

UCH-Fc
Doc-Microb
A 346
C. 1

**ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE UNA
CITOCROMO P450 REDUCTASA (CPR) EN LA
BIOSÍNTESIS DE ASTAXANTINA EN
Xanthophyllomyces dendrorhous.**

Tesis

**Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de**

Doctor en Ciencias con Mención en Microbiología

Facultad de Ciencias

por



Jennifer Alcaíno Gorman

Noviembre, 2008

Director de Tesis Dr: Victor Cifuentes Guzman

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

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

Jennifer Alcaíno Gorman

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 23 de Octubre de 2008.

Director de Tesis:

Dr. Victor Cifuentes Guzman



Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Carlos Jerez

Dr. Octavio Monasterio

Dr. Eugenio Spencer



A mi Familia

Resumen Biográfico



Nací el 2 de Diciembre de 1976. Tuve la gran suerte de pertenecer a la primera generación de Ingenieros en Biotecnología Molecular formados en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, donde también conocí a mi marido Guillermo Aguirre. Me titulé el año 2002 y luego viajé a Toronto. En Canadá, trabajé en el Departamento de Desarrollo de la compañía farmacéutica Aventis-Pasteur. A mediados del año 2004, ingresé al programa de Doctorado en Ciencias c/m Microbiología, de la Universidad de Chile en conjunto con la Universidad de Santiago. El año 2006, nació mi primer hijo Guillermo.

AGRADECIMIENTOS

La felicidad y satisfacción de terminar esta etapa de mi formación es enorme. Me han acompañado muchas personas de las que he aprendido valores para toda mi vida y que quiero agradecer. Tuve la gran fortuna de tener al Dr. Victor Cifuentes como mi director de tesis. Él es una persona íntegra y un gran líder. Su apoyo, ánimo, amistad y comprensión, fueron fundamentales en mí. Sus consejos y experiencias, siempre serán importantes en mis decisiones.

Me enorgullezco de formar parte del grupo de trabajo del Laboratorio de Genética. Agradezco a cada uno de mis compañeros que sin su calidad humana, respeto y compromiso, este trabajo no hubiese sido posible. Gracias a todos por el tiempo compartido y los resultados logrados. Especialmente, quiero agradecer a Salvador.

Quiero agradecer a los profesores Dr. Carlos Jerez, Dr. Octavio Monasterio y Dr. Eugenio Spencer, por sus ideas, críticas constructivas y corregir este trabajo. Agradezco a los profesores Dra. Cecilia Rojas, Dr. Claudio Martínez y Dr. Omar Orellana, por su gran ayuda. A mis amigos, especialmente al Dr. Ricardo Cabrera, por su ayuda y los buenos momentos compartidos.

Finalmente, agradezco a mi familia. A mi marido Guille e hijo Willy, gracias por su amor incondicional y ser la alegría de mi vida. A mis papás Texia y Héctor, por ser el mejor ejemplo para mí.

ÍNDICE DE MATERIAS

AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE MATERIAS	iv
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCION	1
Hipótesis.....	10
Objetivo general.....	11
Objetivos específicos.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
1 Materiales.....	12
1.1 Cepas, plásmidos, librerías genómicas y de cDNAs.....	12
1.2 Enzimas.....	12
1.3 Ácidos nucleicos y oligonucleótidos.....	16
1.4 Medios de cultivo y reactivos químicos.....	16
2 Métodos.....	16
2.1 Cultivo y mantención de microorganismos.....	16
2.1.1 Bacterias.....	16
2.1.2 Levaduras.....	19
2.2 Purificación de ácidos nucleicos.....	19
2.2.1 DNA plasmidial.....	19
2.2.2 DNA genómico de <i>X. dendrorhous</i>	20
2.2.3 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa.....	21
2.2.4 Extracción de RNA de <i>X. dendrorhous</i>	22

2.3 Análisis de DNA.	23
2.3.1 Mapas de restricción y geles de agarosa.	23
2.3.2 Secuenciación y análisis de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas.	23
2.3.3 Reacción de la polimerasa en cadena (PCR).	24
2.4 Transcripción Reversa acoplada a la reacción de la polimerasa en cadena (RT-PCR).	25
2.4.1 Síntesis de cDNA (reacción RT).	25
2.4.2 PCR.	25
2.5 Cariotipo electroforético.	26
2.5.1 Preparación de DNA cromosómico intacto de <i>X. dendrorhous</i>	26
2.5.2 Electroforesis de campo pulsado.	27
2.6 Hibridación DNA-DNA.	27
2.6.1 Marcación radio activa de ácidos nucleicos.	27
2.6.2 Preparación de las membranas.	27
2.6.3 Prehibridación e Hibridación.	28
2.6.4 Lavados.	28
2.7 Transformación genética por electroporación.	29
2.7.1 <i>Escherichia coli</i>	29
2.7.2 <i>X. dendrorhous</i>	30
2.8 Ensayos de complementación en <i>E. coli</i>	31
2.9 Extracción de carotenoides y RP-HPLC.	32
RESULTADOS.	33
Aislamiento y caracterización del gen <i>crtR</i> que codifica la enzima citocromo P450 reductasa de <i>X. dendrorhous</i> en su versión genómica y de cDNA.	33
Expresión de los genes <i>crtS</i> y <i>crtR</i> de <i>X. dendrorhous</i> en una cepa de <i>E. coli</i> que produce beta-caroteno.	54
Estrategia 1: pDS1BΔX + pET- <i>crtS</i> + <i>crtR</i>	61
Estrategia 2: pDS1BΔX::RBSX <i>crtS</i> + pET- <i>crtR</i>	61
Estrategia 3: pDS1BΔXt::RBSX <i>crtS</i> + pET- <i>crtR</i>	63

Construcción de mutantes de delección del gen <i>crtR</i> en cepas silvestres (UCD 67-385 y CBS-6938) de <i>X. dendrorhous</i>	65
Expresión de los genes <i>crtS</i> y <i>crtR</i> en distintas etapas de la curva de crecimiento de la levadura silvestre (UCD 67-385).....	83
DISCUSION	87
CONCLUSIONES	102
PROYECCIONES	103
BIBLIOGRAFÍA	105
ANEXOS	115
Anexo 1. Secuencia completa del fragmento de DNA de cepa UCD 67-385 que contiene al gen <i>crtR</i>	115
Anexo 2. Secuencia completa del cDNA del gen <i>crtR</i>	115

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas y genotecas usadas en esta Tesis	13
Tabla 2. Plásmidos utilizados en esta Tesis	14
Tabla 3. Principales oligonucleótidos utilizados en éste estudio	17
Tabla 4. Resultado hibridación de DNA cepa UCD 67-385 digerido con varias enzimas de restricción y sonda <i>crtR</i>	45
Tabla 5. Resultados de InterProScan	50
Tabla 6. Evaluación de los modelos tridimensionales de CrtR generados	50
Tabla 7. Tamaño de amplificado esperado (kb) al amplificar alelos silvestres o mutantes $\Delta crtR::hph$. 72	
Tabla 8. Tamaño de amplificado obtenido (kb) al amplificar alelos silvestres o mutantes $\Delta crtR::hph$ de las cepas silvestres y transformantes.	72
Tabla 9. Resultado de la hibridación de digestiones de DNA genómico de las cepas silvestres (UCD 67-385 y CBS-6938) y sus derivados transformantes (T13 y CBSTr, respectivamente. Sonda <i>crtR</i>	74
Tabla 10. Resultado de la hibridación de digestiones de DNA genómico de las cepas silvestres (UCD 67-385 y CBS-6938) y sus derivados transformantes (T13 y CBSTr, respectivamente. Sonda <i>hph</i>	75
Tabla 11. Composición de carotenoides de las cepas silvestres y transformantes de <i>X. dendrorhous</i> en ppm.	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ruta de biosíntesis de astaxantina.	6
Figura 2. Comparación de secuencias nucleotídicas de genes de citocromo P450 reductasa.....	36
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa (0,8 %) de los productos de PCR al utilizar DNA genómico de <i>X. dendrorhous</i> como molde y distintas mezclas de partidores.....	37
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa (0,8 %) de los productos de PCR al utilizar DNA de la genoteca YIp5 de <i>X. dendrorhous</i>	39
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa (0,8 %) del DNA plasmidial de los subclones derivados de pPR52.P.44 digerido con <i>Bam</i> HI.....	40
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa (2,5 %) de los productos de PCR al utilizar DNA de una genoteca de cDNAs de <i>X. dendrorhous</i> como molde.	42
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa (2,5 %) de los productos de PCR al utilizar DNA de la genoteca YIp5 de <i>X. dendrorhous</i>	43
Figura 8. Hibridación y mapa genómico de la cepa diploide UCD 67-385.....	46
Figura 9. Esquema y secuencia del DNA genómico del gen <i>crtR</i> de <i>X. dendrorhous</i>	47
Figura 10. Resultado de TMpred.	49
Figura 11. Modelo tridimensional de <i>CrtR</i>	52
Figura 12. Modelo tridimensional de <i>CrtR</i> y cofactores.....	53
Figura 13. Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de <i>CrtR</i> de <i>X.</i> <i>dendrorhous</i> (<i>Xde</i>) y CPRs publicadas de otros organismos.	56
Figura 14. Ubicación del gen <i>crtR</i> en el cariotipo electroforético de la cepa silvestre UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i>	57
Figura 15. Construcciones desarrolladas en la tres estrategias de producción de	

carotenoides en <i>E. coli</i>	60
Figura 16. Técnica de unión de fragmentos de DNA mediante PCR.	62
Figura 17. Construcción de pBS+Ura3GAC7.....	64
Figura 18. Construcciones diseñadas para obtener la delección del gen <i>crtR</i> en las cepas silvestres UCD 67-385 y CBS-6938 de <i>X. dendrorhous</i>	66
Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa (0,8 %), de los fragmentos de DNA utilizados para la construcción de los plásmidos p <i>BsiWI</i> Δ <i>crtR</i> :: <i>hph</i> y p <i>NdeI</i> Δ <i>crtR</i> :: <i>hph</i>	68
Figura 20. Fenotipo y estructura de los alelos silvestres y mutantes del gen <i>crtR</i> en las cepas UCD 67-385, CBS-6938, T13 y CBSTr.	69
Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa (0,8 %), de los productos de PCR al utilizar DNA genómico de las cepas silvestres y transformantes de <i>X. dendrorhous</i> como molde.....	71
Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa (0,8 %), de los productos de PCR al utilizar DNA genómico de la cepa CBSTr como molde.	77
Figura 23. Mapa de restricción de la región cromosómica en donde se ubica el gen <i>crtR</i> en las cepas silvestres (UCD 67-385 y CBS-6938) y en sus transformantes (T13 y CBSTr).	79
Figura 24. Fenotipo y cromatogramas (465 nm) de las levaduras silvestres (UCD 67-385 y CBS-6938) y transformantes (T13: que derivó de UCD 67-385 y CBSTr: que derivó de CBS-6938).....	80
Figura 25. Comparación de pigmentos producidos por cepas silvestres (UCD 67-385 y CBS-6938) y su respectivo mutante (T13: que derivó de UCD 67-385 y CBSTr: que derivó de CBS-6938).	81
Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa (2,5 %), de los productos de RT-PCR de los genes actina, <i>crtS</i> y <i>crtR</i> , en distintos puntos de la curva de crecimiento de la levadura.	84
Figura 27. Expresión relativa de los genes <i>crtR</i> y <i>crtS</i> a lo largo de la curva de crecimiento de <i>X. dendrorhous</i>	86
Figura 28. Secuencia de aminoácidos deducida a partir de la región codificante del gen	

<i>crtR</i>	88
Figura 29. Superficie de la proteína CrtR.	90
Figura 30. Árbol filogenético de citocromos P450 Reductasas.	92
Figura 31. Eventos de mutación del gen <i>crtR</i> por recombinación homóloga en las cepas silvestres UCD 67-385 y CBS-6938 de <i>X. dendrorhous</i>	96

ABREVIATURAS

CHEF	Campo eléctrico de contorno homogéneo
cDNA	DNA complementario al mRNA
CDS	Secuencia codificante
CPR	citocromo P450 reductasa
DMAPP	dimetilalil pirofosfato
CYC	citocromo c
DTT	ditiotreitól
DEPC	Dietil pirocarbonato
DRM	Double Recombinant Method
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
FPP	farnesil pirofosfato
GPDH	gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GPP	geranil pirofosfato
GGPP	geranilgeranil pirofosfato
<i>hph</i>	gen higromicina fosfotransferasa
IPP	isopentenil pirofosfato
kb	kilobases
LB	medio de cultivo Luria Bertani
MM _v	medio mínimo Vogel

P450	citocromo P450
pb	pares de bases
PCR	Reacción de polimerasa en cadena
Pef	Promotor del factor de elongación EF-1 α
RBS	Sitio de unión a ribosoma
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta presión en fase reversa
RT-PCR	Reacción de la transcriptasa reversa acoplada a PCR
SDS	dodecil sulfato de sodio
TAE	amortiguador tris-acetato-EDTA
TE	amortiguador tris-EDTA
TEF	Factor de elongación de la traducción 1 α
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
UV	luz ultravioleta
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β D-galactopiranosido
YM	medio de cultivo rico para <i>X. dendrorhous</i>

RESUMEN

La levadura basidiomicete *Xanthophyllomyces dendrorhous* sintetiza carotenoides, principalmente la xantófila astaxantina que presenta un gran interés biotecnológico debido a su uso como suplemento alimenticio en la industria acuícola y por sus propiedades antioxidantes.

En esta levadura, en la formación de astaxantina a partir de beta-caroteno participa una sola enzima; la astaxantina sintasa o CrtS (codificada por el gen *crtS*) que pertenece a la familia de las proteínas citocromo P450 monooxigenasas (P450), las que requieren de la citocromo P450 reductasa (CPR) como donador de electrones. En esta tesis se aisló y caracterizó por primera vez el gen *crtR* de la CPR de *X. dendrorhous*. Se determinó su organización estructural, su ubicación en el cariotipo electroforético de la levadura y además se construyó un modelo tridimensional de la proteína que codifica. Asimismo, se comprobó que este gen está involucrado en la biosíntesis de astaxantina.

La funcionalidad de dicho gen se demostró mediante experimentos de transformación de *X. dendrorhous*. De esta manera se obtuvieron dos mutantes; CBSTr y T13, por reemplazo de una porción del gen *crtR* por un módulo de resistencia a higromicina B. CBSTr, proveniente de la cepa silvestre CBS-6938, forma colonias de color amarillo, ya que no puede producir astaxantina y acumula beta-caroteno y T13 es un transformante heterocigoto que forma colonias pálidas, debido a que produce menos

astaxantina y más beta-caroteno en relación a su cepa parental UCD 67-385. Los resultados de esta tesis permitieron determinar por primera vez que el producto génico de *crtR* es esencial para la biosíntesis de astaxantina de *X. dendrorhous*.

Adicionalmente, se estudió la expresión génica de los genes *crtS* y *crtR* (a nivel de sus RNA mensajeros) a lo largo del crecimiento de un cultivo de la levadura silvestre en un fermentador. A pesar que ambos genes codifican proteínas que participan en una misma etapa de la ruta de biosíntesis del carotenoide, se observó que su patrón de expresión es distinto, por lo que probablemente su regulación también es diferente.

La biosíntesis de astaxantina de *X. dendrorhous* es un proceso complejo que podría estar regulado en distintos niveles. Sin embargo, para poder comprender la ruta de biosíntesis es importante conocer todos los genes estructurales de las enzimas que participan en esta vía. De esta manera, el aislamiento y caracterización de un gen que aun no ha sido descrito es una gran contribución para el conocimiento de la carotenogénesis de *X. dendrorhous*.

ABSTRACT

The basidiomycete yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* synthesizes carotenoids, primarily astaxanthin. Astaxanthin is a xanthophyll with a huge commercial interest due to its use as a nutritional supplement in the aquaculture industry and its antioxidant properties.

Recently, it has been published that for the astaxanthin formation from beta-carotene in this yeast, a single astaxanthin synthase enzyme or CrtS, encoded by the *crtS* gene, is required. This enzyme belongs to the cytochrome P450 monooxygenase protein family (P450), which requires the cytochrome P450 reductase (CPR) as an electron donor. In this thesis the *crtR* gene, which encodes for CPR from *X. dendrorhous*, was isolated and characterized for the first time. Its structural organization and its location in the yeast electrophoretic karyotype were determined. Also a three dimensional model of CrtR was constructed and the involvement of this protein in the astaxanthin biosynthesis was determined.

Additionally, the functionality of *crtR* was demonstrated through *X. dendrorhous* transformation experiments. By this way two mutants; CBSTr and T13, were obtained by replacing a portion of the *crtR* gene with a hygromycin B resistance cassette. CBSTr, which comes from the wild type strain CBS-6938, forms yellow colonies as it can not produce astaxanthin and accumulates beta-carotene and T13 is a heterozygote

transformant that forms pale colonies, because it produces less astaxanthin and more beta-carotene in relation to its parental strain UCD 67-385. The results of this thesis revealed for the first time that the *crtR* gene product is essential for in *X. dendrorhous* astaxanthin biosynthesis.

Moreover, the expression of genes *crtS* and *crtR* was studied at the messenger RNA level along the growth curve of the wild type yeast culture in a fermenter. Despite the fact that both genes encode proteins involved in the same stage of the carotenoid biosynthetic route, it was noted that their expression pattern was different, suggesting a different regulation for each gene.

Astaxanthin biosynthesis in *X. dendrorhous* is a complex process that could be regulated at different levels. However, in order to understand the biosynthetic route is important to know all the structural genes of the enzymes involved in this path. Thus, the isolation and characterization of a new gene involved in carotenogenesis is a significant contribution to the knowledge of this process in *X. dendrorhous*.

INTRODUCCION

Los carotenoides son pigmentos naturales de los cuales se han descrito más de 600 estructuras químicas diferentes y se ha estimado una producción anual superior a las 100 millones de toneladas (Fraser y Bramley, 2004). Estos pigmentos pueden ser sintetizados por plantas, algas, hongos y bacterias, sin embargo, los animales no pueden sintetizarlos *de novo*, por lo que deben adquirirlos a través de su dieta. En animales, los carotenoides son acumulados en algunos de sus tejidos proporcionándoles el color característico a muchas aves, invertebrados marinos y peces (Armstrong, 1994).

Los carotenoides son moléculas que típicamente están formadas por un esqueleto hidrocarbonado de cuarenta átomos de carbonos (C40) y forman parte del grupo de compuestos llamados isoprenoides o terpenoides. Estos pigmentos pueden presentar algunas modificaciones químicas tales como la ciclación de uno u ambos extremos, nivel de hidrogenación y la incorporación de grupos funcionales oxigenados (Britton, 1995). Según su estructura química se clasifican en dos grupos: los carotenos que no presentan grupos funcionales que contienen átomos de oxígeno y las xantófilas que si los poseen. Su largo esqueleto hidrocarbonado puede presentar numerosos dobles enlaces conjugados responsables de las distintas propiedades espectrales de estos pigmentos, los que absorben la luz dentro de la región visible del espectro entre 400 y 500 nm otorgándoles sus característicos colores amarillos, naranjos y rojos (Britton, 1998). En el

caso de algunos crustáceos, estos pigmentos pueden formar complejos con proteínas extendiendo así su rango de coloración a verde, morado y azul (Britton, 1998).

Actualmente, estos pigmentos reciben una considerable atención debido a sus numerosas propiedades, usos y especialmente, sobre sus efectos potencialmente beneficiosos para la salud humana (Paiva y Russell, 1999). En plantas, ellos contribuyen a la maquinaria fotosintética y las protegen contra el daño foto-oxidativo. En animales, los carotenoides son por ejemplo, la fuente principal de vitamina A, ya que el beta-caroteno es su precursor. En los últimos años, sus propiedades anti-oxidantes han sido relacionadas con la reducción de la incidencia de muchas enfermedades tales como; enfermedades cardiovasculares, cáncer (pulmón, mamas, próstata y colorrectal) y su función como reguladores del sistema inmune ha sido estudiada (Fraser y Bramley, 2004). Los carotenoides también han sido utilizados como colorantes y como suplemento alimenticio de animales en cautiverio, especialmente salmónidos y crustáceos (Johnson y col., 1977; Johnson y Lewis, 1979).

En este sentido, la astaxantina (3,3'-dihidroxi- β - β -caroten-4,4'-diona) es una xantófila que actualmente incita un gran interés para su estudio por su enorme utilidad biotecnológica. Este pigmento es el responsable del color característico de la carne de truchas y salmones requerido por los consumidores (Johnson y col., 1977; Johnson y Lewis, 1979; Visser y col., 2003), que además es esencial para el crecimiento adecuado y reproducción de los peces. Asimismo, se ha reportado que sus propiedades antioxidantes son aún mayores que las reconocidas en el beta-caroteno y el alfa-tocoferol. Posee beneficios para la salud humana como por ejemplo, en la prevención de

enfermedades cardiovasculares, favorece la respuesta del sistema inmune, tiene bioactividad contra *Helicobacter pylori* y acción preventiva de cataratas (Higuera-Ciapara y col., 2006).

En la actualidad, se estima que el mercado mundial de la astaxantina corresponde a los 150 - 200 millones de dólares, abarcado principalmente por su síntesis química (Higuera-Ciapara y col., 2006). De esta manera, nuestro país está claramente involucrado, ya que se considera como el segundo productor mundial de salmónidos. En Chile, entre los años 2000 y 2005, la exportación nacional de salmónidos prácticamente se duplicó alcanzando las 383.704 toneladas (Aguila, 2006), y junto con ello el gasto en astaxantina. En relación a esto, el alto costo de los pigmentos sintéticos y la creciente demanda por productos naturales, es que la búsqueda de fuentes naturales de astaxantina ha cobrado una gran importancia (Higuera-Ciapara y col., 2006).

La biosíntesis de astaxantina se limita exclusivamente a microorganismos y algunos ejemplos son las bacterias marinas *Agrobacterium aurantiacum* y *Alcaligenes* sp. cepa PC-1, la microalga *Haematococcus pluvialis* y la levadura basidiomicete *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Andrewes y col., 1976; Fraser y col., 1997). No obstante, sólo la producción de astaxantina por *H. pluvialis* y *X. dendrorhous* podrían competir económicamente con la astaxantina sintética (Domínguez-Bocanegra y col., 2007).

A pesar que la microalga es la fuente natural con el más alto contenido de astaxantina conocido hasta el momento, el interés para la explotación comercial de estos

organismos no ha sido suficiente debido a los altos índices de contaminación con protozoos y a un menor desarrollo de las tecnologías de cultivo, en comparación con organismos heterotróficos como las levaduras. Adicionalmente, existen otras diferencias importantes entre la astaxantina producida por *H. pluvialis* y *X. dendrorhous*. La astaxantina producida por *H. pluvialis* presenta un elevado porcentaje de esterificación lo que reduce su bioabsorción (Schietd y col., 1985; Sommer y col., 1991). En este sentido, la astaxantina producida por la levadura *X. dendrorhous*, es 100 % libre (no esterificada) (Andrewes y col., 1976), lo que le otorga grandes ventajas comparativas sobre la producida por la microalga.

El contenido de astaxantina en las cepas silvestres de *X. dendrorhous* es alrededor de los 200-400 µg por gramo de levadura seca, lo cual es bajo para su explotación industrial (Visser y col., 2003). Por esta razón, muchas investigaciones se enfocaron en el mejoramiento de la producción de astaxantina. Como primera aproximación, fue el manejo de las condiciones ambientales y medios de cultivo que favorecen su síntesis. En este sentido, se ha estudiado por ejemplo; el efecto de la luz (An y Johnson, 1990), el tipo de fuente de carbono (Meyer y du Preez, 1994 a), las concentraciones de glucosa y oxígeno (Yamane y col., 1997), como también el uso de medios de cultivo de bajo costo como; jugos de uva (Meyer y du Preez, 1994 b) y dátiles (Ramírez y col., 2000), hidrolizados de eucaliptos (Parajo y col., 1998) y molazas (An y col., 2001). Una segunda aproximación fue la obtención de cepas de *X. dendrorhous* con un mayor contenido de astaxantina por mutagénesis al azar. A pesar que no se lograron obtener cepas con los niveles apropiados para su comercialización (An y col., 1989), la

obtención de mutantes fue de gran utilidad para el estudio de la ruta de biosíntesis de astaxantina en la levadura (Girard y col., 1994; Retamales y col., 1998). Finalmente, debido al desarrollo de técnicas apropiadas de biología molecular, la carotenogénesis en *X. dendrorhous* puede ser mejorada mediante la ingeniería metabólica de su ruta de biosíntesis (Visser y col., 2003; Ojima y col., 2006).

La biosíntesis de astaxantina de *X. dendrorhous* (Figura 1), al igual que la síntesis del resto de los isoprenoides, se caracteriza por iniciarse con el compuesto isopentenil-pirofosfato (IPP) que es una molécula de cinco átomos de carbono (Britton, 1998). En eucariontes el IPP se sintetiza preferentemente por la vía del mevalonato (MVA) que luego se isomeriza en dimetilalil-pirofosfato (DMAPP) por el producto del gen *idi* (Kajiwara y col., 1997). La extensión del esqueleto hidrocarbonado de los carotenoides se inicia con la condensación de una molécula de IPP con una de DMAPP lo que forma un compuesto de diez átomos de carbono, geranil-pirofosfato (GPP, C10). Posteriormente, éste se condensa con una nueva molécula de IPP y se forma farnesil-pirofosfato (FPP, C15), que es la molécula precursora del escualeno. Seguidamente, al FPP se le adiciona una tercera molécula de IPP lo que resulta en la formación de geranilgeranil-pirofosfato (GGPP, C20). La adición secuencial de las tres moléculas de IPP a una de DMAPP, en *X. dendrorhous* participaría la enzima GGPP sintasa que está codificada por el gen *crtE* (Niklitschek y col., 2008).

El primer paso específico de la biosíntesis de carotenoides corresponde a la formación de fitoeno (C40, que es incoloro) a partir de la condensación de dos moléculas de GGPP. Este paso se cataliza por la enzima fitoeno sintasa, que en

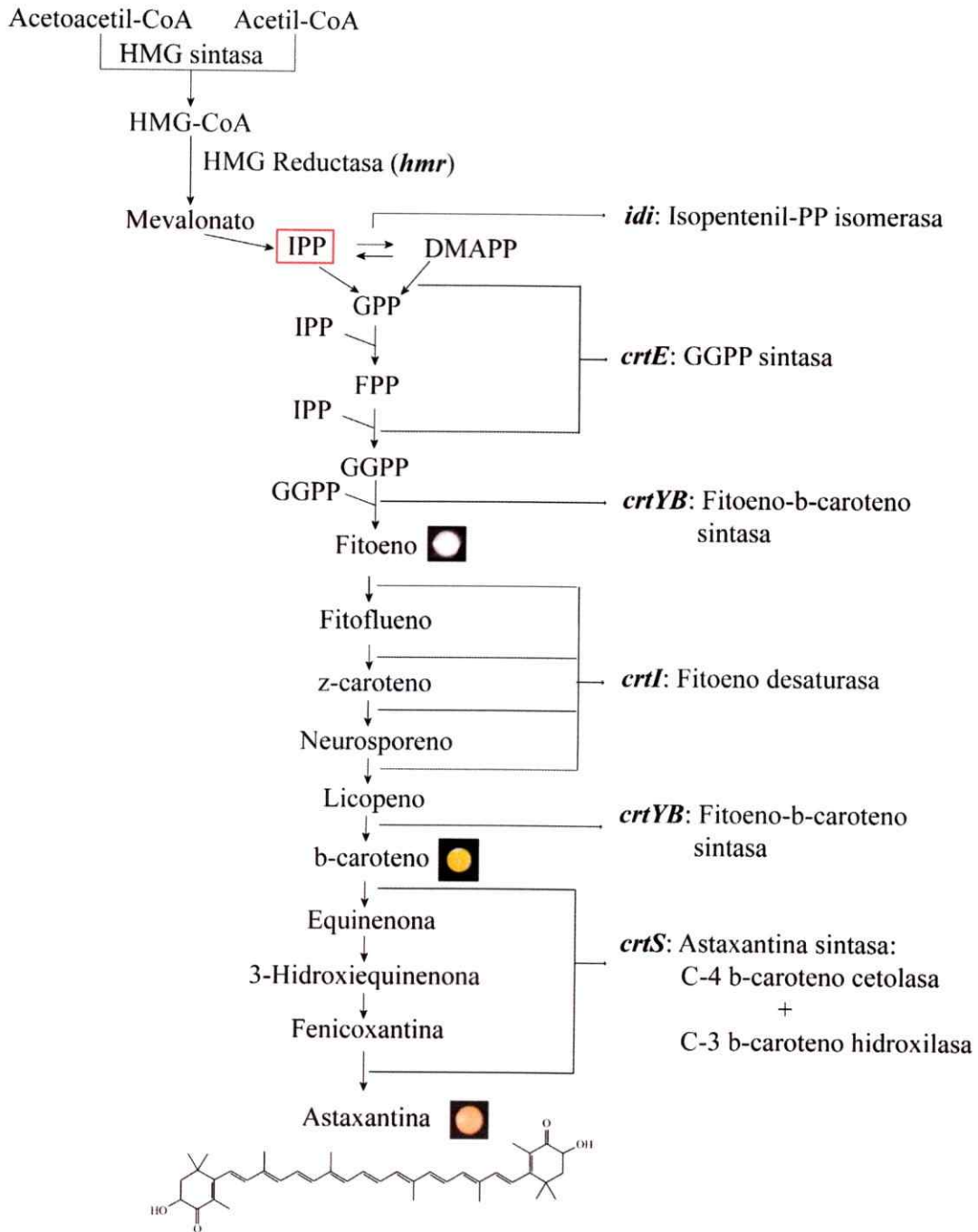


Figura 1. Ruta de biosíntesis de astaxantina. Principales pasos de la ruta de biosíntesis de astaxantina en *X. dendrorhous*. Se destacan los genes estructurales de la vía que han sido clonados y secuenciados. Se ilustra el color de las colonias que acumulan fitoeno (blancas), beta-caroteno (amarillas) y astaxantina (rojo anaranjado). Se ilustra la estructura química de astaxantina.

