>	62%	76%	76%	82%	5e ⁻¹²⁷	2e ⁻¹³⁹
<i>L. bicolor</i>	58%	68%	72%	77%	2e ⁻¹²⁰	1e ⁻¹³¹
<i>L. chrysorrhoeus</i>	53%	67%	70%	78%	7e ⁻¹⁰⁷	2e ⁻¹²²
<i>M. globosa</i>	61%	71%	73%	78%	7e ⁻¹²³	1e ⁻¹³²
<i>U. maydis</i>	69%	77%	81%	85%	2e ⁻¹²⁰	1e ⁻¹²⁸

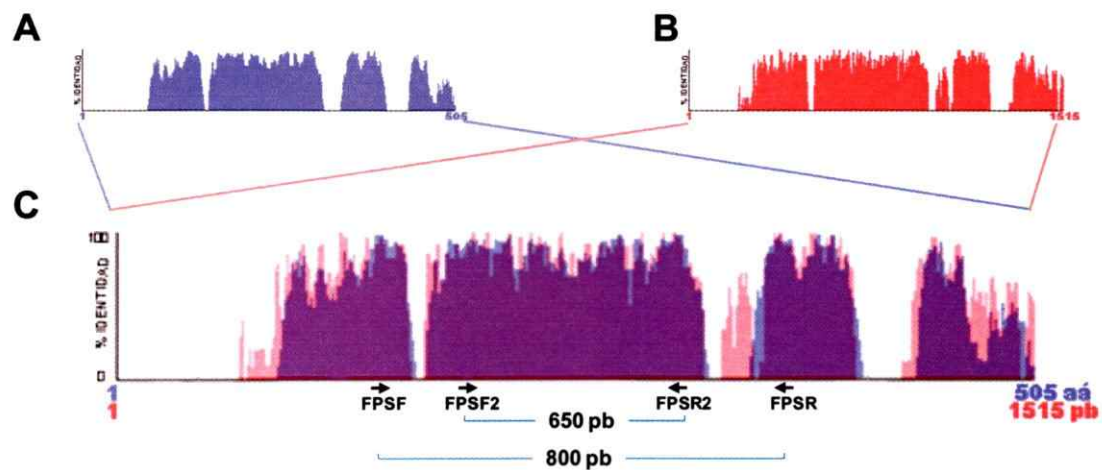


Figura 6. Comparación de secuencias de la enzima FPP sintasa de diferentes hongos.

Se compararon las secuencias de la enzima FPP sintasa de diferentes hongos para determinar las regiones más conservadas dentro de ellas. **A)** Representación esquemática de la comparación de las secuencias aminoacídicas de esta enzima. **B)** Representación esquemática de la comparación de las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican a esta enzima. **C)** Sobreposición de A) y B). Se indica la ubicación y dirección de los partidores diseñados. Un 50% de identidad significa que en una misma posición, en la mitad de las secuencias se encuentra el mismo nucleótido o aminoácido.

Para confirmar la especificidad de los partidores diseñados, se realizó una reacción de PCR utilizando como molde el gDNA de *X. dendrorhous*. La reacción de PCR se verificó por electroforesis en un gel de agarosa, observándose para cada juego de partidores un único amplificado de 800 y 650 pb aproximadamente (figura 7).

El fragmento de mayor tamaño se purificó y se utilizó como DNA molde en una reacción de PCR utilizando los partidores FPSF2 y FPSR2. Se observó un único amplificado de 650 pb demostrando que ambos fragmentos corresponden a la misma región de gDNA de *X. dendrorhous* (resultado no mostrado). El fragmento de mayor tamaño se secuenció y se comparó su secuencia con la base de datos, obteniendo una identidad de 83% y *e-value* de $6e^{-14}$ con la secuencia de una potencial proteína relacionada con la ruta de biosíntesis de isoprenoides de *C. neoformans* (NA: AE017345), y una identidad de 82% y *e-value* de $3e^{-11}$ con la secuencia parcial del mRNA de la enzima farnesil difosfato sintasa de *Ajellomyces capsulatus* (NA: XM_001543317). Este resultado comprobó que los fragmentos obtenidos mediante PCR corresponden a una parte del gen denominado *FPS* que codificaría para la enzima farnesil difosfato sintasa de *X. dendrorhous*.

3.1.3. Búsqueda de la enzima geranylgeranyl difosfato sintasa.

Utilizando la secuencia aminoacídica de la enzima geranylgeranyl difosfato sintasa de *S. cerevisiae* (Bst1p, NA: NP_015256), se buscó en la base de datos no redundante sus ortólogos en otras levaduras y hongos.

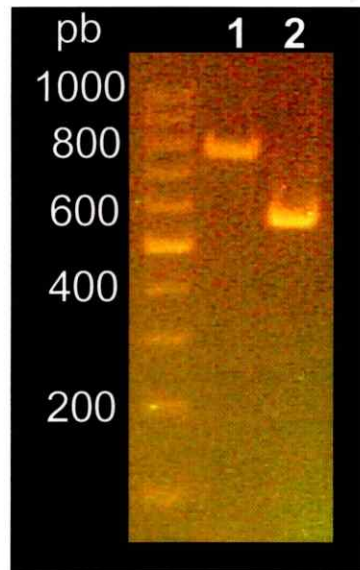


Figura 7. Verificación de la especificidad de los partidores del gen que codifica para la enzima FPP sintasa.

La reacción de PCR se realizó con gDNA de *X. dendrorhous* utilizando los partidores diseñados a partir de las regiones conservadas del gen que codifica para la enzima FPP sintasa de otros hongos. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y tinción con bromuro de etidio. **1)** PCR con los partidores FPSF y FPSR. **2)** PCR con los partidores FPSF2 y FPSR2. A la izquierda se visualiza el marcador de peso molecular 100 bp.

Se seleccionó la secuencia de los hongos basidiomicetes filogenéticamente relacionados con *X. dendrorhous* tale como: *C. cinerea* (NA: EAU91842), *C. neoformans* (NA: XP_572774), *L. bicolor* (NA: EDQ99594) y *U. maydis* (NA: XM_755513). Se compararon las secuencias aminoacídicas de estos 4 hongos permitiendo definir una secuencia consenso de 315 aminoácidos. Utilizando esta secuencia consenso, se realizó una nueva búsqueda en la base de datos no redundante y en la base de datos de patentes. Para ambos casos, se aumentó la identidad entre las secuencias (tabla 5) y además, en la base de datos de patente, se encontró la secuencia de una proteína denominada PRCRTE de *X. dendrorhous* (NA: CAA03761).

Utilizando como molde la secuencia nucleotídica de esta patente, se diseñó un partidor directo ubicado desde el codón de inicio de la traducción (mcrTEF) y un partidor reverso ubicado hasta el codón de término de la traducción (mcrTER).

Debido a que el paso crítico de la etapa intermedia de biosíntesis de carotenoides es la síntesis del GGPP, se enfocó la búsqueda y caracterización del gen *crtE* de *X. dendrorhous* que codificaría para la enzima GGPP sintasa.

3.1.3.1. Determinación de la organización genómica del gen *crtE* en *X. dendrorhous*.

Para verificar la especificidad de los partidores diseñados, se realizó una reacción de PCR utilizando como molde el gDNA de *X. dendrorhous*. La reacción de PCR se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa, observándose un único amplificado de 2 kb aproximadamente (figura 8).

Tabla 5. Comparación de las secuencias aminoacídicas de la enzima geranilgeranil difosfato sintasa de hongos basidiomicetes.

	Identidad		Similitud		<i>e-value</i>	
	Bst1p	Consenso	Bst1p	Consenso	Bst1p	Consenso
<i>C. cinerea</i>	40%	82%	62%	90%	7e ⁻⁵⁹	9e ⁻¹⁴⁹
<i>C. neoformans</i>	43%	69%	61%	77%	1e ⁻⁶²	4e ⁻¹²⁴
<i>L. bicolor</i>	43%	86%	64%	92%	1e ⁻⁶²	2e ⁻¹⁵⁴
<i>U. maydis</i>	41%	55%	62%	67%	9e ⁻⁵⁴	4e ⁻⁹⁹
<i>X. dendrorhous</i>	-	51%	-	66%	-	7e ⁻⁹⁵

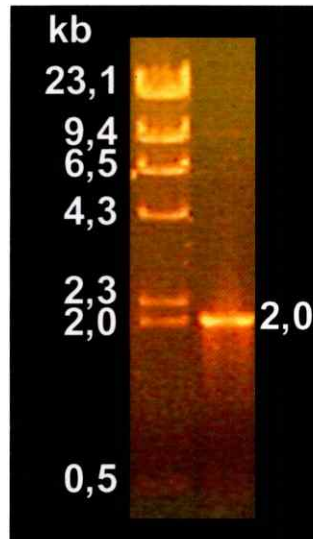


Figura 8. Análisis de la especificidad de los partidores del gen *crtE* de *X. dendrorhous*.

Se realizó una reacción de PCR utilizando como molde el gDNA de *X. dendrorhous* y los partidores mcrTEF y mcrTER diseñados a partir de la secuencia del gen que codificaría para la enzima PRCRTE publicado en la patente WO9723633. El producto de PCR se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 0,7% y tinción con bromuro de etidio. Se observó un único amplificado de 2 kb correspondiente al potencial gen *crtE*. A la izquierda se observa el marcador de peso molecular λ /HindIII.

El producto de PCR se purificó desde el gel y se secuenció completamente. Su secuencia se comparó con la base de datos, obteniendo una identidad de 79% y *e-value* de $2e^{-7}$ con la secuencia de la enzima geranilgeranil difosfato sintasa de *Aspergillus nidulans* (NA: AF479566), y una identidad de 78% y *e-value* de $8e^{-5}$ con la secuencia de la enzima farnesil transtransferasa de *C. neoformans* (NA: XM_572774). Además, en la comparación con la base de datos de patentes se obtuvo una identidad de 98% y *e-value* de $2e^{-128}$ con la secuencia de la patente WO 9723633-A (NA: A63889) correspondiente a la proteína PRCRTE de *X. dendrorhous*. Este resultado comprobó que el fragmento obtenido mediante PCR correspondía al gen *crtE* que codificaría para la enzima geranilgeranil difosfato sintasa de *X. dendrorhous*.

Para determinar la organización genómica del gen *crtE* en *X. dendrorhous*, se sintetizó una sonda marcando radiactivamente con ^{32}P el fragmento correspondiente a este gen y se hibridó contra el gDNA de *X. dendrorhous* digerido con diferentes enzimas de restricción (figura 9).

El resultado de la hibridación con el gDNA digerido con la enzima de restricción *Bam*HI (carril 1) indicó el reconocimiento de un único fragmento de aproximadamente 11,5 kb. Este resultado permitió realizar la búsqueda de este gen en una genoteca que había sido construida previamente en nuestro laboratorio, confeccionada a partir de gDNA de *X. dendrorhous* digerido con *Bam*HI y ligado en el vector YIp5. Esta genoteca está constituida por 6.500 clones, agrupados en grupos de 100 clones cada uno, con un tamaño de inserto promedio de aproximadamente 12 kb.

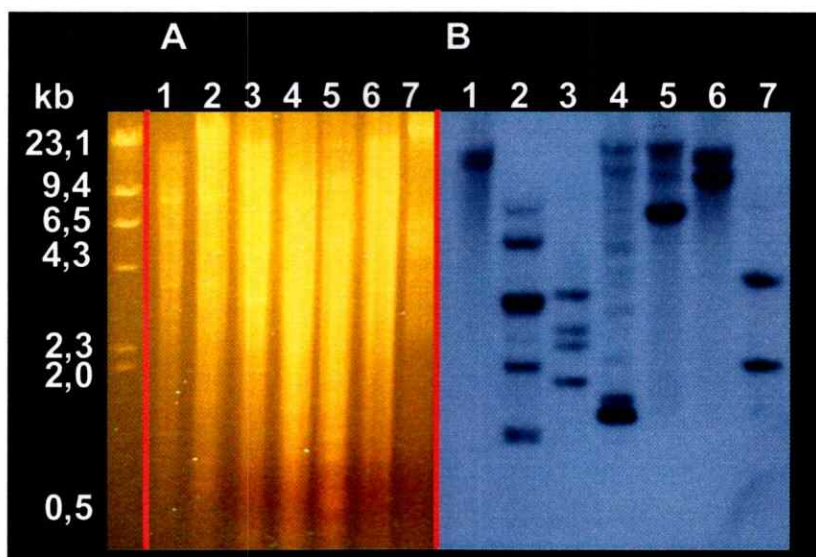


Figura 9. Ubicación del gen *crtE* en el gDNA de *X. dendrorhous* digerido con diferentes enzimas de restricción.

Se utilizó como sonda el producto de amplificado de 2 kb correspondiente al gen *crtE* y se hibridó con el gDNA de *X. dendrorhous* digerido con diferentes enzimas de restricción. **A)** Electroforesis del gDNA en un gel de agarosa al 0,7%. El marcador de peso molecular corresponde a λ *Hind*III. **B)** Autorradiografía de la membrana a 72 h de exposición. Enzimas de restricción utilizadas: 1) *Bam*HI, 2) *Eco*RV, 3) *Eco*RI, 4) *Fsp*AI, 5) *Pst*I, 6) *Sma*I y 7) *Dra*I.

3.1.3.2. Búsqueda del gen *crtE* de *X. dendrorhous* en la genoteca.

Para la búsqueda del gen *crtE* en nuestra genoteca, se siguió el protocolo esquematizado en la figura 10.

Se seleccionó y aisló un clon positivo para la reacción de PCR utilizando los partidores específicos para el gen *crtE* y su inserto *Bam*HI de 11,5 kb se transfirió al plasmidio pBlueScript SK⁻ (pBS) digerido con la misma enzima, obteniéndose el plasmidio pXD-I10.

3.1.3.3. Ubicación del gen *crtE* en el plasmidio pXD-I10.

Para determinar la ubicación del gen *crtE* en el inserto de 11,5 kb del clon pXD-I10 y sub-clonarlo en un fragmento más pequeño, se realizó una reacción de PCR utilizando los partidores propios del vector y partidores divergentes al ORF del gen *crtE* (figura 11).

Para ambas reacciones de PCR, se obtuvo un único amplificado de tamaño similar de 4 kb aproximadamente, indicando que el gen *crtE* se ubicaría en el centro del inserto *Bam*HI del plasmidio pXD-I10.

3.1.3.4. Análisis de restricción del plasmidio pXD-I10.

El plasmidio pXD-I10 se digirió con diferentes enzimas de restricción y los fragmentos resultantes se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa permitiendo confeccionar un mapa de restricción del inserto. Se ubicó la posición relativa del gen *crtE* en el mapa de restricción (figura 12).

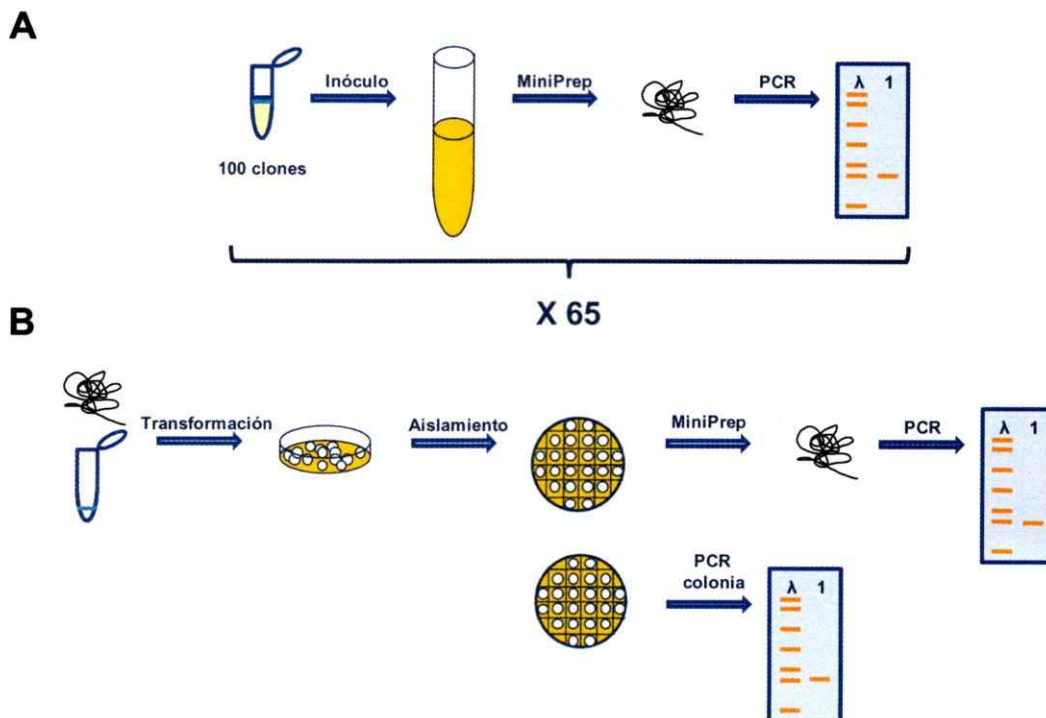


Figura 10. Búsqueda del gen *crtE* en la genoteca de DNA genómico de *X. dendrorhous* en *E. coli*.

A) Se creció por separado cada uno de los 65 grupos de 100 clones cada uno y se les extrajo DNA plasmidial. Este DNA plasmidial fue utilizado como molde para la reacción de PCR con los partidores específicos del gen *crtE* (mcrTEF y mcrTER). **B)** El DNA positivo para la reacción de PCR se utilizó para transformar *E. coli*. Los clones transformantes se aislaron en placas de agar LB por duplicado. Se colectaron los clones de cada placa y se le extrajo DNA plasmidial. A los clones de la placa que dio positiva para la reacción de PCR, se les realizó PCR de colonia para ubicar el gen *crtE*.

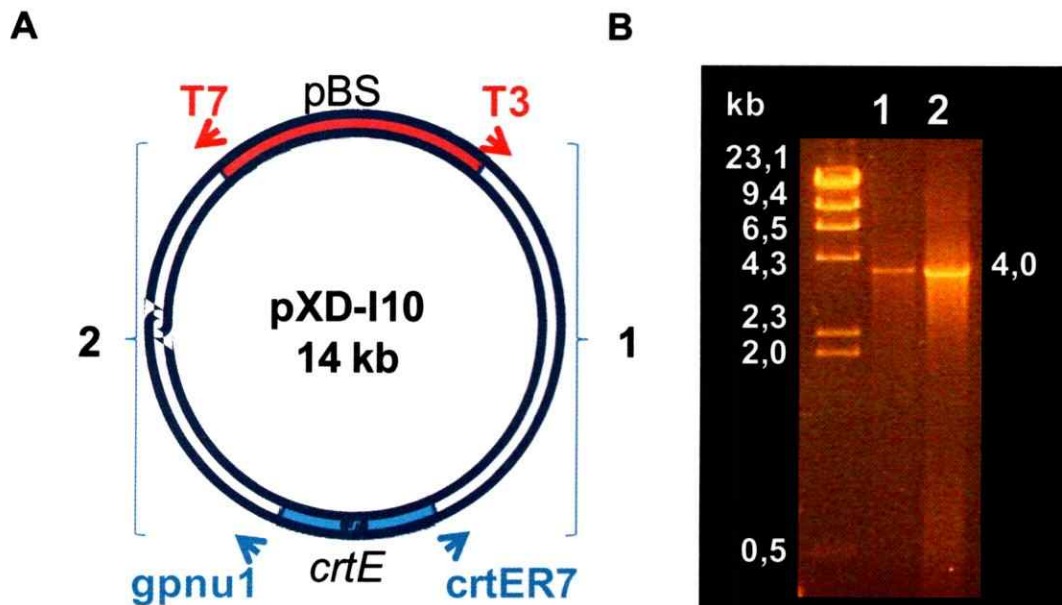


Figura 11. Determinación de la ubicación del gen *crtE* en el plasmidio pXD-I10.

Se realizó una reacción de PCR utilizando como DNA molde el plasmidio pXD-I10 junto con los partidores propios del vector (T7 y T3) y partidores divergentes al ORF del gen *crtE* (*gpnu1* y *crtER7*). **A)** Representación de la posición de los partidores utilizados. **B)** Electroforesis de los productos de amplificado en un gel de agarosa al 0,7%. Carril 1) Partidores T3 y *crtER7*; 2) Partidores T7 y *gpnu1*. A la izquierda se observa el marcador de peso molecular λ /*HindIII*.

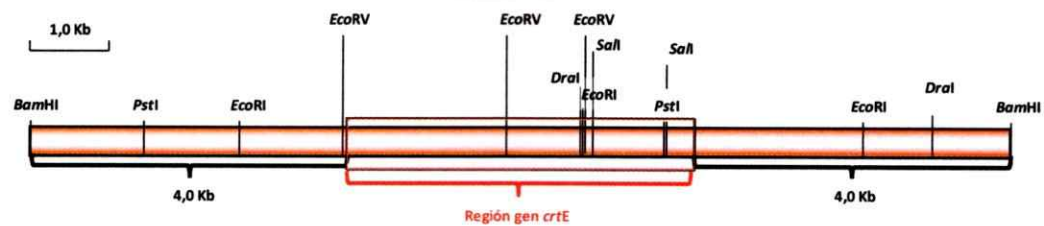
A**B**

Figura 12. Mapa de restricción del plasmidio pXD-I10.

El plasmidio pXD-I10 se digirió con diferentes enzimas de restricción y con los tamaños de los diferentes fragmentos se confeccionó el mapa de restricción del inserto *Bam*HI de este plasmidio. **A)** Análisis de la digestión con diferentes enzimas. El carril 1 corresponde al plasmidio pBS digerido con *Bam*HI. Los carriles 2 al 13 corresponden al plasmidio pXD-I10 con diferentes enzimas de restricción: 2) *Bam*HI, 3) *Pst*I, 4) *Eco*RI, 5) *Eco*RV, 6) *Xho*I, 7) *Sal*I, 8) *Hind*III, 9) *Dra*I, 10) *Bam*HI y *Eco*RI, 11) *Bam*HI y *Sal*I, 12) *Bam*HI y *Hind*III, 13) *Bam*HI y *Dra*I. A la izquierda se observa el marcador de peso molecular λ /*Hind*III. **B)** Mapa de restricción del inserto de 11,5 kb del plasmidio pXD-I10 y ubicación relativa del gen *crtE* en el mapa de restricción.

Ninguna de las enzimas de restricción utilizadas permitió sub-clonar la región correspondiente al gen *crtE*. Finalmente, el plasmidio pXD-110 se secuenció completamente en ambas direcciones obteniendo la secuencia de un fragmento de gDNA de 11.429 pb, la cual fue depositada en la base de datos GenBank con el número de acceso DQ012943.

3.1.3.5. Análisis de la secuencia del plasmidio pXD-110.

Se ubicó la secuencia de los partidores específicos para el gen *crtE* en la secuencia del plasmidio pXD-110 permitiendo definir el ORF de este gen en un fragmento de gDNA de 2.053 pb. Luego, se utilizó la secuencia del plasmidio pXD-110 y se realizó un mapa de restricción "*in-silico*" que permitió definir la utilización de las enzimas *EcoRI* y *DraI* para el sub-clonado del gen *crtE*. Se digirió el plasmidio pXD-110 con estas enzimas y se purificó un fragmento de 3.312 pb que se clonó en pBS digerido con *EcoRI* – *EcoRV*. El plasmidio resultante se denominó pCE (figura 13).

3.2. Clonamiento del cDNA del gen *crtE*.

Para el clonamiento del cDNA del gen *crtE*, se le extrajo RNA total de un cultivo de *X. dendrorhous* de 3 días y se realizó una reacción de transcripción reversa (RT) con el partidor Oligo(dT)₁₈. Se utilizó esta reacción de RT como molde para la amplificación del cDNA del gen *crtE* utilizando los partidores mcrtEF y mcrtER. El producto de amplificado se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa desde donde se purificó un único amplificado de 1,1 kb aproximadamente (figura 14).

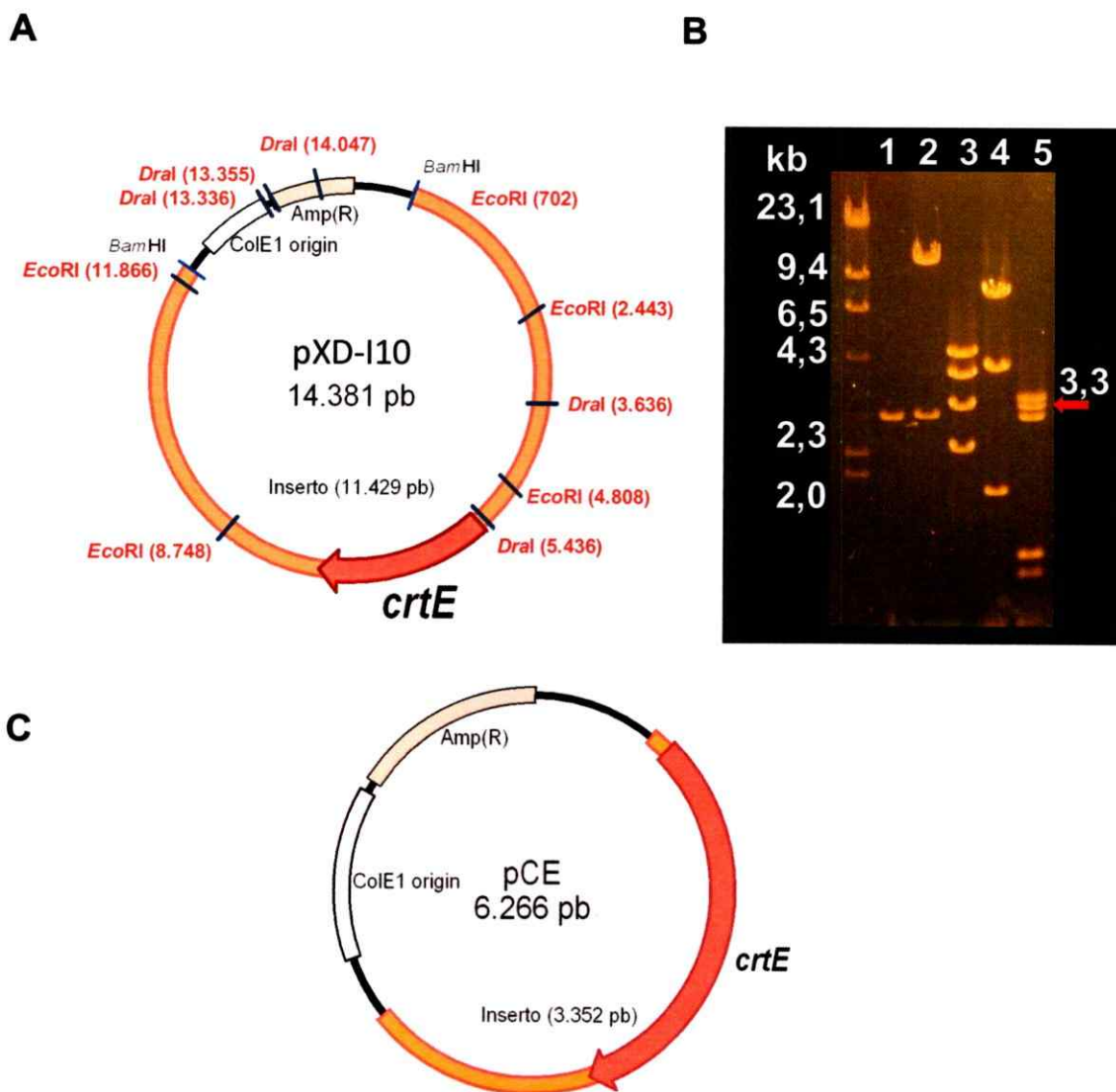


Figura 13. Sub-clonado del gen *crtE*.

Se ubicó el gen *crtE* en el plasmidio pXD-I10 y se realizó un mapa virtual de éste para definir las enzimas de restricción a utilizar para su sub-clonado. **A)** Mapa del plasmidio pXD-I10. Se indica la posición del gen *crtE* y los sitios de corte de las enzimas *EcoRI* y *Dral*. Se definió un fragmento *EcoRI-Dral* de 3.312 pb que contiene este gen. **B)** Electroforesis en gel de agarosa de la digestión del plasmidio pXD-I10. El carril 1 corresponde a pBS digerido con *BamHI*. Los carriles 2 al 5 corresponden al plasmidio pXD-I10 digerido con diferentes enzimas de restricción: 2) *BamHI*, 3) *EcoRI*, 4) *Dral*, 5) *EcoRI* y *Dral*. A la izquierda se observa el marcador de peso molecular λ /*HindIII*. **C)** Plasmidio pCE resultante del sub-clonado del fragmento *EcoRI-Dral* en el plasmidio pBS.

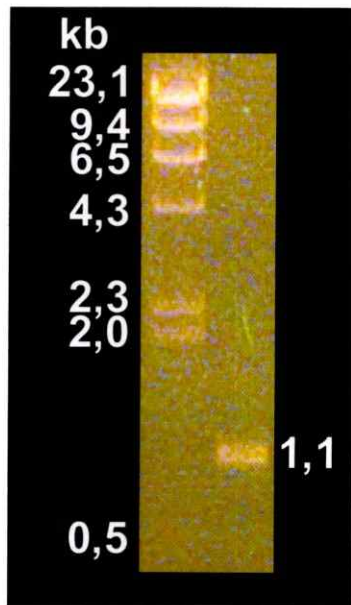


Figura 14. Obtención del cDNA del gen *crtE*.

Se amplificó mediante RT-PCR el cDNA del gen *crtE* utilizando los partidores específicos para éste. El producto de PCR se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0,7% y el amplificado se purificó y clonó en el plasmidio pBS. A la izquierda se observa el marcador de peso molecular λ /HindIII.

El producto de RT-PCR se clonó en el plasmidio pBS digerido con *EcoRV* obteniéndose el plasmidio pXD-mcrtE, que se secuenció completamente. La comparación entre la secuencia del cDNA del gen *crtE* y su versión genómica, indicó que éste está constituido por 9 exones y 8 intrones. La secuencia aminoacídica deducida a partir de la secuencia del cDNA correspondería a una proteína de 376 aminoácidos, con un tamaño molecular aproximado de 42 kDa y un punto isoeléctrico estimado de 5,09. Se comparó la secuencia aminoacídica con la base de datos de dominios conservados del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) (Marchler-Bauer y Bryant, 2004), encontrando un dominio de 258 aá. denominado Trans_IPPS_HT (NA: CD00685) presente en enzimas con actividad trans-isoprenil difosfato sintasa (Trans_IPPS) que realizan la reacción de condensación cabeza-cola (HT) de los isoprenos (figura 15).

La presencia del dominio conservado Trans_IPPS_HT y de las regiones ricas en ácido aspártico I y II corroboraron que el gen *crtE* codificaría para una enzima con actividad preniltransferasa.

3.3. Obtención de mutantes del gen *crtE* de *X. dendrorhous*.

La mutación del *locus crtE* de la cepa silvestre de *X. dendrorhous* se realizó mediante recombinación homóloga y reemplazo de este gen con un módulo portador del gen *hph* de *E. coli*, que le confiere resistencia a higromicina B a las cepas de *X. dendrorhous* que lo portan (Niklitschek, 2007).

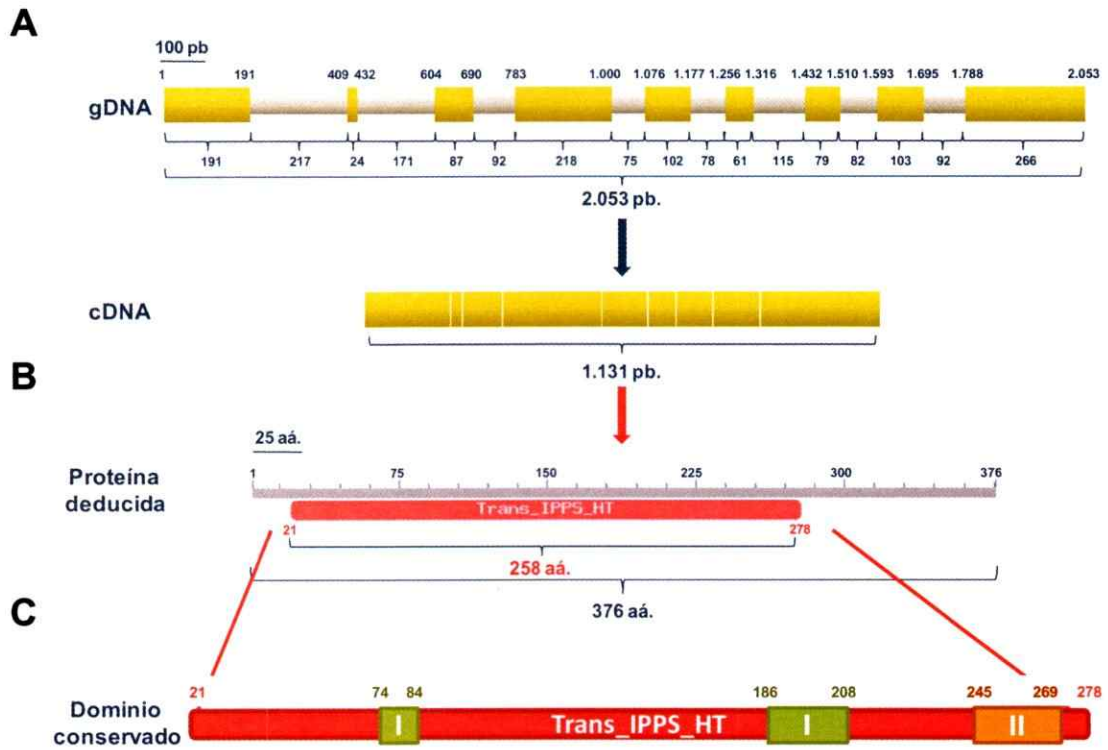


Figura 15. Análisis de la región codificante del gen *crtE*.

A) Comparación del cDNA del gen *crtE* con su versión genómica. La región codificante tiene un tamaño de 2.053 pb y está interrumpida por 8 intrones generando un ORF de 1.131 pb. **B)** Comparación de la secuencia aminoacídica deducida del gen *crtE* con la base de datos. Se observa un dominio conservado de 258 a.á. presente en enzimas con actividad trans-isoprenil difosfato sintasa. **C)** Ubicación de las regiones ricas en aspártico I (74 al 84 y 186 al 208) y II (245 al 269) requeridos para la actividad preniltransferasa.

3.3.1. Obtención del plasmidio de transformación.

Para obtener el plasmidio requerido para la transformación de *X. dendrorhous*, por un lado, se digirió el plasmidio pCE con la enzima *EcoRV* liberando un fragmento de 1.984 pb y generando una deleción del *locus crtE*. La reacción de digestión se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0,7% y se purificó un fragmento de 4.282 pb correspondiente al plasmidio pBS más DNA flanqueante al gen *crtE*. El plasmidio se re-ligó obteniéndose el plasmidio pCE Δ EV. Por otro lado, el plasmidio pMN-Hyg que porta el módulo de resistencia a higromicina B de *X. dendrorhous*, se digirió con la enzima *EcoRV* liberándose un fragmento de 1.912 pb correspondiente a este módulo. Este fragmento se purificó y se introdujo en el sitio *EcoRV* del plasmidio pCE Δ EV obteniéndose el plasmidio pCEH que se utilizó para transformar *X. dendrorhous* (figura 16).

3.3.1.1. Preparación del DNA transformante.

Se purificó el DNA plasmidial del clon pCEH mediante MIDI-Prep y se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa. Para la transformación de *X. dendrorhous* se utilizaron 15 μ g de este DNA plasmidial digerido con las enzimas *KpnI* y *SmaI*, cuyos cortes permiten la liberación del DNA dador de transformación, portando la mutación del gen *crtE*. Una muestra de la reacción de digestión se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa y el resto de la reacción de digestión se trató con un lavado fenólico y luego se precipitó con etanol. El pellet de DNA resultante se resuspendió en 10 μ l de agua y se utilizó para la transformación.

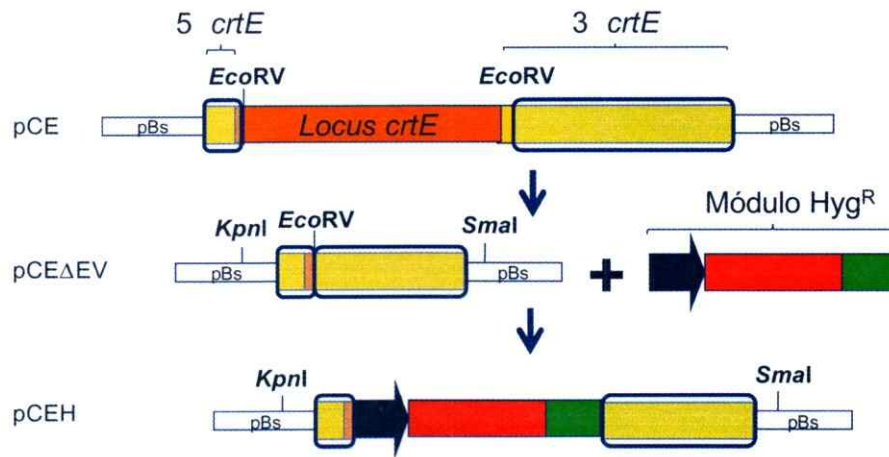
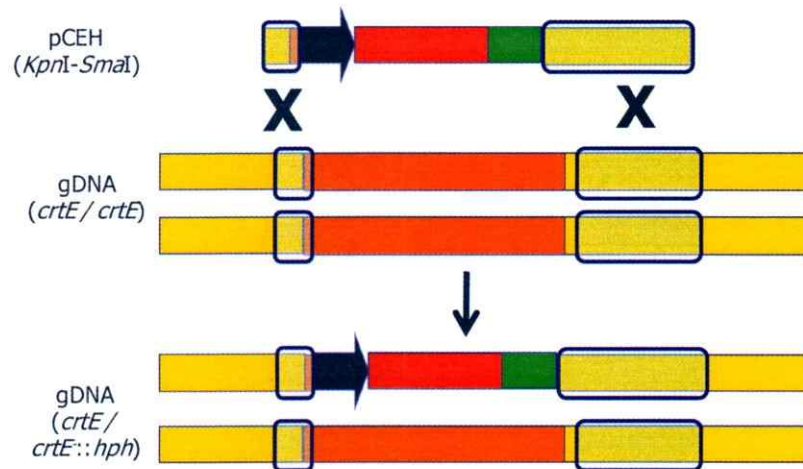
A**B**

Figura 16. Inserción del módulo de resistencia a higromicina B en el *locus crtE*.