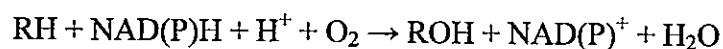
X. dendrorhous es una enzima bifuncional que además presenta actividad licopeno ciclasa. Por esta razón se le llamó fitoeno-beta-caroteno sintasa y es codificada por el gen *crtYB* (Verdoes y col., 1999 a; Alcaíno, 2002). Posteriormente, el fitoeno sufre cuatro reacciones sucesivas de desaturación por el producto del gen *crtI*, produciendo de esta manera licopeno (Verdoes y col., 1999 b; León, 2000). La ruta de biosíntesis de carotenoides se ramifica a este nivel en los distintos organismos carotenogénicos, lo que genera la enorme diversidad de este tipo de pigmentos encontrada en la naturaleza (Britton, 1998).

A continuación, en la biosíntesis de astaxantina de *X. dendrorhous*, ambos extremos del licopeno son ciclados por la actividad licopeno ciclasa de la enzima bifuncional fitoeno-beta-caroteno sintasa formando así beta-caroteno que es el precursor de astaxantina.

Esta tesis se enfocó en la formación de astaxantina a partir de beta-caroteno, lo cual requiere de dos actividades enzimáticas: cetolasa, que incorpora un grupo ceto en las posiciones 4 y 4' de la molécula de beta-caroteno e hidroxilasa, que introduce un grupo hidroxilo en las posiciones 3 y 3' del beta-caroteno (Cunningham y Gantt 1998; Linden 1999). A diferencia de otros organismos, en donde participan dos genes independientes en este paso, en *X. dendrorhous* se aisló un gen *crtS* que codifica la enzima astaxantina sintasa (CrtS) (Hoshino y col., 2000; Ojima y col., 2006; Alvarez y col., 2006). Éste tiene la capacidad de complementar una mutante que acumula beta-caroteno en *X. dendrorhous* (Alvarez y col., 2006), lo que demostró que participa en la última etapa de la síntesis de carotenoides de la levadura. Sin embargo, posteriormente

se sugirió que la enzima CrtS requeriría de un gen adicional que tendría un posible rol auxiliar (Martín y col., 2008). El análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica deducida del gen *crtS* indicó que la enzima astaxantina sintasa de *X. dendrorhous* pertenece a la familia de proteínas citocromo P450 monooxigenasas o P450 (Ojima y col., 2006).

En este sentido, las enzimas citocromo P450 monooxigenasas son hemo-proteínas que participan en la biosíntesis de compuestos intracelulares como esteroides y ácidos grasos (Bernhardt, 2006), y en la síntesis de metabolitos secundarios en plantas, insectos y hongos (Estabrook, 2003). Además están involucradas en el metabolismo de xenobióticos tales como drogas y toxinas, que al ser oxidados se hacen más polares y son más fácilmente secretados (Porter y Coon, 1991). La reacción general catalizada por estas enzimas es la siguiente, en donde R representa al sustrato:



Para la oxidación del sustrato las enzimas P450 requieren de un sistema donador de electrones, que en eucariontes es una enzima citocromo P450 reductasa o CPR (van den Brink y col., 1998). Las CPRs son flavoproteínas que contienen un mol de cada cofactor: FAD (flavin adenina dinucleótido) y FMN (flavin mononucleótido) por cada mol de proteína. Éstas consisten de una región pequeña de transmembrana y una región hidrofílica citoplasmática mayor que interactúa con la enzima citocromo P450, NAD(P)H, y los cofactores FAD y FMN. Los cofactores son necesarios para el flujo de electrones que van desde el NAD(P)H a FAD a FMN y finalmente a la enzima

citocromo P450 (van den Brink y col., 1998). A diferencia de las enzimas citocromo P450 en que se ha observado que en un organismo pueden existir varios genes para enzimas citocromo P450 diferentes, sólo un gen codifica una CPR única en la mayoría de las especies, salvo algunas excepciones observadas en plantas y algunos zigomicetes que contienen dos o tres CPRs (Malonek y col., 2004; Lah y col., 2008). En relación a esto es posible pensar que dado que la enzima astaxantina sintasa pertenece a la familia de enzimas citocromo P450, la reacción catalizada por ella necesariamente debe requerir de la asociación de una CPR que aun no ha sido descrita.

De acuerdo a lo anterior, en el año 2006 se describió un trabajo en el cual se transformó una cepa de *Escherichia coli* con 3 plásmidos compatibles entre si, uno de ellos contenía los genes necesarios para la síntesis de beta-caroteno, otro contenía el gen *crtS* de *X. dendrorhous* y el tercero contenía el gen de la CPR (*cpr*) de *Saccharomyces cerevisiae* (Ojima y col., 2006). Mediante este sistema sólo fue posible obtener derivados oxigenados de beta-caroteno en muy bajas cantidades, pero no astaxantina. Este resultado sugiere la necesidad de contar con una enzima CPR adecuada para complementar la ruta biosintética en el sistema utilizado, implicando también la participación de un nuevo gen en la síntesis de astaxantina a partir de beta-caroteno. En este sentido, hasta el momento no se ha identificado aún el gen que codifique a una citocromo P450 reductasa en *X. dendrorhous* y no se ha demostrado su posible participación en la biosíntesis de astaxantina.

Debido a que la biosíntesis de astaxantina de *X. dendrorhous*, es un proceso complejo que podría estar regulado en distintos niveles, es importante conocer todos los

genes estructurales de las enzimas que participan en esta vía para su comprensión. De esta manera, debido a las evidencias que la enzima astaxantina sintasa es necesaria en el último paso de la vía y que pertenece a la familia de enzimas citocromo P450, esta tesis planteó la participación de una enzima citocromo P450 reductasa en la síntesis de astaxantina. Se propuso el clonamiento y caracterización del gen de la enzima citocromo P450 reductasa (gen *crtR*) de *X. dendrorhous*, como también el análisis de su funcionalidad mediante la construcción de cepas mutantes de la levadura en este gen para poder estudiar su efecto en la síntesis de astaxantina. Finalmente, también se realizaron experimentos para el análisis de la expresión a nivel de mRNA de los genes *crtR* y *crtS* en distintas etapas de la curva de crecimiento de una cepa silvestre de *X. dendrorhous*.

Hipótesis.

La enzima citocromo P450 reductasa (CrtR, producto del gen *crtR*) participa en la formación de astaxantina a partir de beta-caroteno en la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* y su papel sería el de un dador de electrones. Éstos son requeridos para la actividad de la enzima astaxantina sintasa (producto del gen *crtS*) que pertenece a la familia de las citocromo P450 monooxigenasas.

Objetivo general.

Estudiar la participación de un gen auxiliar en la formación de astaxantina a partir de beta-caroteno en *X. dendrorhous*.

Objetivos específicos.

1. Aislar y caracterizar el gen *crtR* que codifica la enzima citocromo P450 reductasa de *X. dendrorhous* en su versión genómica y de cDNA.
2. Expresar los genes *crtS* y *crtR* de *X. dendrorhous* en una cepa de *E. coli* que produce beta-caroteno.
3. Construir mutantes de delección del gen *crtR* en cepas silvestres (UCD 67-385 y CBS-6938) de *X. dendrorhous* y estudiar su fenotipo productor de pigmentos.
4. Estudiar la expresión de los genes *crtS* y *crtR* en distintas etapas de la curva de crecimiento de la levadura silvestre (UCD 67-385).

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Materiales.

1.1 Cepas, plásmidos, librerías genómicas y de cDNAs. Las cepas bacterianas y de *X. dendrorhous* (Phaff y col., 1972; Miller y col., 1976; Golubev y col., 1995) utilizadas y modificadas en esta tesis se indican en la Tabla 1 y los plásmidos utilizados y contruidos en este trabajo se describen en la Tabla 2. Se utilizó a la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* como levadura silvestre la cual se obtuvo desde la colección "American Type Culture Collection" (ATCC). En este trabajo se utilizaron dos librerías genómicas y una librería de cDNAs de la cepa UCD 67-385 (Tabla 1). La búsqueda del gen *crtR* en las librerías genómicas y de cDNA se realizó de acuerdo a Barahona y col., 2001.

1.2 Enzimas. Las endonucleasas de restricción, DNA ligasa del bacteriófago T4, DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*, transcriptasa reversa de M-MLV, Klenow, DNasa, RNasaA, etc. se adquirieron de las compañías Promega, BioLabs y Gibco-BRL, U.S.A., y se usaron de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Las enzimas novozima, proteinasa K y lisozima, se adquirieron de Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, U.S.A. y Gibco-BRL, U.S.A.

Tabla 1. Cepas y genotecas usadas en esta Tesis

Cepa	Genotipo o características relevantes	Referencia
<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(r_k⁻ m_k⁺) phoA supE441- thi-1 gyrA96 relA1</i> .	Sambrook y Russell, 2001.
DS1B	Cepa productora de beta-caroteno con fenotipo amarillo. Corresponde a la cepa BL21 de <i>E. coli</i> con pDS1B.	Niklitschek col., 2008. y
DS1C	Cepa BL21 de <i>E. coli</i> con pDS1B Δ X:: <i>RBSXcrtS</i> .	Esta Tesis.
DS1D	Cepa BL21 de <i>E. coli</i> con pDS1B Δ Xt:: <i>RBSXcrtS</i> .	Esta Tesis.
<i>X. dendrorhous</i>		
UCD 67-385	ATCC 24230, cepa silvestre.	ATCC
CBS-6938	ATCC 96594, cepa silvestre.	ATCC
T13	(<i>crtR</i> ^{ΔBsiWI::hph} / <i>crtR</i> ⁺). Transformante heterocigoto de la cepa UCD 67-385. Contiene una copia silvestre y una con una delección en gen <i>crtR</i> . (<i>BsiWI</i>) y una inserción del módulo de resistencia a higromicina B.	Esta Tesis.
CBSTr	(<i>crtR</i> ^{ΔNdeI::hph}). Transformante de la cepa CBS-6938 que acumula beta-caroteno. Contiene una delección en gen <i>crtR</i> (<i>NdeI</i>) y una inserción del módulo de resistencia a higromicina B.	Esta Tesis.
Genotecas		
YIp5/ <i>BamHI</i>	Compuesta por 65 mezclas (PR1 a PR65) con 100 clones recombinantes cada una portadores de DNA genómico parcialmente digerido con la endonucleasa <i>BamHI</i> y clonado en el sitio <i>BamHI</i> del vector YIp5.	Niklitschek col., 2008. y
pBS/ <i>SalI</i>	Compuesta por 10 mezclas (CPRA a CPRJ) de 52 clones recombinantes cada una, portadores de fragmentos entre 5,0 y 6,0 kb de DNA genómico digerido con la endonucleasa de restricción <i>SalI</i> y clonados en el plásmido pBluescript SK-.	Esta Tesis.
cDNA	Compuesta por 5 mezclas (cXDA a cXDE) de 5.000 clones cada una. Se construyó con el kit "pBluescript II XR cDNA library construction kit" de Stratagene.	Marcoleta, 2007.

Tabla 2. Plásmidos utilizados en esta Tesis

Plásmido	Genotipo o características relevantes	Referencia
pBluescript SK- pBAD33	ColE1 ori; Amp ^R ; Vector de clonamiento. p15 ori; Cam ^R ; Vector de clonamiento.	Stratagene Beckwith Lab.
YIp5	pMB1 ori; Amp ^R ; TET ^R ; URA3. Vector de clonamiento de <i>S. cerevisiae/E. coli</i> .	ATCC
pET101/D-TOPO pPR52.P.44	Vector de expresión. ColE1 ori; Amp ^R . YIp5 con un inserto de 12,8 kb que contiene al gen <i>crtR</i> desde la base n° 88 del exon 1.	Invitrogen Esta Tesis.
pCPR1.3	pBluescript SK- con un fragmento de DNA entre los sitios <i>Bam</i> HI 4.529 y 9.895 (Figura 5, Figura 9). A partir de pCPR1.3 se construyeron las deleciones del gen <i>crtR</i> .	Esta Tesis.
pCPR1.5	pBluescript SK- con un fragmento de DNA <i>Bam</i> HI de 4,4 kb proveniente de pPR52.P.44 (Figura 5).	Esta Tesis.
PCPR2.7	pBluescript SK- con un fragmento de DNA <i>Bam</i> HI de 0,9 kb proveniente de pPR52.P.44 (Figura 5).	Esta Tesis.
pCPR3.4	pBluescript SK- con un fragmento de DNA <i>Bam</i> HI de 0,8 kb proveniente de pPR52.P.44 (Figura 5).	Esta Tesis.
pCPR4.8	pBluescript SK- con un fragmento de DNA <i>Bam</i> HI de 0,4 kb proveniente de pPR52.P.44 (Figura 5).	Esta Tesis.
pcXDA.44.29	pBluescript SK- con el cDNA del gen <i>crtR</i> . El cDNA mide 2.680 pb.	Esta Tesis.
pPR32.AA.51	YIp5 con un inserto de 4,5 kb que contiene hasta la base n° 87 del exon 1 del gen <i>crtR</i> .	Esta Tesis.
pCPRB6	pBluescript SK- con un inserto de 5,9 kb que contiene la versión genómica completa del gen <i>crtR</i> . Aislado desde genoteca parcial <i>Sal</i> I.	Esta Tesis.
pBS-Erw	Genes carotenogénicos <i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i> , <i>crtY</i> y <i>crtX</i> de <i>Erwinia uredovora</i> en pBluescript SK-. En pBS-Erw se realizaron las modificaciones del gen <i>crtX</i> y luego se clonaron en pBAD33.	Esta Tesis.
pDS1B	Genes carotenogénicos <i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i> , <i>crtY</i> y <i>crtX</i> de <i>Erwinia uredovora</i> en pBAD33.	Niklitschek y col., 2008.
pDS1BΔX	pDS1BΔ <i>crtX</i> . La deleción del gen <i>crtX</i> es parcial y fue producida digiriendo pBS-Erw con las enzimas <i>Bst</i> EII y <i>Afl</i> III. Luego el inserto se clonó en pBAD33.	Esta Tesis.
pDS1BAX::RBSX <i>crtS</i>	pDS1BΔ <i>crtX</i> con el cDNA del gen <i>crtS</i> de <i>X. dendrorhous</i> bajo el RBS de <i>crtX</i> en la deleción del gen <i>crtX</i> . Luego el inserto se clonó en pBAD33.	Esta Tesis.

Plásmido	Genotipo o características relevantes	Referencia
pDS1BΔXt::RBS <i>XcrtS</i>	El gen <i>crtX</i> fue totalmente reemplazado por el gen <i>crtS</i> bajo el RBS de <i>crtX</i> . Luego el inserto se clonó en pBAD33.	Esta Tesis.
pET- <i>crtS+crtR</i>	cDNAs de genes <i>crtS</i> y <i>crtR</i> de <i>X. dendrorhous</i> clonados en pET101/D-TOPO.	Esta Tesis.
pET- <i>crtR</i>	cDNA de gene <i>crtR</i> de <i>X. dendrorhous</i> clonado en pET101/D-TOPO.	Esta Tesis.
pBsiWIΔ <i>crtR</i> :: <i>hph</i>	pCPR1.3 con una deleción <i>BsiWI</i> e inserción del módulo <i>hph</i> .	Esta Tesis.
pNdeIΔ <i>crtR</i> :: <i>hph</i>	pCPR1.3 con una deleción <i>NdeI</i> e inserción del módulo <i>hph</i> .	Esta Tesis.
p5C2	pBluescript SK- con un fragmento de DNA de aproximadamente 5,0 kb obtenido al digerir DNA genómico de la cepa CBSTr con <i>PstI</i> y <i>XhoI</i> .	Esta Tesis.
p5D18	pBluescript SK- con un fragmento de DNA de aproximadamente 5,0 kb obtenido al digerir DNA genómico de la cepa CBSTr con <i>PstI</i> y <i>XhoI</i> .	Esta Tesis.
pBS+Ura3GAC7	pBluescript SK- portador del gen <i>ura3</i> de <i>S. cerevisiae</i> , interrumpido por el gen de resistencia a G418 y la región codificante de los genes <i>crtS</i> y <i>crtR</i> bajo el control del promotor TEF del hongo <i>Ashbya gossypii</i> y el terminador de la transcripción CYC1 de <i>S. cerevisiae</i> cada uno.	Esta Tesis.

1.3 Ácidos nucleicos y oligonucleótidos. Los marcadores de tamaño molecular de DNA como; el DNA del bacteriófago lambda digerido con la endonucleasa de restricción *HindIII* y 100 bp se adquirieron de BioLabs Inc. U.S.A.

Los oligonucleótidos se sintetizaron por Alpha-DNA, Montreal, Canadá y se ilustran en la Tabla 3. Éstos se utilizaron para la amplificación de fragmentos de DNA, secuenciación, análisis de transformantes por PCR, RT-PCR y unión de fragmentos de DNA por PCR.

1.4 Medios de cultivo y reactivos químicos. Todos los reactivos químicos y componentes de los medios de cultivo utilizados fueron los de uso general y frecuente en un laboratorio de microbiología y biología molecular. Se adquirieron de las compañías Merck Química Chilena Soc. Ltda., Sigma Chemical Co. ST. Louis, Missouri, U.S.A. y Difco Laboratories, Detroit, Michigan U.S.A.

2 Métodos.

2.1 Cultivo y mantención de microorganismos.

2.1.1 Bacterias. Las cepas de *E. coli* se crecieron en el medio de cultivo Luria Bertani (LB) (triptona 1 %; extracto de levadura 0,5 % y NaCl 0,5 %) a 37 °C con agitación constante o en medio sólido en placas LB-agar al 1,5 %. Las cepas portadoras de plásmidos se crecieron en medio LB suplementado con el antibiótico que permite la selección plasmidial según las instrucciones de su proveedor. La mantención de cepas

Tabla 3. Principales oligonucleótidos utilizados en éste estudio

Nombre	Secuencia (5'a 3')	Orientación
CPR 1	aagytgcagccycgctactaytcsatctc	Directo
CPR 2	cttcayttertcttgtasargaartcctc	Reverso
CPR 3	caractggkacdgcgargatt	Directo
CPR 4	caaacctggtagcgctgaagatt	Directo
CPR 5	wggdcratcatgayractgg	Reverso
CPR 6	aggtccaatcatgacgactgg	Reverso
CPR 7	crgtaccwggdcratcatga	Reverso
CPR 8	ccagtaccaggtccaatcatga	Reverso
CPR 9	ggatccgcgacatcgaagagtatgac	Directo
CPR12	ggatccctccaagcgaggtagtctt	Reverso
CPR 3A	tacaacgtcgtcggtagaca	Directo
CPR3D	ggtctcacttctccagagaa	Directo
CPR 56	tcgttggtgtgctattcg	Reverso
CPR 13	agaagactgtgcgatcgtgt	Directo
CPR 7A	tattccacaccgtggtgttc	Reverso
CPR 31	tcaagcaattggtgttggtc	Reverso
CPRfwdC	gcacaggaagttggttgat	Directo
CPR1ExC	gccacactctccgatctgt	Directo
CPR3D	ggtctcacttctccagagaa	Directo
ARC- <i>crtS</i> 5'	atgttcactcttggcttctc	Directo
ARC- <i>crtS</i> 3'	tgtggccatagctgtcctccttcattcgaccggcttgacct	Reverso
ARC- <i>crtR</i> 5'	gtcgaatgaaggaggacagctatggccacactctccgatct	Directo
ARC- <i>crtR</i> 3'	ctacgaccagacgtccatca	Reverso
<i>crtSRBSX</i>	taaggatgctgcatgttcacttggctctg	Directo
<i>crtS</i> stop	tcattcgaccggcttgacctg	Reverso
CLUSerw-F	ggatccggtagccgacggtctgccaat	Directo
<i>crtE</i> (c) <i>crtS</i> -R	gatgaacatgcagatccttaactgacggc	Reverso
<i>crtS</i> (c) <i>crtE</i> -F	ccgtcagtaaggatgctgcatgttcacttgg	Directo
<i>crtS</i> (c) <i>crtY</i> -R	ggttgcatagccgctcccacttaccattcgaccgg	Reverso
<i>crtY</i> (c) <i>crtS</i> -F	cgaatgataagtgggagcggctatgcaacc	Directo
mediocrtI-R	ggatccccgcagctgtgacgaattgcc	Reverso
Pef fwd	gatatcggctcatcagccgac	Directo
gpd rev	atgagagatgacggagatg	Reverso
HR	ctattcctttgccctcggac	Reverso

Nombre	Secuencia (5'a 3')	Orientación
HF	atgaaaagcctgaactcacc	Directo
HygSecR	gtattgaccgattccttgcg	Reverso
HygSecF	tcgccaacatcttctctg	Directo
ACT3	actcctacgttggtgacgag	Directo
ACT4	tcaagtctcgaccggccaag	Reverso
AST1	catcctctcagctgtacagg	Directo
AST2	gtctccgtttcatagttcgg	Reverso
M13R	ggaaacagctatgaccatg	Reverso
M13 F	tgtaaaacgacggccagt	Directo
ProTEFBam-F	gcgggatccgacatggaggcccagaat	Directo
Ast(c)ProTEF-F	acataaacaaccatgttcatcttggtcttgctcac	Directo
TermCYC(c)Ast-F	cggtcgaatgaatcatgtaattagttatgtcacgc	Directo
ProTEFSpe-F	tgcgactagtgacatggaggcccagaat	Directo
ProTEFXba-F	gcgtctagagacatggaggcccagaat	Directo
CPR(c)ProTEF-F	acataaacaaccatggccacactctccgat	Directo
TermCYC(c)CPR-F	gtctggtcgtagatcatgtaattagttatgtcacgc	Directo
TermCYCSpe-R	gcgactagtcaaattaaagccttcgagcg	Reverso
CPR(c)TermCYC-R	taattacatgatctacgaccagacgtccat	Reverso
ProTEF(c)CPR-R	gagtgtggccatggtgtttatggtcggatgtgat	Reverso
TermTEFXba-R	tgcgtctagacagtatagcaccagcattc	Reverso
TermCYCBam-R	gcgggatccgcaaattaaagccttcgagcgt	Reverso
Ast(c)TermCYC-R	taattacatgattcattcgaccggcttgac	Reverso
Ast(c)ProTEF-R	caagatgaacatggtgtttatggtcggatgt	Reverso
Ura3 NotI-F	tgcggcggccgcgggtaataactgatataattaa	Directo
Ura3 NotI-R	tgcggcggccgcgatgtcgaaagctacatataag	Reverso

se realizó mezclando 1 ml de un cultivo saturado con 298 μ l de glicerol al 87 % y se congeló a -80°C .

2.1.2 Levaduras. Las cepas de *X. dendrorhous* se crecieron en medio YM (glucosa 1 %; extracto de levadura 0,3 %; extracto de malta 0,3 % y peptona 0,5 %) a 22°C con agitación constante. Para los experimentos que requerían formación de protoplastos la levadura se creció en medio mínimo MM_V + 2 % glucosa (Retamales y col., 2002). Los cultivos en medio sólido se realizaron en placas con agar al 1,5 %. Para la fermentación de la cepa UCD 67-385 se utilizó un fermentador de 12 l (New Brunswick) con 8,8 l de MM_V + 2 % glucosa con temperatura controlada a $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, agitación de 300 rpm y se inyectó aire estéril a una velocidad de 13 l/min. Se adicionó el agente antiespumante (1520 US, Dow Corning) cuando éste era requerido (Wozniak, 2008).

2.2 Purificación de ácidos nucleicos.

2.2.1 DNA plasmidial. El DNA plasmidial de los cultivos bacterianos se purificó por el método de la lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979; Sambroock y Russell, 2001). Para ello, las cepas bacterianas se crecieron en medio LB suplementado con el antibiótico indicado. Las células de 3 ml de cultivo se recolectaron por centrifugación a velocidad máxima en una microcentrífuga por 1 min y luego se resuspendieron en 100 μ l de solución I (glucosa 50 mM; EDTA 10 mM y Tris-HCl 25 mM pH 8,0) con lisozima a 4 mg/ml. La mezcla se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó 200 μ l de solución II (NaOH 0,2 N y SDS 1 %), se mezcló suavemente y se dejó la mezcla en hielo por 5 min. Finalmente, se agregó solución III (acetato de potasio 5 M)

y se incubó por otros 5 min en hielo. La mezcla se centrifugó a velocidad máxima en una microcentrífuga por 10 min. El sobrenadante se extrajo dos veces con 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y una vez con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El DNA se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto frío, manteniéndolo por un tiempo mínimo de 30 min a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y luego se centrifugó. Finalmente, el DNA se solubilizó en 50 μl de amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y EDTA 10 mM) con RNasa A a una concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$. La mezcla se incubó durante 30 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y luego el DNA se guardó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior utilización.

En el caso de requerir DNA plasmidial de una mayor calidad, se utilizaron sistemas comerciales para su purificación; “AxyPrepTM Plasmid Miniprep Kit” y “AxyPrepTM Plasmid Midiprep Kit”, los cuales se adquirieron de Axygen Biosciences, U.S.A.

2.2.2 DNA genómico de *X. dendrorhous*. El DNA genómico de *X. dendrorhous* se obtuvo a partir de protoplastos de la levadura. La obtención de protoplastos se realizó por el método desarrollado en nuestro laboratorio (Hermosilla y col., 1995; Retamales y col., 1998). Para ello, la levadura se creció en 500 ml de MM_V a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación constante hasta saturación y las células se lavaron 2 veces con KCl 0,8 M. Luego, éstas se suspendieron en 4 ml de KCl 0,8 M y se les agregó novozima a una concentración final de 4 mg/ml, completando un volumen final de 5 ml. La mezcla se incubó con agitación suave por un tiempo mínimo de 12 h a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los protoplastos se lavaron tres veces con KCl 0,8 M centrifugando a 1.935 x g (Rotor: SS-34, Sorvall) por 10 min cada vez y se suspendieron en 5,4 ml de Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y EDTA 20 mM.