A) El módulo de resistencia a higromicina B de *X. dendrorhous* se insertó en el sitio *EcoRV* del plasmidio pCEΔEV reemplazando 1.984 pb del gen *crtE*. El clon resultante pCEH se utilizó para la transformación de *X. dendrorhous*. **B)** Esquema del mecanismo de inserción del módulo de resistencia a higromicina B por recombinación homóloga en el *locus crtE* de *X. dendrorhous*. En naranja se representa el *locus crtE*. En amarillo se representa el gDNA flanqueante al *locus crtE*. El recuadro azul representa la región de gDNA potencialmente recombinante. En azul se representa la región promotora de la transcripción del gen *TEF-1α* de *X. dendrorhous*. En rojo se representa el gen *hph* de *E. coli*. En verde se representa la región terminadora de la transcripción del gen *gpd* de *X. dendrorhous*.

3.3.2. Transformación de *X. dendrorhous*.

La transformación de *X. dendrorhous* se realizó mediante electroporación, utilizando como cepa receptora de transformación la cepa silvestre UCD 67-385. El DNA utilizado como dador correspondió al plasmidio pCEH digerido con las enzimas de restricción *KpnI* y *SmaI*.

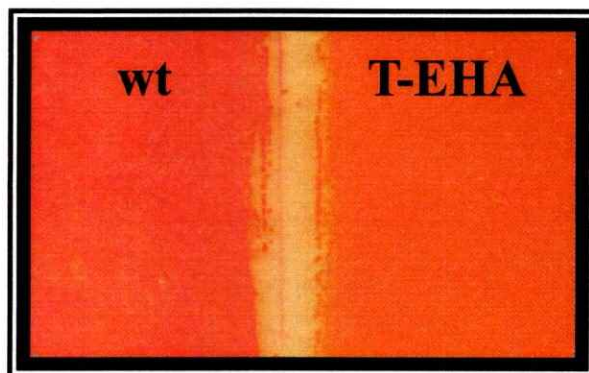
3.3.2.1. Electrotransformación de *X. dendrorhous*.

Para la transformación de *X. dendrorhous*, se utilizaron 60 μl de células electrocompetentes a las que se les agregó los 10 μl del DNA digerido (15 μg). Posterior a la electroporación, las células se resuspendieron en 1 ml de medio YM y se incubaron por 5 h a 22 °C. Después de este periodo de incubación, se plaquearon 100 μl en placas agar YM con higromicina B a una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Después de 4 días, se observó la presencia de 18 colonias transformantes resistentes a higromicina B en la placa. La comparación visual entre las colonias transformantes y su cepa parental indicó diferencias en su pigmentación (figura 17).

3.3.3. Análisis de pigmentos.

Para determinar si la diferencia en la pigmentación entre la cepa silvestre y la cepa transformante se debía a diferencias en la cantidad de pigmentos producida y/o a diferencias en la composición de éstos, se extrajo los pigmentos de ambas cepas, los que se cuantificaron espectrofotométricamente (figura 18) y se analizaron mediante cromatografía líquida en fase reversa (figura 19).

A



B

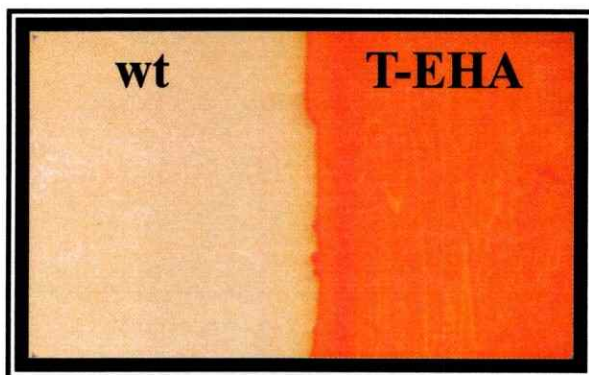


Figura 17. Cepa transformante de *X. dendrorhous* resistente a higromicina B.

Se aisló una colonia resistente a higromicina B (T-EHA) a partir de la transformación de la cepa silvestre de *X. dendrorhous* con el plasmidio pCEH. Se creció la cepa parental UCD 67-385 (wt) y la cepa transformante en medio YM sin (A) y con (B) higromicina B a 10 µg/ml. La cepa silvestre no crece en presencia del antibiótico a diferencia de la cepa transformante.

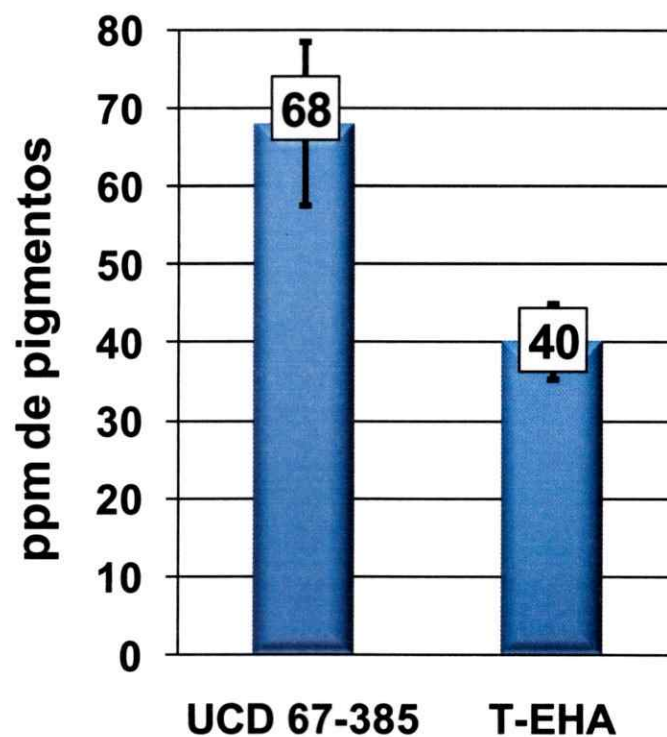


Figura 18. Cuantificación de pigmentos de las cepas de *X. dendrorhous*.

Se cuantificaron los pigmentos producidos por la cepa silvestre (UCD 67-385) y la cepa mutante para el gen *crtE* (T-EHA) observando una disminución en la producción de pigmentos de esta última.

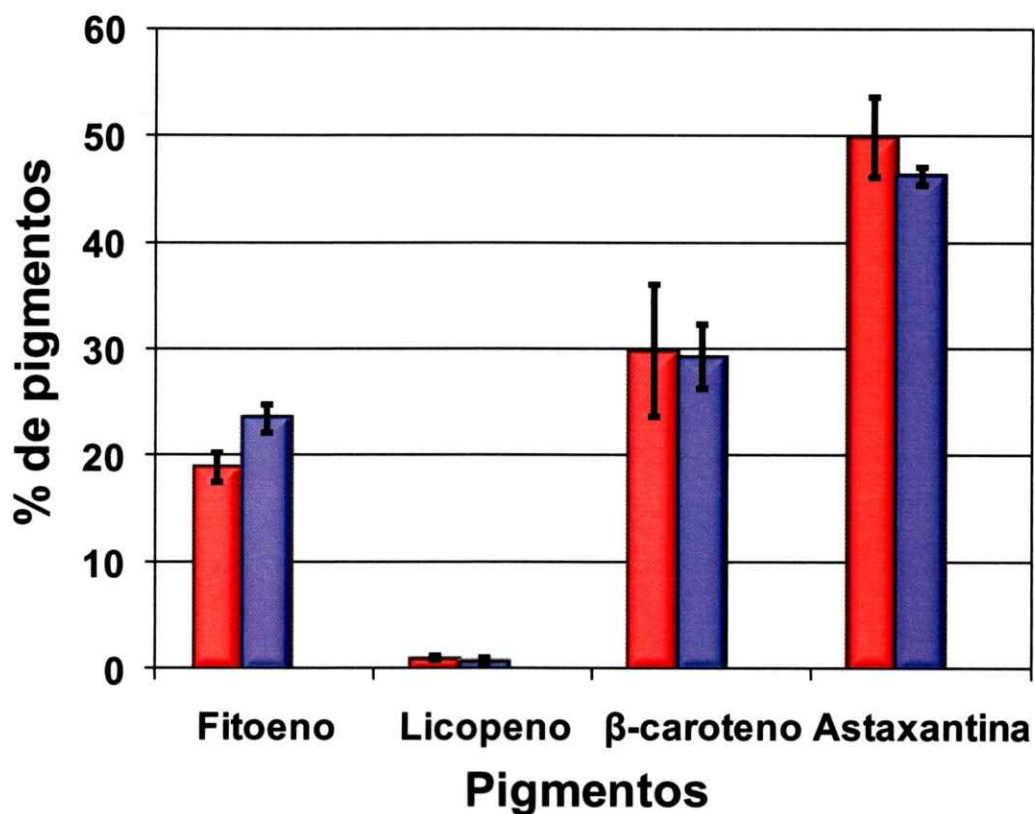


Figura 19. Composición de pigmentos de las diferentes cepas.

Se separaron y analizaron los pigmentos producidos por la cepa silvestre ■ (UCD 67-385) y la cepa mutante ■ (T-EHA) para el gen *crtE* mediante cromatografía líquida en fase reversa. Para cada cepa se determinó el porcentaje de cada uno de los pigmentos en el total producido. Se observó que para ambas cepas la composición de pigmentos era similar.

La cuantificación de los pigmentos indicó que la cepa silvestre produjo 68 ± 10 ppm y la cepa mutante T-EHA 40 ± 4 ppm, significando una disminución de un 42% aproximadamente de los pigmentos totales. El análisis de la composición de estos pigmentos mediante HPLC, no mostró diferencias significativas en la composición de ninguno de ellos.

3.4. Determinación de la actividad GGPP sintasa en *E. coli*.

Para determinar la actividad GGPP sintasa de la enzima codificada por el gen *crtE* de *X. dendrorhous*, se construyó un sistema reportero en *E. coli* (Misawa y col., 1990; Sandmann y col., 1999). Para esto, se clonó en nuestro laboratorio el clúster carotenogénico de *E. uredovora* de 6.088 pb en el vector pBAD33 de *E. coli* obteniéndose el plasmidio pDS1B. Este clúster carotenogénico está conformado por los genes *crtE*, *crtB*, *crtI*, *crtY* y *crtX* permitiendo la síntesis de β -caroteno a cepas de *E. coli* que lo portan (figura 20) (Fraser y col., 1992; Misawa y col., 1995; Schnurr y col., 1996; To y col., 1994).

Luego, se eliminó la actividad geranilgeranil difosfato sintasa de estas cepas, eliminando mediante delección el gen *crtE* de este clúster carotenogénico de *E. uredovora* y se complementó esta actividad expresando la potencial enzima GGPP sintasa de *X. dendrorhous* codificada por su gen *crtE*.

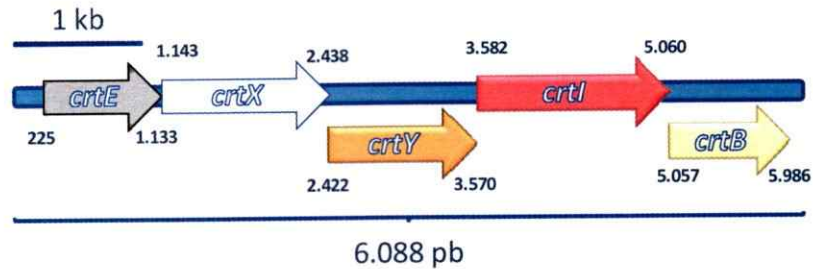
A**B**

Figura 20. Clúster carotenogénico de *E. uredoovora*.

A) Fragmento de gDNA de *E. uredoovora* de 6.088 pb que contiene el clúster carotenogénico de esta bacteria, compuestos por los genes *crtE*, *crtB*, *crtI*, *crtY* y *crtX*. Se indican las posiciones de inicio y término de cada uno de los genes. El gen *crtX* codifica para la enzima zeaxantina glicosilasa que no participa en la ruta de biosíntesis de β -caroteno. **B)** Ruta de biosíntesis de β -caroteno en *E. uredoovora*. *crtE*= GGPP sintasa, *crtB*= fitoeno sintasa, *crtI*= fitoeno desaturasa, *crtY*= licopeno β -ciclasa. El gen *crtZ* codifica a la enzima β -caroteno hidroxilasa que participa en la síntesis de zeaxantina en *E. uredoovora* pero que no ha sido clonado dentro del clúster carotenogénico.

3.4.1. Obtención de mutantes del gen *crtE* de *E. uredovora*.

Para eliminar el gen *crtE* del clúster carotenogénico de *E. uredovora*, se realizó un mapa de digestión virtual del plasmidio pDS1B y se seleccionaron las enzimas de restricción *SpeI* y *HpaI* que tienen sitios únicos de corte y liberan un fragmento de 1.269 pb correspondiente al gen *crtE*. La reacción de digestión se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa, desde donde se purificó un fragmento de 10.179 pb correspondiente al plasmidio lineal con la deleción del gen *crtE*. Los extremos generados por las enzimas de restricción fueron rellenados con la enzima DNA polimerasa I (fragmento Klenow) y el plasmidio se re-ligó y se utilizó para la transformación de *E. coli*. El plasmidio resultante se denominó pDS1BΔE (figura 21).

La cepa de *E. coli* que porta el plasmidio pDS1B presentan una coloración amarilla por la acumulación de β-caroteno. La cepa que porta el plasmidio con la deleción del gen *crtE* (pDS1BΔE) pierde la capacidad de producir este pigmento (Misawa y col., 1990).

3.4.2. Clonamiento del gen *crtE* de *X. dendrorhous* en un vector de expresión

Para complementar la actividad geranylgeranyl difosfato sintasa con la potencial enzima de *X. dendrorhous*, se clonó mediante PCR el cDNA del gen *crtE* de esta levadura en el plasmidio de expresión pET101/D-TOPO (pET-T). Para esto, se realizó una reacción de PCR utilizando como DNA molde el plasmidio pXD-mcrtE, que porta el cDNA del gen *crtE* y los partidores mcrtEXdF-TOPO y mcrtER. El producto de PCR se analizó por electroforesis en un gel de agarosa desde donde se purificó y se ligó al plasmidio pET-T obteniendo el plasmidio pT-EXd.

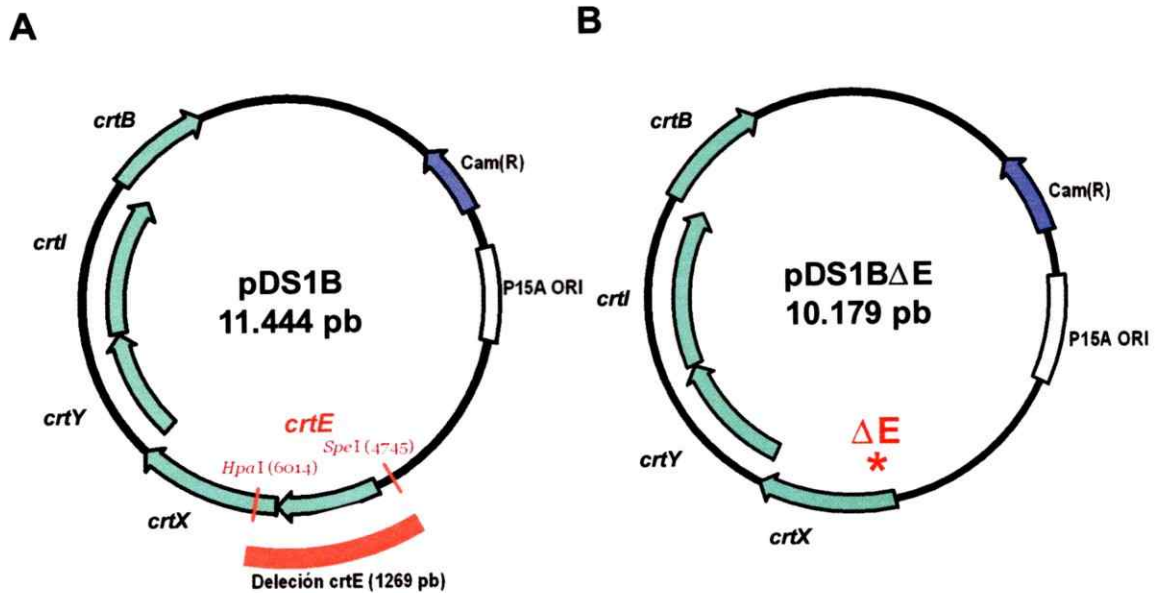


Figura 21. Plasmidios portadores del clúster carotenogénico de *E. uredoovora*.

A) Plasmidio pDS1B que porta el clúster carotenogénico de *E. uredoovora* constituido por los genes *crtE*, *crtB*, *crtI*, *crtY* y *crtX*. Se indican los sitios de corte de las enzimas *SpeI* y *HpaI*. **B)** Plasmidio pDS1BΔE que porta el clúster carotenogénico de *E. uredoovora* sin el gen *crtE*. * Se indica la eliminación del gen *crtE*.

Para confirmar que el sistema de complementación era funcional, se clonó el gen *crtE* de *E. uredoovora* en el plasmidio de expresión pET-T mediante PCR, obteniendo el plasmidio pT-EEu. Como control negativo, se clonó un inserto control de 700 pb proporcionado en el kit de expresión, obteniéndose el plasmidio pT-Ins (figura 22).

3.4.3. Obtención de los clones para los ensayos de complementación.

Para los ensayos de complementación, primero se transformó la cepa de *E. coli* BL21-Gold(DE3), que permite la expresión de los genes que son controlados por el promotor T7, con los plasmidios pDS1B y pDS1BΔE, obteniéndose las cepas DS1B y DS1BΔE respectivamente. Luego, la cepa DS1B se transformó con el plasmidio pT-Ins, obteniéndose el clon DS1B-Ins. Este clon se utilizó como control para determinar la capacidad de síntesis de pigmentos de esta cepa. Finalmente, la cepa DS1BΔE se transformó con los plasmidios pT-Ins, pT-EEu y pT-EXd, obteniéndose los clones DS1BΔE -Ins, DS1BΔE -EEu y DS1BΔE -EXd respectivamente (tabla 6). Así, los clones DS1B-Ins y DS1BΔE-EEu sintetizarían β-caroteno por tener todos los genes de *E. uredoovora* necesarios para su síntesis (*crtE*, *crtB*, *crtI*, *crtY*). En el caso del clon DS1BΔE-Ins se espera que no haya síntesis de β-caroteno por no tener el gen de *E. uredoovora* (*crtE*) que codifica a la enzima GGPP sintasa y para el caso del clon DS1BΔE-EXd se espera que, en condiciones de inducción, se sintetice β-caroteno si el gen *crtE* de *X. dendrorhous* (*crtE**) codifica para la enzima GGPP sintasa.

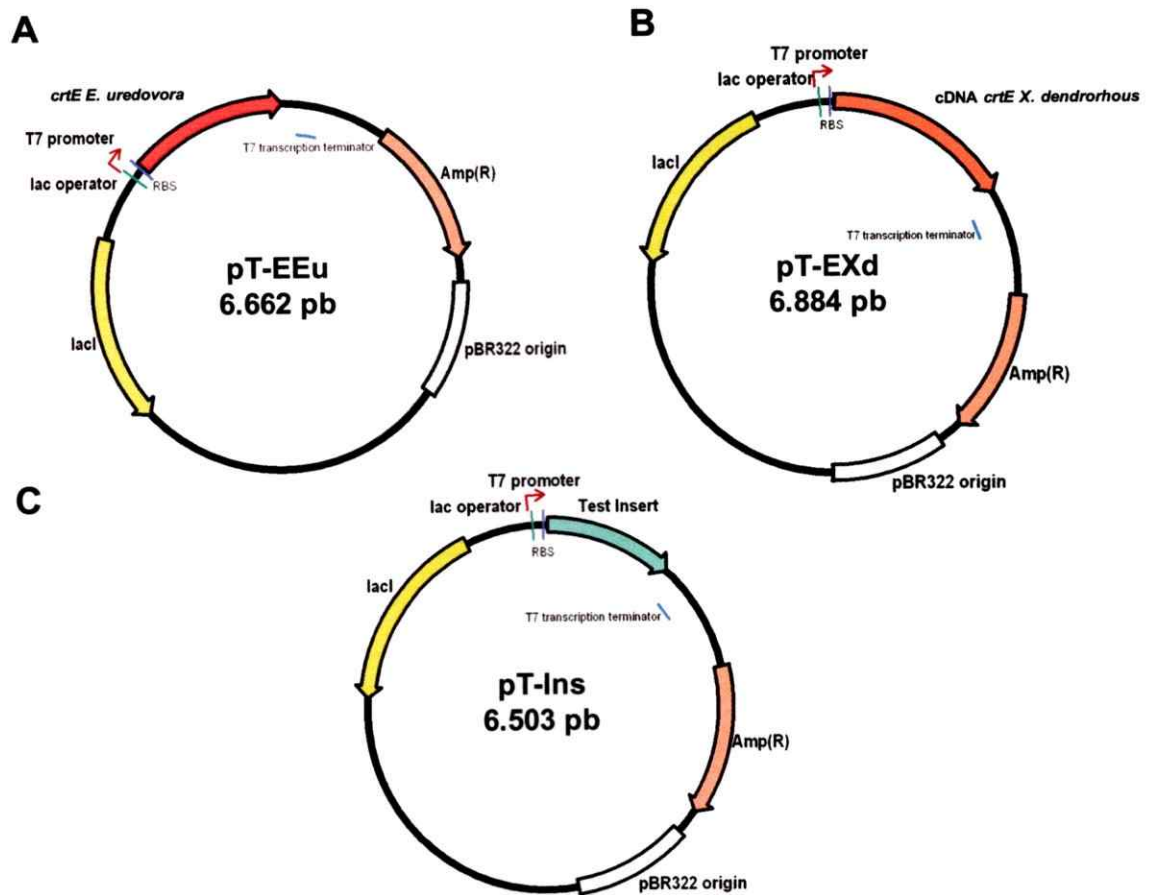


Figura 22. Plasmidios de expresión del gen *crtE*.

Plasmidios de expresión construidos para los ensayos de complementación. **A)** Plasmidio pET-T que porta el gen *crtE* de *E. uredovora*. Corresponde al control positivo de complementación. **B)** Plasmidio pET-T que porta el gen *crtE* de *X. dendrorhous*. **C)** Plasmidio pET-T que porta un inserto control (Test Insert). Corresponde al control negativo de complementación.

Tabla 6. Clones utilizados para los experimentos de complementación en *E. coli*.

Cepa receptora	Derivado pET101/D-TOPO	Clon obtenido	Genotipo (<i>crt</i>)	Pigmento
DS1B	pT-Ins	DS1B-Ins	E-B-I-Y	β -caroteno
	pT-Ins	DS1B Δ E-Ins	B-I-Y	-
DS1B Δ E	pT-EEu	DS1B Δ E-EEu	E-B-I-Y	β -caroteno
	pT-EXd	DS1B Δ E-EXd	E*-B-I-Y	γ β -caroteno?

* Gen *crtE* de *X. dendrorhous*.

3.4.4. Análisis de pigmentos.

Una vez terminado el ensayo de complementación, los cultivos fueron colectados para la determinación del peso seco celular y pigmentos producidos. Se cuantificó la cantidad de pigmento espectrofotométricamente (figura 23) y se analizó su composición por cromatografía líquida en fase reversa.

Se observó un aumento en la producción de pigmentos cuando se indujo la transcripción del gen *crtE* de *X. dendrorhous* (IPTG 1 mM), demostrando la actividad GGPP sintasa de la enzima codificada por éste. El análisis de los pigmentos corroboró que el único pigmento producido correspondía a β -caroteno.

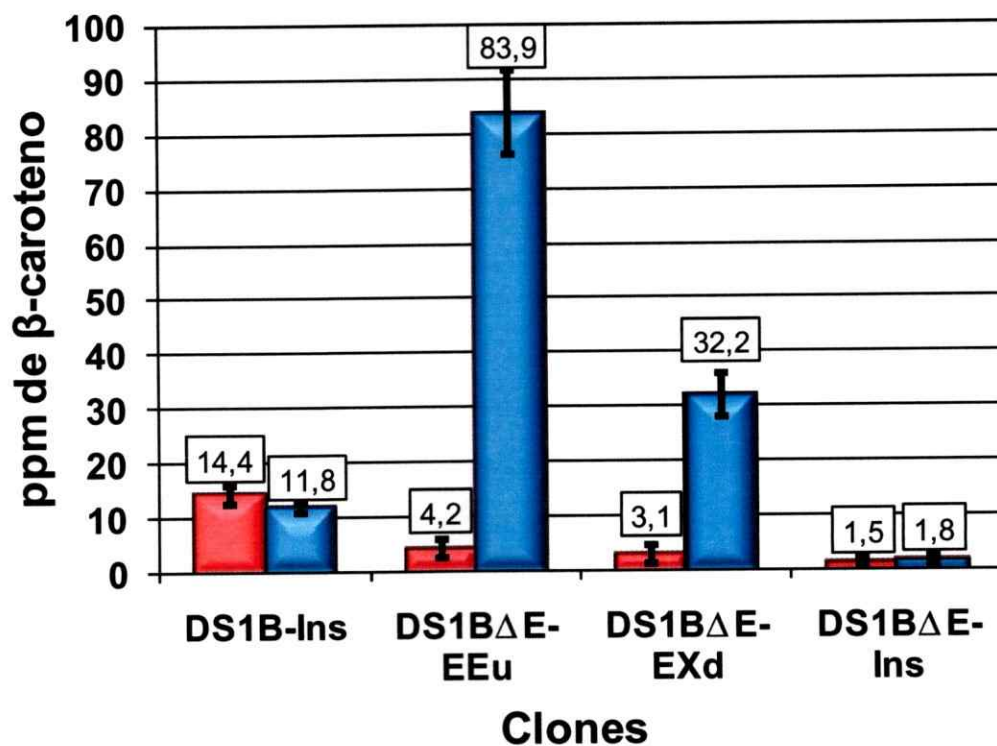


Figura 23. Cuantificación del β -caroteno producido.

Se cuantificaron los pigmentos producidos por las diferentes cepas de *E. coli* sin inducción (■) y con inducción (■), observando un aumento en la síntesis de éstos cuando se indujo la expresión del gen *crtE* de *E. uredoovora* (DS1BΔE-EEu) y *X. dendrorhous* (DS1BΔE-EXd). Los cultivos se indujeron con IPTG a una concentración final de 1 mM.

4. DISCUSIÓN

En la biosíntesis de GGPP a partir de IPP y DMAPP se distinguen 2 sistemas, los cuales se basan en la cantidad de enzimas que participan. En algunos organismos, la síntesis de GGPP depende sólo de la enzima GGPP sintasa, que cataliza la adición de los 3 grupos prenilos (IPP) al DMAPP (Chen y Poulter, 1993; Chia-Wei Wang, 1999; Ohnuma y col., 1998). En otros organismos, como *S. cerevisiae*, la síntesis del GGPP depende de la acción conjunta de las enzimas FPP y GGPP sintasa (Nagaki y col., 2004; Rohlin y col., 2001). En esta tesis, se comprobó la presencia en *X. dendrorhous* de los genes *FPS* y *crtE* que codificarían a las enzimas farnesil difosfato sintasa y geranilgeranil difosfato sintasa, respectivamente. La presencia de ambos genes en *X. dendrorhous* sugiere que la biosíntesis del GGPP a partir de IPP y DMAPP dependería de estas dos enzimas. Sin embargo, será importante determinar la verdadera participación de la enzima farnesil difosfato sintasa en la síntesis de GGPP. Para ello, se están construyendo cepas mutantes del gen *FPS*, utilizando la misma metodología empleada para obtener cepas mutantes del gen *crtE* y así demostrar su participación en la síntesis de carotenoides.

El análisis de la secuencia parcial del gen *FPS* de *X. dendrorhous* inicialmente se realizó utilizando como modelo la levadura basidiomicete *C. neoformans*, debido a que la organización estructural de genes ortólogos de ambos organismos es idéntica (igual relación exón-intrón) (Fell y Blatt, 1999). De esta manera se logró ubicar nuestra secuencia parcial en la región central del gen, evidenciando la presencia de 4 posibles intrones en esa zona (figura 24). Actualmente, estamos buscando la versión genómica y de cDNA completas del gen *FPS* en las genotecas disponibles en nuestro laboratorio (Marcoleta, 2007), para determinar la organización estructural de dicho gen.

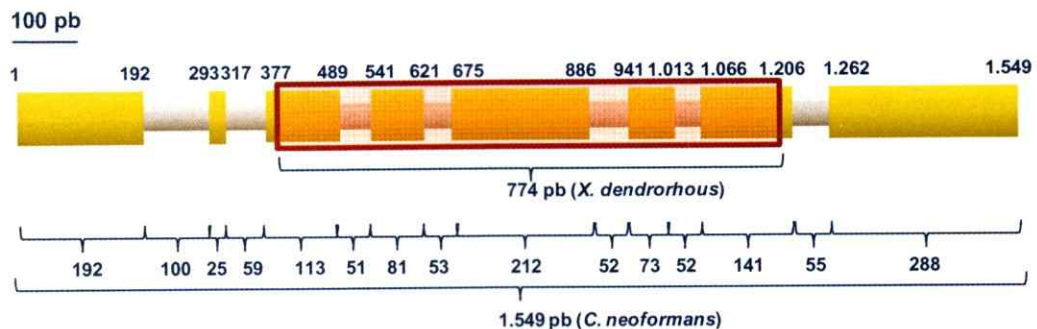


Figura 24. Análisis de la secuencia del gen *FPS* de *X. dendrorhous*.

Se compararon las secuencias del gen *FPS* de *C. neoformans* con su cDNA, determinando su relación exón-intrón en 8-7. Se utilizó esta comparación como molde para ubicar en ella la secuencia parcial del gen *FPS* de *X. dendrorhous*. La secuencia parcial de 774 pb se ubicaría en la zona central del gen, estando interrumpida por 4 intrones.

Para el caso del gen *crtE* de *X. dendrorhous*, la traducción de su ORF genera una enzima de 376 aminoácidos que presenta un dominio denominado Trans_IPPS_HT [*Trans-Isoprenyl Diphosphate Synthases, head-to-tail (HT) (1'-4) condensation reaction*] de 258 a.á. característico de las enzimas preniltransferasas del grupo I (Marchler-Bauer y col., 2007). El análisis de este dominio permitió definir 3 regiones [i), ii) e iii)] en donde se encuentran los aminoácidos esenciales para la actividad de la enzima (figura 25) (Ling y col., 2007). La región i) ubicada desde el a.á. 69 al 79 se denomina región determinante del largo de cadena ya que su secuencia determina el largo del isoprenoide a sintetizar por esta enzima (Tarshis y col., 1996). Se ha observado que en esta región las enzimas FPP sintasas tienen en la segunda posición fenilalanina, en cambio las enzimas GGPP sintasas y otras sintasas de isoprenoides de cadena más larga tienen serina, alanina o treonina (Ohnuma y col., 1996). La modificación puntual de este aminoácido permite a las enzimas FPP sintasas sintetizar isoprenoides de cadena más larga (Kojima y col., 2000). Las regiones ii) e iii) ubicadas desde el a.á. 80 al 94 y 252 al 271 respectivamente, poseen los residuos que forman el sitio activo de la proteína, requeridos para la interacción entre el sustrato alílico (DMAPP, GPP, FPP, etc.) asociado a Mg^{+2} y el sustrato homoalílico (IPP) (Ling y col., 2007).

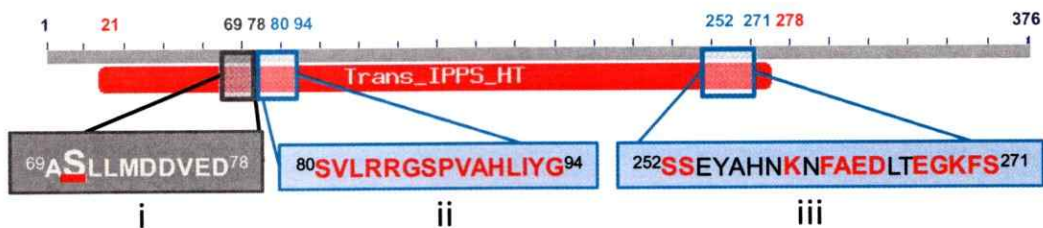


Figura 25. Análisis del dominio Trans_IPPS_HT de la enzima GGPP sintasa de *X. dendrorhous*.

En la secuencia aminoacídica deducida de 376 aá. de la enzima GGPP sintasa de *X. dendrorhous* se ubicó el dominio Trans_IPPS_HT desde el aá. 21 al 278. Dentro de este dominio se ubicaron 3 regiones: i) desde el aá. 69 al 78, ii) desde el aá. 80 al 94, iii) desde el aá. 252 al 271. En la región i) se resalta el segundo aá. correspondiente a serina presente en las enzimas GGPP sintasas. En la región ii) e iii) se resaltan en rojo los aá. que forman el sitio activo.

La comparación de nuestras secuencias del gen *crtE* con aquella publicada en la patente WO9723633 de la cepa de *X. dendrorhous* CBS-6938, que no había sido identificada como cDNA o gDNA, indicó que esta última correspondería a la versión cDNA. Adicionalmente, la comparación de las secuencias de ambos cDNAs evidenció 4 diferencias puntuales que serían de carácter silenciosas (tabla 7). De hecho, la comparación entre la secuencia aminoacídica deducida de ambos cDNAs indica que la modificación en la posición 804 no conlleva un cambio en el aminoácido y las modificaciones en las posiciones 1.037, 1.041 y 1.059 significan cambios por aminoácidos similares. Además, los cambios de aminoácidos están ubicados en las posiciones 346, 347 y 353 de la proteína, respectivamente, en una región que no sería determinante para la actividad de ésta.

Por otro lado, la obtención de cepas transformantes de *X. dendrorhous* por recombinación homóloga y reemplazo del gen blanco, genera cepas mutantes del gen cuando éste se encuentra en copia única en el genoma de la levadura, esto es, en condición haploide. En *X. dendrorhous* se han encontrado evidencias genéticas que sugieren su condición diploide (Alcaíno, 2002; Carmona, 2007; León, 2000; Niklitschek, 2007), aunque en algunos casos se ha observado el fenómeno de aneuploidía para algunos genes (Retamales, 2004). Para el caso del gen *crtE*, análisis posteriores de las cepas transformantes indican que estas cepas serían heterocigotas, portadoras de un alelo silvestre y un alelo mutado (*crtE/crtE::hph*). Sin embargo, se ha intentado por diferentes métodos obtener cepas mutantes homocigotas del gen *crtE* (*crtE::hph/crtE::hph*) sin resultados satisfactorios.

Tabla 7. Variaciones de secuencia del gen *crtE* de *X. dendrorhous*

Posición	Base (patente / laboratorio)	Aminoácido
804	G/A	Gly 268 Gly
1.037	G/A	Arg 346 Lys
1.041	G/T	Met 347 Ile
1.059	T/G	Asp 353 Glu

En otras levaduras como *S. cerevisiae* y *N. crassa*, se ha observado la esencialidad de los genes ortólogos al gen *crtE* de *X. dendrorhous* (Carattoli y col., 1991; Ye y col., 2007). Esta evidencia, junto a la imposibilidad de obtener cepas mutantes, sugieren que este gen sería esencial para el crecimiento de la levadura.

Desde el punto de vista de la participación del gen *crtE* en la ruta de biosíntesis de astaxantina en *X. dendrorhous* y de las implicancias que tienen mutaciones en él, se puede deducir su gran importancia en este proceso. Así, cuando se le compara con otros genes de la vía (*crtYB*, *crtI* y *crtS*), en los cuales es posible obtener cepas mutantes heterocigotas y homocigotas, todas resultan en una disminución en la cantidad de pigmentos producidos. Sin embargo, las cepas heterocigotas para los genes *crtYB*, *crtI* y *crtS* conducen a diferencias en la composición de los pigmentos con respecto a la cepa silvestre (Niklitschek y col., 2008; Verdoes y col., 2003). No obstante, las cepas heterocigotas para el gen *crtE* sólo producen una menor cantidad de pigmento, sin afectar la composición de los mismos. La disminución en la cantidad de pigmentos producidos por las cepas heterocigotas para el gen *crtE*, se debería al menor flujo de GGPP hacia la ruta de biosíntesis de astaxantina, siendo éste un potencial blanco de modificación y mejora biotecnológica de la biosíntesis de astaxantina.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran la gran importancia que tiene la etapa intermedia de biosíntesis de terpenos en la síntesis de astaxantina en *X.*

dendrorhous. La modificación de esta etapa, por ejemplo aumentando el número de copia de los genes que participan en ella, podría aumentar la cantidad de astaxantina producida. Esto es muy relevante, ya que la modificación de los otros genes descritos relacionados con las etapas posteriores de la biosíntesis de astaxantina en *X. dendrorhous* han resultado en modificaciones de la composición de los pigmentos producidos, pero no su cantidad.