Posteriormente, se agregó 0,6 ml de SDS 10 % y se incubó a 37 °C por 10 min. A continuación se agregó 50 µl de proteinasa K a una concentración de 20 mg/ml y la mezcla se incubó a 55 °C por 1 h. La mezcla se centrifugó a 1.935 x g (Rotor: SS-34, Sorvall) por 5 min y el sobrenadante se extrajo tres veces con un volumen de fenol saturado en amortiguador Tris-HCl pH 7,4, dos veces con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y una vez con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Durante los lavados, las fases se separaron por centrifugación a 1.935 x g (Rotor: SS-34, Sorvall) por 10 min. El DNA se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto frío y luego se lavó con etanol al 70 %. Finalmente, el DNA se solubilizó en 500 µl de amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y EDTA 10 mM) y se almacenó a -20 °C hasta su posterior utilización.

2.2.3 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa. Para la extracción de DNA a partir de geles de agarosa se utilizó el método de las perlas de sílica descrito por Boyle y Lew, 1995. Los fragmentos de DNA se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % en amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM pH 8,0). La zona del gel o la banda de interés se cortó con un bisturí visualizando al DNA bajo luz UV en un trans-iluminador. El trozo de gel se depositó en un tubo Eppendorf y se agregó 3 volúmenes de NaI 6 M (de acuerdo al peso del trozo de gel en gramos). La mezcla se incubó por 10 min a 55 °C o hasta que la agarosa se disolvió completamente. Luego, se agregó 7 µl de perlas de sílica suspendidas en NaI 3 M y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la resina con el DNA unido se precipitó por centrifugación a velocidad máxima en una microcentrífuga por 5 s. El sobrenadante se

eliminó y la resina se lavó tres veces con 500 µl de solución "NewWash" (Tris-HCl pH 7,5 10 mM; NaCl 50 mM; EDTA 2,5 mM y etanol 50 % v/v) centrifugando 10 s a velocidad máxima en una microcentrífuga cada vez. Finalmente, el DNA se eluyó de la resina agregando 15 µl de agua estéril e incubando por 10 min a 55 °C. El DNA suspendido se recuperó por centrifugación a velocidad máxima en una microcentrífuga por 30 s y se depositó en un tubo Eppendorf limpio y estéril. El DNA se guardó a -20 °C hasta su posterior utilización.

2.2.4 Extracción de RNA de *X. dendrorhous*. La extracción de RNA total se realizó de acuerdo a un método modificado de Chomczynski y Sacchi para *X. dendrorhous* (Chomczynski y Sacchi, 1987; Lodato y col., 2004). Para evitar contaminación con RNasas se utilizó el inhibidor dietilpircarbonato (DEPC), el cual se agregó al agua con la que se prepararon las soluciones y se lavó el material previo a ser utilizado. Para la extracción del RNA total, a las células provenientes de 40 ml de cultivo de *X. dendrorhous* se les agregó 5 ml de solución Ch-P (Chomczynski y Sacchi, 1987) y 1 volumen de perlas de vidrio de 0,5 mm. La mezcla se agitó en vórtex a máxima velocidad durante 5 min y luego el homogeneizado se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó 1 ml de cloroformo y se agitó en forma manual por 5 min a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 12.100 x g (Rotor: SS-34, Sorvall) por 15 min a 4 °C. Se depositó la fase acuosa (superior) en un nuevo tubo y se lavó 2 veces con 2,5 ml de fenol:CH₃Cl 1:1, centrifugando a 12.100 x g (Rotor: SS-34, Sorvall) por 15 min a 4 °C. Finalmente, el sobrenadante se lavó con 2,5 ml de isopropanol y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, el RNA se

precipitó por centrifugación a 12.100 x g (Rotor: SS-34, Sorvall) por 10 min a 4 °C y se lavó con 1 ml de etanol 75 %. El RNA se dejó secar, se solubilizó en agua tratada con DEPC y se incubó a 55 °C. El RNA se almacenó a -20 °C hasta su posterior utilización.

2.3 Análisis de DNA.

2.3.1 Mapas de restricción y geles de agarosa. Las digestiones de DNA plasmidial y genómico, se realizaron de acuerdo a las instrucciones de su proveedor.

Las muestras de DNA se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,8 - 3,0 % en amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM pH 8,0) suplementado con bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml. El DNA se visualizó con luz UV con un trans-iluminador (Sambroock y Russell, 2001). El DNA se cuantificó con los programas Kodak 1D o Image J versión 1,40. Como estándar de tamaño molecular se utilizó los marcadores: DNA del bacteriófago lambda digerido con la endonucleasa de restricción *Hind*III y/o 100 bp.

2.3.2 Secuenciación y análisis de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas. La secuenciación de DNA se realizó en un equipo ABI 3.100 Avant Genetic Analyzer y se utilizó el sistema DYEnamic ET terminator Kit de Amersham Bioscience. Las secuencias de DNA se analizaron con el paquete de programas Vector NTI Suite v.10 (Informax) y programas en línea como CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) y BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Para el análisis de la secuencia aminoacídica se utilizaron los programas disponibles en línea; InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>) y TMPRED (http://www.ch.embnet.or/software/TMPRED_form.html). El análisis filogenético se realizó con los programas BioEdit 7.0.0 y Treecon 1.3b.

La proteína CrtR se modeló utilizando como template las estructuras con código PDB: 1AMO, 1TLL y 2BF4. Inicialmente, se generó un alineamiento por superposición estructural de estas proteínas utilizando el programa CE-MC (<http://pathway.rit.albany.edu/~cemic>), el cual se refinó manualmente. Posteriormente, la secuencia problema se alineó sobre este perfil con el programa Clustal X (<http://bioinformatics.ubc.ca/resources/tools/clustalx>). 30 modelos se construyeron desde el residuo 61 utilizando el programa Modeller 9. Estos modelos se evaluaron mediante ProQ (<http://www.sbc.su.se/~bjornw/ProQ/ProQ.html>) y Verify3D (http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D/) y la calidad estereoquímica de ellos se verificó utilizando el programa Procheck (Laskowski y col., 1993). El modelo se editó con el programa VMD 1.8.6.

2.3.3 Reacción de la polimerasa en cadena (PCR). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 μ l que contenía amortiguador de PCR 1X pH 8,4 (Tris-HCl 200 mM y KCl 500 mM), 2 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 μ M de cada partidor, entre 10 y 100 ng de DNA molde y entre 0,2 y 0,5 unidades de *Taq* polimerasa. Se utilizó un termociclador Perkin Elmer 2.400 utilizando el siguiente programa: denaturación inicial a 95 °C por 3 min, 35 ciclos de denaturación a 94 °C por 30 s, alineación de los

partidores a 55 °C por 30 s y elongación a 72 °C por 3 min. Finalmente, la mezcla se dejó por 10 min a 72 °C para una elongación final y luego se mantuvo a 4 °C hasta su análisis.

2.4 Transcripción Reversa acoplada a la reacción de la polimerasa en cadena (RT-PCR). La determinación de los niveles relativos de los mRNAs de los genes *crtS* y *crtR* se realizó de acuerdo a un método de RT-PCR semi-cuantitativo. Para ello, las intensidades de los amplificadores de los genes *crtS* y *crtR* se normalizaron con la intensidad del amplificado del gen de actina (Wery y col., 1996; Ngiam y col., 2000; Lodato y col., 2003, 2004). Los niveles relativos de los mRNAs de los genes *crtS* y *crtR* se determinaron como una relación entre las intensidades de sus amplificadores y la intensidad del amplificado del gen de actina.

2.4.1 Síntesis de cDNA (reacción RT). Las muestras de RNA se trataron previamente con 10 U de DNasa (Roche) y la reacción RT se realizó con transcriptasa reversa M-MLV (Promega). En un volumen total de 11 µl se mezcló 3 µg de RNA total, partidor oligo-dT15 (25 µM) y agua destilada estéril. La mezcla se incubó a 70 °C durante 5 min y luego se dejó en hielo por 3 min. A la mezcla se le agregó 4 µl de amortiguador M-MLV 5X, 2 µl de dNTP's 10 mM, 2 µl de H₂O y se incubó a 37 °C por 5 min. Finalmente, se agregaron 200 U de M-MLV RT en 1 µl y la reacción se incubó por 1 h a 42 °C y luego se calentó a 70 °C por 10 min. Las muestras se mantuvieron a -20 °C hasta su posterior análisis.

2.4.2 PCR. La reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 25 µl en la mezcla de

reacción que contenía 2,5 µl de amortiguador *Taq* polimerasa 10X, 0,5 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de MgCl₂ 50 mM, 1 µl de cada partidor 25 µM, 2 µl de reacción RT, 1 U de *Taq*pol y H₂O. El programa que se utilizó fue el siguiente: 95 °C por 3 min, 28 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 3 min, extensión final a 72 °C por 10 min y luego la reacción se mantuvo a 4 °C. El número de ciclos utilizado corresponde al número estandarizado que permite realizar un PCR semi-cuantitativo (Lodato, 2002).

2.5 Cariotipo electroforético.

2.5.1 Preparación de DNA cromosómico intacto de *X. dendrorhous*. Para los análisis de electroforesis de campo pulsado se preparó DNA cromosómico intacto de la levadura mediante la técnica descrita por Cifuentes y col., 1997 basada en Schwartz y Cantor, 1984. Para ello, se colectaron las células provenientes de 100 ml de un cultivo en fase estacionaria de *X. dendrorhous* crecido en MM_v. Éstas se lavaron dos veces con EDTA 50 mM pH 8,0 y luego se suspendieron en una solución de EDTA 50 mM pH 8,0 con 10 mg/ml de novozima. Posteriormente, se les agregó 3 ml de agarosa de bajo punto de fusión al 1 % en EDTA 125 mM pH 8,0, precalentada a 42 °C y la mezcla se distribuyó en moldes de 100 µl. La gelificación de los bloques se realizó a 4 °C y luego éstos se sumergieron en 5 ml de amortiguador LET (EDTA 500 mM; β-mercaptoetanol 7,5 % y Tris-HCl 10 mM pH 7,5) que contenía 0,4 mg/ml de novozima y se incubaron a 37 °C por 24 h. Transcurrida la incubación, los bloques se lavaron dos veces con EDTA 50 mM y luego se sumergieron en 5 ml de solución NDS (EDTA 500 mM; N-lauroylsarcosina 1 % y Tris-HCl 10 mM pH 7,5) que contenía 1 mg/ml de proteinasa K y se incubaron a 55 °C por 24 h. Finalmente, los bloques se lavaron dos veces con

EDTA 50 mM y se dejaron en la misma solución a 4 °C hasta su posterior utilización.

2.5.2 Electroforesis de campo pulsado. La electroforesis de campo pulsado se realizó en un sistema CHEF II y CHEF III de BioRad (Chu y col., 1986) en geles de agarosa al 0,9 % en amortiguador TBE 0,5X (Tris-borato 45 mM y EDTA 1 mM pH 8,0) a 14 °C. Las condiciones óptimas utilizadas para la separación de las bandas de DNA cromosómico de *X. dendrorhous* fueron las descritas por Cifuentes y col., 1997. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio 1 µg/ml por 6 h y luego se lavaron con agua destilada por 3 a 4 h. Las bandas cromosómicas se visualizaron con un trans-iluminador con radiación UV.

2.6 Hibridación DNA-DNA. Los experimentos de hibridación se basaron en las técnicas desarrolladas por Southern, 1975 y descritas por Sambrook y Russell, 2001.

2.6.1 Marcación radio activa de ácidos nucleicos. La marcación radio activa de las sondas se realizó con el sistema “Prime-a-Gene Labeling system” de Promega de acuerdo a las instrucciones del proveedor. α -[³²P]-dCTP, que se adquirió de PerkinElmer. Las sondas se lavaron en columnas de Sephadex G-50 estéril en jeringas de tuberculina.

2.6.2 Preparación de las membranas. Para transferir el DNA desde un gel de agarosa a una membrana luego de realizar la electroforesis en el gel de agarosa, éste se fotografió junto a una regla como registro de la migración del DNA. El gel se sumergió en HCl 0,2 N por 15 min con agitación suave para depurinar el DNA y se enjuagó con agua desionizada. Posteriormente, el gel se sumergió en una solución de NaCl 1,5 M y NaOH

0,5 N, por 45 min a temperatura ambiente y agitación suave para denaturar al DNA. A continuación el gel se lavó con agua desionizada y se neutralizó dos veces por sumersión en una solución de Tris-HCl 1 M pH 7,4 y NaCl 1,5 M, primero por 30 min y luego por 15 min a temperatura ambiente y agitación suave. El DNA se transfirió a una membrana de nylon PALL BIODYNE B según Sambrook y Russell, 2001, utilizando una solución SSC 10X (SSC 20X= NaCl 3 M y citrato de sodio 0,3 M pH 7,0) como amortiguador de transferencia. La transferencia se realizó durante toda la noche y para fijar el DNA a la membrana de nylon, ésta se calentó a 80 °C por 15 min.

2.6.3 Prehibridación e Hibridación. Las membranas se lavaron con SSC 2X y luego se depositaron en botellas de hibridación con 10 ml de solución de hibridación (Na_2HPO_4 0,5 M pH 7,2 y SDS 7 %). La membrana en la botella se incubó por 5 min a 65 °C en un horno de hibridación Hybrilinker HL-2000 de UVP Laboratory Products. Posteriormente, se agregó la sonda (desnaturada por ebullición y mantenida en hielo) a la botella de hibridación con la membrana totalmente empapada con la solución de hibridación y se dejó por 16 h a 65 °C con agitación suave en el horno de hibridación.

2.6.4 Lavados. Las membranas se lavaron cuatro veces en las botellas de hibridación. Los lavados consistieron en dos lavados con 10 ml de una solución de Na_2HPO_4 40 mM pH 7,2 y SDS 5 % y dos lavados con 10 ml de una solución compuesta por Na_2HPO_4 40 mM pH 7,2 y SDS 1 %. En cada lavado la membrana se mantuvo entre 30 y 60 min a 65 °C con agitación suave con la solución de lavado correspondiente. Posteriormente, las membranas se retiraron de las botellas de hibridación y se depositaron sobre un soporte cubierto por plástico. Las membranas sobre el soporte también se recubrieron con

plástico y se depositaron en "cassettes" que luego en la oscuridad se pusieron sobre ellas placas autoradiográficas. Los "cassettes" con las membranas y placas autoradiográficas se mantuvieron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por tiempos variables antes de revelar la placa autoradiográfica en un equipo Curix 60 de AGFA.

2.7 Transformación genética por electroporación.

2.7.1 *Escherichia coli*. Las células electrocompetentes se prepararon a partir de 1 l de un cultivo de *E. coli* DH5 α con una $\text{DO}_{580\text{nm}}$ entre 0,5 y 0,8, el cual se enfrió en hielo durante 15 a 30 min y luego se centrifugó a $4.080 \times g$ (Rotor: GSA, Sorvall) por 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las células colectadas se lavaron una vez con 1 l de agua destilada estéril y fría, una vez con 500 ml de agua destilada estéril y fría y una vez con 20 ml de glicerol al 10 % estéril y frío, centrifugando a $4.080 \times g$ (Rotor: GSA, Sorvall) por 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ cada vez. Las células se suspendieron en 3 ml de glicerol al 10 % estéril y frío, se pusieron alícuotas de 50 μl por tubo Eppendorf y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. Para cada transformación de *E. coli*, se tomó un tubo Eppendorf con los 50 μl de células electrocompetentes que se descongelaron en hielo y luego se les agregó el DNA transformante en un volumen no mayor de 10 μl . La mezcla se depositó en una cubeta de electroporación de 0,2 cm (Bio Rad) y se utilizó un equipo Gene Pulser Bio Rad para generar el siguiente pulso: 25 μF , 200 Ω y 2,5 kV. Luego de aplicar el pulso, se agregó 1 ml de medio LB precalentado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y las células se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 h. Finalmente, se sembraron alícuotas de 100 μl de células en placas con medio LB-agar 1,5 % suplementadas con el antibiótico adecuado y se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por toda la noche.

Cuando se utilizó al plásmido pBluescript SK- como vehículo de clonamiento, la selección de transformantes se realizó en placas con medio LB-agar 1,5 % suplementadas con 100 µg/ml ampicilina y 32 µg/ml de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D galactopiranosido). El plásmido pBluescript SK- confiere resistencia a ampicilina a las células que lo contienen y por lo tanto, la presencia de ampicilina en el medio selectivo permite que sólo crezcan aquellas bacterias que hayan incorporado al plásmido. La selección de los clones portadores de plásmidos que contienen un inserto se realizó por el color de la colonia. El sitio de clonamiento múltiple del plásmido pBluescript SK- interrumpe al gen *lacZ* que codifica a la enzima β-galactosidasa. La enzima β-galactosidasa actúa sobre el sustrato cromogénico X-gal, proporcionando el color azul a la colonia. Por lo tanto, las colonias azules son portadoras del plásmido pero no contienen inserto y no así las colonias blancas cuyo color se debe a la interrupción del gen *lacZ* (Sambrook y Russell, 2001).

2.7.2 *X. dendrorhous*. Las transformaciones de *X. dendrorhous* se realizaron por electroporación de acuerdo a Adrio y Veiga, 1995 y Kim y col., 1998. Las células electrocompetentes se prepararon a partir de cultivos en medio YM en fase exponencial con una $DO_{600nm} = 1,2$ (Niklitschek y col., 2008). Las células se cosecharon por centrifugación a 4.080 x g (Rotor: GSA, Sorvall) durante 5 min, se suspendieron en 25 ml de amortiguador BD (amortiguador fosfato de potasio 50 mM pH 7,0 y ditionitrito [DTT] 25 mM) y se incubaron a 22 °C por 15 min. Las células se lavaron dos veces con 25 ml de amortiguador STM (sacarosa 270 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5 y MgCl₂ 1 mM) frío y finalmente se suspendieron en 1 ml de amortiguador STM. 60 µl de células

electrocompetentes se mezclaron con 10 a 20 μg de DNA transformante en un volumen de 5 μl , se depositaron en una cubeta de electroporación y se electroporaron con un equipo BioRad Gene Pulser X Cell bajo las condiciones de: 125 μF , 600 Ω y 0,45 kV. Posteriormente las células se suspendieron en 1 ml de medio YM líquido, se incubaron a 22 °C por 5 h y se sembraron en placas con medio YM-agar al 1,5 %. Para la selección de transformantes de *X. dendrorhous*, se utilizó un módulo de resistencia al antibiótico higromicina B. El módulo consistió en el gen *hph* de *E. coli* bajo el control del promotor del factor de elongación EF-1 α y el terminador de la transcripción del gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (Niklitschek, 2007). La selección se realizó en placas YM suplementadas con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de higromicina B. Los transformantes se identificaron como *X. dendrorhous* por amplificación de las secuencias de DNA: ITS1, el gen del rRNA de 5,8 e ITS2 (Reyes y col., 2004).

2.8 Ensayos de complementación en *E. coli*. Para los ensayos de complementación se creció una colonia transformante en 10 ml de medio LB suplementado con los antibióticos cloramfenicol (CM: 34 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y ampicilina (Amp: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) por 5 h con agitación a 37 °C. Con este pre-inóculo, se inoculó 160 ml de LB suplementado con ambos antibióticos y se dejó a 37 °C hasta alcanzar una $\text{DO}_{580\text{nm}}$ de 0,6 a 0,8. El cultivo se dividió en dos y uno de ellos se indujo agregando IPTG a una concentración final de 1 mM. Los cultivos se dejaron a 30 °C con agitación constante por 3 días para luego extraer los pigmentos producidos. El medio LB además fue suplementado con hemina (10 μM) y ácido- δ -aminolevulínico (o ALA, 0,5 mM) que son precursores del grupo prostético hemo (Guengerich y col., 1996; Ojima y col., 2006).

2.9 Extracción de carotenoides y RP-HPLC. Los carotenoides se extrajeron de acuerdo al método de extracción con acetona a partir de precipitados celulares (An y col., 1989). Los carotenoides se cuantificaron de acuerdo a su absorbancia a 465 nm y se utilizó un coeficiente de extinción $1 \% = 2.100$ (An y col., 1989). Los pigmentos se normalizaron en relación al peso seco de la levadura y los ensayos se realizaron por triplicado. Los carotenoides se separaron por HPLC utilizando una columna de fase reversa RP-18 Lichrocart 125-4 (Merck) con la fase móvil de acetonitrilo: metanol: isopropanol (85:10:5 v/v) con un flujo de 1ml/min bajo condiciones isocráticas. Los espectros de elusión se registraron con un detector de arreglo de diodos. Los carotenoides se identificaron de acuerdo a su espectro de absorción y tiempos de retención.

RESULTADOS

Aislamiento y caracterización del gen *crtR* que codifica la enzima citocromo P450 reductasa de *X. dendrorhous* en su versión genómica y de cDNA. Mediante el alineamiento y comparación de las secuencias codificantes (CDS) del gen *cpr* de las citocromo P450 reductasas provenientes de tres especies de hongos (*Cunninghamella echinulata*: zigomicete, *Saccharomyces cerevisiae*: ascomicete y *Rhodotorula minuta*: basidiomicete, cuyos números de acceso en la base de datos GenBank son; AF195660, ND13788 y AB055119, respectivamente) y utilizando métodos bioinformáticos (programa: Clustal W), se identificaron regiones conservadas en las tres especies. Con base en ellas se diseñaron partidores semi-degenerados (Figura 2 y Tabla 3) para la búsqueda del gen *crtR* de *X. dendrorhous* mediante PCR utilizando su DNA genómico como molde. Al utilizar la pareja de partidores CPR3 y CPR7 se obtuvo un amplificado de aproximadamente 1,6 kb (Banda A, Figura 3), el cual se purificó a partir de un gel de agarosa y posteriormente se secuenció. El fragmento de DNA correspondiente a la banda A se denominó como SEQ3-7 y su secuencia se analizó con el programa BLAST, observándose que es homóloga a genes de citocromo P450 reductasa. El gen se designó como *crtR*, con el objetivo de mantener la nomenclatura definida para los genes de la carotenogénesis (*crt*) y debido a que éste codifica una citocromo P450 Reductasa.

CPR3 >>>
CPR4 >>>

C. *echinulata* -----CAAACCTGGTACAGCAGAAGATTT 23
 S. *cerevisiae* CTGTCAGCTCGGCAACACAGACATGCTCAGTGGTGCACCGAAAACAAGAACTACTTTGGTGTGCTATGCGTCCAGACTGGGACTCGCAGAGGATTA 224
 R. *minuta* GCATCCAAAGCCGTGGCAGGGACATTCGCAAGCTCTCAAGATAACAACAAGCGCATAGCGGTTATTTATGGCTCTCAAACCTGGTACGGCTGAAGATTA 296
 ** * * * * *

C. *echinulata* TGCATCCAGGCTTGTAAAGAAATGTTCAAAAATAATGGAGTTAGCTGTATGACAGCTGATATAGAAAATGATGATTTAACCTATTTAGACACATTAAGC 123
 S. *cerevisiae* CGCCAAAAGTTTTCCAAAGGAGCTGGTCCCAAGTCAACCTAAACGTGATGCGCAGATGTTGAGAACTACGACTTGGAGTAAACG-ATGTGCC 323
 R. *minuta* CGCTCTCCGGATCGCAAGGAATCAAAACAAGTTTTGACATTTCCAGTTTGGTATTTGGATCCTGAAGACTATGACTACCGATACCCCTAGACCAGCATCC 396
 ** * * * * *

C. *echinulata* GAAGACAGTTTTGGTTTTGTTGTCATGGCTACTTTATGGTGAAGGAGAACCTACAGACAATGCAGTTGATTTTGGGAACAATTTATTCAGATGAATCAC 223
 S. *cerevisiae* CGTCATAGTCTCGATTTTTATCTC----TACATATGGTGAAGGAGACTCCCGCAGCGGGCTCAACTTT---GAAGACTTTTATTTGTAATG----- 409
 R. *minuta* AACGATTCGGCCGTTATCTTTGTGATGGCTACCTATGGCGAGGGCCAGCCGACAACGCGGT-GGCGT---GATGGATTTCCCTGAAAAGAGCCCTAAC 492
 * * * * *

C. *echinulata* CCGAGTTCTCAGAAGGTGGCGATAGATTAATTAAGTTACCTTATCTTTGGTCTCGGAATAAGACTTATGAACAATAAATGCTGTGGCTCGTAT 323
 S. *cerevisiae* -----CGGAAGCGGTGC--ACTATCGAACCTGAGGTATAATATGTTGGTCTGGAAATCTACTTATGAATTTCTTTAATGGTGGCCCAAGAA 497
 R. *minuta* TTCCGAG--TCGGGAGC-AACGTC--TTTGGACAATCTCAACTACGTAGTCTTTGGCCTTTGGCAATAATGACATACTCAGAATAAAGCGGCTCGCCCGAAA 587
 * * * * *

C. *echinulata* TTTGGATAAAAATAAATTAACCTGTTAGGCGCTAAACGTTATGGTGAACGTTGATGATGATA--GTTCTTTTAGAAGAAGACTTCTTAGCATGG 420
 S. *cerevisiae* GGCAGAAAGCACTCTCCCGCGGGCTATCAGACTAGCAAGCTCGGTAAGCTGATGATGGTGAAGAACTACAGCAAGAAATACATGGCCCTGG 597
 R. *minuta* GGTGACTCCCTTCTCAGCAATATGGGCGCCAAAGCTGTTGGCAACGAGGTGAAGGTGACGAGATA--AGTCAATGGAGGAAGACTACCTAGGTTGG 684
 ** * * * * *

C. *echinulata* CAAGAACTATGAGGCTGCTTTGTCAAGCTTTGGTGTGGATGAAAATAAATCACTCAA--CAAGGTTCAAGCAAGCTTCTTATCTAGTAGAAGA--- 515
 S. *cerevisiae* AAGACTCCATCCTGGAGTTTGAAGACGAAGTGCATTTGGACGAACAGGAAGCCAAAGTTCACCTCAATCCAGTACACTGTGTTGAACGAAATCA 697
 R. *minuta* AAGATGGCATGCTTGTCTTTCAGCAAGAGAGCTTAAGCTCGAAGAGGTTGTTGGTGGCGAGCTCCCGATTTCAAGGTCAACGAACTCGGCCAG--- 781
 * * * * *

C. *echinulata* ---ATTACAAGAAATATCAACAAGA---TGATGTTTATTTT-CGGTGAATTTGGTACAAGCAAAAGGATACACTACTCAA--AATTAATTTATGATGCTTAA 605
 S. *cerevisiae* CTGACTCATGCTGGTGAACCCCTGCTCCTCATTTTGGCTCGACTCAGTTGAACCGCAACGACGCGCATCCAATGGGTCCCTTCGATTTGTC 797
 R. *minuta* ---CCGATGAGAAAGGACAACAAG-----TCTACCT-AGGTGAACCTCTCAACCGTGT---CTTACTGGATCGCG--CGGTAATTTTCGACGCCAA 863
 * * * * *

C. *echinulata* ACGACCCCTATCTGCACCCTTACTACA--CGTGAACCTTTCAAAGGATCAGAACGTCATGTTTACATGTAGATATTTCCGGAACATAATCTTT 702
 S. *cerevisiae* TCAACCGTATATTCACCCCATCGTGAATCTCGGAACCTGTTCTTCCAAATGACCGTAATGATCCACTGAAATTTGACTTTGTCGGCTCTAACATC 897
 R. *minuta* GAACCCATACCCCTGCTCTCTGCTATCAAGTCGGGAGCTTCTCCGCGGTTGACAGAAACTGTGCTTCGCGAGTTCCGGAATCAAAGATACCCGTTGTG 963
 ** * * * * *

C. *echinulata* AGCTACCAAACTGGTGAATCATGTAGTATGTTGGCAACCAATAATGAGATGAATTAATTCGATFAGCAACTGACTTTGGATTTAAAAGATAAATTTGGACA 802
 S. *cerevisiae* AAGTACTCACCTGGTACCATTTGCTGTTTGGCTTCCAAACCCATTTGAAAGGTCGAACAGTTCTTATCCATATTCAACTGGACCTGAA-----A 991
 R. *minuta* CGATACCAGACTGGTGAATCATGTTGGAGTATGGCCCATGAACCCCTGAGACTGAAGTCGAGAGAATAATCTCCGCTCTTTGGACTACAAGATAAGGCCAACA 1063
 ** * * * * *