5. CONCLUSIONES.

- La presencia de los genes *FPS* y *crtE* en *X. dendrorhous* sugiere que la biosíntesis del GGPP a partir de IPP y DMAPP se realizaría en dos pasos, dependiente de las enzimas farnesil difosfato sintasa y geranylgeranyl difosfato sintasa codificadas por sus respectivos genes.
- La imposibilidad de obtener cepas de *X. dendrorhous* mutantes homocigotas para el gen *crtE*, sugiere que este gen sería esencial para el crecimiento de esta levadura.
- Las cepas de *X. dendrorhous* mutantes heterocigotas para el gen *crtE* producen un 42% menos de pigmentos que la cepa silvestre, posiblemente por una disminución en la canalización de sustratos hacia la ruta de biosíntesis de los carotenoides.
- El gen *crtE* de *X. dendrorhous* complementa la mutación del gen *crtE* de *E. uredovora* en las cepas de *E. coli* que portan el clúster carotenogénico, demostrando que codificaría una enzima con actividad geranylgeranyl difosfato sintasa.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- Adrio, J. L., Lopez, M., Casqueiro, J., Fernandez, C., y Veiga, M. 1995. Electrophoretic karyotype of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *Curr. Genet.* 27:447-450.
- Alcaíno, J. 2002. Organización estructural del gen de la fitoeno sintasa en el genoma de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex. *Phaffia rhodozyma*). Seminario de título para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- Alvarez, V., Rodriguez-Saiz, M., de la Fuente, J. L., Gudina, E. J., Godio, R. P., Martin, J. F., y Barredo, J. L. 2006. The *crtS* gene of *Xanthophyllomyces dendrorhous* encodes a novel cytochrome-P450 hydroxylase involved in the conversion of beta-carotene into astaxanthin and other xanthophylls. *Fungal Genet. Biol.* 43:261-272.
- An, G. H., Schuman, D. B., y Johnson, E. A. 1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* Mutants with Increased Astaxanthin Content. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:116-124.
- An, G. H., Cho, M. H., y Johnson, E. A. 1999. Monocyclic carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*). *J. Biosci. Bioeng.* 88:189-193.
- Armstrong, G. A. 1994. Eubacteria show their true colors: genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *J. Bacteriol.* 176:4795-4802.
- Arrach, N., Fernandez-Martin, R., Cerda-Olmedo, E., y Avalos, J. 2001. A single gene for lycopene cyclase, phytoene synthase, and regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:1687-1692.
- Barkovich, R., y Liao, J. C. 2001. Metabolic engineering of isoprenoids. *Metab. Eng.* 3:27-39.
- Boyle, J. S., y Lew, A. M. 1995. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends Genet.* 11:8.
- Britton, G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* 9:1551-1558.
- Calo, P., Miguel, T., Velázquez, J. B., y Villa, T. G. 1995. Mevalonic acid increases *trans*-astaxanthin and carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Lett.* 17:575-578.
- Canizares-Villanu, R. O., Rios-Leal, E., Olvera Ramirez, R., Ponce Noyola, T., y Marquez Rocha, F. 1998. Microbial sources of pigments. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 40:87-107.
- Carattoli, A., Romano, N., Ballario, P., Morelli, G., y Macino, G. 1991. The *Neurospora crassa* carotenoid biosynthetic gene (albino 3) reveals highly conserved regions among prenyltransferases. *J. Biol. Chem.* 266:5854-5859.

- Carmona, M. 2007. Caracterización estructural del gen *AST* de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex. *Phaffia rhodozyma*) Tesis para optar al Grado de Magíster en Ciencias Biológicas Mención en Genética. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- Chen, A., y Poulter, C. D. 1993. Purification and characterization of farnesyl diphosphate/geranylgeranyl diphosphate synthase. A thermostable bifunctional enzyme from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Biol. Chem.* 268:11002-11007.
- Chia-Wei Wang, M.-K. O. J. C. L. 1999. Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 62:235-241.
- Choi, S. K., Kim, J. H., Park, Y. S., Kim, Y. J., y Chang, H. I. 2007. An efficient method for the extraction of astaxanthin from the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17:847-852.
- Chomczynski, P., y Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Dominguez-Bocaneg, A. R., Ponce-Noyola, T., y Torres-Munoz, J. A. 2007. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75:783-791.
- Dong, Q. L., Zhao, X. M., Ma, H. W., Xing, X. Y., y Sun, N. X. 2006. Metabolic flux analysis of the two astaxanthin-producing microorganisms *Haematococcus pluvialis* and *Phaffia rhodozyma* in the pure and mixed cultures. *Biotechnol. J.* 1:1283-1292.
- Echavarri-Erasun, C., y Johnson, E. A. 2004. Stimulation of astaxanthin formation in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* by the fungus *Epicoccum nigrum*. *FEMS Yeast Res.* 4:511-519.
- Fang, T. J., y Cheng, Y. S. 1992. Isolation of astaxanthin over-producing mutants of *Phaffia rhodozyma* and their fermentation kinetics. *Chin. J. Microbiol. Immunol.* 25:209-222.
- Fell, J. W., y Blatt, G. M. 1999. Separation of strains of the yeasts *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Phaffia rhodozyma* based on rDNA IGS and ITS sequence analysis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23:677-681.
- Fraser, P. D., Misawa, N., Linden, H., Yamano, S., Kobayashi, K., y Sandmann, G. 1992. Expression in *Escherichia coli*, purification, and reactivation of the recombinant *Erwinia uredovora* phytoene desaturase. *J. Biol. Chem.* 267:19891-19895.
- Golubev, W. I. 1995. Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Yeast.* 11:101-110.
- Gu, W. L., An, G. H., y Johnson, E. A. 1997. Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19:114-117.

- Hermosilla, G., Martinez, C., Retamales, P., Leon, R., y Cifuentes, V. 2003. Genetic determination of ploidy level in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Antonie Leeuwenhoek*. 84:279-287.
- Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L., y Goycoolea, F. M. 2006. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 46:185-196.
- Jiang, Y., Proteau, P., Poulter, D., y Ferro-Novick, S. 1995. *BTS1* encodes a geranylgeranyl diphosphate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 270:21793-21799.
- Johnson, E. A., Villa, T. G., Lewis, M. J., y Phaff, H. J. 1978. Simple method for the isolation of astaxanthin from the basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma*. *Appl. Environ. Microbiol.* 35:1155-1159.
- Johnson, E. A. 2003. *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. *Int. Microbiol.* 6:169-174.
- Kanehisa, M. 2002. The KEGG database. *Novartis Found Symp.* 247:91-101; discussion 101-103, 119-128, 244-152.
- Kim, J. H., Kang, S. W., Kim, S. W., y Chang, H. I. 2005. High-level production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant JH1 using statistical experimental designs. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69:1743-1748.
- Kojima, N., Sitthithaworn, W., Viroonchatapan, E., Suh, D. Y., Iwanami, N., Hayashi, T., y Sankaw, U. 2000. Geranylgeranyl diphosphate synthases from *Scoparia dulcis* and *Croton sublyratus*. cDNA cloning, functional expression, and conversion to a farnesyl diphosphate synthase. *Chem. Pharm. Bull.* 48:1101-1103.
- Lange, B. M., Rujan, T., Martin, W., y Croteau, R. 2000. Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:13172-13177.
- Lee, P. C., y Schmidt-Dannert, C. 2002. Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60:1-11.
- León, R. 2000. Aislamiento y caracterización del gen de la fitoeno deshidrogenasa de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex *Phaffia rhodozyma*). Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias Mención en Biología. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- 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.* 56:2944-2945.
- Liang, P. H., Ko, T. P., y Wang, A. H. 2002. Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *Eur. J. Biochem.* 269:3339-3354.
- Ling, Y., Li, Z.-H., Miranda, K., Oldfield, E., y Moreno, S. N. J. 2007. The Farnesyl-diphosphate/Geranylgeranyl-diphosphate Synthase of *Toxoplasma gondii* Is a Bifunctional Enzyme and a Molecular Target of Bisphosphonates. *J. Biol. Chem.* 282:30804-30816.

- Lodato, P. 2002. Estudio de la expresión de genes de la carotenogénesis en *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex. *Phaffia rhodozyma*). Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias Mención en Biología. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- Lodato, P., Alcaíno, J., Barahona, S., Retamales, P., y Cifuentes, V. 2003. Alternative Splicing of Transcripts from *crtI* and *crtYB* Genes of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4676-4682.
- Lodato, P., Alcaíno, J., Barahona, S., Retamales, P., Jiménez, A., y Cifuentes, V. 2004. Study of the expression of carotenoid biosynthesis genes in wild-type and deregulated strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Ex.: *Phaffia rhodozyma*). *Biol. Res.* 37:83-93.
- Lodato, P., Alcaíno, J., Barahona, S., Niklitschek, M., Carmona, M., Wozniak, A., Baeza, M., Jiménez, A., y Cifuentes, V. 2007. Expression of the carotenoid biosynthesis genes in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biol. Res.* 40:73-84.
- Marcoleta, A. 2007. Identificación y caracterización de genes que se expresan en el metabolismo fermentativo de *Xanthophyllomyces dendrorhous* Seminario de título para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- Marchler-Bauer, A., y Bryant, S. H. 2004. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.* 32:W327-331.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hao, L., He, S., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Ke, Z., Krylov, D., Lanczycki, C. J., Liebert, C. A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G. H., Mullokandov, M., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Yin, J. J., Zhang, D., y Bryant, S. H. 2007. CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res.* 35:D237-240.
- Martin, J. F., Gudina, E., y Barredo, J. L. 2008. Conversion of beta-carotene into astaxanthin: Two separate enzymes or a bifunctional hydroxylase-ketolase protein? *Microb. Cell Fact.* 7:3.
- Martin, V. J., Pitera, D. J., Withers, S. T., Newman, J. D., y Keasling, J. D. 2003. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat. Biotechnol.* 21:796-802.
- McCarthy, S. S., Kobayashi, M. C., y Niyogi, K. K. 2004. White Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* Are Defective in Phytoene Synthase. *Genetics.* 168:1249-1257.
- McGarvey, D. J., y Croteau, R. 1995. Terpenoid Metabolism. *Plant Cell.* 7:1015-1026.
- Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K., y Harashima, K. 1990. Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172:6704-6712.

- Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwar, S., Saito, T., Ohtani, T., y Miki, W. 1995. Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *J. Bacteriol.* 177:6575-6584.
- Miura, Y., Kondo, K., Saito, T., Shimada, H., Fraser, P. D., y Misawa, N. 1998. Production of the carotenoids lycopene, beta -carotene, and astaxanthin in the food yeast *Candida utilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1226-1229.
- Nagaki, M., Miki, Y., Nakada, M., Kawakami, J., Kitahara, H., Maki, Y., Gotoh, Y., Nishino, T., y Koyama, T. 2004. Substrate specificities of several prenyl chain elongating enzymes with respect to 4-methyl-4-pentenyl diphosphate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68:2070-2075.
- Nakano, T., Kanmuri, T., Sato, M., y Takeuchi, M. 1999. Effect of astaxanthin rich red yeast (*Phaffia rhodozyma*) on oxidative stress in rainbow trout. *Biochim. Biophys. Acta.* 1426:119-125.
- Narita, K., Ishida, C., Takeuchi, Y., Ohto, C., Ohnuma, S., y Nishino, T. 2001. Mutant prenyl diphosphate synthase, DNA encoding mutant prenyl diphosphate synthase and process for producing mutant prenyl phosphate synthase. United States. Patente 6225096.
- Nellis, H. J., y De Leenheer, A. P. 1989. Profiling and quantitation of bacterial carotenoids by liquid chromatography and photodiode array detection. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:3065-3071.
- Ni, H., Chen, Q. H., Ruan, H., Yang, Y. F., Li, L. J., Wu, G. B., Hu, Y., y He, G. Q. 2007. Studies on optimization of nitrogen sources for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 8:365-370.
- Niklitschek, M. 2007. Desarrollo de un casete de resistencia a antibiótico en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Seminario de título para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- Niklitschek, M., Alcaíno, J., Barahona, S., Sepulveda, D., Lozano, C., Carmona, M., Marcoleta, A., Martínez, C., Lodato, P., Baeza, M., y Cifuentes, V. 2008. Genomic organization of the structural genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biol. Res.* 41:93-108.
- Ogura, K., y Koyama, T. 1998. Enzymatic aspects of isoprenoid chain elongation. *Chem. Rev.* 98:1263-1276.
- 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.* 269:14792-14797.
- Ohnuma, S., Nakazawa, T., Hemmi, H., Hallberg, A., Koyama, T., Ogura, K., y Nishino, T. 1996. Conversion from Farnesyl Diphosphate Synthase to Geranylgeranyl Diphosphate Synthase by Random Chemical Mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 271:10087-10095.

- Ohnuma, S., Hemmi, H., Koyama, T., Ogura, K., y Nishino, T. 1998. Recognition of allylic substrates in *Sulfolobus acidocaldarius* geranylgeranyl diphosphate synthase: analysis using mutated enzymes and artificial allylic substrates. *J. Biochem.* 123:1036-1040.
- Ojima, K., Breitenbach, J., Visser, H., Setoguchi, Y., Tabata, K., Hoshino, T., van den Berg, J., y Sandmann, G. 2006. Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a beta-carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. *Mol. Genet. Genomics.* 275:148-158.
- Okada, K., Saito, T., Nakagawa, T., Kawamukai, M., y Kamiya, Y. 2000. Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in arabidopsis. *Plant Physiology.* 122:1045-1056.
- Plochocka, D., Karst, F., Swiezewska, E., y Szkopinska, 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.
- Retamales, P., Hermosilla, G., Leon, R., Martinez, C., Jimenez, A., y Cifuentes, V. 2002. Development of the sexual reproductive cycle of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *J. Microbiol. Methods.* 48:87-93.
- Retamales, P. 2004. Estudio del mecanismo de inducción de la fase sexuada del ciclo reproductivo de *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias Mención en Microbiología. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- Rohlin, L., Oh, M. K., y Liao, J. C. 2001. Microbial pathway engineering for industrial processes: evolution, combinatorial biosynthesis and rational design. *Curr. Opin. Microbiol.* 4:330-335.
- Ruzicka, L. 1953. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS).* 9:357-367.
- Sacchettini, J. C., y Poulter, C. D. 1997. BIOCHEMISTRY: Creating Isoprenoid Diversity. *Science.* 277:1788-1789.
- Sambrook, J., y Russell, D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sandmann, G., Albrecht, M., Schnurr, G., Knorz, O., y Boger, P. 1999. The biotechnological potential and design of novel carotenoids by gene combination in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 17:233-237.
- Santopietro, L. M., y Kula, M. R. 1998. Studies of astaxanthin biosynthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). Effect of inhibitors and low temperature. *Yeast.* 14:1007-1016.
- Schnurr, G., Misawa, N., y Sandmann, G. 1996. Expression, purification and properties of lycopene cyclase from *Erwinia uredovora*. *Biochem. J.* 315 (Pt 3):869-874.
- Schroeder, W. A., y Johnson, E. A. 1993. Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* 139:907-912.

- Schroeder, W. A., y Johnson, E. A. 1995. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *J. Biol. Chem.* 270:18374-18379.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 98:503-517.
- Takimoto, T., Takahashi, K., y Akiba, Y. 2007. Effect of dietary supplementation of astaxanthin by *Phaffia rhodozyma* on lipid peroxidation, drug metabolism and some immunological variables in male broiler chicks fed on diets with or without oxidised fat. *Br. Poult. Sci.* 48:90-97.
- Tarshis, L. C., Proteau, Philip J., Kellogg, Brenda A., Sacchettini, James C., y Poulter, C. D. 1996. Regulation of product chain length by isoprenyl diphosphate synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:15018-15023.
- To, K. Y., Lai, E. M., Lee, L. Y., Lin, T. P., Hung, C. H., Chen, C. L., Chang, Y. S., y Liu, S. T. 1994. Analysis of the gene cluster encoding carotenoid biosynthesis in *Erwinia herbicola* Eho13. *Microbiology.* 140:331-339.
- Verdoes, J. C., Misawa, N., y van Ooyen, A. J. 1999a. Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnol. Bioeng.* 63:750-755.
- Verdoes, J. C., Krubasik, K. P., Sandmann, G., y van Ooyen, A. J. 1999b. Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Mol. Gen. Genet.* 262:453-461.
- Verdoes, J. C., Sandmann, G., Visser, H., Diaz, M., van Mossel, M., y van Ooyen, A. J. 2003. Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3728-3738.
- Verwaal, R., Wang, J., Meijnen, J.-P., Visser, H., Sandmann, G., van den Berg, J. A., y van Ooyen, A. J. J. 2007. High-level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:4342-4350.
- Visser, H., van Ooyen, A. J., y Verdoes, J. C. 2003. Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *FEMS Yeast Res.* 4:221-231.
- Wang, G. Y., y Keasling, J. D. 2002. Amplification of HMG-CoA reductase production enhances carotenoid accumulation in *Neurospora crassa*. *Metab. Eng.* 4:193-201.
- Ye, Y., Fujii, M., Hirata, A., Kawamukai, M., Shimoda, C., y Nakamura, T. 2007. Geranylgeranyl diphosphate synthase in fission yeast is a heteromer of farnesyl diphosphate synthase (FPS), *Fps1*, and an FPS-like Protein, *Spo9*, essential for sporulation. *Mol. Biol. Cell.* 18:3568-3581.

7. ANEXO.



Genomic organization of the structural genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*

MAURICIO NIKLITSCHKE¹, JENNIFER ALCAÍNO¹, SALVADOR BARAHONA¹,
DIONISIA SEPÚLVEDA¹, CARLA LOZANO¹, MARISELA CARMONA¹,
ANDRÉS MARCOLETA¹, CLAUDIO MARTÍNEZ², PATRICIA LODATO¹,
MARCELO BAEZA¹ and VÍCTOR CIFUENTES^{1*}

¹ Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

² Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Santiago de Chile.

ABSTRACT

The cloning and nucleotide sequence of the genes (*idi*, *crtE*, *crtYB*, *crtI* and *crtS*) controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of the wild-type ATCC 24230 strain of *Xanthophyllomyces dendrorhous* in their genomic and cDNA version were obtained. The *idi*, *crtE*, *crtYB*, *crtI* and *crtS* genes were cloned, as fragments of 10.9, 11.5, 15.8, 5.9 and 4 kb respectively. The nucleotide sequence data analysis indicates that the *idi*, *crtE*, *crtYB*, *crtI* and *crtS* genes have 4, 8, 4, 11, and 17 introns and 5, 9, 5, 12 and 18 exons respectively. In addition, a highly efficient site-directed mutagenesis system was developed by transformation by integration, followed by mitotic recombination (the double recombinant method). Heterozygote *idi* (*idi⁺idi⁻::hph*), *crtE* (*crtE⁺crtE⁻::hph*), *crtYB* (*crtYB⁺crtYB⁻::hph*), *crtI* (*crtI⁺crtI⁻::hph*) and *crtS* (*crtS⁺crtS⁻::hph*) and homozygote mutants *crtYB* (*crtYB⁻::hph/crtYB⁻::hph*), *crtI* (*crtI⁻::hph/crtI⁻::hph*) and *crtS* (*crtS⁻::hph/crtS⁻::hph*) were constructed. All the heterozygote mutants have a pale phenotype and produce less carotenoids than the wild-type strain. The genetic analysis of the *crtYB*, *crtI* and *crtS* loci in the wild-type, heterozygote, and homozygote give evidence of the diploid constitution of ATCC 24230 strains. In addition, the cloning of a truncated form of the *crtYB* that lacks 153 amino acids of the N-terminal region derived from alternatively spliced mRNA was obtained. Their heterologous expression in *Escherichia coli* carrying the carotenogenic cluster of *Erwinia uredovora* result in trans-complementation and give evidence of its functionality in this bacterium, maintaining its phytoene synthase activity but not the lycopene cyclase activity.

Key terms: astaxanthin biosynthesis, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Phaffia rhodozyma*.

INTRODUCTION

In nature, carotenoids are produced on a large scale: over 100 million tons per year. In addition, these pigments are synthesized in a wide variety of structures by plants, algae, bacteria and fungi. One of them, astaxanthin, is the principal carotenoid responsible for the orange-red color of marine invertebrates, fish, and birds and is primarily produced by phytoplankton and the red basidiomycetous yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Andrewes et al., 1976; Johnson and Lewis, 1979; Miller et al., 1976; Johnson, 2003).

In this yeast, astaxanthin, like other carotenoids, is a terpenoid pigment that is produced by the terpenoid biosynthetic pathway from the basic C5-isoprene unit isopentenyl pyrophosphate (IPP) and its isomer dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP), produced by the isopentenyl pyrophosphate isomerase enzyme encoded by the *idi* gene. In a following step, DMAPP and IPP are condensed to geranyl pyrophosphate, farnesyl, and geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP), possibly through the action of farnesyl pyrophosphate synthase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase encoded by the *fps*

* Corresponding Author: Víctor Cifuentes, Casilla 653, Santiago, Chile; Tel: 56-2-9787346; Fax: 56-2-2727363 ; E-mail: vcifuentes@uchile.cl

and *crtE* genes, respectively. Two GGPP molecules are condensed to phytoene by the phytoene synthase enzyme encoded by the *crtYB* gene, representing the first specific step in the carotenoid biosynthesis. Subsequently, via four desaturations by the action of the phytoene desaturase encoded by the *crtI* gene, lycopene is produced, which is converted to β -carotene by the lycopene cyclase activity encoded by the *crtYB* gene after two cyclization reactions. Finally β -carotene is oxidized to astaxanthin by the product of the *crtS* gene.

The *crtYB* and *crtI* genes were isolated from a cDNA library of the strain CBS 6938 of *X. dendrorhous* by heterologous complementation in *Escherichia coli* strains carrying carotenoid biosynthesis genes from the bacteria *Erwinia uredovora* (Verdoes et al., 1999a, Verdoes et al., 1999b). In addition, in the wild-type ATCC 24230 strain of *X. dendrorhous*, two unexpected cDNA of *crtYB* and *crtI* genes have been isolated that correspond to alternative spliced variants, which have numerous stop codons in their sequence (Lodato et al., 2003). The ratio of mature to alternative mRNA for the *crtI* gene decreased as a function of the age of the culture, while the carotenoids content increased (Lodato et al., 2003). Furthermore, the expression at the mRNA level of the carotenoid biosynthesis *idi*, *crtE*, *crtYB*, *crtI*, and *crtS* genes from *X. dendrorhous* was studied by RT-PCR (Lodato et al. 2003; 2004 and 2007). However, little is known about the genomic organization of these genes in this yeast.

In this work, we cloned the *idi*, *crtE*, *crtYB*, *crtI*, and *crtS* genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway and their respective cDNAs and determined their genetic organization by sequence analysis and electrophoretic karyotyping. The function of the *crtYB*, *crtI*, and *crtS* genes was inferred from site-directed mutagenesis.

MATERIALS AND METHODS

Strains, media, plasmid and genomic library

All strains used in this study are listed in Table I and the plasmids in Table II.

The *X. dendrorhous* wild-type strain ATCC 24230 was used to obtain genomic DNA for the construction of the genome library and site-directed mutagenesis. *E. coli* strain DH-5 α was used for the propagation of plasmids and the genomic libraries of *X. dendrorhous*. Three genomic libraries of wild-type *X. dendrorhous* were used in this study. The first one contains partially digested *Bam*HI DNA fragments inserted in the *Bam*HI site of the YIp5 vector. The other two partial genomic libraries contain *Eco*RV or *Pst*I DNA fragments in the *Eco*RV or *Pst*I sites of the Bluescript SK- plasmid respectively.

X. dendrorhous wild-type strain was grown at 22 °C in baffled flasks containing YM medium in an orbital shaker at 100 rpm.

The DNA fragment of 3558 bp containing the *crtI* gene of *X. dendrorhous* carried by pL22 plasmid was amplified by PCR using primers PHA1 (5' AAGCTTA AACTGACGTGCC TC 3') and PHA4 (5'GAATTCAGAAAGCAAGAAC 3').

The *E. coli*-transformed cells were plated on selective Luria-Bertani agar plates (Sambrook et al., 1989) and incubated at 37°C overnight. These plates contained ampicillin (100 μ g/ml) for plasmid selection and 40 μ l of a 2% solution of X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) for selection of recombinant clones. The *X. dendrorhous* transformed cells were plated on YM containing 10 μ g/ml of hygromycin B.

cDNA synthesis and cloning

For the reverse transcription (RT) reaction, total RNA was purified from cellular pellets obtained from 40 ml aliquots of culture by a modified protocol of Chomczynski and Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987; Lodato et al., 2004). The total RNA concentration was quantified at 260 nm, and the integrity of the RNA was checked in denaturant agarose gel electrophoresis. The RNA sample was then treated with 1U of DNase I (Roche) in 2.5 mM MgCl₂ at 25°C for 30 min. The reaction was stopped by the addition of EDTA at 2.5 mM final concentration and heating at 65°C for 15

min. The RT reaction was performed in 25 μ l final volume with 3 μ g of total RNA, 75 pmoles oligodT15-18, 0.5 mM of dNTPs and 200 U of M-MLV reverse transcriptase (Promega) (Lodato et al., 2003, 2004). The reaction mixture was incubated at 42°C for 60 min and then heated to 65°C for 10 min. For the amplification of double-stranded cDNA of carotenoid biosynthesis genes, PCR reactions were performed according to the experimental conditions previously described (Lodato et al., 2003, 2004) in a final volume of 25 μ l containing 2 U of *Pfu*

polimerase (Stratagene), 2.5 μ l of 10 X *Pfu* buffer, 0.5 μ l of 10 mM dNTPs, 1 μ l of 50 mM $MgCl_2$, 1 μ l of 25 μ M of each primer, and 2 μ l of RT reaction product, and the final volume was adjusted with nuclease-free water. Amplification was performed in a DNA Thermal Cycler 2400 (Perkin-Elmer) or 2720 ABI Thermal cycler as follows: 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.

TABLE I

Strains of *E. coli* and *X. dendrorhous* created and used in this study

Strains	Genotype or relevant features	Source of reference
<i>E. coli</i>		
DH-5 α	F ⁻ ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZY-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_K⁺ m_K⁺</i>) <i>phoA supE441- thi-1 gyrA96 relA1</i>	Sambrook et al.
DS1B	β -carotene producer strain with a yellow phenotype which corresponds to BL21-Gold strain carrying pDS1B	This work
DS1B- Δ crtB	strain BL21-Gold carrying the plasmid pDS1B- Δ crtB.	This work
DS1B- Δ crtY	Strain with a red phenotype, derived from BL21-Gold strain carrying the plasmid pDS1B- Δ crtBY.	This work
<i>X. dendrorhous</i>		
ATCC 24230	Wild-type	ATCC
T-5	Heterozygote transformant from ATCC 24230 containing an allele of <i>crtI</i> gene with a deletion of 1.1 kb.	This work
T-B2	Homozygote transformant for the 1.1 kb deletion from T-5.	This work
T-I21H	Heterozygote transformant from ATCC 24230 containing an insertion of <i>hph</i> cassette of hygromycin resistance in the <i>crtI</i> locus.	This work
T-I21H1H	Homozygote double recombinant from T-21H resistant to hygromycin B.	This work
T-YBH1	Heterozygote transformant resistant to hygromycin B, containing a partial deletion of <i>crtYB</i> gene and the insertion of the cassette <i>hph</i>	This work
T-YBHH2	Homozygote double recombinant, hygromycin B-resistant, from T-YBH.	This work
T-SH1	Heterozygote <i>hyhBr</i> obtained by transformation of the wild-type strain of <i>X. dendrorhous</i> with the cassette <i>crtS::hph</i> .	This work
T-SHH2	Homozygote double recombinant <i>hygBr</i> obtained by MDR from T-SH	This work

TABLE II

Plasmids built and used in this study

Plasmid	Genotype or relevant features	Source of reference
pBluescript SK-	ColE1 ori; Amp ^r ; cloning vector with blue-white screen	Stratagene
pL22	pBluescript with a 3558 bp PCR product containing the <i>crtI</i> gene of <i>X. dendrorhous</i> , in the <i>EcoRV</i> site.	This work
pL22ΔRV	pL22 containing a deletion of an internal 1.1 kb <i>EcoRV</i> fragment of the <i>crtI</i> gene	This work
pBAD33	P15 ori; Cam ^r ; cloning vector	Beckwith Lab.
pDS1B	pBAD33 vector carrying the carotenogenesis genes <i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i> and <i>crtY</i> and <i>crtX</i> from <i>Erwinia uredovora</i> .	This work
pDS1B-Δ <i>crtB</i>	Plasmid pDS1B with a deletion of the Eu- <i>crtB</i> gene	This work
pDS1B-Δ <i>crtY</i>	Plasmid pDS1B with a deletion of the Eu- <i>crtY</i> gene	This work
pXD- <i>tcrtYB</i>	pETOP0 expression vector containing cDNA of the truncated <i>crtYB</i> gene from alternatively spliced mRNA	This work
pET101/D-TOPO	ColE1 ori; Amp ^r ; expression vector	Invitrogene
pETOP0-CI	pET101/D-TOPO plus an unspecific DNA fragment	This work
pMN- <i>hph</i>	pBluescript SK-containing, in the <i>EcoRV</i> site, a cassette of 1.8 kb bearing the <i>E. coli</i> -resistant Hygromycin B (<i>hph</i>) gene under EF-1a promoter and GPD transcription terminator of <i>X. dendrorhous</i> respectively	Niklitschek, 2007
pXD- <i>idi</i>	pBluescript carrying a 4.8 kb <i>XhoI</i> fragment containing the <i>idi</i> gene of <i>X. dendrorhous</i> .	This work
pXD-I10	pBluescript containing a 11.5 kb <i>BamHI</i> DNA fragment carrying the <i>crtE</i> gene of <i>X. dendrorhous</i> .	This work
pXD-C13	pBluescript containing a 15.8 kb <i>BamHI</i> DNA fragment carrying the <i>crtI</i> gene of <i>X. dendrorhous</i> .	This work
pXD-33.13	pBluescript containing a 5.9 kb <i>EcoRV</i> DNA fragment carrying the <i>crtYB</i> gene of <i>X. dendrorhous</i>	This work
pXD-C19	pBluescript containing a 4 kb <i>PstI</i> DNA fragment carrying the <i>crtS</i> gene of <i>X. dendrorhous</i> .	This work
pXD- <i>idi::hph</i>	pXD- <i>idi</i> with a deletion of a <i>HpaI</i> 1245 bp fragment of the <i>idi</i> gene of <i>X. dendrorhous</i> and insertion of <i>hph</i> cassette from pMN- <i>hph</i> .	This work
pXD- <i>crtE::hph</i>	pXD-I10 with a deletion of an <i>EcoRV</i> 1984 bp fragment of <i>crtE</i> gene of <i>X. dendrorhous</i> and inserted cassette <i>hph</i> from pMN- <i>hph</i> .	This work
pXD- <i>crtYB::hph</i>	pXD-33.13 with a deletion of a <i>HpaI</i> 1245 bp fragment of the <i>crtYB</i> gene of <i>X. dendrorhous</i> and an insertion of <i>hph</i> cassette from pMN- <i>hph</i> .	This work
pXD- <i>crtI::hph</i>	pL22 with a deletion of a <i>EcoRV</i> 1127 bp fragment of the <i>crtI</i> gene of <i>X. dendrorhous</i> and insertion of <i>hph</i> cassette from pMN- <i>hph</i> .	This work
pXD- <i>crtS::hph</i>	pXD-C19 with a deletion of a <i>StuI-HpaI</i> 2479 bp fragment of the <i>crtS</i> gene of <i>X. dendrorhous</i> and an insertion of <i>hph</i> cassette from pMN- <i>hph</i> .	This work

The amplicons of the five genes were separated by electrophoresis in 1% agarose gels in TAE buffer containing 0.5 µg/ml of ethidium bromide followed by purification of each DNA fragment using glassmilk (Boyle and Lew, 1995), mixed with plasmid pBluescript SK previously digested with *EcoRV* and treated with T4 DNA ligase for 16 h at 14°C. Individual ligation mixture reactions for each gene were used to electroporate *E. coli* DH-5 α , plated onto LB agar containing 100 µg/ml ampicillin and X-gal. Transformants were selected as white ampicillin-resistant colonies.

DNA sequence

The nucleotide sequences were determined using a DYEnamic ET terminator Kit Amersham Bioscience in an ABI 3100 Avant genetic analyzer. Each DNA fragment was sequenced by both strands, and the ambiguities were resolved by new sequencing. The sequence data was analyzed using the University of Wisconsin Genetics Computer Group package, version 10.0 (Devereux et al., 1984) and the CLUSTAL W program, version 1.8. (Thompson et al., 1994).

Pulse field gel electrophoresis

Intact chromosomal DNA of *X. dendrorhous* was prepared in agarose plugs from cells grown to stationary phase in 100 ml of YM medium, washed twice with 50 mM EDTA pH 7.5 and suspended in 1 ml of a solution containing 10 mg Lysing enzyme per ml of 50 mM EDTA, as previously described (Cifuentes et al., 1997). The chromosomal DNA was separated by contour-clamped homogeneous electric fields (CHEF) in a LKB 2015 pulsaphor on a 1% agarose gel at 14°C in 0.1 M TBE buffer or in a Bio Rad DR II equipment on a 0.85% agarose gel at 14°C in 0.5 X TBE respectively (Sambrook et al., 1989).

Southern blot hybridization

Probes were labeled with [³²P]α-dCTP by the random primer technique and Southern blot hybridization was performed according to Sambrook et al. (1989).

Transformation of *X. dendrorhous*

The transformation of the wild-type strain of *X. dendrorhous* was performed by electroporation according to a previously described method (Wery et al., 1997). For the electrotransformation of 60 µl of electrocompetent cells, 10 to 20 µg of DNA was used. The electrocompetent cells were prepared from 200 ml YM culture grown until D.O.660_{nm} = 1.2. Cells were harvested at 5000 x g for 5 min, and the pellet was suspended in 25 ml of potassium phosphate buffer (50 mM potassium phosphate pH 7, 25 mM DTT) and incubated for 15 min at 21°C. The next step was at 4°C, using all the materials previously refrigerated. The cells were washed twice with 25 ml of STM buffer (270 mM sucrose, 10 mM Tris HCl pH 7.5, 1 mM MgCl₂). Subsequently, the cells were suspended with 500 µl of STM buffer at 4°C and stored at -70°C. The electroporation conditions were 25 µF, 1000 Ω, 800 V using a BioRad Gene Pulser X Cell with PC and CE Modules. The transformant DNA was linearized with restriction endonucleases according to the cassette type used. The transformant, hygromycin B-resistant colonies were selected on YM with 10 µg/ml hygromycin B. The transformants were identified as *X. dendrorhous* by the presence of dsRNA elements (Castillo and Cifuentes, 1994) and ITS1, 5.8 rRNA gene and ITS2 DNA sequences (Reyes et al., 2004).

RESULTS AND DISCUSSION

Cloning of the structural genes of carotenoids biosynthesis pathway

The structural genes of the astaxanthin biosynthesis pathway were isolated from the genomic libraries of *X. dendrorhous* by PCR using specific primers. Three recombinant plasmids carrying the genes *idi* (pA1), *crtE* (pI10), and *crtI* (pC13) in *Bam*HI fragments of 10.9, 11.5, and 15.8 kb respectively were isolated from a genomic library of *X. dendrorhous* in the YIp5 plasmid. No positive results were

obtained for the *crtYB* and *crtS* genes in this genomic library, possibly by the existence of an internal restriction site in these genes. The *Bam*HI inserts of each plasmid were transferred to the pBluescript SK vector and renamed as pXD-A1 (*idi*), pXD-I10 (*crtE*), and pXD-C13 (*crtI*) respectively (Fig. 1).

To determine a single restriction DNA fragment of *X. dendrorhous* containing either the *crtYB* or *crtS* genes, a genomic restriction map was carried out by hybridization experiments. For this, the DNA of *X. dendrorhous*, in duplicate, was digested with different restriction enzymes, separated by electrophoresis in 0.7% agarose gels, and transferred to a nylon membrane. After hybridization experiments, using radioactive probes for *crtYB* and *crtS* genes, we determined that

the *crtYB* gene is contained in an *Eco*RV fragment of 5.9 kb and *crtS* in a 4 kb *Pst*I fragment (data not shown). Using this data, two recombinant plasmids containing a 5.9 kb *Eco*RV insert harboring the *crtYB* (pXD-33.13) and a 4 kb *Pst*I insert harboring the *crtS* (pXD-C19) genes were isolated from the partial genome libraries *Eco*RV and *Pst*I respectively (Fig. 1). In addition, using specific primers for the start and the end codon of each carotenogenesis gene, it was possible to synthesize, by RT-PCR, the respective cDNA of the *idi* (756 bp), *crtE* (1131 bp), and *crtS* (1809 bp) genes, and cloning in the *Eco*RV-restriction site of the pBluescript SK vector. On the other hand, the cDNA of the mature mRNA and the alternative splicing variants of the *crtYB* and *crtI* genes have been previously reported by our group (Lodato et al., 2003).

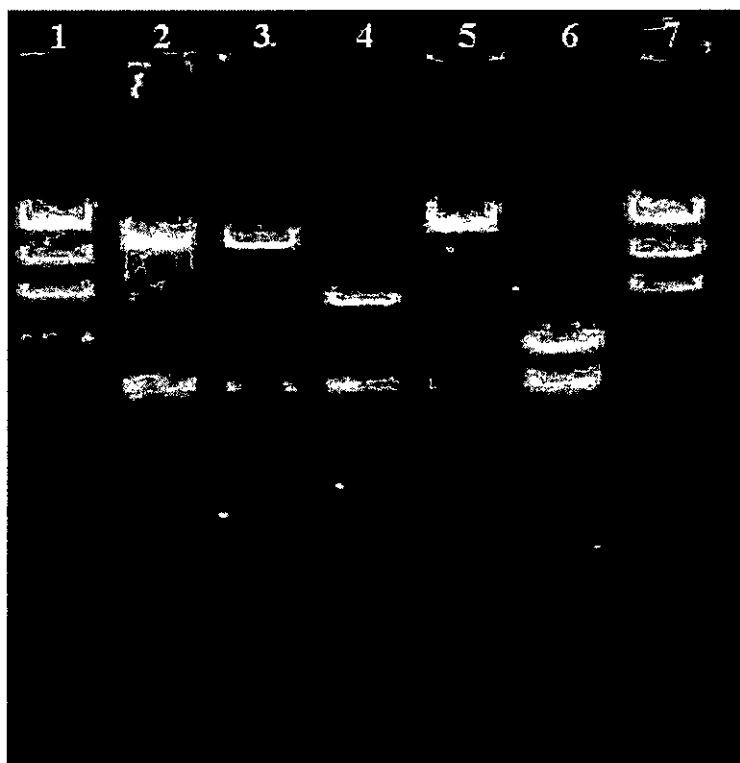


Figure 1: Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmids carrying carotenoids biosynthesis genes.

Lanes 1 and 7, Lambda DNA/*Hind*III as size standard; lane 2, pXD-A1 (*idi*); lane 3, pXD-I10 (*crtE*); lane 4, pXD33.13 (*crtYB*); lane 5, pXD-C13 (*crtI*); lane 6, pXD-C19 (*ast*). The plasmids pXD-A1, pXD-I10, and pXD-C13 were digested with *Bam*HI (lanes 2, 3, and 5). The plasmid pXD33.13 was digested with *Eco*RV (lane 4), and plasmid pXD-C19 was digested with *Pst*I (lane 6).