C. echinulata
S. cerevisiae
R. minuta

CGGTAAGTAAATGTTAAAGCCATTGATTCCTCGAG-CCTTAAACAATAACCTTTCCAGTCCCAACCACTATCGTGTATTTTTAGACACTATATTGATA 901
 CCAATTTTGGACTTGAAGCCCTGGATCCAC---CGTCAAAGTG---CCCTTCCCAAGCCTACTATTTGGGGCTGCTATTAACACTATTTGGAAA 1084
 CCGTCATCGAGGTCATTCGCTCAGCCCTGGCCCTGCCCCCTGGCCAAAGTA---CCTTTCCCTAGCCCTACCACCTATTTGAAGCTGTCCCTCAGACACTACCTCGACA 1159

C. echinulata
S. cerevisiae
R. minuta

TTTGTGCACCAGCTTCTAGACAAATCCTTAAATGTCTTTTAGAATTTGGCCCACTG---AAGCTTCTAAAGAATTAATTAAGGTAATTAGCTACCGATTA 998
 TTAGAGGACCTGTCTCCAGACAAATGTTTTTTCATCTTTGATTCAGTTGCGCCCCAACG---CTGACGTCAAGGAAAATTTGACTGTCTTTGGAAGACAA 1181
 TCAACGCCGTCGCCCAACCGACAGCCCTGGCGTCCGCTCGATGGGGCCCCCTGAGGGCTCGGTCTCGTGAAGTCTCAGAGATGGGGATCCGACAA 1259

C. echinulata
S. cerevisiae
R. minuta

AGATGAATATAGATTAAAATTTGTTGAAGCCGTGGTAAATTTAGTGAAGTCFTT-----GGAAATTTGGTTGCTGG----- 1067
 GGACCAATTTGCGCGTCGAGATAACTCCAAATATTTCAACATCCAGATGCTCTT-----GAAATATTTGTCTGA----- 1250
 GGAAGCTTACCACAAACGAAGTCGCCGAACCATGCTTTGAAACTGTCCAGGTACTCTCCGCCGGAATGGAGAAGAACCCAGGCGGCCCATGGACCOC 1359

C. echinulata
S. cerevisiae
R. minuta

--TAAAGAGCCCTCTTTTCTGTACTCCTTTTGTAAATTTGAATTTAAATTTGTTGAACCAATTCCTCGTTCACCAACCAAGATATATTTCCATTTCCTTCCTCCAAA- 1164
 --T---GGCCCCAAATGGCAACAGTCACTCCATGCCAATCTTGTTGGTGAATCAGTTCCCAAAATGACTCCCTGTACTCTATCTCTTCCTCTTCCTCTGT 1345
 GCTTTCAAAGATCAGAGCCCTGGAACATCCTCCCTCCGACAGATCACTCACTCGTTCGCGGTCTACAGCCCTTACTCCTCATCTCTTCGTCGCCCTAAGC 1459

C. echinulata
S. cerevisiae
R. minuta

--GAAACCCCTACCATC-ATCTCAGCTAC-TTGTGT---GACATTTGGCCTATCAACCTGAGCCCTCACCTGAACGTAC-----TGTTTATGG 1244
 CTGAAAAGCAAAACCGTCCAATGCATCCTCCATGTGG---AAAATTTCCTAAC---CCAGAAATGCCCTGATCTCCCTCC-----AGGTGTTGG 1427
 TTTACCCCGACTCAATCCACGTACGGCCGTAGTACTAAGTATCGACCTGGCGGAGCGGTAACAAAGTGCACAGGATGCCCAAATATATGTCTCCG 1559

C. echinulata
S. cerevisiae
R. minuta

TGTACATACCAAACTTTTTTTATTCGTATACA-TATCCAAAGTCAAGAACA-----GATAACAAGAA-AACTTTACCT-----CAAT-AT 1320
 TGTACAGTAACTTGTAAAGAAACATTCAAATTCGCTCAAACAAATGTTAA-----CATTTCCGAAACTAACCTAACCTCTCTT-----CACT-AC 1509
 AACAGTACCAACTACCTGCTCAACGTCGAAGTGCACCCAGCACAATGAGAAAGTTCGCATCGAACACAAAGCCGACTACCCCATCACGAAGACACCCCGC 1659

C. echinulata
S. cerevisiae
R. minuta

GATCTTGTGGCCCTCG---CCAACTTTTACC-----TCAATGAACAAGGTAATTAGTCAATAAGTACCCTATTCATAATTCTGTCGATCACAAT 1402
 GATTTAAATGGCCACG---TAAACTTTTTCG-----CCAAAT-----TACAAAATTTGCCCCCTCCACGTTCCGTTCTTAAT 1576
 GATCACGGAAAGCCCTCAGTATAAATTTGGATGGACCCTAGGAACAAGTTCAAATCTGCTGATGGGGCTACTGCGTACCCTATCCATGTCAGAAAGATCCCACT 1759

C. echinulata
S. cerevisiae
R. minuta

TTAAATACCACGGTAATCAAAGCTGTCAGTTTATCATGATTGGCCCTGGTACTGGTGTGCTCCTTTCAGAGGTTTGTAGAGAACCGGC----- 1493
 TCAGATGCTTCAACACCTTCCACCCCAAGTTTATCATGATPCGGTCCAGTACCGGTGTTGCCCACTCCGTGGGTTTACAGAGACGGTTGCGGTTTC-C 1675
 TCCGCTTGCCCTACTCTCCCAAGATCCAGTCCGTCATGATTGGACCTGGTACGGTGTGCTCCCTTCGAGGTTTCATTTCAAGAACGGTGTGCTCTTC 1859

<<<< CPR5
 <<<< CPR6
 <<<< CPR7
 <<<< CPR8

Figura 2. Comparación de secuencias nucleotídicas de genes de citocromo P450 reductasa. Se alinearon y compararon las secuencias del gen *cpr* de *C. echinulata* (zigomicete, GenBank: AF195660), *S. cerevisiae* (ascomicete, GenBank: D13788) y *R. minuta* (basidiomicete, GenBank: AB055119). En amarillo se destacan aquellas regiones conservadas utilizadas para el diseño de los partidores CPR3, CPR4, CPR5, CPR6, CPR7 y CPR8, que permitieron amplificar parte del gen *crtR* de *X. dendrorhous*. La numeración de las secuencias coincide con su CDS en GenBank.

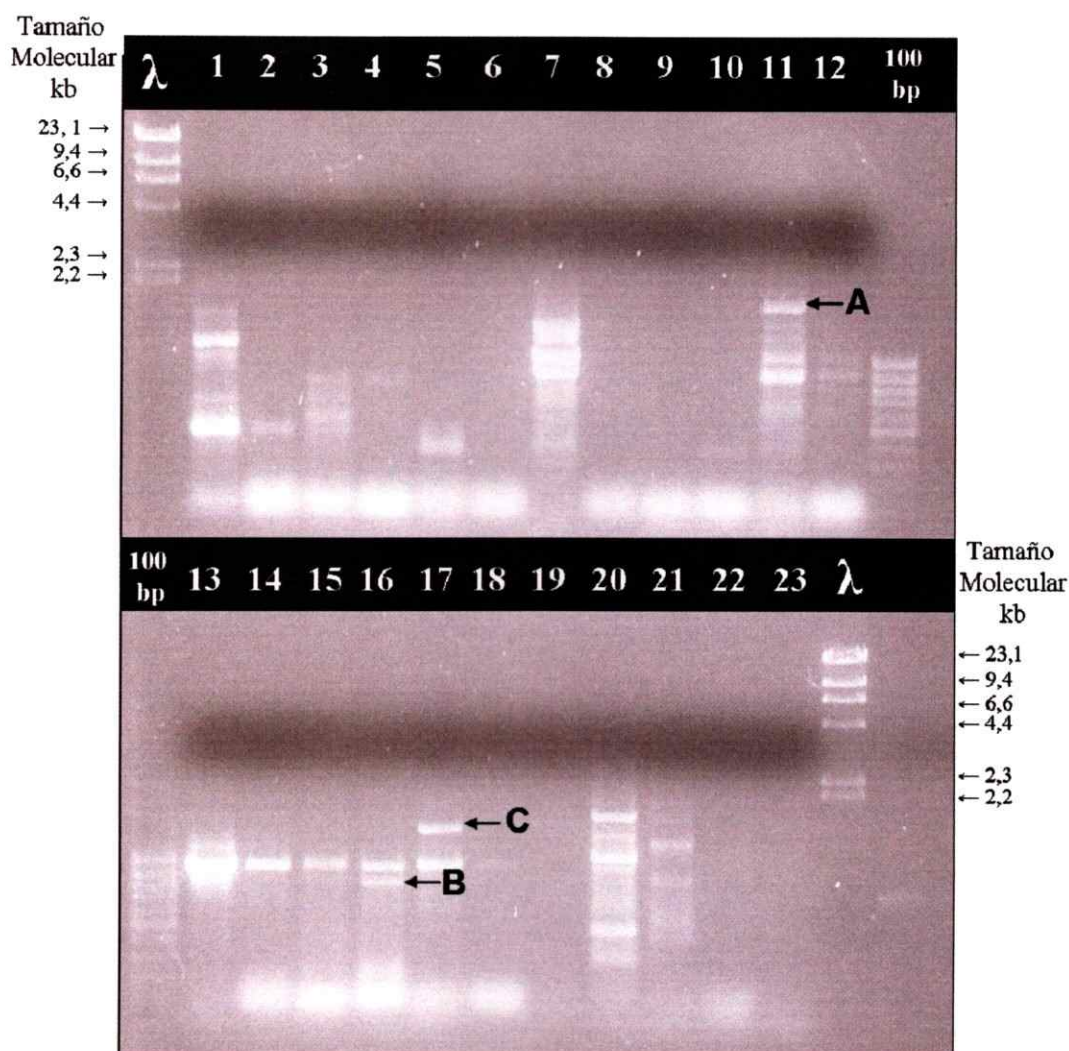


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa (0,8 %) de los productos de PCR al utilizar DNA genómico de *X. dendrorhous* como molde y distintas mezclas de partidores. Como estándar de tamaño molecular, se utilizó el DNA del bacteriófago lambda digerido con la enzima *HindIII* (λ *HindIII*) y a 100 bp. Cada carril es una reacción de PCR en que se utilizó el (los) siguiente(s) partidore(s): Carril 1: CPR1, 2: CPR1+CPR2, 3: CPR1+CPR5, 4: CPR1+CPR6, 5: CPR1+CPR7, 6: CPR1+CPR8, 7: CPR3, 8: CPR3+CPR2, 9: CPR3+CPR5, 10: CPR3+CPR6, 11: CPR3+CPR7, 12: CPR3+CPR8, 13: CPR4, 14: CPR4+CPR2, 15: CPR4+CPR5, 16: CPR4+CPR6, 17: CPR4+CPR7, 18: CPR4+CPR8, 19: CPR2, 20: CPR5, 21: CPR6, 22: CPR7 y 23: CPR8. Las bandas A, B y C corresponden a los amplificados que se purificaron y secuenciaron. Se determinó por medio de herramientas bioinformáticas que la secuencia de la banda A (SEQ3-7) es homóloga a genes *cpr* de otros organismos.

A continuación, a partir de la secuencia de SEQ3-7 se diseñaron partidores específicos para el gen *crtR* (Tabla 3) para buscar su versión genómica. Los partidores se utilizaron en reacciones de PCR usando como molde DNA de la genoteca YIp5 de *X. dendrorhous* (Tabla 1). La genoteca estaba compuesta por 65 mezclas (denominadas PR1 a PR65) de aproximadamente 100 clones recombinantes cada una. Al utilizar la pareja de partidores CPR9 y CPR12, cuyo producto de amplificación es de un tamaño esperado de aproximadamente 500 pb, se obtuvo un resultado positivo en la mezcla PR52. Posteriormente, se formaron 26 submezclas (PR52.A a PR52.Z) por duplicado (replicas A y B, respectivamente) en placas que contenían 52 clones diferentes cada una. La replica A de cada duplicado se utilizó para purificar DNA plasmidial y la replica B se almacenó a 4 °C. Posteriormente, a partir del DNA plasmidial de la submezcla PR52.P, se logró la amplificación de un fragmento de 500 pb. Luego, a partir de la replica B de la placa PR52.P se realizó una reacción de PCR con cada una de sus 52 colonias, utilizando la misma pareja de partidores. Como resultado se logró identificar a la colonia PR52.P.44 como portadora del gen *crtR* (Figura 4). El DNA plasmidial de la colonia PR52.P.44 se purificó y analizó por mapeo de restricción. Al ser digerido con *Bam*HI se obtuvieron 5 fragmentos de tamaños aproximados; 5,4 kb, 4,4 kb, 0,9 kb (doblete), 0,8 kb y 0,4 kb. Luego, los 5 fragmentos de pPR52.P.44 se sub-clonaron en el plásmido pBluescript SK- (Figura 5). Los plásmidos de los sub-clones se nombraron como pCPR1.3, pCPR1.5, pCPR2.7, pCPR3.4 y pCPR4.8, que contienen los insertos de 5,4 kb, 4,4 kb, 0,9 kb, 0,8 kb y 0,4 kb, respectivamente, y se secuenciaron completamente en ambas direcciones.

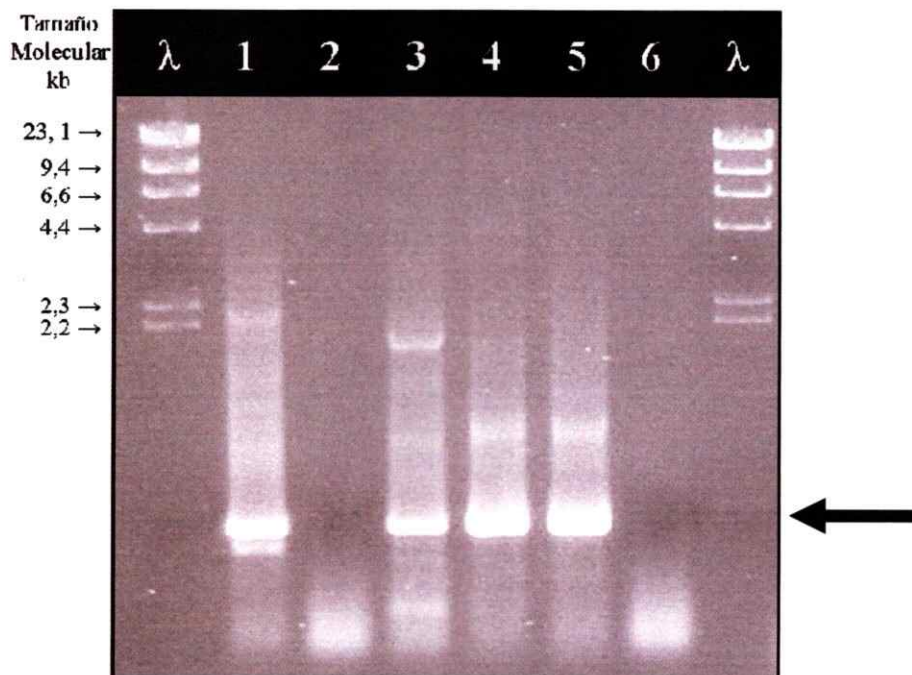


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa (0,8 %) de los productos de PCR al utilizar DNA de la genoteca YIp5 de *X. dendrorhous*. Cada carril es una reacción de PCR con la pareja de partidores CPR9 y CPR12, en que se utilizó como DNA molde a: carril 1: control positivo corresponde a DNA de la cepa UCD 67-385, 2: control negativo corresponde a H₂O, 3: PR52, 4: PR52.P, 5: PR52.P.44 (colonia N° 44 de la sub-mezcla PR52.P) y 6: control negativo (H₂O). λ: Estándar de tamaño molecular (λ HindIII). La flecha a la derecha señala la banda de DNA amplificada del gen *crtR*.

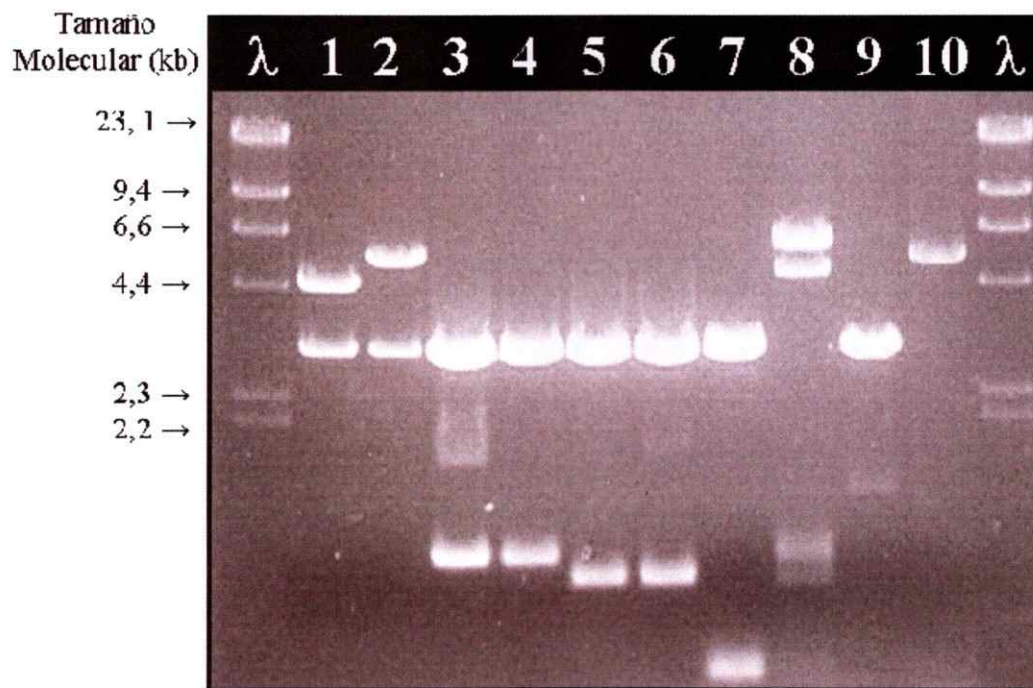


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa (0,8 %) del DNA plasmidial de los subclones derivados de pPR52.P.44 digerido con *Bam*HI. Digestiones con *Bam*HI de: carril(es) 1: pCPR1.5; 2: pCPR1.3; 3 y 4: pCPR2.7; 5 y 6: pCPR3.4; 7: pCPR4.8; 8: PR52.P.44; 9: pBluescript SK- y 10: YIp5. λ : Estándar de tamaño molecular (λ HindIII).

El análisis de las secuencias de los subclones indicó que el gen *crtR* se ubica en un extremo del fragmento de 5,4 kb en el plásmido pCPR1.3. No obstante, la comparación de la secuencia del inserto de pCPR1.3 con genes de CPRs de otros organismos y la búsqueda de un marco de lectura abierto, indicó que la secuencia del gen *crtR* no estaba completa, pues faltaba parte de su primer exón y la región promotora, indicando que el gen *crtR* estaría interrumpido por un sitio *Bam*HI en su secuencia.

Es por ello que para poder aislar un clon que contenga la región que falta del gen *crtR*, se procedió a clonar el cDNA a partir de su mRNA y para conocer la secuencia río arriba del sitio *Bam*HI de éste. Para identificar un clon independiente que contenía al cDNA del gen *crtR* de *X. dendrorhous*, se utilizó la misma estrategia descrita para la búsqueda de su versión genómica, pero esta vez se utilizó una genoteca de cDNAs como DNA molde (Marcoleta, 2007). Como resultado se identificó al clon cXDA.44.29 como el portador del cDNA de este gen (Figura 6). El inserto de cDNA de este clon se secuenció completamente en ambas direcciones y correspondió a un segmento de 2.680 pb.

Posteriormente, a partir de la secuencia del cDNA del gen *crtR* se diseñaron partidores, cuyo producto de amplificación era de 130 pb, que permitieron buscar el clon genómico que contenía la parte que faltaba del gen en la genoteca YIp5. Como resultado se aisló un clon denominado PR32.AA.51, portador de un inserto de 4,5 kb que contenía la zona faltante del gen (Figura 7). El DNA inserto de este nuevo clon se secuenció completamente en ambas direcciones e indicó que la región 5' del gen *crtR* se ubica en un extremo del fragmento *Bam*HI. Virtualmente se unieron las secuencias de los insertos

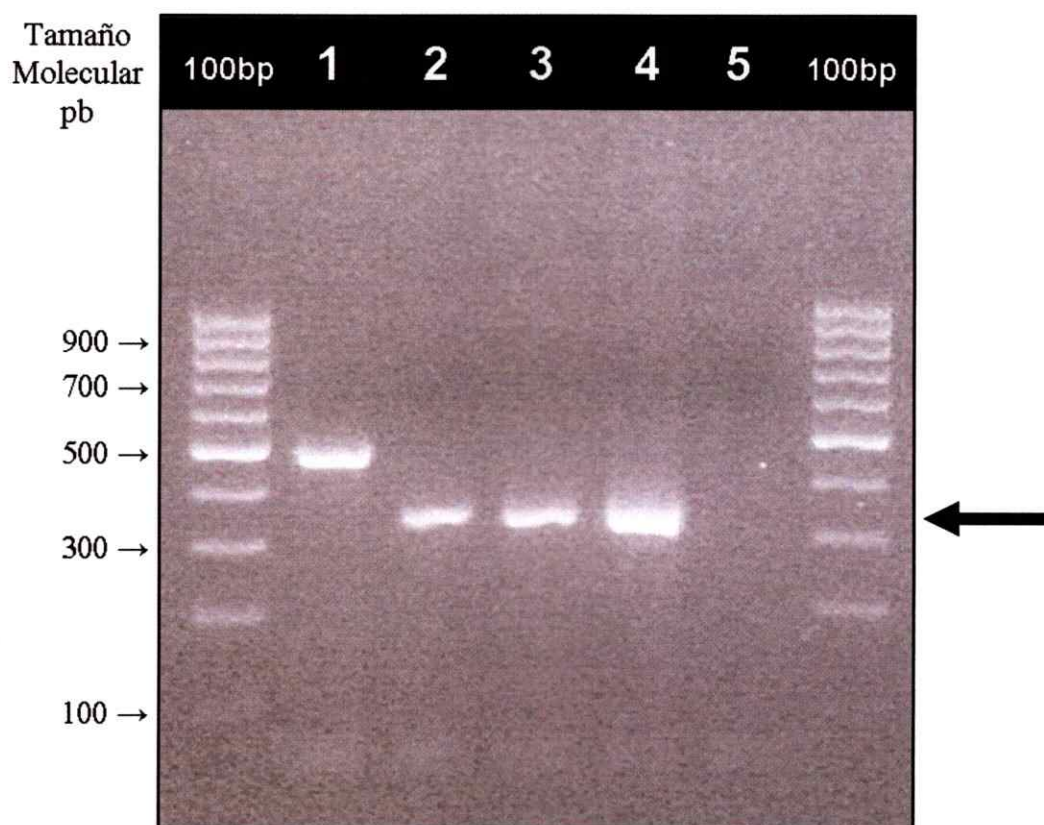


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa (2,5 %) de los productos de PCR al utilizar DNA de una genoteca de cDNAs de *X. dendrorhous* como molde. Cada carril es una reacción de PCR con la pareja de partidores CPR9 y CPR12, en la que se utilizó como DNA molde a: Carril 1: DNA de la cepa UCD 67-385, 2: mezcla cXDA (DNA plasmidial de mezcla de 5.000 clones), 3: cXDA.44 (DNA plasmidial de sub-mezcla de 200 clones), 4: cXDA.44.29 (DNA plasmidial de colonia N° 29), 5: control negativo corresponde a H₂O. 100 bp: Estándar de tamaño molecular. La flecha a la derecha señala la banda amplificada obtenida a partir del cDNA del gen *crtR*, que es de menor tamaño al amplificado obtenido a partir del DNA genómico, ya que probablemente las zonas con las que aparean los partidores CPR9 y CPR12, están interrumpidas por un intrón.

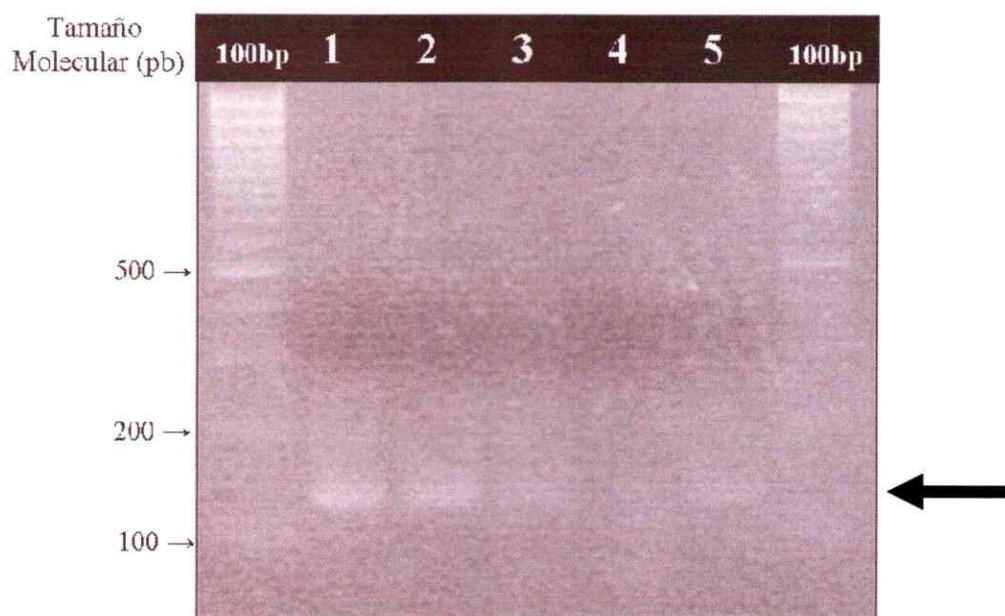


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa (2,5 %) de los productos de PCR al utilizar DNA de la genoteca YIp5 de *X. dendrorhous*. Cada carril es una reacción de PCR con los partidores CPREx1fwdb, CPREx1rev y DNA molde Carril 1: DNA genómico cepa UCD 67-385, 2: PR32: (DNA plasmidial de mezcla de 100 clones), 3: PR32.AA: (DNA plasmidial de sub-mezcla de 52 clones), 4: Control negativo (H_2O) y 5: PR32.AA.22: colonia N° 22. La flecha señala el amplificado obtenido.

de los plásmidos pPR32.AA.51 y pPR52.P.44, y se elaboró su mapa de restricción *in silico*. De esta forma, se determinó que la enzima *SalI* no corta al gen *crtR* de *X. dendrorhous* y que además genera un fragmento de aproximadamente 5,9 kb que lo contiene íntegramente.

Paralelamente, se realizó una hibridación del DNA genómico de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*, digerido con distintas enzimas de restricción, utilizando un fragmento de 1,6 kb de DNA del gen *crtR* como sonda (Tabla 4 y Figura 8). Con estos resultados, se construyó un mapa de restricción genómico y se confirmó que el gen *crtR* se encuentra completo en un fragmento *SalI* de aproximadamente 5,9 kb (Figura 8).

Debido a estos resultados, se construyó una genoteca parcial en el sitio *SalI* del plásmido pBluescript SK- utilizando fragmentos *SalI* de aproximadamente 5,9 kb de DNA genómico de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*. Los clones recombinantes de la genoteca se agruparon por duplicado en placas, que contenían 50 colonias y se analizaron por PCR utilizando a la pareja de partidores CPR9 y CPR12. De esta forma se identificó al clon CPRB6 como portador del gen *crtR* en el fragmento *SalI* de 5,9 kb. El inserto del DNA plasmidial del clon CPRB6 se secuenció completamente y su análisis confirmó que contiene al gen *crtR*.

Adicionalmente, la comparación de las secuencias obtenidas del cDNA y del DNA genómico del gen *crtR*, permitió determinar la organización de exones e intrones. El gen *crtR* esta compuesto por 3 exones de 222, 317 y 1.702 pb y 2 intrones de 240 y 138 pb (Figura 9). Una vez identificado el marco de lectura correcto, mediante análisis

Tabla 4. Resultado hibridación de DNA cepa UCD 67-385 digerido con varias enzimas de restricción y sonda *crtR*.