Localization of carotenoids biosynthesis genes in the electrophoretic karyotype

In order to study the genomic organization of the carotenoids biosynthesis genes *crtE*, *crtYB*, *crtI*, and *crtS* of *X. dendrorhous*, assays to determine the location of each gene in the electrophoretic karyotype of the yeast were performed. For this, the intact chromosomal DNA was separated by pulsed field electrophoresis (Cifuentes et al., 1997), using pulses of 90 seconds at 6 V/cm for 24 hours, followed by DNA transfer to nylon membranes and hybridization using radioactive probes of each gene. As is shown in Figure 2, the *crtE* and *crtI* genes were located in the chromosomal band I corresponding to a triplet (Cifuentes et al., 1997). The *crtYB* gene was located in the chromosomal band II, which also

corresponds to a triplet. When a pulsed field gel electrophoresis was carried out using pulses of 500 seconds for 48 hours, followed by pulses of 250 seconds for 12 h at 6 V/cm – conditions that separate the chromosomes of the bands I and II – it was observed that the *crtYB* gene is located in two different chromosomal bands (Fig. 2B). In addition, the *crtS* gene was located in two chromosomal bands of the electrophoretic karyotype, using pulses of 90 seconds for 24 hours at 12 V/cm (Fig. 2C). These results could contribute to the evidence supporting the diploid condition and genetic polymorphism of the wild-type strain ATCC 24230 of *X. dendrorhous* as previously described (Hermosilla et al., 2003; Retamales et al., 1998). In fact, electrophoretic karyotype analysis of wild-type strains of *X. dendrorhous* shows a

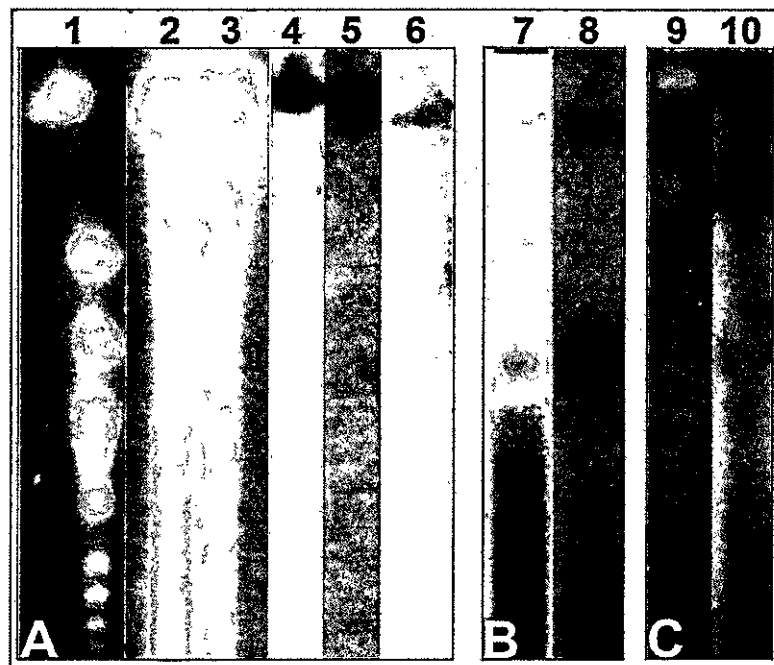


Figure 2: Assignment of cloned carotenoid biosynthesis genes in the chromosome bands of the electrophoretic karyotype of *X. dendrorhous*. (A) Lane 1, CHEF of *S. cerevisiae* AB1380; lanes 2 and 3, CHEF of *X. dendrorhous* ATCC 24230 strain; lane 4, hybridized with *crtE* gene probe; lane 5, hybridized with *crtI* gen probe; lane 6, hybridized with *crtYB* gene probe. (6 V/cm, pulse time 90 seconds for 24 hours) (B): CHEF of *X. dendrorhous* at 6 V/cm with pulse time of 500 seconds for 48 hours, followed by pulses of 250 seconds for 12 hours. Lane 7, ethidium bromide-stained CHEF (negative vision); lane 8, hybridized with *crtYB* gene probe. (C): CHEF of *X. dendrorhous* at 12 V/cm, pulse time of 90 seconds for 24 hours. Lane 9, ethidium bromide-stained CHEF; lane 10, hybridized with *crtS* gene probe.

large chromosomal polymorphism (Cifuentes et al., 1997; Nagy et al., 1997; Adrio et al., 1995) and could explain the fact that both the *crtYB* and *crtS* genes were located on two different chromosomal bands suggesting that their respective homologous chromosomes could be a polymorphic product of chromosomal rearrangement.

Sequence analysis of the carotenoids biosynthesis genes

The genes *idi*, *crtE*, *crtYB*, *crtI*, and *crtS* and their respective cDNAs were completely sequenced, and the analysis of sequence allowed the establishment of the exon-intron organization (Fig. 3). According to the sequence data, the *idi* gene was located in a *Bam*HI fragment of 10,960 bp, containing 4 introns and 5 exons with a coding region of 756 bp corresponding to a peptide of 251 amino acids. The *crtE* gene was isolated in a *Bam*HI fragment of 11,504 bp, containing 8 introns, and their ORF contained 1,131 bp, which corresponds to a peptide of 376 amino acids. The *crtI* gene was isolated as a *Bam*HI segment of 15,778 bp, containing 11 introns and 12 exons with an ORF of 1,749 bp encoding a peptide of 582 amino acids. The *crtYB* gene is located in an *Eco*RV fragment of 5,917 bp; it contains 4 introns and 5 exons, and its ORF is 2,022 bp, and the peptide encoded has 673 amino acids. Finally the *crtS* gene is located in a *Pst*I fragment of 3,995 bp; it contains 17 introns and 18 exons, and its ORF has 1,674 bp corresponding to a peptide of 577 amino acids. The DNA sequences of the *idi*, *crtE*, *crtYB*, *crtI*, and *crtS* genes and the cDNA sequences from the mRNA of the *crtE* and *crtS* genes of the wild-type strain ATCC 24230 of *X. dendrorhous* have been deposited in the GenBank database under accession numbers DQ235686, DQ012943, DQ016503, DQ028748, DQ002006, DQ016502 and DQ002007, respectively.

On the other hand, the genes *crtYB* and *crtI*, in addition to the mature mRNA, produce variants of alternative splicing – amRNA *crtYB* and amRNA *crtI*, respectively – as previously reported by our

group, suggesting that the splicing to mature or alternative messenger could regulate the cellular concentration of both enzymes depending on the physiological or environmental conditions (Lodato et al., 2003). In both genes, the variants of alternative splicing lead to the formation of premature stop codons in the translation of the three reading frames. However, a correct reading frame of both transcripts may be reestablished downstream from the start codon. In the case of the *crtI* messenger, if the translation could start internally in the alternative messenger, a truncated phytoene desaturase enzyme without 81 amino acids in the N-terminal of the protein could be synthesized from amRNA *crtI*. However, the N-terminal of the phytoene desaturase of *X. dendrorhous* has a dinucleotide binding motif that is conserved in the phytoene desaturases (Lodato et al., 2003), indicating that it is unlikely that an enzyme lacking 81 amino acids in the N-terminal could remain active. In the case of the *crtYB* gene, the analysis of the nucleotide sequence of the amRNA indicates that downstream from the initial start codon, an open reading frame is re-established that could be translated to a protein that lacks the first 153 amino acids of the N-terminal, which constitutes part of the lycopene cyclase domain of the enzyme phytoene- β -carotene synthase (Verdoes et al., 1999b). To determine if the truncated CRTYB has the lycopene cyclase or phytoene synthase activity, a heterologous complementary system was elaborated in *E. coli*. For this, three *E. coli* strains were constructed that carried three different carotenogenesis gene arrangements from *E. uredovora* (DS1B, having the wild-type cluster of carotenogenic genes of *E. uredovora*; DS1B- Δ *crtB* bearing a deletion of the *Eu-crtB* gene; and DS1B- Δ *crtY* bearing the cluster with a deletion of *Eu-crtY* gene, respectively). These were transformed with the pXD-*tcrtYB* (Table II) vector carrying cDNA of the truncated version of the gene *crtYB* that specifies a protein of 520 amino acids. Results show that the truncated gene may weakly complement the function of the phytoene synthase in the *E. coli* bearing a deletion of

the *Eu-crtB* of *E. uredovora*, but not lycopene cyclase in the *E. coli* strain carrying a deletion of the *Eu-crtY* gene of *E. uredovora* (Table III). These results suggest that the lack of the first 153 amino acids completely alters the lycopene cyclase domain of this bifunctional enzyme encoded by *crtYB* gene of *X. dendrorhous*. However, the phytoene synthase activity is maintained, although the levels of activity are reduced in comparison to the gene *Eu-crtB* of *E. uredovora*. If the alternative splicing of the mRNA of the gene *crtYB* fulfills a regulatory role in the carotenoids biosynthesis pathway of *X. dendrorhous*, the existence of a gene product with a single activity, phytoene synthase, could change the composition of intermediates and thus exert a regulatory role in the pathway, a mechanism which should be studied to identify all the processes involved in the carotenogenesis.

Additionally, a blast analysis of the deduced amino acid sequence of the astaxanthin synthase enzyme, the product of the *crtS* gene, shows a high level of similarity with cytochrome P450 hydroxylase. In other organisms that synthesize astaxanthin, such as the microalgae *H. pluvialis* and the bacteria *Agrobacterium auriantiacum* (Misawa et al., 1995) or *Paracoccus haeundaensis* (Lee and Kim, 2006), the step from β -carotene to astaxanthin using several ketocarotenoids as intermediates are controlled by two genes. The gene *crtW* that codes for the enzyme β -carotene ketolase catalyzes the introduction of the keto groups, while the gene *crtZ* that codes for the enzyme β -carotene hydroxylase catalyzes the incorporation of the hydroxyl groups in positions C3 and C3'. However, in *X. dendrorhous*, the step from β -carotene to astaxanthin is controlled by a single

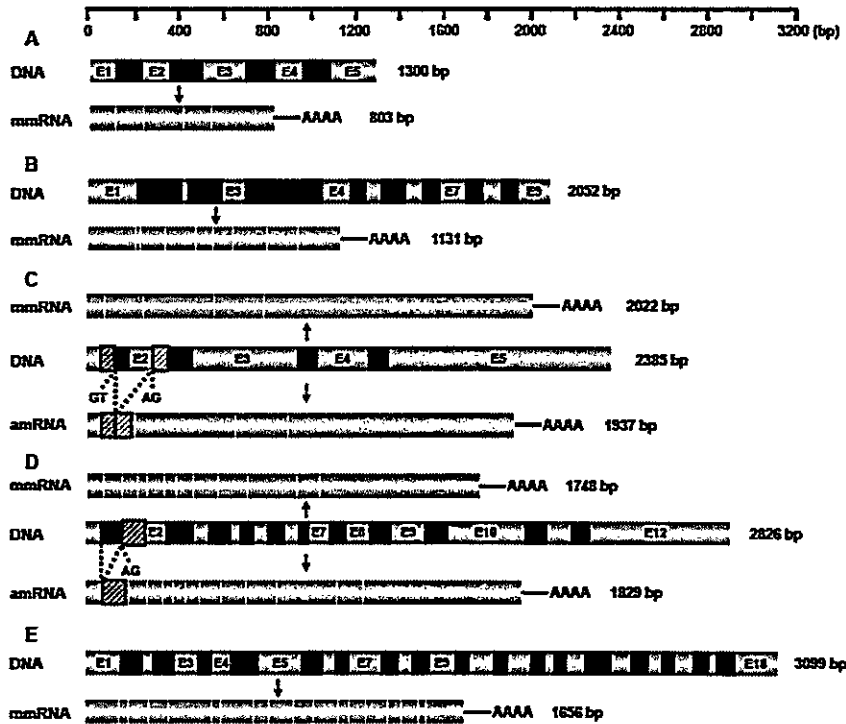


Figure 3: Schematic representation of the structure of genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *X. dendrorhous*. (A) *idi*; (B) *crtE*; (C) *crtYB*; (D) *crtI*; (E) *crtS*. DNA: genomic sequence of gene; mRNA: messenger RNA; mmRNA: mature messenger RNA; amRNA: alternative splicing RNA. Gray boxes: exon regions. Dark gray boxes: intron regions. Gray striped boxes: exon region involved in alternative splicing. Dark gray striped boxes: intron region involved in alternative splicing.

gene, *crtS*, that codes for the enzyme astaxanthin synthase, which is a cytochrome P450 hydroxylase-type enzyme, subfamily 3A (Ojima et al., 2006), which catalyzes all the reactions to convert β -carotene to astaxanthin. However, it has recently been suggested that CRTS would require an additional gene function, which could play a possible auxiliary role (Martín et al., 2008). This explains the inability to obtain mutants blocked in same step between β -carotene and astaxanthin that accumulate echinenone, 3-hydroxyechinenone or phoenicoxanthin.

Additionally, after nitrosoguanidine (NTG) mutagenesis, we isolated the mutant strain *atx5*, that shows a yellow phenotype as a result of β -carotene accumulation (Cifuentes et al., 1997). To discover if the mutation of *atx5* affects the *crtS* gene, a 5,920 bp fragment containing the complete *crtS* gene of strain *atx5* was sequenced (GenBank accession number EU713462). The sequence analysis indicates there is only a single base change that corresponds to a guanine (G) in position 376, from the ATG of the genome version, to an adenine (A). This change is located in exon 3, 12 nucleotides from the limit between exon 2 and 3. This transition mutation provokes a change from the Gly to Asp in position 60 of the CRTS protein. According to the literature, the location of this change does

not affect important sites for the correct functioning of astaxanthin synthase, such as the oxygen-binding site, binding domain to the Heme group, or the ESLR domain involved in the maintenance of the tridimensional structure (Álvarez et al., 2006). However, since G376A (Gly 60 to Asp) is the only change observed in strain *atx5* and considering that glycine is an amino acid that given its short hydrophobic lateral chain, makes no real contributions to the hydrophobic interactions and that Aspartic is a negatively charged amino acid, this change could have not affected the activity of astaxanthin synthase. The aforementioned, coupled with six out of six unsuccessful attempts to transform strain *atx5* using as donor DNA the complete wild-type *crtS* including the promoter region, suggests the involvement of at least another gene, complementary to the *crtS* gene, in the conversion of β -carotene to astaxanthin in *X. dendrorhous*.

Directed mutagenesis of crtI, crtYB, and crtS in X. dendrorhous

The cDNA of the genes *crtYB* and *crtI* have been cloned by heterologous complementation in *E. coli*. The *crtI* gene of *X. dendrorhous* is expressed in *E. coli*, which synthesizes phytoene due to the plasmid carrying the genes *crtE* and *crtB* of

TABLE III

Heterologous complementation analysis of truncated *crtYB* gene in *E. coli* carrying carotenoids biosynthesis genes of *E. uredovora*

Strain	Plasmid A	Plasmid B	Carotenoid (ug/g of biomass)	Produced	Phenotype
BL21 Gold	-	-	none	-	albino
BL21 Gold	pETOPO-CI	-	none	-	albino
DS1B	pDS1B	-	β -carotene	1226	yellow
DS1B- Δ <i>crtB</i>	pDS1B- Δ <i>crtB</i>	-	none	-	albino
DS1B- Δ <i>crtB</i>	pDS1B- Δ <i>crtB</i>	pXd- <i>tcrtYB</i>	β -carotene	139	yellow
DS1B- Δ <i>crtY</i>	pDS1B- Δ <i>crtY</i>	-	Lycopene	849	Red
DS1B- Δ <i>crtY</i>	pDS1B- Δ <i>crtY</i>	pXd- <i>tcrtYB</i>	Lycopene	859	Red

E. uredo, giving lycopene as producer of the desaturation reactions of phytoene (Verdoes et al., 1999a). Similarly, the cDNA of the gene *crtYB* of *X. dendrorhous* is expressed in different carotenogenic strains of *E. coli*, providing evidence that it codes for a bifunctional protein with phytoene synthase and lycopene cyclase activity (Verdoes et al., 1999b). However, the functionality of these genes in *X. dendrorhous* has not been directly demonstrated. Therefore, the effect of mutations in these genes in the carotenoids synthesized in *X. dendrorhous* was determined. For the study of the functionality of the *crtI* gene, the wild-type strain was transformed with the plasmid pL22ΔRV, harboring a 1.1 kb deletion of the *crtI* gene, linearized with *Bam*HI and *Xho*I. A total of 8 colonies with a pale phenotype were obtained, and one of these, named T5, was selected, and the presence of the 1.1 kb deletion of the *crtI* gene was confirmed by PCR using specific primers PHA1 and PHA4. In addition, the PCR analysis also showed the presence of a wild-type copy of the *crtI* gene, indicating that this strain was heterozygous for the *crtI* locus, it is *crtI*⁺/*crtI*⁻, with this *crtI*⁻ allele being a deletion of 1.1 kb *Eco*RV fragment of the gene (*crtI*^{ΔRV} allele), which was integrated in the chromosomal *crtI* locus by a double recombination or double crossover event and gives evidence that the ATCC 24230 wild-type strain is diploid. Subsequently, the heterozygote T5 strain was transformed with the same linear DNA plasmid pL22ΔRV, obtaining a large number of white (albino) colonies and few red colonies, some of which showed sectors (wild-type red and pale phenotype). It is possible that these colonies arose by a mitotic recombination event between heterozygote chromosomes in the T5 transformant, reverting to the wild-type condition of red phenotype. Similarly, transformation of the heterozygote T5 strain homozygote double transformants for the deletion mutation *crtI*^{ΔRV} (*crtI*^{ΔRV} / *crtI*^{ΔRV}) of albino phenotype arise. However, the high number of albino transformants could be a result of two events, one by transformation by integration and the other

by mitotic recombination between homologous chromosomes of the heterozygote strain, generating albino homozygotes in both cases. Once the homozygotization has occurred, the wild-type revertant or albino double mutant becomes genetically stable. These results suggest that homozygote mutants can be obtained from the wild-type *X. dendrorhous* strain through a single genetic transformation event followed by mitotic recombination which we have called the double recombinant method (DRM). From the results shown above, the DRM was developed to obtain deletion homozygote mutants of the gene *crtI* and insertion of a hygromycin B-resistant cassette. For this, cells of the wild-type strain were transformed with the plasmid pXD-*crtI*::*hph* previously linearized with *Bam*HI and *Xho*I restriction enzymes. As a result, 15 heterozygote pale colonies resistant to 10 μg/ml of hygromycin B were obtained. The genetic analysis of these colonies by PCR using specific primers for the *crtI* and the *hph* genes and their DNA sequence, indicates that they all bear the *hph* gene in the *crtI* locus in addition to a wt allele of the *crtI*. Cells of one heterozygote pale hygromycin B-resistant colony, named T-I21H, showing the *crtI*⁺/*crtI*::*hph* genotype, were grown in 50 ml flasks containing 10 ml of YM plus 10 μg/ml of hygromycin B for 3 days. Then, a 0.3 ml aliquot of the culture was diluted 100 times in a 125 ml flask with 30 ml of YM medium supplemented with 50 μg/ml of hygromycin B. After incubation for five days at 22°C, a transition from a paler culture was observed, with a pigmentation of approximately 10% of the wild-type, resulting in a white culture. Dilutions were plated on solid YM containing 10 μg/ml hygromycin B to give between 200 to 500 colonies per dish. Over 90% of colonies developed were white and hygromycin B-resistant. The genetic analysis by PCR shows that these colonies (represented by T-I21H1H) were homozygote for the mutation by insertion of the *hph* gene in *crtI* locus; it contains the allele *crtI*::*hph* on both homologous chromosomes (*crtI*::*hph* / *crtI*::*hph*). The pigment content analysis by

HPLC showed that they only produced phytoene, which accumulates due to the absence of the enzyme phytoene desaturase that prevents its conversion to lycopene (Fig. 5 B and C).