Carril N°	Enzima de Restricción	kb
1	<i>EcoRI</i>	18,8
2	<i>EcoRI + PstI</i>	10,8
3	<i>EcoRI+SmaI</i>	12,1
4	<i>EcoRI+HdIII</i>	9,8
5	<i>PstI</i>	10,8
6	<i>SmaI</i>	12,1
7	<i>HdIII</i>	9,8
8	<i>XhoI</i>	3,2 y 2,6
9	<i>XhoI +XbaI</i>	2,6 y 1,4
10	<i>XbaI</i>	No cortó
11	<i>NcoI</i>	4,9
12	<i>XmaI</i>	10,8
13	<i>SaII</i>	5,8

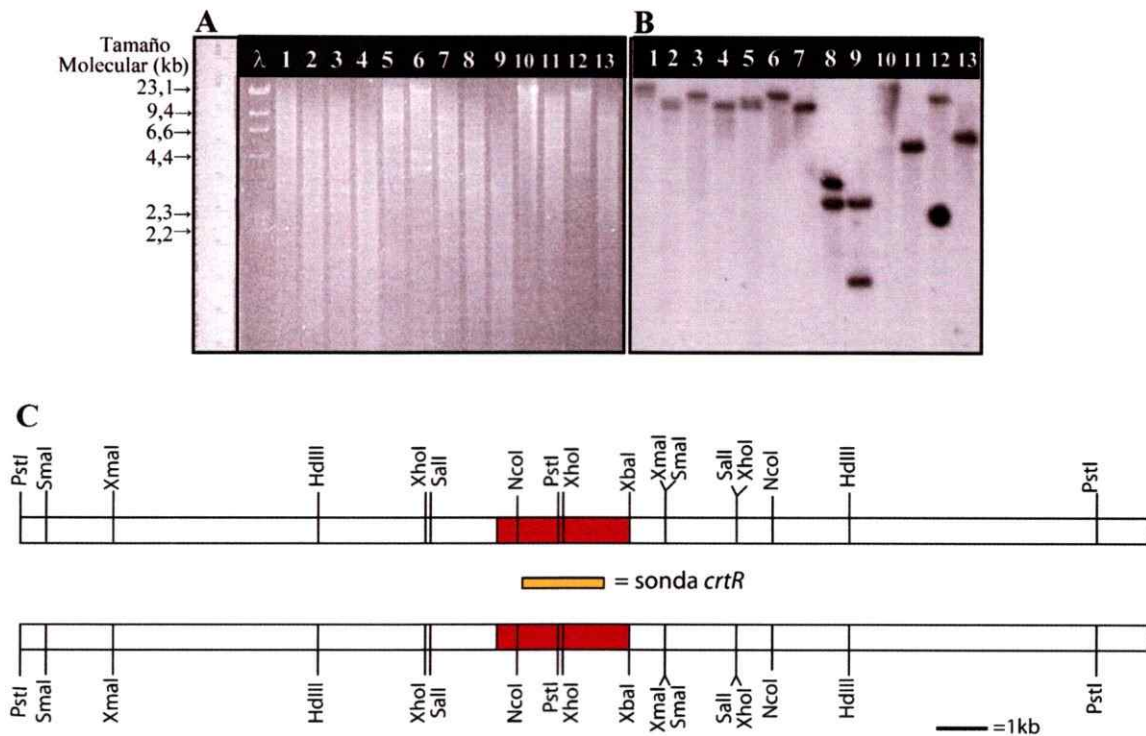


Figura 8. Hibridación y mapa genómico de la cepa diploide UCD 67-385. A: Digestiones en gel de agarosa 0,8 %. Carriles: 1: *EcoRI*, 2: *EcoRI* + *PstI*, 3: *EcoRI*+*SmaI*, 4: *EcoRI*+*HdIII*, 5: *PstI*, 6: *SmaI*, 7: *HdIII*, 8: *XhoI*, 9: *XhoI* +*XbaI*, 10: *XbaI*, 11: *NcoI*, 12: *XmaI* y 13: *Sall*. **B:** Autorradiografía de hibridación. **C:** Mapa de restricción genómico deducido. Se esquematiza el fragmento de DNA que contiene al gen *crtR* (bloque rojo) en ambos cromosomas y la posición de la sonda *crtR* (en naranja).

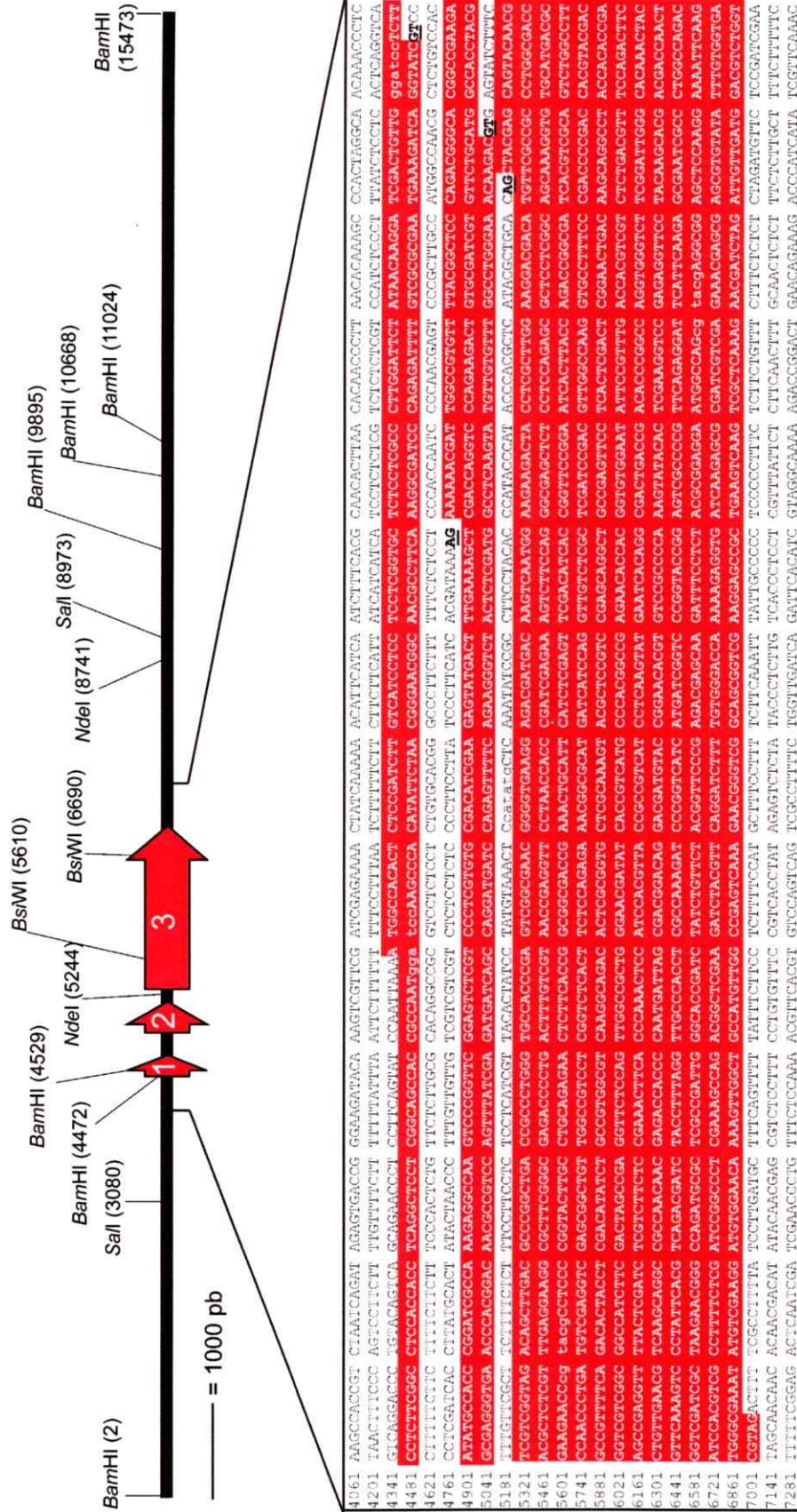


Figura 9. Esquema y secuencia del DNA genómico del gen *crtR* de *X. dendrorhous*. Los tres exones del gen *crtR* se encuentran destacados en rojo y en letras blancas. Subrayado y en negritas se muestran los sitios dadores y receptores para procesos de empalme. pCPR1.3 corresponde al vector pBluescript SK- con el fragmento de DNA entre los sitios *Bam*HI 4.529 y 9.895. A partir de pCPR1.3 se construyeron las delecciones de la secuencia se encuentra en acorde con el esquema.

bioinformáticos del cDNA del gen *crtR*, se realizó una traducción virtual a aminoácidos de la secuencia obtenida. Se determinó que el gen *crtR* de la cepa UCD 67-385, codifica a una proteína de 746 aminoácidos de un tamaño molecular estimado de 81,9 kDa. Además se reconoció los dominios conservados en enzimas citocromo P450 reductasas tal como una pequeña región de transmembrana que se identificó con el programa TMpred (Figura 10). Los dominios conservados en CPRs se determinaron mediante el programa InterProScan. Este programa compara la secuencia aminoacídica de una proteína desconocida con la base de datos InterPro que está constituida por familias de proteínas, dominios, repetidos y sitios que identifican características encontradas en proteínas conocidas. De esta manera se identificó los dominios de unión a FMN, FAD y NAD(P)H (Tabla 5).

Adicionalmente, a partir de la estructura primaria de CrtR, se construyeron 30 modelos tridimensionales desde el residuo 61 utilizando el programa Modeller 9. Ellos se evaluaron mediante ProQ y Verify3D y su calidad estereoquímica se verificó con el programa Procheck (Tabla 6). En la evaluación Procheck, se observó que en promedio los modelos presentan un 86,8 % de sus residuos en las regiones más favorecidas en el gráfico de Ramachandran, valor comparable a la evaluación obtenida por las proteínas templados (PDB: 1amo, 1tll y 2bf4).

Respecto al estadígrafo ProQ, los modelos se clasificaron como buenos ya que presentaron un LGscore mayor que 3,0 y un MaxSub mayor que 0,5, y los modelos incorrectos presentan puntajes bajo 1,5 y 0,1, respectivamente (Wallner y Elofsson, 2003). Finalmente, la evaluación por Verify3D indicó una buena calidad de las

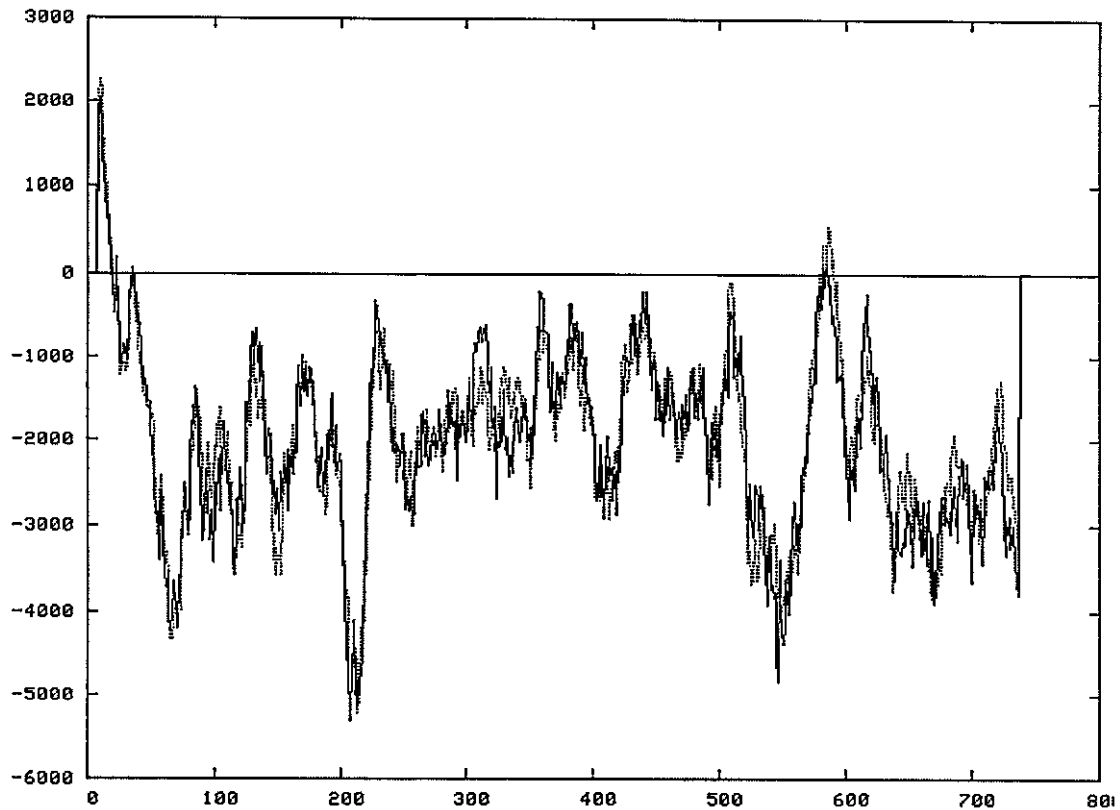


Figura 10. Resultado de TMpred. El programa TMpred sugiere la existencia de una hélice de transmembrana hidrofóbica entre los aminoácidos 1 y 22. El programa predice las regiones de transmembrana con base al análisis estadístico de la base de datos TMbase que se compone de proteínas de transmembrana. En el eje de las ordenadas se grafica el índice de hidropatía ("score"), en donde los valores negativos indican características hidrofílicas y valores positivos indican características hidrofóbicas. En el eje de las abscisas se representa la posición del aminoácido.

Tabla 5. Resultados de InterProScan






InterPro (IPR) N°	Esquema y nombre de motivo o dominio identificado en proteína CrtR (746 aa). (e-value) [aa].
IPR001094	 FLAVODOXINA. (1.5e-21) [79-92]; (1.5e-21) [131-142]; (1.5e-21) [168-178]; (1.5e-21) [192-211].
IPR001433	 Dominio de unión a NAD(P)H. (7.8e-23) [582-709].
IPR003097	 Dominio de unión a FAD 1.6e-67 [275-512].
IPR015702	 NAD(P)H CITOCROMO P450 REDUCTASA. (3.9e-243) [80-414]; (3.9e-243) [436-518]; (3.9e-243) [557-745].
No IPR	 PEPTIDO SEÑAL. [1-19]

Tabla 6. Evaluación de los modelos tridimensionales de CrtR generados

Proteína	"Core"	Procheck			LG-Score	ProQ		Verify3D
		Permitido	Generalmente permitido	No permitido		MaxSub		
1amo	86,3	13,7	0	0	/	/	/	
1tll	84,8	14,5	0,5	0,2	/	/	/	
2bf4	85,8	13,2	0,7	0,4	/	/	/	
CrtR ^a	86,8 ± 0,4	10,1 ± 0,9	1,9 ± 0,2	0,9 ± 0,2	5,89 ± 0,05	0,619 ± 0,006	0,394 ± 0,004	

^a: Valor promedio de los 30 modelos generados.

estructuras generadas, ya que el promedio de los 30 modelos fue mayor que 0,2 y mientras más alto el valor, mejor es la calidad del modelo (Lüthy y cols., 1992).

La estructura tridimensional de CrtR (Figura 11) se compone de cuatro dominios estructurales, que desde el amino al carboxilo-terminal son; (I) dominio de unión a FMN, (II) dominio conector, (III) dominio de unión a FAD y (IV) dominio de unión a NAD(P)H. Los dominios de unión a FMN y a NAD(P)H consisten en una sábana beta de 5 hebras paralelas rodeada por 5 hélices alfa cada uno, estructura conocida como plegamiento de Rossmann característico en proteínas que unen nucleótidos (Creighton, 1999). El dominio de unión a FAD se compone por un barril beta de 6 hebras antiparalelas (Figura 11). El dominio conector, se sitúa entre los dos dominios de unión a flavinas (FMN y FAD) desde los residuos 247 a 239 y 327 a 467. Este último dominio se compone principalmente por hélices alfa y sería el responsable de acercar a las dos flavinas para modular la transferencia de electrones entre ellas (Wang y col., 1997).

Adicionalmente, mediante la superposición del modelo tridimensional de CrtR y la estructura tridimensional de la CPR de rata que fue determinada experimentalmente por cristalografía de rayos x con una resolución de 2,6 Å (PDB: 1amo, Wang y col., 1997), se incluyeron los cofactores FMN, FAD y NAD(P)H en el modelo (Figura 12).

De igual importancia, a partir del alineamiento de las secuencias aminoacídicas de proteínas citocromo P450 reductasas, se identificaron tres regiones conservadas en cada uno de los dominios de unión de los cofactores, FMN, FAD y NAD(P)H, que probablemente participarían en su unión (Yadav y Loper, 2000 a y b; Ichinose y col.,

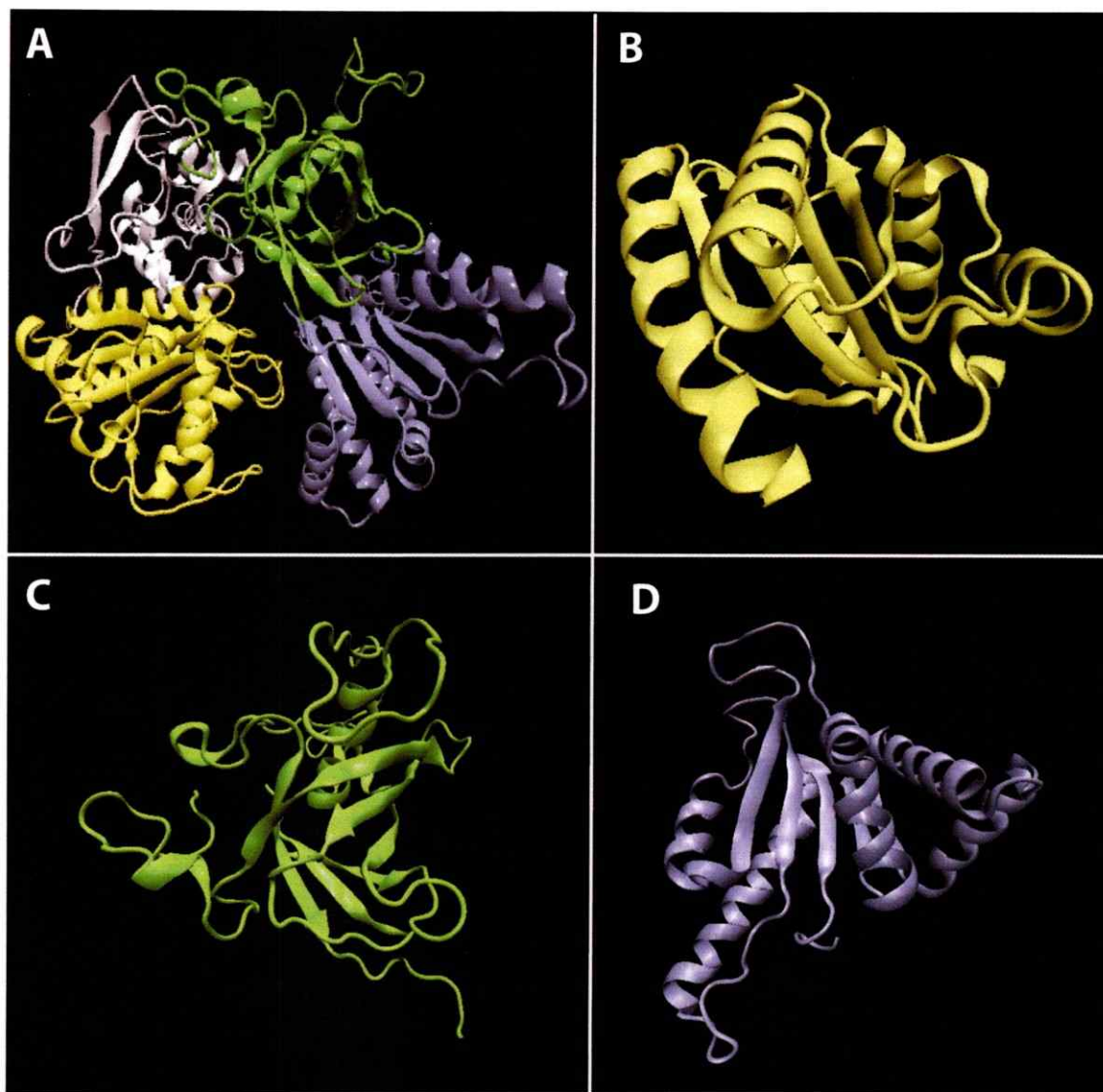


Figura 11. Modelo tridimensional de CrtR. A: CrtR. En amarillo: dominio de unión a FMN, blanco: domino conector, verde: dominio de unión a FAD y azul: dominio de unión a NAD(P)H. B: Dominio de unión a FMN. C: Dominio de unión a FAD. D: Dominio de unión a NAD(P)H.

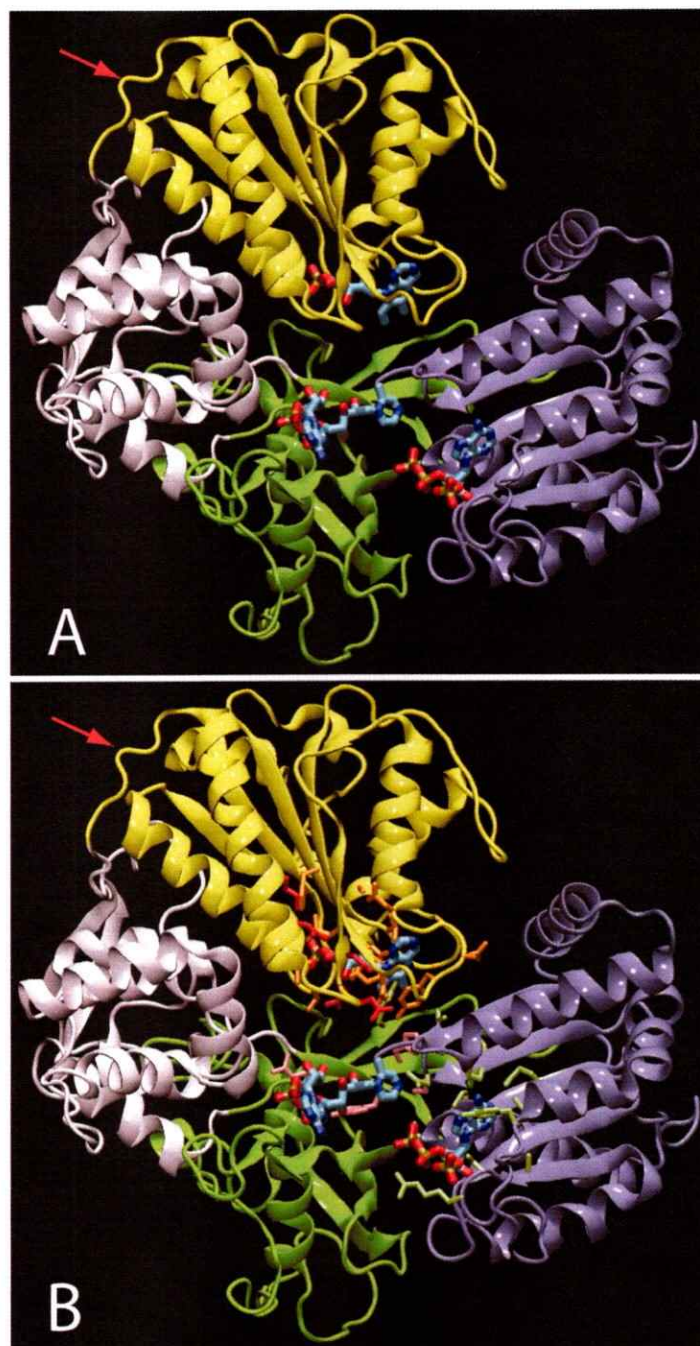


Figura 12. Modelo tridimensional de CrtR y cofactores. **A:** CrtR y cofactores FMN, FAD y NAD(P)H. **B:** CrtR y cofactores FMN, FAD y NAD(P)H. Se incluyen las cadenas laterales de aminoácidos conservados en los dominios de unión a FMN (cadenas naranjas), FAD (cadenas rosadas) y a NAD(P)H (cadenas verdes). En amarillo: Dominio de unión a FMN, blanco: dominio conector, verde: dominio de unión a FAD y azul: dominio de unión a NAD(P)H. La flecha roja indica una estructura de “bisagra” entre los dominios de unión a FMN dominio conector.

2002). Estas regiones también se identificaron en CrtR (Figura 13) y los residuos conservados en las seis secuencias analizadas en estas regiones se localizaron en el modelo tridimensional de CrtR (Figura 12). Se observó que la gran mayoría de estos residuos se localizan en la cercanía de los cofactores (Figura 12). También se identificaron dos regiones (P450-1 y P450-2) de CrtR que posiblemente estarían involucradas en la unión al citocromo P450 (Yadav y Loper, 2000 a y b; Ichinose y col., 2002), (Figura 13).

Finalmente, con el objetivo de estudiar la organización genómica del gen *crtR*, se determinó su ubicación en el cariotipo electroforético de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* (Figura 14). Para ello se realizó una electroforesis de campo pulsado para separar las bandas cromosómicas de la cepa silvestre UCD 67-385 y se realizó una hibridación DNA-DNA. Como sonda se utilizó un fragmento de DNA correspondiente a parte del gen *crtR* que hibridó con las dos primeras bandas cromosómicas del cariotipo electroforético de la levadura, las cuales están constituidas por tres cromosomas cada una (Cifuentes y col., 1997).