Subsequently, the double recombinant method was used to obtain mutants of genes *crtYB* and *crtS*, inserting the hygromycin B-resistance cassette in each gene. In an initial step, the wild-type strain ATCC 24230 of *X. dendrorhous* was transformed, in parallel, with the *crtYB::hph* cassette from plasmid pXD-*crtYB::hph* linearized with the enzyme *Xho*I and with the cassette *crtS::hph* from the plasmid pXD-*crtS::hph* linearized with *Sma*I. Five heterozygote transformants of the gene *crtYB* (*crtYB*⁺/*crtYB*⁺::*hph*) and 12 heterozygote transformants for the gene *crtS* (*crtS*⁺/*crtS*⁺::*hph*) were obtained. One colony of each transformant type (T-YBH1 and T-SH1, respectively) was selected and grown in conditions for enrichment of mitotic recombination, after which thousands of albino (*crtYB* ^{-/-}, non-pigment producing) or yellow (*crtS* ^{-/-}, β -carotene accumulating) colonies were observed, respectively. Similarly to what was observed with the mutants of the gene *crtI*, in genes *crtYB* and *crtS*, more than 90% of the colonies were homozygous after the application of DRM.

In addition, the wild-type and the heterozygote and homozygote strains affected in the *crtI*, *crtYB*, and *crtS* genes were analyzed for their cellular production and composition of carotenoids by HPLC. In all heterozygote strains, T-I21H (*crtI* +/-), T-YBH1 (*crtYB* +/-) and T-SH1 (*crtS* +/-), the production of total carotenoids is less than in the wild-type. However, its composition was similar (Fig. 5 B, D and F). On the other hand, both the homozygote T-I21H1H (*crtI* ^{-/-}) and T-YBH2 (*crtYB* ^{-/-}) do not produce colored pigments and are albino in phenotype (Fig. 5 C and E) and T-SH2 (*crtS* ^{-/-}) produces β -carotene and was yellow in phenotype (Fig. 5 G). However, the *crtI* ^{-/-} homozygote produces and accumulates the uncolored carotenoid phytoene (peak 10 in box of Fig. 4) because this mutant does not synthesize the phytoene desaturase enzyme that transforms

phytoene to lycopene, accumulating the former carotenoid. However, in the homozygote *crtYB* ^{-/-} strain, its albino phenotype is a product of the inability to synthesize phytoene due to the lack of the enzyme phytoene synthase. In addition, the *crtS* ^{-/-} homozygote strain produces and accumulates β -carotene (peak 9 in Fig. 4). These results provide clear evidence of the functionality of the genes *crtYB*, *crtI*, and *crtS* of *X. dendrorhous* and confirm the previous data obtained from heterologous complementation (Verdoes et al., 1999a; 1999b). In addition, it was also possible to obtain heterozygous transformants for the genes *idi* (*idi*⁺/*idi*⁺::*hph*) and *crtE* (*crtE*⁺/*crtE*⁺::*hph*), however, the respective homozygotes using DRM or by transformation of the heterozygotes were not obtained, suggesting a possible essential role for the products of both genes in *X. dendrorhous*.

Finally, in *X. dendrorhous*, the astaxanthin biosynthesis from IPP could be controlled by five structural genes, *idi*, *crtE*, *crtYB*, *crtI*, and *crtS*, while other organisms such as plants, algae, and bacteria, require a greater number of genes. The intermediaries from isopentenyl pyrophosphate to astaxanthin, in the main biosynthetic pathway of *X. dendrorhous*, except HDCO, DCD, HDC (Andrewes et al., 1976; An et al., 1999) are: IPP \leftrightarrow DMAPP \rightarrow GPP \rightarrow FPP \rightarrow GGPP \rightarrow phytoene \rightarrow phytofluene \rightarrow ζ -carotene \rightarrow neurosporene \rightarrow lycopene \rightarrow β -carotene \rightarrow echinenone \rightarrow 3-hydroxy-echinenone \rightarrow phoenicoxanthin \rightarrow astaxanthin. In *X. dendrorhous*, as in all fungi and eubacteria, the four desaturations required to convert phytoene into lycopene are synthesized by phytoene desaturase, controlled by the *crtI* gene (Verdoes et al., 1999a). However, in plants and algae, two gene products are required in this step, a phytoene desaturase that converts phytoene to ζ -carotene and ζ -carotene desaturase that transforms ζ -carotene into lycopene. In addition, in *X. dendrorhous* in the phytoene synthesis from GGPP and the β -carotene production from lycopene, two enzymatic reactions are catalyzed by a bi-functional gene product with phytoene synthase and lycopene

cyclase activity (Verdoes et al., 1999b), which differs from plants, algae, and bacteria in which two independent gene products are required. The four steps to convert β -carotene to astaxanthin in *X. dendrorhous* are catalyzed by the *crtS* gene product, a protein of 557 amino acids in which the sequence analysis by blast suggests a cytochrome P450 in accordance with that previously described (Hoshino et al., 2000; Ojima et al., 2006). This is consistent with the first report that cytochrome P450 was involved with astaxanthin production in *X. dendrorhous* (An et al., 1989, Johnson 2003). Other organisms require at least two genes, *crtW* and *crtZ*, encoding a β -carotene oxygenase and a β -carotene hydroxylase respectively.

Knowledge about the regulation of the expression of genes controlling the carotenogenesis in *X. dendrorhous* is limited. In fact, in previous works, it was determined that the *crtI* mRNA and *crtYB* mRNA levels decreased during the stationary phase of *X. dendrorhous* (Lodato et al., 2003). However, the carotenoid production differences between wild-type and astaxanthin-overproducing strains of *X. dendrorhous* could not be explained by a difference in the carotenogenic transcript at the stationary phase of growth (Lodato et al., 2007; 2004). The knowledge of the genomic organization of the structural genes controlling the carotenogenesis and the homozygous and heterozygous mutants obtained carrying deletions of each gene

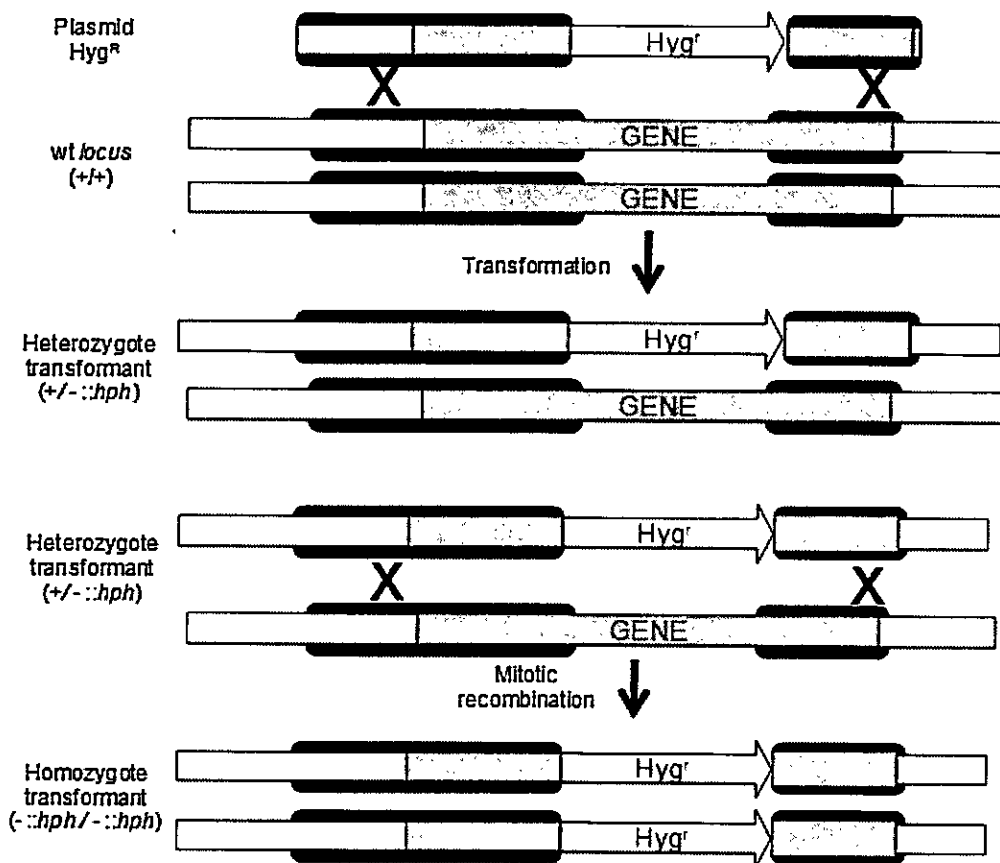


Figure 4. Schematic representation of the Double Recombinant Method in *X. dendrorhous*. The locus of interest is represented in gray. The gDNA that flanks the locus of interest is represented in white. The potentially recombinant gDNA region is represented in black. The hygromycin B resistant cassette of *X. dendrorhous* is represented as an arrow. GENE: represents any one of the five carotenogenesis genes (*idi*, *crtE*, *crtYB*, *crtI* and *crtS*) of the yeast.

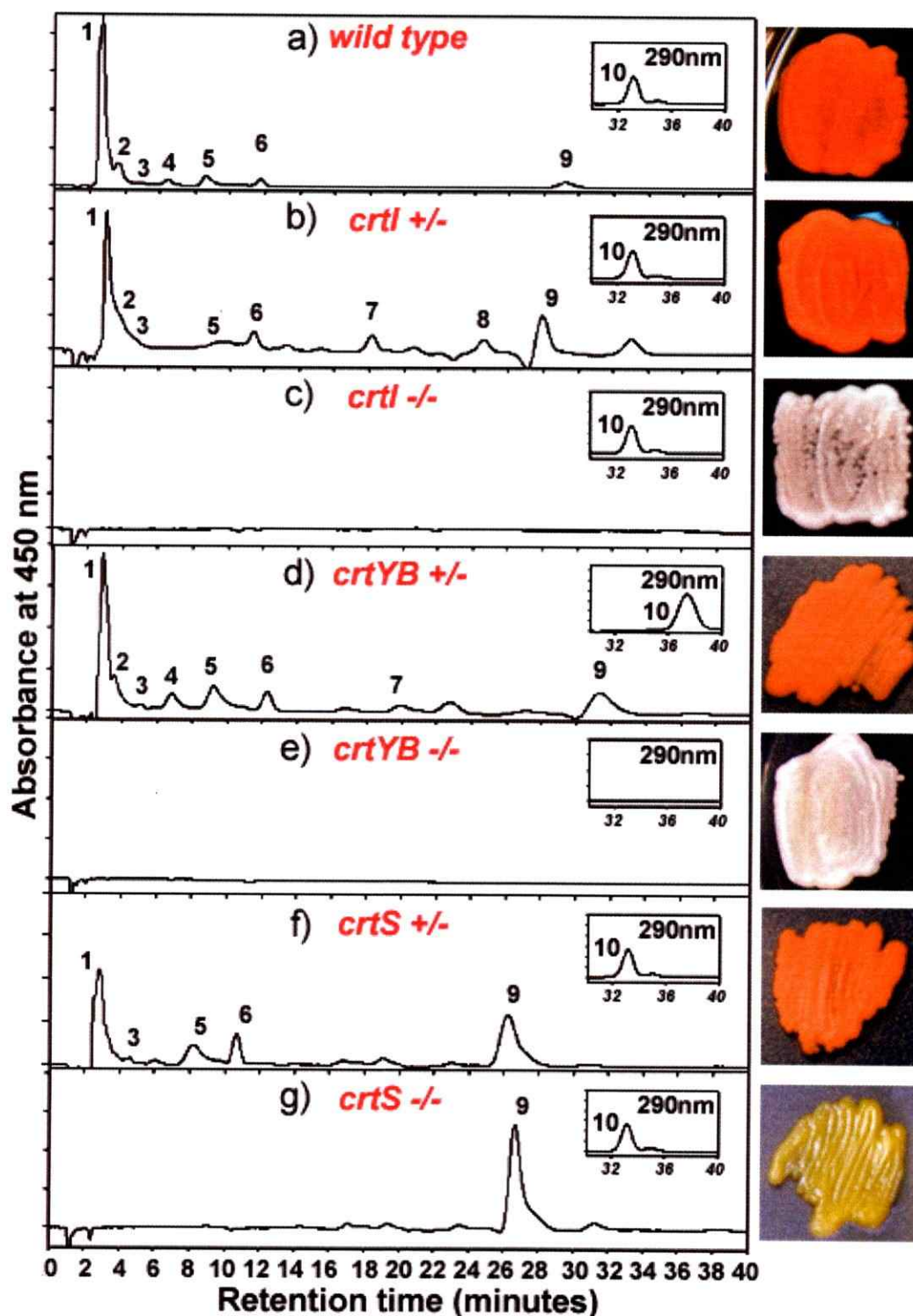


Figure 5: HPLC analysis of the pigment content of wild-type and heterozygous and homozygous strains of *X. dendrorhous*. The symbols: (+/-) represents the heterozygous and (-/-) the homozygous genotype of the strains. The numbers represent the different carotenoids intermediates as follow: 1, astaxanthin; 2, phoenicoxanthin; 3, canthaxanthin; 4, 3-hydroxy-4-ketotoruleno; 5, hydroxyl-keto- γ -carotene; 6, hydroxyl echinenone; 7, echinenone; 8, neurosporene; 9, β -carotene; 10, phytoene.

provides the genetic tools that will permit the study of the mechanism involved in the genetic regulation of the carotenoids biosynthesis pathway of *X. dendrorhous*. In addition, these site-specific mutants would allow the study of the gene dose effect and how it participates in the final expression of the structural genes of carotenogenesis and its regulation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Fondecyt 1040450, Mecesup UCH 0106, through a graduate scholarship to Jennifer Alcaino and Mauricio Niklitschek; Fundación María Ghilardi, through a graduate scholarship to Carla Lozano; CONICYT through a graduate scholarship to Andrés Marcoleta; and Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) through a graduate scholarship to P. Lodato.

REFERENCES

- ADRIO JL, LÓPEZ M, CASQUEIRO J, FERNÁNDEZ C, VEIGA M (1995) Electrophoretic karyotype of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *Curr Genet* 27: 447-450
- ÁLVAREZ V, RODRÍGUEZ-SAIZ M, DE LA FUENTE JL, GUDIÑA EJ, GODIO RP, MARTIN JF, BARREDO JL (2006) The *crtS* gene of *Xanthophyllomyces dendrorhous* encodes a novel cytochrome-P450 hydroxylase involved in the conversion of b-carotene into astaxanthin and other xanthophylls. *Fungal Genetics and Biology* 43: 261-272
- AN GH, SCHUMAN DB, JOHNSON EA (1989) Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl Environ Microbiol* 55: 116-124
- AN GH, CHO MH, JOHNSON EA (1999) Monocyclic carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*). *Journal Bioscience Bioengineering* 88: 189-193
- ANDREWES A G, PHAFF HJ, STARR MP (1976) Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*. A red-pigmented fermenting yeast. *Phytochemistry* 15:1003-1007
- BOYLE JS, LEW AM (1995) An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *TIG* 11:8
- CASTILLO A, CIFUENTES V (1994) Presence of double-stranded RNA and virus like-particles in *Phaffia rhodozyma*. *Curr Genet* 26: 364-368
- CHOMCZYNSKI P, SACCHI YN (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159
- CIFUENTES V, HERMOSILLA G, MARTÍNEZ C, LEÓN R, PINCHEIRA G, JIMÉNEZ A (1997) Genetics and electrophoretic karyotyping of wild-type and astaxanthin mutant strains of *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek* 72: 111-117
- DEVEREUX J, HAEBERLI P, SMITHIES O (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* 12:387-395
- 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
- HOSHINO T, OJIMA K, SETOGUCHI Y (2000) Astaxanthin synthetase. Hoffman-LaRoche, European Patent No. 1035206-A3
- JOHNSON EA (2003) *Phaffia rhodozyma*: Colorful odyssey. *Int Microbiol* 6: 169-174
- JOHNSON EA, LEWIS M (1979) Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *J Gen Microbiol* 115: 173-183
- LEE JH, KIM YT (2006) Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthesis gene cluster from the marine bacterium *Paracoccus haeundaensis*. *Gene* 370: 86-95
- LODATO P, ALCAÍNO J, BARAHONA S, RETAMALES P, CIFUENTES V (2003) Alternative splicing of transcripts from *crtI* and *crtYB* genes of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Environ Microbiol* 69: 4676-4682
- LODATO P, ALCAÍNO J, BARAHONA S, RETAMALES P, JIMÉNEZ A, CIFUENTES V (2004) Study of the expression of carotenoid biosynthesis genes in wild-type and deregulated strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biol Res* 37: 83-93
- LODATO P, ALCAÍNO J, BARAHONA S, NIKLIITSCHKE M, CARMONA M, WOZNIAK A, BAEZA M, JIMÉNEZ A, CIFUENTES V (2007) Expression of the carotenoid biosynthesis genes in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biol Res* 40: 73-84
- MARTIN JF, GUDIÑA E, BARREDO JL (2008) Conversion of beta-carotene into astaxanthin: Two separate enzymes or a bifunctional hydroxylase-ketolase protein? *Microb Cell Fact* 20: 7-13
- MILLER MW, YONEYAMA M, SONEDA M (1976) *Phaffia*, a new yeast genus in the Deuteromycotina (Blastomycetes). *Int J Syst Bacteriol* 26: 286-291
- MISAWA N, SATOMI Y, KONDO K, YOKOYAMA A, KAJIWARA S, SAITO T, OHTANI T, MIKI W (1995) Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *J Bacteriol* 177: 6575-6584
- NAGY A, PALÁGYI Z, FERENCZY L, VÁGVÖLGYI C (1997) Radiation-induced chromosomal rearrangement as an aid to analysis of the genetic constitution of *Phaffia rhodozyma*. *FEMS Microbiol Lett* 152: 249-254
- NIKLIITSCHKE M (2007) Desarrollo de un cassette de Resistencia a antibiótico en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular, Universidad de Chile
- OJIMA K, BREITENBACH J, VISSER H, SETOGUCHI Y, TABATA K, HOSHINO T, VAN DEN BERG J, SANDMANN G (2006) Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a b-carotene 3-hydroxylase/ketolase. *Mol Gen Genomics* 275: 148-158
- RETAMALES P, LEÓN R, MARTÍNEZ C, HERMOSILLA G, PINCHEIRA G, CIFUENTES V (1998) Complementation analysis with new genetic markers in *Phaffia rhodozyma*. *Anton van Leeuwenhoek* 73:229-236

- REYES E, BARAHONA S, FISCHMAN O, NIKLITSCHKE M, BAEZA M, CIFUENTES V (2004) Genetic polymorphism of clinical and environmental strains of *Pichia anomala*. *Biol Res* 37: 747-757
- SAMBROOCK J, FRITSCH E F, MANIATIS T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680
- VERDOES JC, MISAWA N, VAN OUYEN AJJ (1999a) Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnol Bioeng* 63: 750-755
- VERDOES JC, KRUBASIK P, SANDMANN G, VAN OUYEN AJJ (1999b) Isolation and functional characterization of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Mol Gen Genet* 262: 453-461
- WERY J, GUTKER D, RENNIERS AC, VERDOES JC, VAN OUYEN AJ (1997) High copy number integration into the ribosomal DNA of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Gene* 184: 89-97