Expresión de los genes *crtS* y *crtR* de *X. dendrorhous* en una cepa de *E. coli* que produce beta-caroteno. En trabajos previos y con el objetivo de producir astaxantina, se transformó una cepa de *E. coli* con 3 plásmidos compatibles entre sí, de los cuales uno contenía los genes necesarios para la síntesis de beta-caroteno de *Erwinia uredovora*, otro contenía el gen *crtS* de *X. dendrorhous* y el tercero contenía un gen de la

Rno -MGSHEDTSATPEAEVAEVSFSTTDMVLSLIVGLVITWYFTRKKEEIP-----EFSKIQTAPPVKESSFVEKMKTKGRNIIIFYGSGTGTAEFFANRLSKDAHR- YGMRGMSADP 114
 Hsa -MGDSDVDTSSVSEAEVSLFSMTDMILFSLIVGLLTYWELFRKKEEVP-----EFKIQLTSSVRESFVEKMKTKGRNIIIFYGSGTGTAEFFANRLSKDAHR- YGMRGMSADP 114
 Dme MASEQTIDGAARIPSGGDEP-FIGLDDVALLAVLIGGVTFFYLRTRKKEEPTRSYSIQPTTTSASDNTFKKLKASGRSLVIFYGSGTGTAEFFAGLAKEGLR-YRUKGMVADP 118
 Pch -MAYSSSSDVLIVSVGIIAALIFREQIFSAARKPKTVQVSSRAAG-----GNG-----NPRDFLAKMKKRIIVIFYGSGTGTAEYAIRLAKAEKSKFGLASLVCDP 113
 Xde ----MATLSLVLIIALLGALALGFYKDRILLSSSSASATSSSAATANGSKP-----TYSNGNNGNAFGPDRDFVARKDQKRLAVIFYGSGTGTAEYAIRLAKAEKSKFGLASLVCDI 113
 Sce -MPFGIDNTFTVLAGLVLVLYVKK-----NSIKELIMSDGDDITAVS-----SG-----NRDIAQVVTENKNLVLVYASGTGTAEYAKKFSKELVAKENLNVMCADV 96
 Ath MTSALYASDLFKQLKKSIMTDSLDDVVIVIAATTSALVAGFVLLWKKTTADRSGELKPLMIPKSLMAKDEDDLDLGSCKTRVSIFFGQTGTAEYAKKFSKELVAKENLNVMCADV 120

FMN-1

P450-1

Rno EYDLADLSSLPEDK--SLVFCMATYGECDPTDNAQDFYDWLQETD-----VDLTGVKFAVFLGNKTYEHFNAMGRKYVDQRLEQLGAQRI FELGLGDDG-NLEEDFTWREQFW 224
 Hsa EYDLADLSSLPEDN--ALVFCMATYGECDPTDNAQDFYDWLQETD-----VDLSGVKFAVFLGNKTYEHFNAMGRKYVDQRLEQLGAQRI FELGLGDDG-NLEEDFTWREQFW 224
 Dme EECDMEEILLQKDTDN--SLAVFLCMTYGECDPTDNAMFYEWITSQD-----VDLSGLNYAVFLGNKTYEHFNAMGRKYVDQRLEQLGAQRI FELGLGDDG-NLEEDFTWREQFW 228
 Pch EYDFENLQVPEP---CCVFCMATYGECDPTDNAQDFYDWLQETD-----VDLSGVKFAVFLGNKTYEHFNAMGRKYVDQRLEQLGAQRI FELGLGDDG-NLEEDFTWREQFW 216
 Xde EYDFEKLQVPEP---CAIVFCMATYGECDPTDNAQDFYDWLQETD-----VDLSGLNYAVFLGNKTYEHFNAMGRKYVDQRLEQLGAQRI FELGLGDDG-NLEEDFTWREQFW 227
 Sce EYDFESLNDVP-----VIVSIFSTYGECDPTDNAQDFYDWLQETD-----VDLSGVKFAVFLGNKTYEHFNAMGRKYVDQRLEQLGAQRI FELGLGDDG-NLEEDFTWREQFW 204
 Ath LDDYAADDQYEEKLKKETLAFECVATYGDGEPDNDNAAREFSKWFTEEN---ERDIKLOQLAYGVFALGNRQYEHFNAMGRKYVDQRLEQLGAQRI FELGLGDDG-NLEEDFTWREQFW 235

FMN-3

P450-2

Rno PAVCEFFGVEATGESSIRQYELVWHEDMDAAKVTGEMGRKLSYENOK-----PPFDKNPFLAAVTANRKLNQ-GTERHLMHLELDISDSKIRYESGDHVAVYPANDSALVNI 334
 Hsa PAVCEFFGVEATGESSIRQYELVWHEDMDAAKVTGEMGRKLSYENOK-----PPFDKNPFLAAVTANRKLNQ-GTERHLMHLELDISDSKIRYESGDHVAVYPANDSALVNI 334
 Dme PAVCDHFGEVLEIROYRLEQPDVDPDRITGTETARLHSTONOR-----PPFDKNPFLAAVTANRKLNQ-GTERHLMHLELDISDSKIRYESGDHVAVYPANDSALVNI 338
 Pch EAFKAMVVEE-GGGGSDPFDVTEVFDHPEEKVYLGEL SARALTRK-----GLHDAKNPYPALIAAKELFAPGSDRNCVHIEIESTESSITYQHGDHGVWVWPSNADKEVDRL 325
 Xde AALATLTFEE-GASGERPFDVTEVFNHPIEKVFQEGELSSRALLGSK-----GVHDAKNPYPALIAAKELFAPGSDRNCVHIEIESTESSITYQHGDHGVWVWPSNADKEVDRL 325
 Sce EVLKDELHLE-QEAKFTSQFYT-VLNEITDSMLGEPESAHYLPHQNRNADGICLQGFEDLSQFYIAPVKSRELFSS-SDRNCIHSEFDLSSGNIKYSTGDHLLAVWVWPSNADKEVDRL 321
 Ath SELDKLLKDEDDKSVATPYTAVIPEYRVVTHDPRFTTQXSMESNVANGN-----TTIDIHPCRVDAVAVQKELHTHESDRSCIHLEFDISRGITETGDHLLAVWVWPSNADKEVDRL 346

FAD-1

Rno GEILGAD---LDVIMSLNLDDESN-----KHPFPCTTYRTALTYVLDITNPPRTNVLYELAQYASEPSEOEHLHKWASSGEGKELYLSWVVEARRHILAILQDYPS----- 436
 Hsa GEILGAD---LDVIMSLNLDDESN-----KHPFPCTTYRTALTYVLDITNPPRTNVLYELAQYASEPSEOEHLHKWASSGEGKELYLSWVVEARRHILAILQDYPS----- 436
 Dme GQLCNAD---LDVFSINTDSS-----KHPFPCTTYRTALTYVLDITNPPRTNVLYELAQYASEPSEOEHLHKWASSGEGKELYLSWVVEARRHILAILQDYPS----- 440
 Pch LYALGLH---EKKDVINIESLDPAL-----AKVPFPPTTYAVLRHYDIDISALAGRQLGLVAKAFAPNEAAVLDKLN-----NKEHYQNI VANGCMLGEVLYAAGNDLHADPTA 433
 Xde LAVLGLTSEKRRMIOVSLDPTL-----AKVPFPPTTYAVLRHYDIDISAVASRQTLAVLAKYAPSEQAEEFLTRCT-----DKQAYTEVVGGLHAEVLAQAGNDITVMPTA 445
 Sce LSIENLD---PETIFDLKPLDPT-----VKVPFPPTTYAVLRHYDIDISAVASRQTLAVLAKYAPSEQAEEFLTRCT-----DKQAYTEVVGGLHAEVLAQAGNDITVMPTA 416
 Ath GKLGLHS---LDVFSIHADKEDGSPLESAVPPFPCTTYRTALTYVLDITNPPRTNVLYELAQYASEPSEOEHLHKWASSGEGKELYLSWVVEARRHILAILQDYPS----- 451

Rno FAD-2 FAD-3 RALVP 510
Hsa RALVP 510
Dme EVKVP 512
Pch EVKVP 512
Xde VVKVP 552
Sce VVKVP 563
Ath VVKVP 518

Rno FAD-2 FAD-3 * * * * *
Hsa FAD-2 FAD-3 * * * * *
Dme FAD-2 FAD-3 * * * * *
Pch FAD-2 FAD-3 * * * * *
Xde FAD-2 FAD-3 * * * * *
Sce FAD-2 FAD-3 * * * * *
Ath FAD-2 FAD-3 * * * * *

Rno NAD (P) H-1 NAD (P) H-2
Hsa NAD (P) H-1 NAD (P) H-2
Dme NAD (P) H-1 NAD (P) H-2
Pch NAD (P) H-1 NAD (P) H-2
Xde NAD (P) H-1 NAD (P) H-2
Sce NAD (P) H-1 NAD (P) H-2
Ath NAD (P) H-1 NAD (P) H-2

Figura 13. Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de CrtrR de *X. dendrorhous* (Xde) y CPRs publicadas de otros organismos. Las regiones conservadas de unión a FMN (FMN1, 2 y 3), FAD (FAD 1, 2 y 3), NAD(P)H (NAD(P)H 1, 2 y 3) y a citocromo P450 (P450 1 y 2) se identificaron de acuerdo a Yadav y Loper, 2000 a y b; Ichinose y col., 2002. Los nombres y sus números de acceso corresponden a Rno: *Rattus norvegicus* (M58937), Hsa: *Homo sapiens* (AF258341), Dme: *Drosophila melanogaster* (X93090), Pch: *Phanerochaete chrysosporium* (AF193060), Sce: *S. cerevisiae* (D13788) Ath: *Arabidopsis thaliana* (A75959). (*): Aminoácido idéntico, (:): sustitución conservada y (:): sustitución semi-conservada.

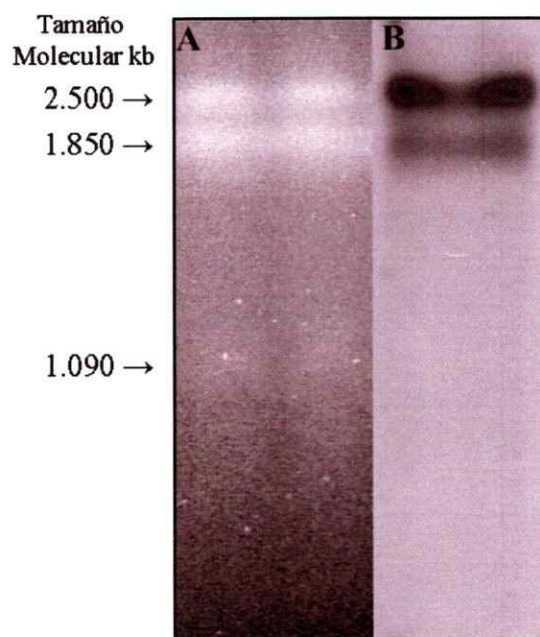
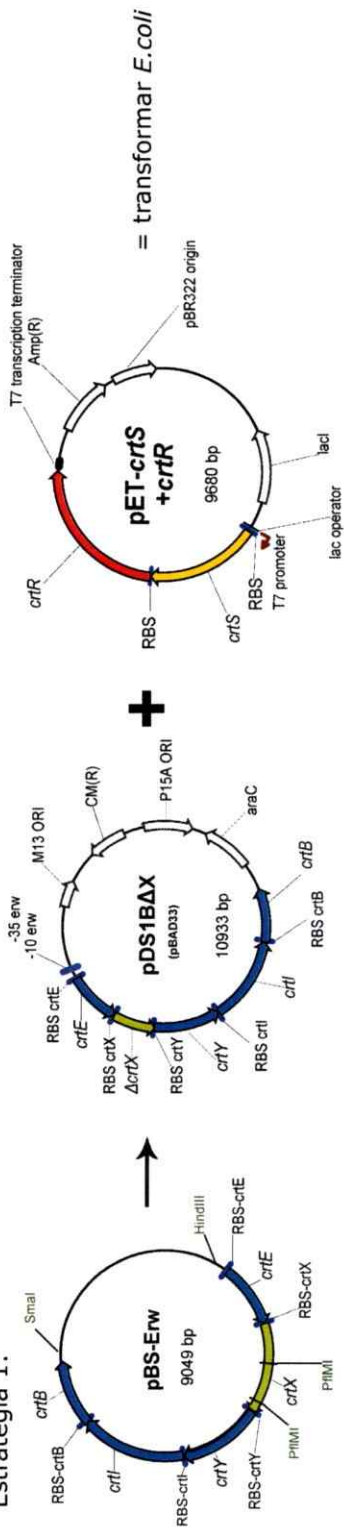


Figura 14. Ubicación del gen *crtR* en el cariotipo electroforético de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*. A: CHEF de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*. Se utilizaron pulsos de 90 s por 24 h, seguidos por pulsos de 120 s por 24 h a 6 V/cm. **B:** Autorradiografía al realizar una hibridación con la sonda *crtR*.

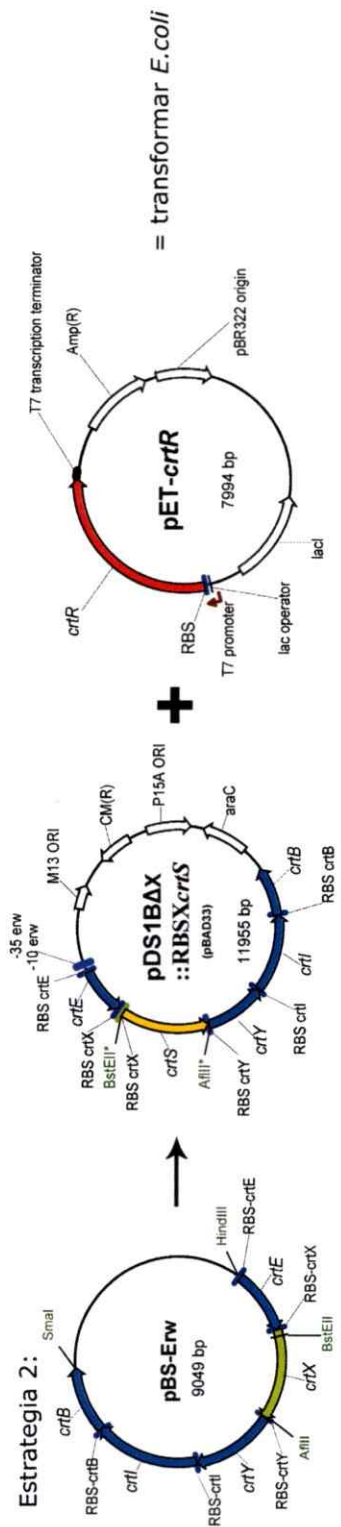
citocromo P450 reductasa de *S. cerevisiae* (Ojima y col., 2006). Como resultado se observó muy bajas cantidades de los derivados oxigenados de beta-caroteno, pero no astaxantina. A partir de este dato es posible inferir la necesidad de contar con la adecuada secuencia de citocromo P450 reductasa para complementar la ruta biosintética en el sistema utilizado. Así, en esta tesis se diseñaron tres estrategias (Figura 15, Tabla 2) para determinar si el producto del gen *crtR* participa en la ruta desde beta-caroteno hasta astaxantina en el sistema heterólogo de *E. coli*. Cada estrategia se componía por una cepa de *E. coli* que producía beta-caroteno, ya que contenía a los genes carotenogénicos de la bacteria *E. uredovora* clonados en el plásmido pBAD 33, complementada con los genes *crtS* y *crtR* de *X. dendrorhous* clonados en el plásmido de expresión pET-TOPO (estrategia 1). Alternativamente se tenía una cepa de *E. coli* que contenía a los genes carotenogénicos de *E. uredovora* clonados juntos a *crtS* en pBAD 33 complementada con el gen *crtR* clonado en pET-TOPO (estrategias 2 y 3). Los pigmentos totales producidos se separaron por RP-HPLC para su identificación.

Inicialmente, se clonó el cluster de carotenogénesis de *E. uredovora* en el plásmido pBluescript SK- (pBS-Erw). Este cluster contiene los genes *crtE*, *crtX*, *crtY*, *crtI* y *crtB*. El gen *crtX* no es requerido para la síntesis de beta-caroteno ya que codifica una glicosidasa que modifica al beta-caroteno, por lo tanto es necesario bloquearlo o eliminarlo para realizar estos ensayos. En algunos casos (estrategias 2 y 3), el gen *crtX* se reemplazó por el gen *crtS* de *X. dendrorhous*. Las modificaciones generadas en el gen *crtX* se desarrollaron en pBS-Erw, posteriormente el inserto modificado de pBS-Erw se liberó mediante digestión con las enzimas *HindIII* y *SmaI* y ligados a pBAD33.

Estrategia 1:



Estrategia 2:



Estrategia 3:

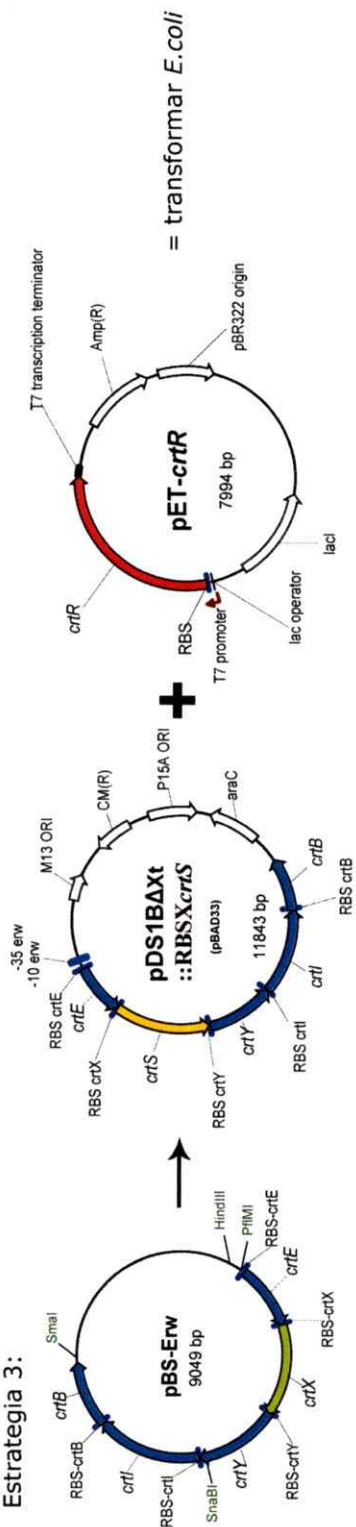


Figura 15. Construcciones desarrolladas en la tres estrategias de producción de carotenoides en *E. coli*. Los genes carotenogénicos se representan como flechas; azules: genes *crtE*, *crtY*, *crtI* y *crtB* de *E. uredovora* con sus respectivos RBS; verde: *crtX* de *E. uredovora*; amarillo: *crtS* de *X. dendrorhous* y rojo: *crtR* de *X. dendrorhous*. En flechas blancas figuran los elementos propios de los vectores pBAD33 y pET-TOPO. Se señalan los sitios de restricción *Sma*I y *Hind*III: con los cuales se liberó el inserto desde pBS-Erw, *A*fIII y *B*stEII: con los que generó una delección en *crtX*, y *S*naBI y *P*flMI: con las cuales se reemplazó *crtE*, *crtX* y *crtY*, por *crtE*, *crtS* y *crtY*.

Estrategia 1: pDS1BAX + pET-*crtS*+*crtR*. Se diseñaron partidores que permitieron la unión de la región codificante de los cDNAs de los genes *crtS* y *crtR* incluyendo un sitio de unión a ribosoma (RBS) entre ambas mediante la técnica de PCR (partidores: ARC-*crtS*5', ARC-*crtS*3', ARC-*crtR*5', ARC-*crtR*3' en Tabla 3; Figura 16). El amplificado obtenido se secuenció completamente y se insertó en el plásmido de expresión pET-TOPO de *E. coli* (pET-*crtS*+*crtR*), (Figura 15). Con este plásmido se transformó la cepa DS1B de *E. coli* (Tabla 1) ya que contiene a pDS1BAX (Tabla 2). Al separar los pigmentos producidos por RP-HPLC, se observó que sólo sintetiza beta-caroteno. Debido a este resultado, se diseñó una segunda estrategia.

Estrategia 2: pDS1BAX::*RBSXcrtS* + pET-*crtR*. Mediante la técnica de PCR (partidores *crtSRBSX* y *crtSstop*, (Tabla 3), se generó un fragmento de DNA compuesto por la región codificante del gen *crtS* bajo el RBS del gen *crtX* y se clonó junto a los genes carotenogénicos de *E. uredovora*. Para ello, pBS-Erw se digirió con las enzimas de restricción *BstEII* y *AflIII* generando una deleción en el gen *crtX* que se rellenó con la polimerasa Klenow para posibilitar el ligado del fragmento de DNA portador del gen *crtS* cuyos extremos son romos. De esta forma se generó un plásmido que contenía al cluster de *E. uredovora* con el gen *crtS* de *X. dendrorhous* en una deleción del gen *crtX* (Figura 15). En esta estrategia se mantuvieron las primeras 98 pb del gen *crtX* río arriba del gen *crtS* y las últimas 16 pb del gen *crtX* río abajo de *crtS*. El inserto se liberó digiriendo con las enzimas *HindIII* y *SmaI*, se ligó al plásmido pBAD33 (pDS1BAX::*RBSXcrtS*) y posteriormente se transformó *E. coli* creándose la cepa DS1C (Tabla 1). Este plásmido fue complementado con el plásmido pET-*crtR* en *E. coli*

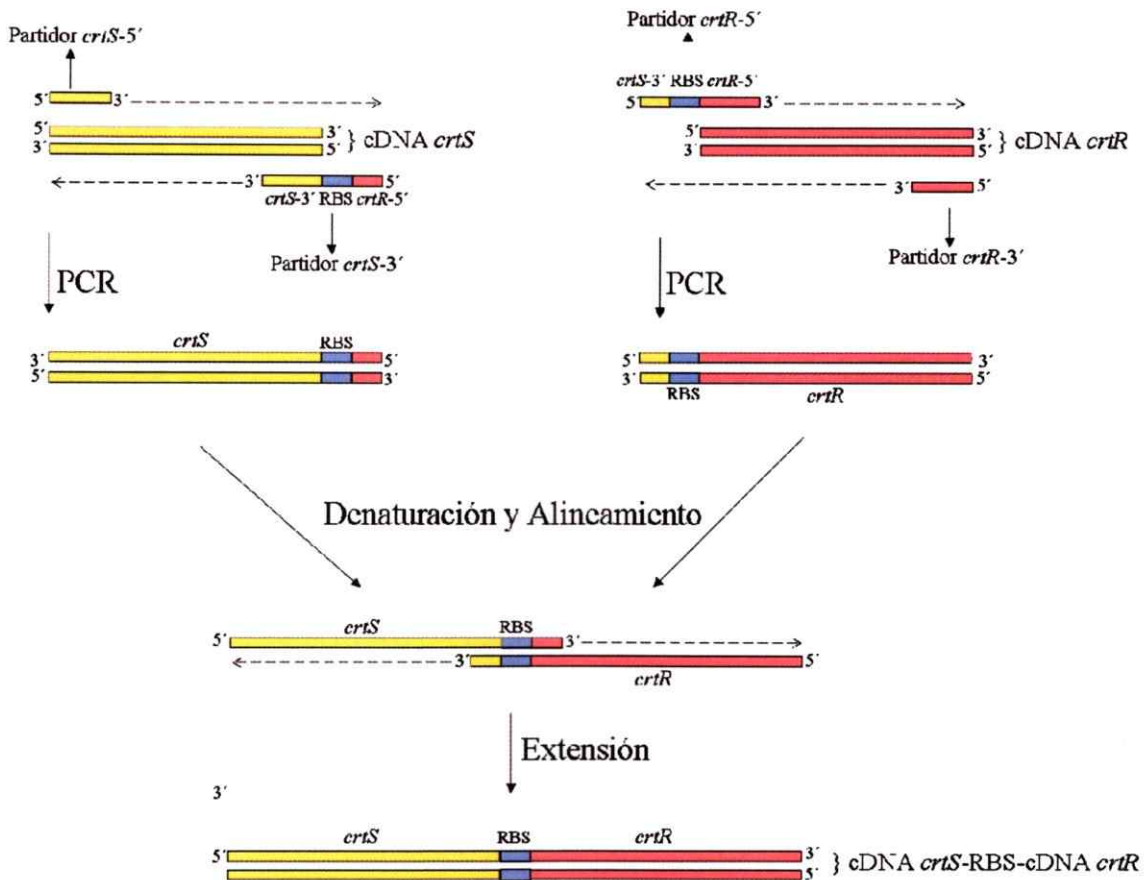


Figura 16. Técnica de unión de fragmentos de DNA mediante PCR. En amarillo: CDS de *crtS*, rojo: CDS de *crtR* y en azul: RBS. En primer lugar, se amplificó por PCR independientemente el CDS de los genes *crtS* y *crtR* con los partidores adecuados que permitieran su posterior unión. Luego, ambos amplificados se unieron por denaturación de las hebras de DNA para a continuación permitir su alineamiento. Finalmente, por polimerización desde su extremo 3', se generó un fragmento de DNA compuesto por el CDS de *crtS* y *crtR*, además de un sitio de unión a ribosoma entre ambos.

(Tabla 2). Al extraer los pigmentos producidos y separarlos por RP-HPLC para su identificación, se observó que sólo se produce beta-caroteno. Debido a este resultado, se diseñó una tercera estrategia.

Estrategia 3: pDS1BAXt::RBSXcrtS + pET-crtR. En esta tercera estrategia, se reemplazó completamente al gen *crtX* por *crtS*. Para ello se diseñaron partidores que permitieron la unión mediante PCR de los genes *crtE*, *crtS* (con el RBS de *crtX*), *crtY* y *crtI* (partidores CLUSerw-F, *crtE(c)crtS-R*, *crtS(c)crtE-F*, *crtS(c)crtY-R*, *crtY(c)crtS-F* y *mediocrtI-R* en Tabla 3. Los genes *crtE*, *crtY* y *crtI* de *E. uredoovora* mantuvieron sus propios RBS. El fragmento generado se digirió con las enzimas *SnaBI* y *PfI*MI y se ligó al plásmido pBS-Erw digerido con las mismas enzimas para reemplazar al gen *crtX* por *crtS*. El inserto se liberó cortando con las enzimas *HindIII* y *SmaI*, y se ligó al plásmido pBAD33 (Figura 15). De esta manera, se generó el plásmido pDS1BAXt::RBSXcrtS con el que se transformó *E. coli* creándose la cepa DS1D (Tabla 1). Este plásmido se complementó con el plásmido pET-crtR (Tabla 2) en *E. coli*. El análisis de los pigmentos producidos, indicó que sólo se produce beta-caroteno.

Puesto que con ninguna de las construcciones generadas se produjo astaxantina u otra xantófila en *E. coli*, se diseñó un método para la producción de carotenoides en un sistema eucariótico, utilizando como modelo a la levadura no carotenogénica *S. cerevisiae*. Para ello, se construyó al plásmido pBS+Ura3GAC7 (Figura 17) compuesto por pBluescript SK- portador del gen *ura3* de *S. cerevisiae*, el cual permitirá la integración en el genoma de la levadura. El gen *ura3* se interrumpió por el gen de resistencia a G418, que permitirá la selección de los transformantes y la región

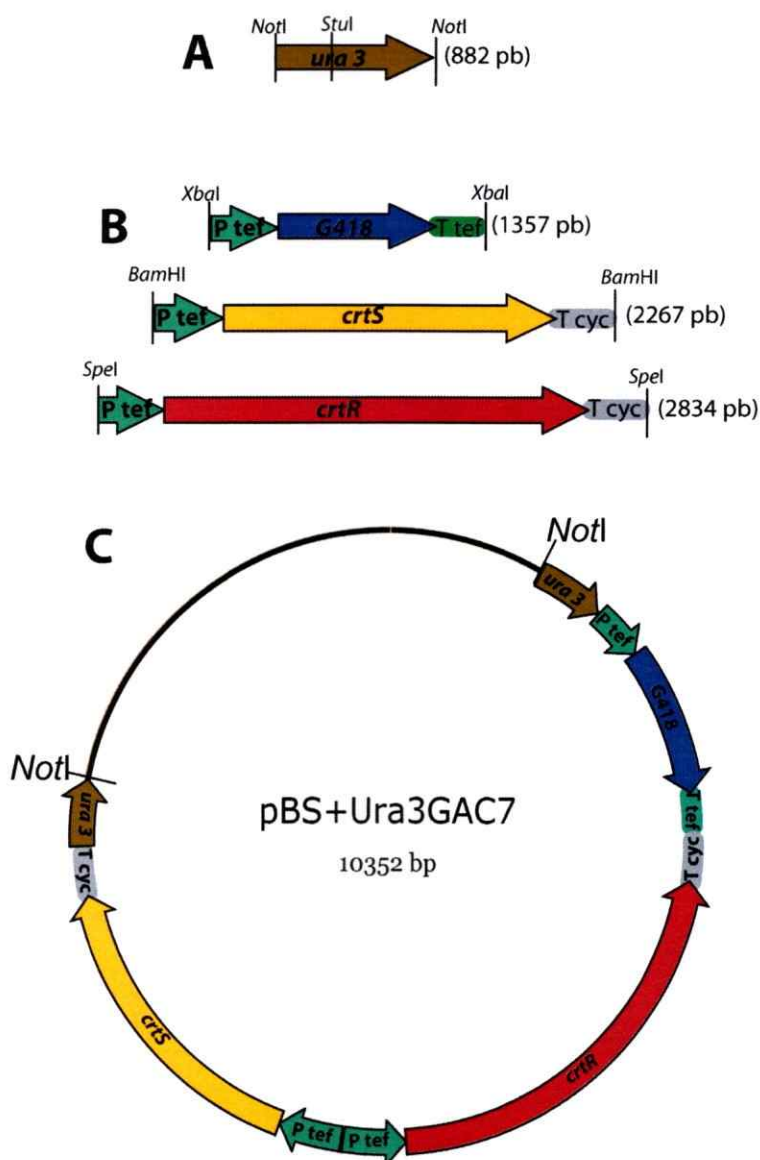


Figura 17. Construcción de pBS+Ura3GAC7. **A:** Gen *ura3* de *S. cerevisiae* con sitios de restricción *NotI* en sus extremos. Se clonó en el plásmido pBluescript SK-. **B:** Gen resistencia a G418 bajo el promotor (P tef) y terminador de la transcripción (T tef) TEF de *A. gossypii*, con sitios de restricción *XbaI* en sus extremos. Región codificante de los genes *crtS* y *crtR* unidos al promotor TEF y Terminador CYC (T cyc) con sitios de restricción *BamHI* y *SpeI*, respectivamente. Las tres construcciones se clonaron en pBluescript SK- en el siguiente orden estricto: G418 en *XbaI*, *crtS* en *BamHI* y *crtR* en *SpeI*. **C:** El inserto de la construcción generada en **B**, se liberó mediante la digestión con las enzimas *SmaI* y *NotI*, se rellenó con la polimerasa Klenow para generar extremos romos y se insertó en el sitio *StuI* del gen *ura3* de la construcción generada en **A**. El inserto de pBS+Ura3GAC7 puede ser liberado mediante digestión con *NotI*.

codificante de los genes *crtS* y *crtR* bajo el control del promotor TEF del hongo *Ashbya gossypii* (que demostró ser funcional en *S. cerevisiae*) (Wach y col., 1994) y el terminador de la transcripción CYC1 de *S. cerevisiae*. Para la unión de los promotores y terminadores a los genes se utilizó la técnica de PCR con partidores que se diseñaron específicamente para permitir dicha unión (Tabla 3). Este vector quedará disponible para futuros experimentos, ya que para intentar producir astaxantina u otra xantófila en *S. cerevisiae*, antes es necesario construir una cepa de la levadura productora de beta-caroteno.

Construcción de mutantes de delección del gen *crtR* en cepas silvestres (UCD 67-385 y CBS-6938) de *X. dendrorhous*. Para demostrar la importancia del gen *crtR* en la ruta biosintética de astaxantina de la levadura *X. dendrorhous*, se construyeron mutantes por delección del gen *crtR* en cepas silvestres de *X. dendrorhous* y se comparó el fenotipo de las mutantes con respecto a su cepa parental. Con este fin, se desarrolló una construcción en la cual se reemplazó un fragmento de DNA que contenía al gen *crtR* por un módulo de resistencia al antibiótico higromicina B (Niklitschek, 2007). Las construcciones (Figura 18) se generaron a partir de pCPR1.3 (Tabla 2), que se digirió con las endonucleasas de restricción *BsiWI* o *NdeI* para generar una delección en el gen *crtR*. Los extremos de los fragmentos generados (que contienen la delección *crtR*), se rellenaron con la polimerasa Klenow para posibilitar el ligado del módulo de resistencia cuyos extremos son romos. De esta manera se obtuvieron dos plásmidos: *pBsiWIΔcrtR::hph* y

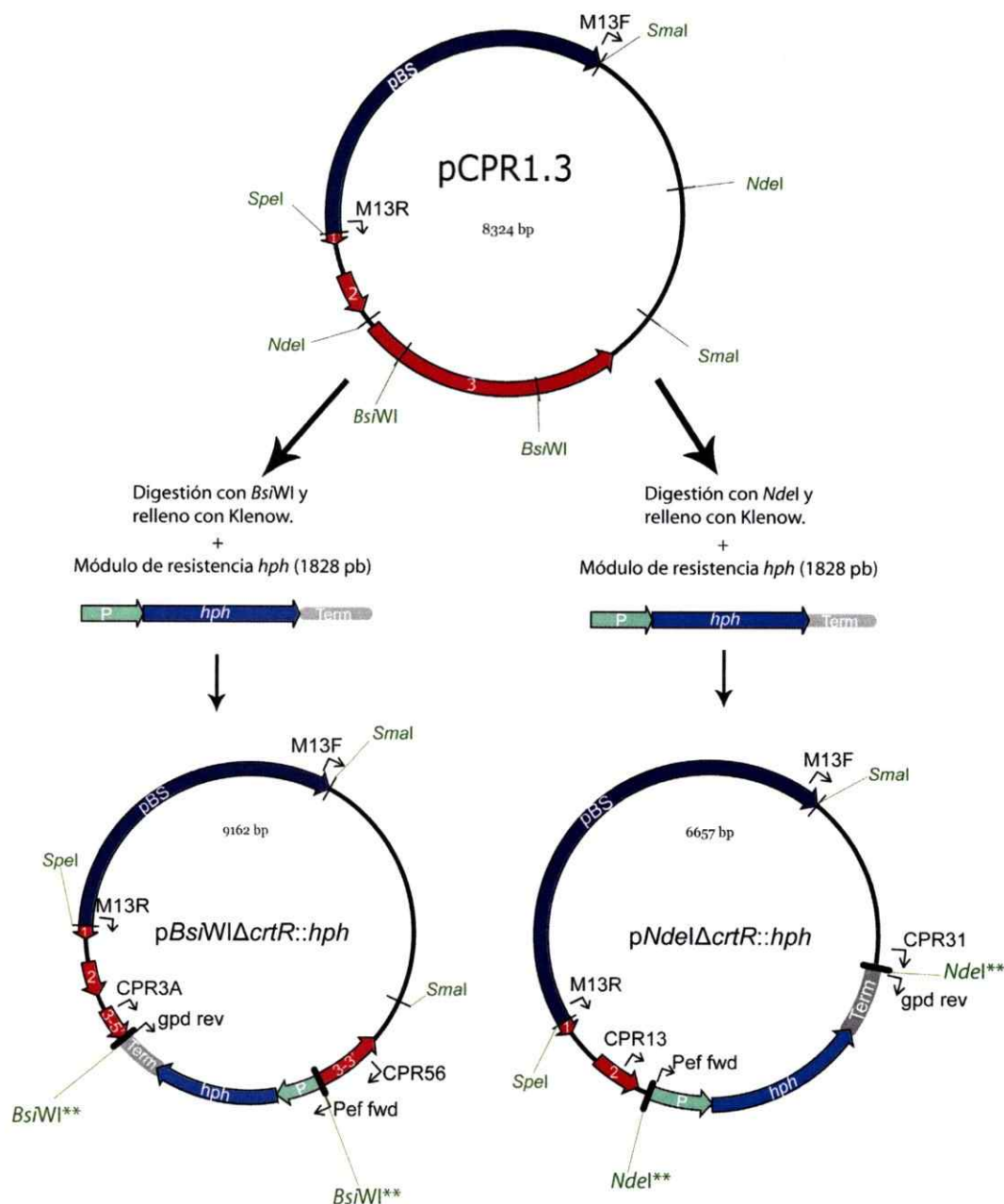


Figura 18. Construcciones diseñadas para obtener la delección del gen *crtR* en las cepas silvestres UCD 67-385 y CBS-6938 de *X. dendrorhous*. Las delecciones del gen *crtR* se generaron a partir de *pCPR1.3* digerido con las enzimas *BsiWI* o *NdeI*. Luego se insertó un módulo de resistencia a higromicina B (P: promotor EF1 α , *hph*: gen *hph* de *E. coli*, Term: terminador de transcripción de gliceraldehido 3-deshidrogenasa). 1, 2, 3: Exones 1, 2 y 3 de gen *crtR*, pBS: plásmido pBluescript SK-, \curvearrowright : sitio de unión y nombre del partidor correspondiente. De esta manera se obtuvieron dos clones: *pBsIW1ΔcrtR::hph* y *pNdeIΔcrtR::hph*.

pNdeIΔcrtR::hph (Figura 18 y Figura 19.).

Por medio de electroporación, se transformaron dos cepas silvestres de *X. dendrorhous*, específicamente UCD 67-385 (con *pBsiWIΔcrtR::hph* lineal) y CBS-6938 (con *pNdeIΔcrtR::hph* circular). Mediante eventos de recombinación homóloga, se intercambió el gen *crtR* silvestre por el fragmento de DNA que contenía la delección y el marcador de resistencia en las cepas silvestres mencionadas anteriormente.

A través de este experimento se obtuvieron cepas de *X. dendrorhous* transformantes resistentes a higromicina B, una de color amarillo (CBSTr, que deriva de la cepa silvestre CBS-6938) y la otra de color rojo-anaranjado pálido (T13, que deriva de la cepa silvestre UCD 67-385) (Figura 20). El color es un indicador de una alteración en la síntesis de astaxantina, la cual es de color rojo-anaranjado fuerte. Cabe hacer notar que se ha demostrado que existe un alto nivel de polimorfismo cromosómico en distintas cepas silvestres de *X. dendrorhous* (Nagy y col., 1994) y que la cepa UCD 67-385 es diploide (Hermosilla y col., 2003). Sin embargo, se desconoce el nivel de ploidía de la cepa CBS-6938, aunque los resultados experimentales de transformación con genes de carotenogénesis (Verdoes y col., 2003) sugieren de que esta cepa es haploide. Debido a esto, es necesario confirmar las delecciones generadas para determinar la posible existencia de alelos silvestres además de los mutantes del gen *crtR* en las cepas transformantes.

Para estudiar la delección en el gen *crtR* a nivel genómico de las cepas mencionadas anteriormente, se analizó el locus afectado mediante la técnica de PCR



Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa (0,8 %), de los fragmentos de DNA utilizados para la construcción de los plásmidos *pBsiWIΔcrtR::hph* y *pNdeIΔcrtR::hph*. Carriles 1: pCPR1.3; 2: pCPR1.3 digerido con *NdeI*; 3: fragmento de 4,8 kb de (pCPR1.3 digerido con *NdeI*) purificado; 4: módulo *hph* purificado; 5: *pNdeIΔcrtR::hph*; 6: *pNdeIΔcrtR::hph* digerido con *SmaI* y *SpeI*; 7: pCPR1.3; 8: pCPR1.3 digerido con *BsiWI*; 9: fragmento de 7,2 kb de (pCPR1.3 digerido con *BsiWI*) purificado; 10: módulo *hph* purificado; 11: *pBsiWIΔcrtR::hph* y 12: *pBsiWIΔcrtR::hph* digerido con *SmaI* y *SpeI*. λ: Estándar de tamaño molecular (λ HindIII).

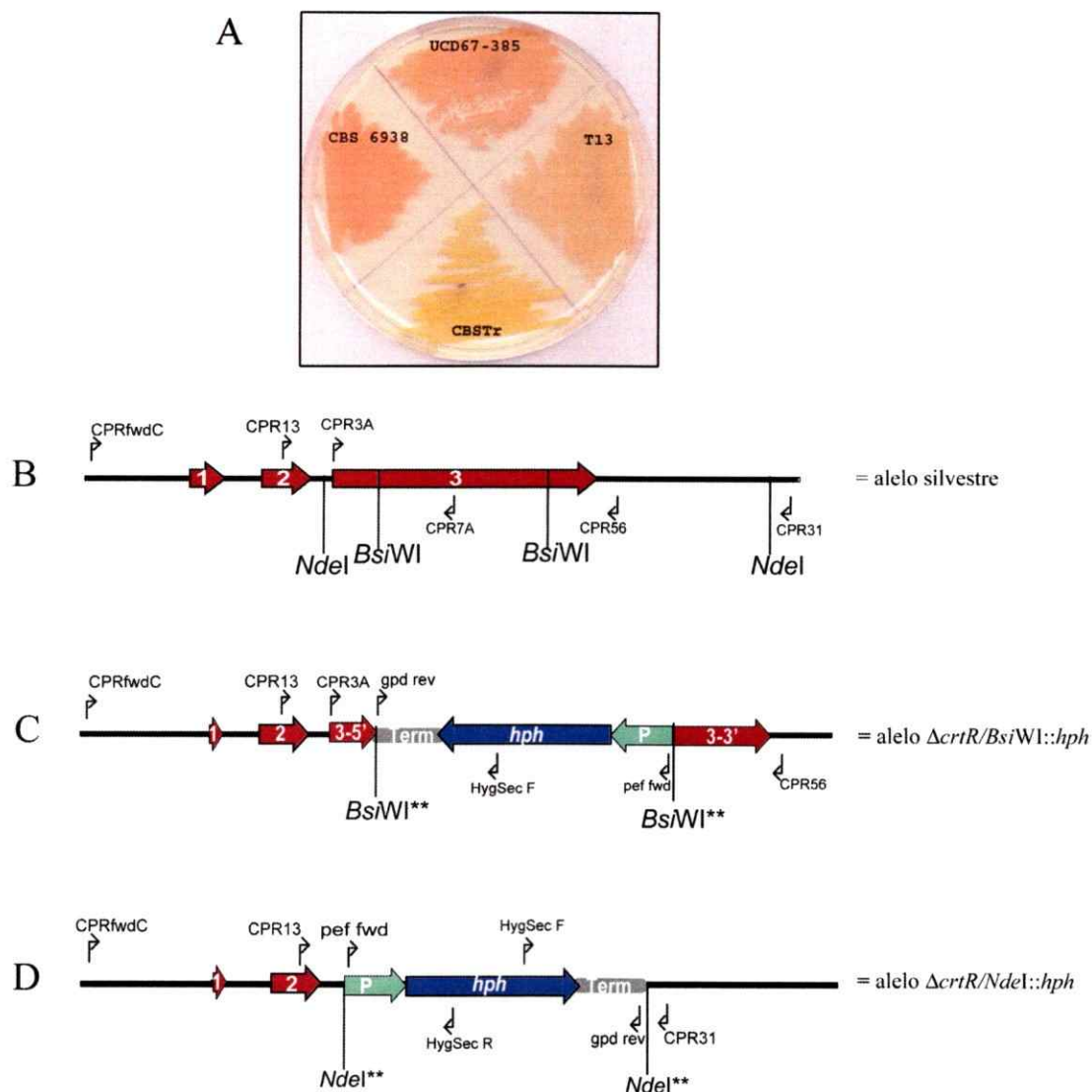


Figura 20. Fenotipo y estructura de los alelos silvestres y mutantes del gen *crtR* en las cepas UCD 67-385, CBS-6938, T13 y CBSTr. **A:** Cultivo en placa las cepas silvestres (UCD 67-385 y CBS-6938) y transformantes (T13: que derivó de UCD 67-385 y CBSTr: que derivó de CBS-6938). **B:** Estructura de alelo *crtR* silvestre. **C:** Estructura de alelo $\Delta crtR/BsiWI::hph$. Delección creada en la cepa silvestre UCD 67-385. **D:** Estructura de alelo $\Delta crtR/NdeI::hph$. Delección creada en la cepa silvestre CBS-6938. Módulo de resistencia a higromicina B: P: promotor EF1 α , *hph*: gen *hph* de *E. coli*, Term: terminador de transcripción de gliceraldehido 3-deshidrogenasa. 1, 2, 3: Exones 1, 2 y 3 de gen *crtR*, \uparrow : sitio de unión y nombre del partidor correspondiente.

utilizando como DNA molde al DNA genómico de las cepas silvestres parentales (UCD 67-385 y CBS-6938) y de los transformantes. El sitio de reconocimiento y orientación de los partidores utilizados se ilustran en la Figura 20. Las parejas de partidores utilizadas junto con los tamaños de los amplificadores esperados y obtenidos (Figura 21) se muestran en la Tabla 7 y Tabla 8.

Los resultados de las reacciones de PCR indicaron que en la cepa T13 hay un alelo silvestre y uno mutante ($\Delta crtR::hph$), por lo tanto es heterocigota para el gen *crtR*. A pesar que se realizaron varios intentos para obtener un transformante homocigoto mutante del gen *crtR* derivado de la cepa UCD 67-385 mediante ensayos de transformación, no se obtuvo uno con estas características. En varios intentos para retransformar a la cepa T13 con un fragmento de DNA portador de una delección en el gen *crtR* y una inserción de un módulo de resistencia al antibiótico G418, el análisis genómico de los transformantes resistentes a G418 indicó que la inserción ocurrió de manera aleatoria y no en el locus *crtR*. Adicionalmente, con el fin de producir la homocigotización de la mutación del gen *crtR*, se hicieron ensayos de DRM (Double Recombinant Method, Niklitschek y col., 2008) con la cepa T13. El método DRM se caracteriza por favorecer el crecimiento de los transformantes que por eventos de recombinación mitótica, hayan adquirido una segunda copia del módulo de resistencia cuando el transformante heterocigoto se crece en altas concentraciones de higromicina B y por lo tanto, se produce la homocigotización de la mutación del gen *crtR*. Sin embargo, tampoco se obtuvo una cepa doble mutante para el gen *crtR* a través de este método, el cual si ha funcionado para otros genes carotenogénicos de *X. dendrorhous*

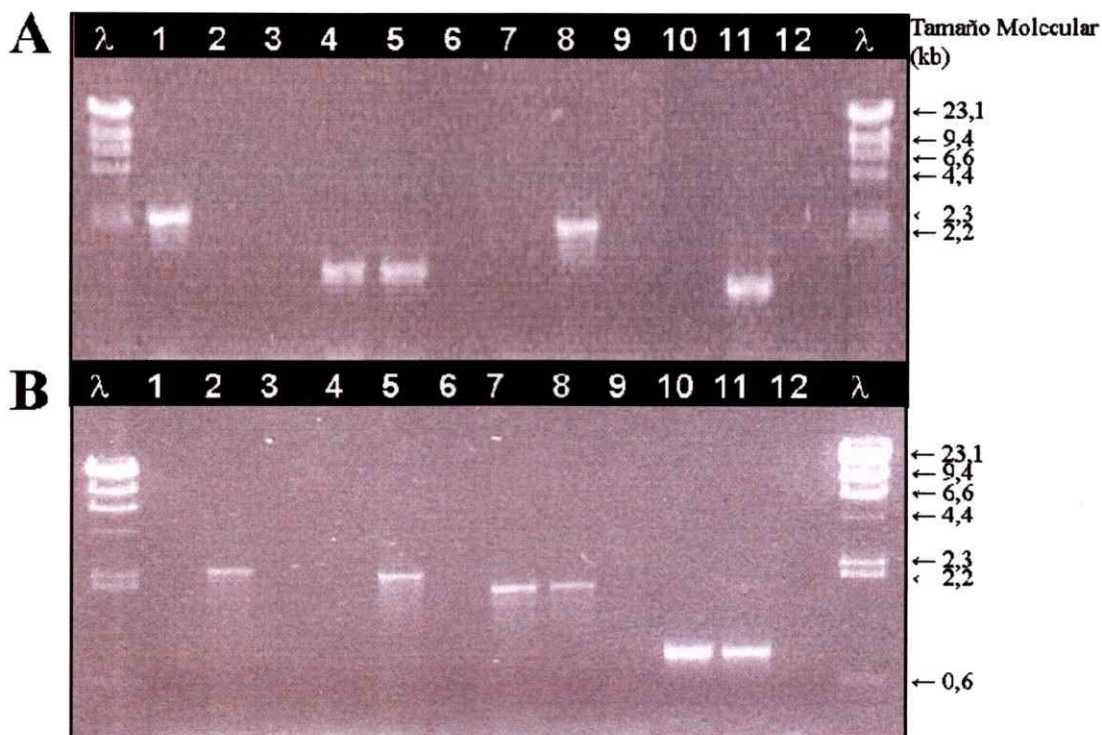


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa (0,8 %), de los productos de PCR al utilizar DNA genómico de las cepas silvestres y transformantes de *X. dendrorhous* como molde. λ: Estándar de tamaño molecular (*λHindIII*). Cada carril: DNA molde, pareja de partidores. **A: Carriles 1: CBS-6938, CPRfwdC + CPR7A; 2: CBSTr, CPRfwdC + CPR7A; 3: H₂O, CPRfwdC + CPR7A; 4: CBS-6938, CPR13 + CPR7A; 5: CBSTr, CPR13 + CPR7A; 6: H₂O, CPR13 + CPR7A; 7: CBS-6938, CPRfwdC + HygSecR; 8: CBSTr, CPRfwdC + HygSecR; 9: H₂O, CPRfwdC + HygSecR; 10: CBS-6938, HygSecF + CPR31; 11: CBSTr, HygSecF + CPR31; 12: H₂O, HygSecF + CPR31. **B:** Carriles 1: UCD 67-385, CPR56 + gpd rev; 2: T13, CPR56 + gpd rev; 3: H₂O, CPR56 + gpd rev; 4: UCD 67-385, pef fwd + CPR3A; 5: T13, pef fwd + CPR3A; 6: H₂O, pef fwd + CPR3A; 7: UCD 67-385, CPR3A + CPR56; 8: T13, CPR3A + CPR56; 9: H₂O, CPR3A + CPR56; 10: UCD 67-385, CPR3A + CPR7A; 11: T13, CPR3A + CPR7A; 12: H₂O, CPR3A + CPR7A.**

Tabla 7. Tamaño de amplificado esperado (kb) al amplificar alelos silvestres o mutantes $\Delta crtR::hph$.

Partidores	Alelo silvestre	Alelo $\Delta crtR/NdeI::hph$	Alelo $\Delta crtR/BsiWI::hph$
CPR3A + CPR7A	0,8	(-)	(-)
CPRfwdC + CPR7A	2,3	(-)	(-)
CPR13 + CPR7A	1,1	(-)	(-)
CPR3A + CPR56	1,8	(-)	2,5
CPRfwdC + HygSecR	(-) ¹	2,3	(-)
HygSecF + CPR31	(-)	1,0	(-)
pef fwd + CPR3A	(-)	(-)	2,1
CPR56 + gpd rev	(-)	(-)	2,3

(-)¹: No se espera amplificado.

Tabla 8. Tamaño de amplificado obtenido (kb) al amplificar alelos silvestres o mutantes $\Delta crtR::hph$ de las cepas silvestres y transformantes.

Partidores	UCD 67-385	T13	CBS-6938	CBSTr
CPR3A + CPR7A	0,8	0,8	(/)	(/)
CPRfwdC + CPR7A	(/) ¹	(/)	2,3	(-)
CPR13 + CPR7A	(/)	(/)	1,1	1,1
CPR3A + CPR56	1,8	1,8	1,8	1,8
CPRfwdC + HygSecR	(/)	(/)	(-)	2,3
HygSecF + CPR31	(/)	(/)	(-)	1,0
pef fwd + CPR3A	(-) ²	2,1	(/)	(/)
CPR56 + gpd rev	(-)	2,3	(/)	(/)

(/)¹: No se realizó la reacción de PCR correspondiente; (-)²: No se obtuvo amplificado.

(Niklitschek y col., 2008).

Por otra parte, los resultados del análisis genómico del transformante CBSTr sugieren la existencia de dos copias del gen *crtR* mutantes; en donde una de ellas corresponde a la delección del gen *crtR* ($\Delta crtR::hph$) y otra copia que posee una mutación en la región 5' de dicho gen. Esta afirmación se debe a que sólo se obtuvo un amplificado al usar la pareja de partidores CPR13 + CPR7A, pero no con la pareja CPRfwdC + CPR 7A, en donde el partidor CPRfwdC aparee con secuencias de DNA río arriba de la zona de reconocimiento del partidor CPR13 (Figura 20). Adicionalmente, las deleciones en el gen *crtR* a nivel genómico también se analizaron por ensayos de hibridación DNA-DNA de diferentes digestiones del DNA genómico de las cepas parentales y sus mutantes. Como sonda se utilizó un fragmento de DNA específico para el gen *crtR* y otro para el gen *hph*. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 9 y Tabla 10.

Con el objetivo de identificar el tipo de mutación en la región 5' del gen *crtR* en la cepa transformante CBSTr, se construyó una genoteca parcial digiriendo el DNA genómico de la cepa CBSTr con las enzimas *Pst*I y *Xho*I, y se seleccionaron aquellos fragmentos de aproximadamente 5,0 kb, de acuerdo a los resultados de la hibridación anteriormente descrita. Estos fragmentos de DNA se ligaron al plásmido pBluescript SK- digerido con las mismas enzimas y el clon portador de la región 5' mutante del gen *crtR*, se identificó mediante PCR utilizando una pareja de partidores que hibridaba con esa región. De esta manera se identificaron dos clones cuyos plásmidos (p5C2 y p5D18)

Tabla 9. Resultado de la hibridación de digestiones de DNA genómico de las cepas silvestres (UCD 67-385 y CBS-6938) y sus derivados transformantes (T13 y CBSTr, respectivamente. Sonda *crtR*.

Enzima de digestión	Tamaño de las bandas de hibridación (kb) sonda <i>crtR</i> (valores aproximados)			
	UCD 67-385	T13	CBS-6938	CBSTr
<i>Hind</i> III	10,4	10,4; 6,3	10,4	9,7; 4,4
<i>Bam</i> HI	(-) ^a	(-)	5,4	5,4; 2,2
<i>Xho</i> I	3,4; 2,7	6,8; 3,4; 2,7	3,4; 2,7	5,3; 4,4; 3,4
<i>Sal</i> I	6,0	6,0; 4,2	6,0	7,7; 4,2; 2,5
<i>Pst</i> I	10,5	10,5	(-)	(-)
<i>Sma</i> I	(-)	(-)	12,9	12,9; 8,1
<i>Xba</i> I	6,8	6,8	(-)	(-)
<i>Pst</i> I + <i>Sal</i> I	3,3; 2,5	3,6; 3,3; 2,5	(-)	(-)
<i>Pst</i> I + <i>Hind</i> III	5,6; 4,6	4,6; 5,6	(-)	(-)
<i>Pst</i> I + <i>Xba</i> I	5,6; 1,3	6,6; 5,6; 1,3	(-)	(-)
<i>Hind</i> III + <i>Xho</i> I	(-)	(-)	3,4; 2,7	4,2; 3,4; 2,6
<i>Hind</i> III + <i>Sal</i> I	(-)	(-)	6,0	7,7; 4,2; 2,5
<i>Hind</i> III + <i>Sma</i> I	(-)	(-)	6,9	6,4; 4,8
<i>Sal</i> I + <i>Sma</i> I	(-)	(-)	5,1	6,4; 4,2; 2,5

(-)^a: Digestión no realizada.

Tabla 10. Resultado de la hibridación de digestiones de DNA genómico de las cepas silvestres (UCD 67-385 y CBS-6938) y sus derivados transformantes (T13 y CBSTr, respectivamente. Sonda *hph*.

Enzima de digestión	Tamaño de las bandas de hibridación (kb) sonda <i>hph</i> (valores aproximados)	
	T13	CBSTr
<i>Hind</i> III	6,3	2,8
<i>Bam</i> HI	(-) ^a	2,2; 1,8
<i>Xho</i> I	6,9	5,2
<i>Sal</i> I	4,2	2,0
<i>Pst</i> I	11,5	(-)
<i>Sma</i> I	(-)	16,8
<i>Xba</i> I	7,5	(-)
<i>Pst</i> I + <i>Sal</i> I	3,8	(-)
<i>Pst</i> I + <i>Hind</i> III	5,7	(-)
<i>Pst</i> I + <i>Xba</i> I	6,1; 1,3	(-)
<i>Hind</i> III + <i>Xho</i> I	(-)	2,0
<i>Hind</i> III + <i>Sal</i> I	(-)	2,0
<i>Hind</i> III + <i>Sma</i> I	(-)	2,9
<i>Sal</i> I + <i>Sma</i> I	(-)	2,0

(-)^a: Digestión no realizada.

eran portadores de la región de interés. Los insertos de ambos plásmidos se secuenciaron completamente y su análisis indicó que en la región 5' del gen *crtR* se insertó el plásmido pBluescript SK-, proveniente del DNA transformante *pNdeIΔcrtR::hph*, utilizado en la transformación de la cepa CBS-6938. Este resultado se apoyó por las evidencias obtenidas desde los experimentos de hibridación DNA-DNA y confirmado por medio de la técnica de PCR, donde se utilizó DNA genómico de la cepa CBSTr como molde y partidores que hibridizan con el gen *crtR*, el módulo de *hph* y con el plásmido pBluescript SK- (Figura 22). Los amplicones se secuenciaron completamente para confirmar su origen. De esta manera, junto con los resultados de los ensayos de hibridación, se construyó un mapa genómico que representa al locus *crtR* en las cepas parentales (UCD 67-385 y CBS-6938) y sus transformantes (T13 y CBSTr) (Figura 23).

Finalmente, con el objetivo de conocer la composición de los carotenoides se extrajeron los pigmentos totales de las dos cepas silvestres y de las dos cepas transformantes. La identificación de los picos obtenidos al separar los carotenoides totales mediante RP-HPLC confirmó los resultados por inspección visual de las colonias. Se observó que la composición de carotenoides en las cepas transformantes era completamente distinta en relación a la de las cepas silvestres de las cuales provienen. Así, el transformante T13 redujo su producción de astaxantina a costa de un aumento en la producción de beta-caroteno que es el precursor de la astaxantina y por lo tanto las colonias que forma son pálidas con respecto a su cepa parental silvestre (Figura 24, Figura 25 y Tabla 11). Por otra parte, el transformante CBSTr forma colonias amarillas ya que acumula beta-caroteno y no produce astaxantina (Figura 24, Figura 25, y



Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa (0,8 %), de los productos de PCR al utilizar DNA genómico de la cepa CBSTr como molde. λ : Estándar de tamaño molecular (*NHindIII*). Partidores de la reacción de PCR: Carriles 1 y 2: CPRfwdC + HygSecR; 3 y 4: HF + CPR31; 5 y 6: HygSecF + M13F; 7 y 8: M13R + CPR7A; 9 y 10: CPR3D + CPR56; 11 y 12: CPR13 + CPR56.

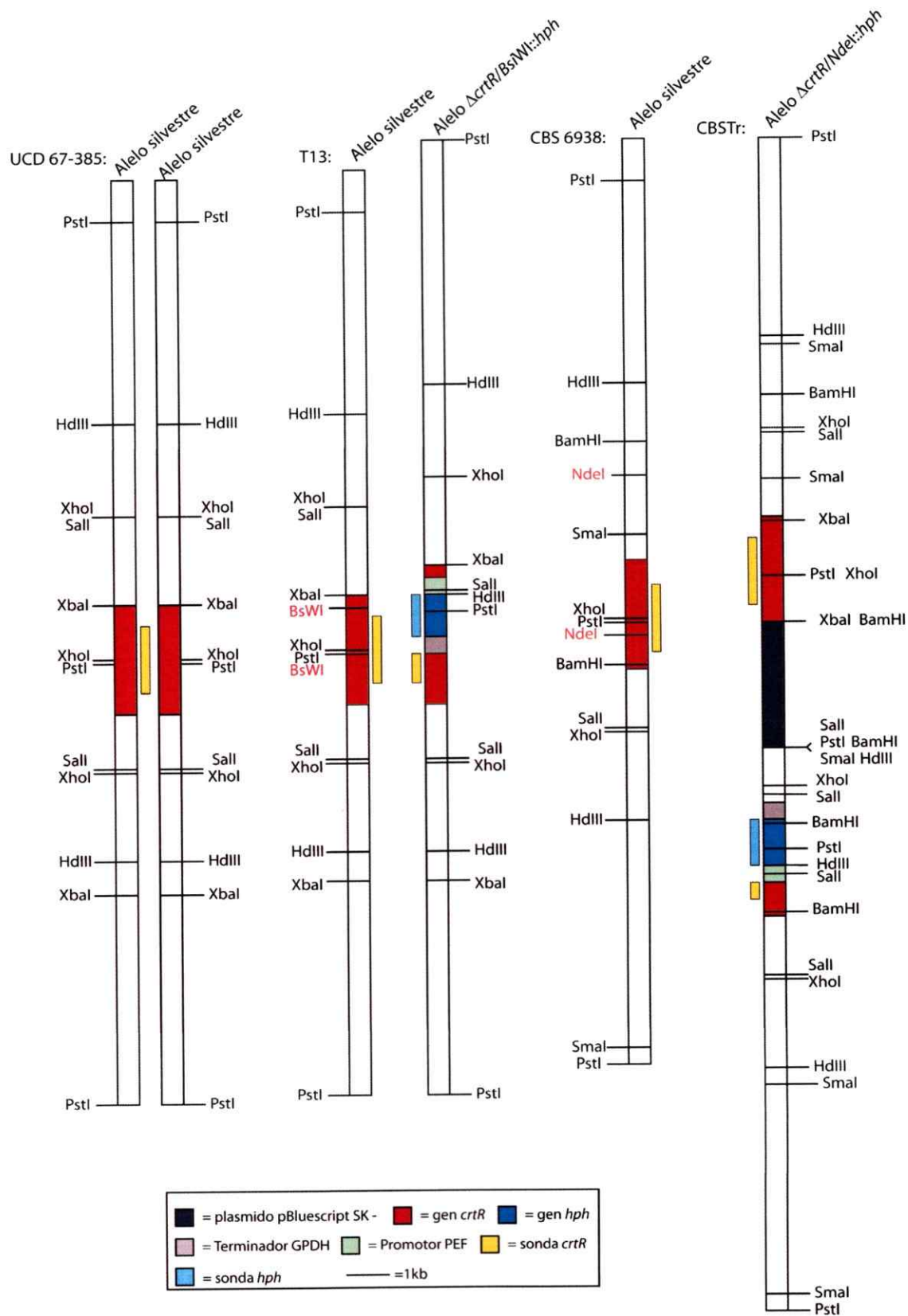


Figura 23. Mapa de restricción de la región cromosómica en donde se ubica el gen *crtR* en las cepas silvestres (UCD 67-385 y CBS-6938) y en sus transformantes (T13 y CBSTr). En esta figura se esquematiza la ubicación del gen *crtR* en una sección del genoma de *X. dendrorhous* en las cuatro cepas; UCD 67-385, CBS-6938, T13 y CBSTr. En rojo: gen *crtR*, naranja: sonda *crtR*, negro: plásmido pBluescript SK-, azul: gen *hph*, celeste: sonda *hph*, verde: promotor Pef del módulo de resistencia a higromicina B y gris: terminador de GPDH del módulo de resistencia a higromicina B. La barra representa a 1,0 kb.

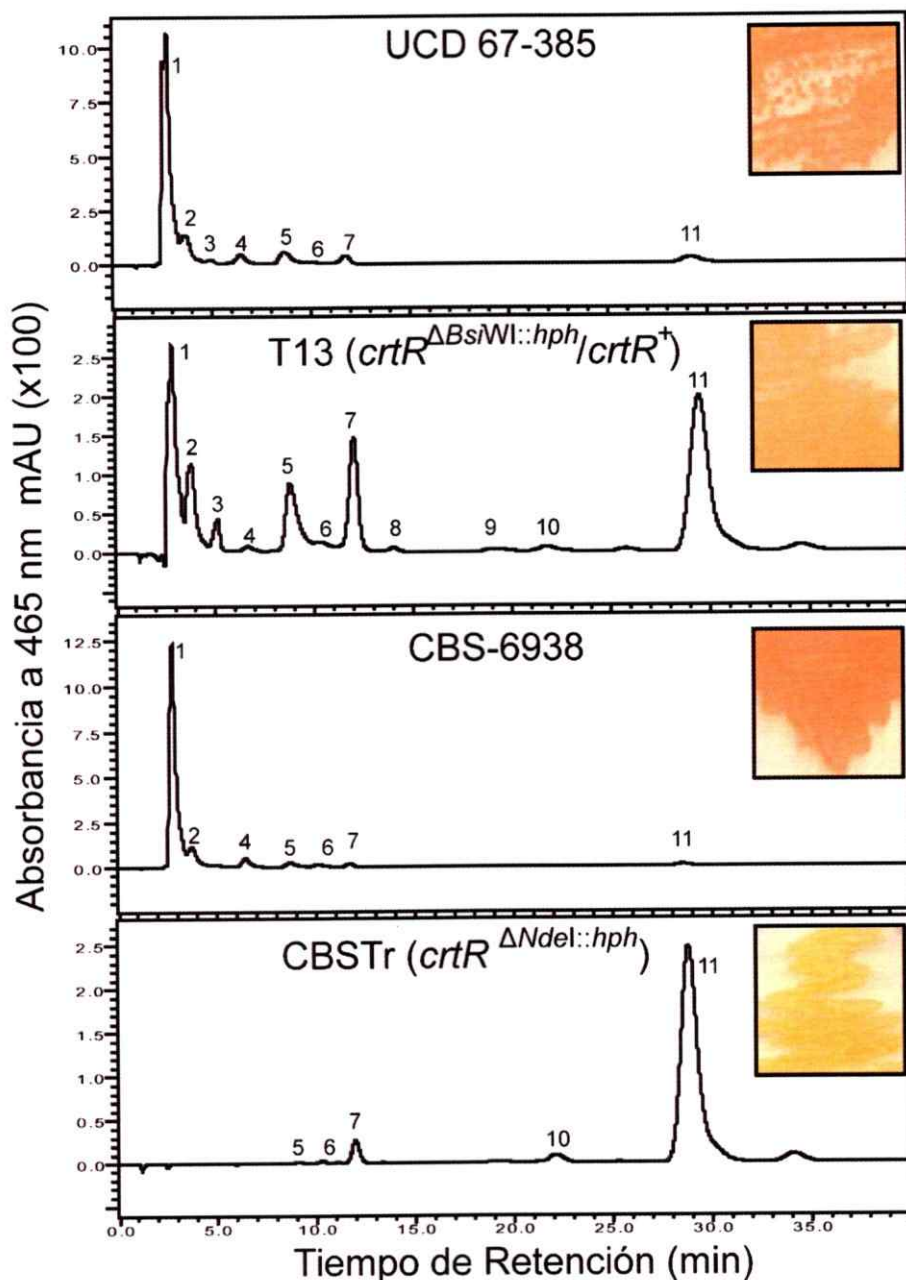


Figura 24. Fenotipo y cromatogramas (465 nm) de las levaduras silvestres (UCD 67-385 y CBS-6938) y transformantes (T13: que derivó de UCD 67-385 y CBSTr: que derivó de CBS-6938). Cromatogramas por RP-HPLC (465 nm). Los números en los cromatogramas representan los siguientes carotenoides; 1: astaxantina; 2: fenicoxantina; 3: cantaxantina; 4: hidroxy-keto- γ -caroteno; 5: keto- γ -caroteno; 6: hidroxy-equinenona; 7: equinenona; 8: licopeno; 9: neurosporeno; 10: γ -caroteno y 11: β -caroteno.

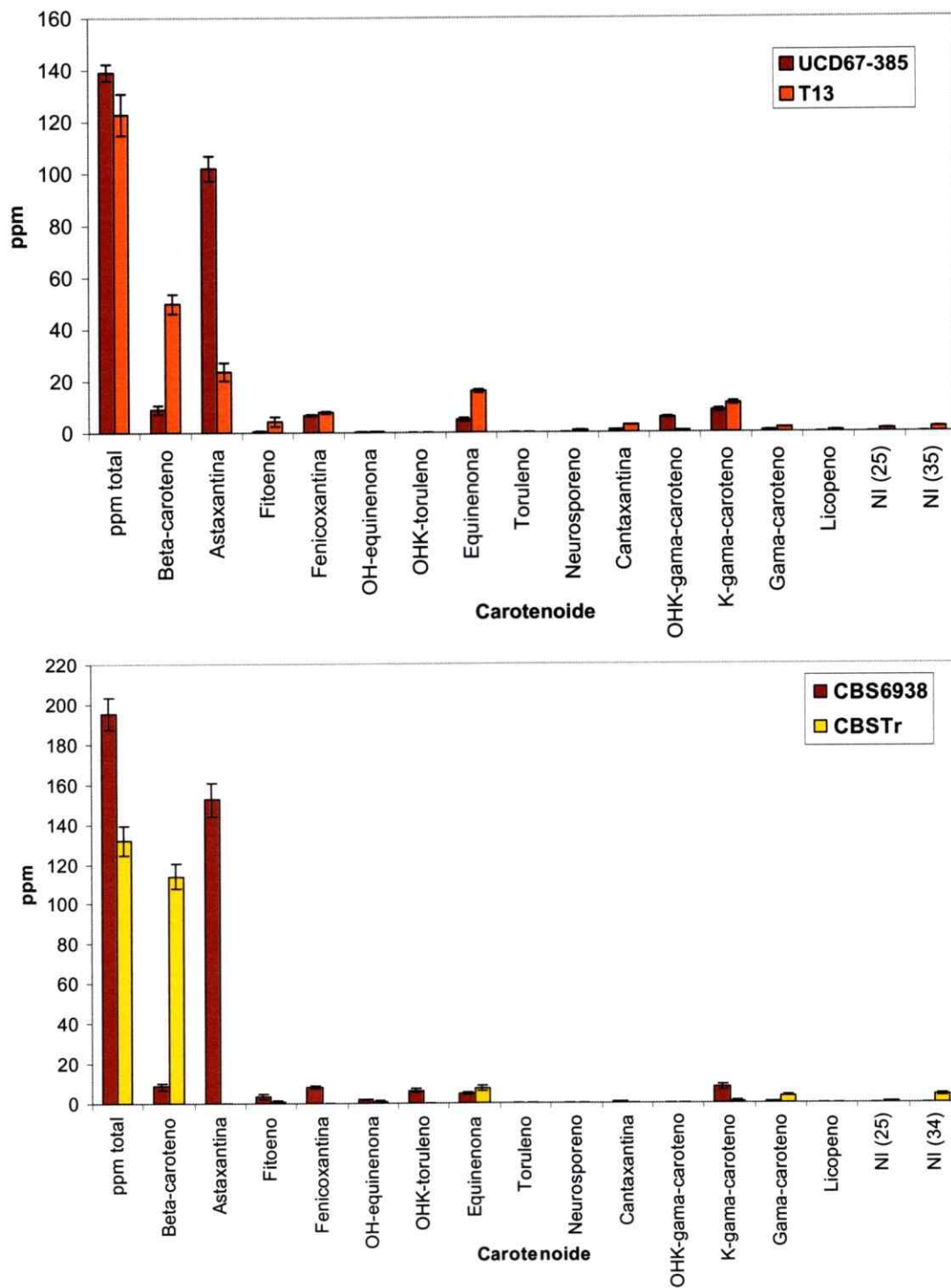


Figura 25. Comparación de pigmentos producidos por cepas silvestres (UCD 67-385 y CBS-6938) y su respectivo mutante (T13: que derivó de UCD 67-385 y CBSTr: que derivó de CBS-6938).

Tabla 11. Composición de carotenoides de las cepas silvestres y transformantes de *X. dendrorhous* en ppm.

Carotenoide	UCD 67-385	T13 (<i>crtR</i> ^{ΔBsiWI::hph} / <i>crtR</i> ⁺)	CBS-6938	CBSTr (<i>crtR</i> ^{ΔNdeI::hph})
astaxantina	102,0 ± (4,8)	24,0 ± (3,6)	152,0 ± (8,5)	ND
fenicoxantina	7,0 ± (0,4)	8,0 ± (0,4)	8,0 ± (0,5)	ND
cantaxantina	1,0 ± (0,1)	3,00 ± (0,06)	1,0 ± (0,1)	ND
OH-K-γ-caroteno	6,0 ± (0,2)	1,00 ± (0,06)	ND	ND
OH-K-toruleno	ND ^a	ND	6,0 ± (1,1)	ND
K-γ-caroteno	9,0 ± (0,7)	11,0 ± (0,7)	8,0 ± (1,2)	1,0 ± (0,3)
OH-equinenona	ND	ND	2,0 ± (0,4)	1,0 ± (0,4)
equinenona	5,0 ± (0,6)	16,0 ± (0,5)	5,0 ± (0,7)	8,0 ± (1,2)
licopeno	ND	1,0 ± (0,01)	ND	ND
neurosporeno	ND	1,00 ± (0,02)	ND	ND
γ-caroteno	1,0 ± (0,1)	2,00 ± (0,05)	1,0 ± (0,1)	3,0 ± (0,2)
β-caroteno	9,0 ± (1,7)	50,0 ± (3,7)	9,0 ± (1,5)	114,5 ± (6,6)
fitoeno	0,4 ± (0,3)	4,2 ± (1,9)	3,3 ± (1,2)	1,0 ± (0,4)
NI (25 min) ^b	ND	1,0 ± (0,1)	ND	1,0 ± (0,1)
NI (34 min) ^c	ND	2,00 ± (0,04)	ND	4,0 ± (0,9)
Carotenoides totales	139,0 ± (3,2)	122,8 ± (8,0)	195,3 ± (8,0)	131,9 ± (7,5)

^a: No detectado.

^b: Carotenoide no identificado, probablemente es un isómero de gama-caroteno, según su espectro de absorción.

^c: Carotenoide no identificado, probablemente es un isómero de beta-caroteno, según su espectro de absorción.

Los valores en la tabla, son el promedio de tres experimentos independientes. OH: grupo hidroxilo, K: grupo ceto.

Tabla 11). Más aún, se observó que la producción de carotenoides totales en la cepa CBSTr se redujo en un 30 % aproximadamente respecto a su cepa parental. Cabe destacar que los resultados del análisis de los carotenoides separados por RP-HPLC se obtuvieron a partir de al menos tres extracciones de carotenoides totales independientes para cada una de las cuatro cepas analizadas.

Expresión de los genes *crtS* y *crtR* en distintas etapas de la curva de crecimiento de la levadura silvestre (UCD 67-385). Para estudiar la expresión de los genes *crtS* y *crtR* a nivel del mRNA, se hizo crecer a la cepa silvestre UCD 67-385 en un fermentador en MM_v suplementado con glucosa al 2 %. Se tomaron muestras en distintas etapas de la curva de crecimiento y se extrajo RNA para determinar los niveles de los mRNAs de los genes *crtS* y *crtR* mediante RT-PCR, normalizados respecto al del gen de actina (Lodato, 2002; Lodato y col., 2004). Los niveles relativos de cada transcrito corresponden a la relación entre las intensidades de los amplificados de los genes *crtS* o *crtR* y la intensidad del amplificado del gen de actina (*crtS* o *crtR*/actina) (Figura 26). Cada transcrito se amplificó con los partidores AST1 y AST2 (gen *crtS*), CPR1ExC y CPR12 (gen *crtR*) y ACT3 y ACT4 (gen de actina) (Tabla 3), respectivamente.

Como resultado se observó que el nivel del mRNA del gen *crtS* tiene un máximo a las 66 h de cultivo, lo que coincide aproximadamente con la mitad de la fase exponencial de crecimiento. A diferencia, los niveles de mRNA del gen *crtR* se

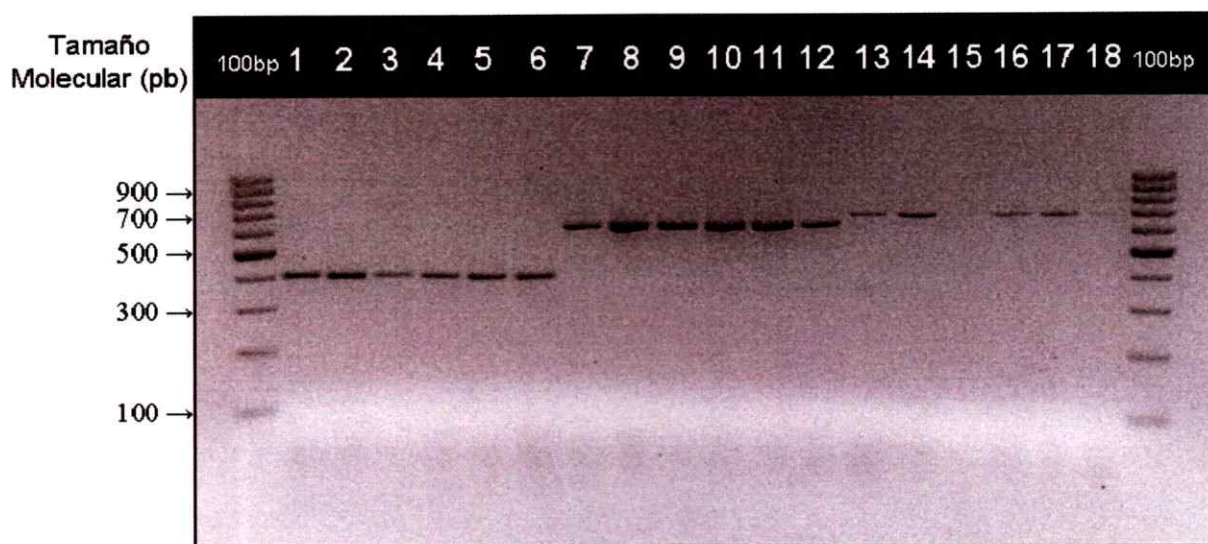


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa (2,5 %), de los productos de RT-PCR de los genes *actina*, *crtS* y *crtR*, en distintos puntos de la curva de crecimiento de la levadura. 100 bp: Estándar de tamaño molecular. Carriles 1 a 6: *actina* (a 41,4; 51,5; 66,0; 75,7; 92,1 y 116,5 h de cultivo respectivamente) amplificado con partidores ACT3 y ACT4; 7 a 12: *crtS* (a 41,4; 51,5; 66,0; 75,7; 92,1 y 116,5 h de cultivo respectivamente) amplificado con los partidores AST1 y AST2; 13 a 18: *crtR* (a 41,4; 51,5; 66,0; 75,7; 92,1 y 116,5 h de cultivo respectivamente) amplificado con CPR1ExC y CPR12.

mantienen constantes (Figura 27). A pesar que ambas proteínas participarían en la misma etapa de la carotenogénesis, no existe una misma tendencia en la expresión de sus genes a nivel de mRNA.

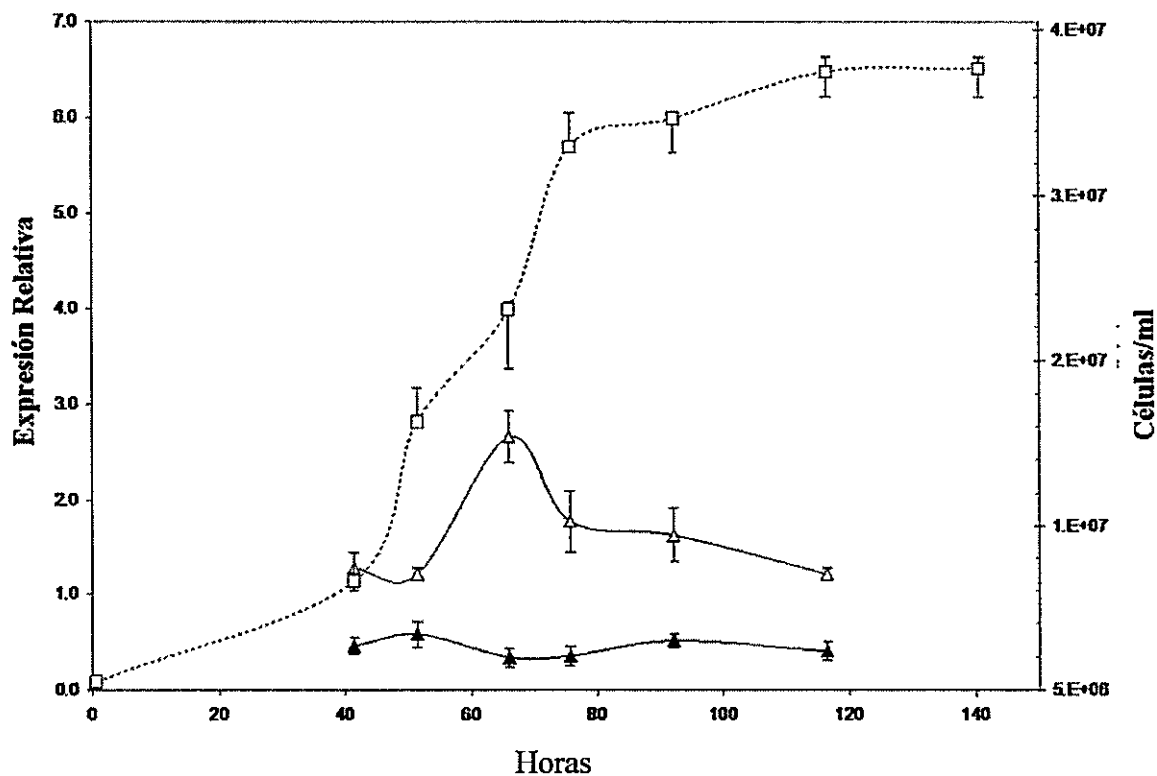


Figura 27. Expresión relativa de los genes *crtR* y *crtS* a lo largo de la curva de crecimiento de *X. dendrorhous*. La cepa silvestre UCD 67-385 se creció en MM_v + 2 % glucosa en un fermentador a 22 °C. (Δ): Expresión relativa *crtS*, (▲): Expresión relativa *crtR* y (□): n° células por ml. La expresión relativa se determinó como el cociente entre la masa del amplificado de los genes *crtS* o *crtR* y la masa del amplificado del gen de actina. Los valores graficados corresponden al promedio de tres experimentos independientes.

DISCUSION

El clonamiento de las versiones genómicas y de cDNA del gen *crtR*, permitió determinar su estructura de exones e intrones y se comprobó que codifica una proteína CrtR de 746 aminoácidos. Esta proteína posee 22 aminoácidos hidrofóbicos en su extremo amino-terminal, el cual no es conservado entre las citocromo P450 reductasas en cuanto a su secuencia, pero si es un típico segmento de transmembrana presente en todas ellas permitiendo su anclamiento en la membrana del retículo endoplasmático en la célula (Yadav y Loper, 2000 a). De esta manera, se asegura la interacción espacial apropiada para la transferencia de electrones desde la CPR a las citocromo P450. En ausencia de esta región hidrofóbica, la región soluble de las CPRs es capaz de transferir electrones a citocromo c, el cual no es su sustrato natural, pero no es capaz de transferirlos a las citocromo P450 (Wang y col., 1997).

También se distinguió los dominios conservados en CPRs tales como: los dominios de unión a FMN, FAD y NAD(P)H (Figura 28). El dominio de unión a FMN se identificó como la estructura típica encontrada en flavodoxinas. Éstas sólo se han encontrado en algunas bacterias y algas, sin embargo, el dominio de unión a FMN de las CPRs es homólogo a las flavodoxinas bacterianas (Porter y Kasper, 1986). En otros trabajos se identificaron por medio de herramientas bioinformáticas, dos regiones ricas en residuos ácidos que probablemente estarían involucrados en la unión a la enzima

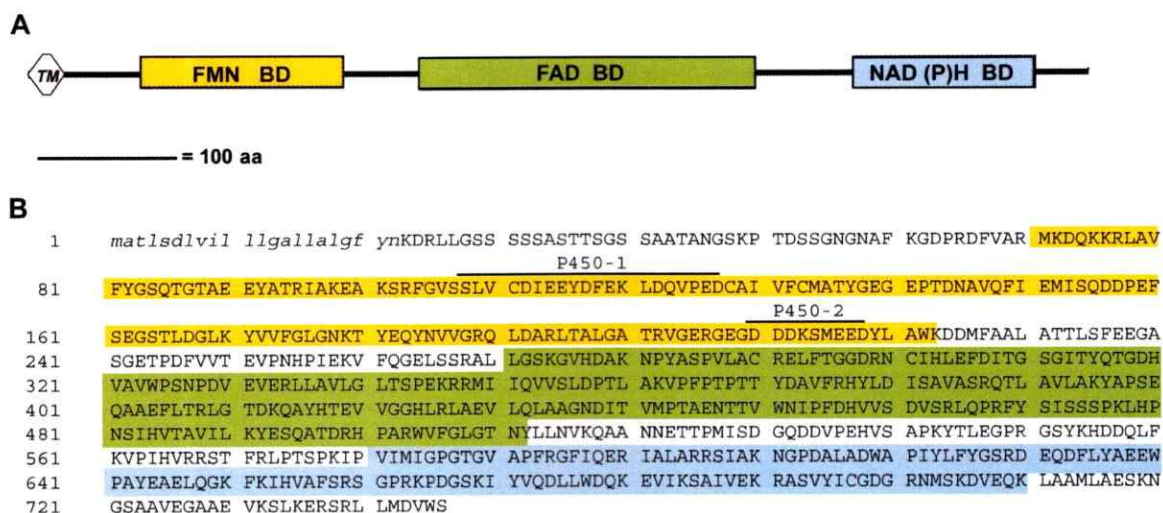


Figura 28. Secuencia de aminoácidos deducida a partir de la región codificante del gen *crtR*. **A:** Representación gráfica de los dominios conservados de CPRs en CrtR de *X. dendrorhous*. **B:** Secuencia aminoacídica deducida de la proteína CrtR. Los dominios conservados se han destacado en amarillo: dominio de unión a FMN, verde: dominio de unión a FAD y en celeste: dominio de unión a NAD(P)H. En cursiva y minúsculas se indica la región de transmembrana. Además se ilustran dos regiones ácidas (P450-1 y P450-2) que estarían involucradas en la unión de citocromo P450.

citocromo P450 (regiones P450-1 y P450-2, Figura 28) (Yadav y Loper, 2000 a y b; Ichinose y col., 2002). Las correspondientes regiones en CrtR también se caracterizaron por la presencia de aminoácidos ácidos en donde los residuos de ácido aspártico en las posiciones 210, 211 y 218 son extremadamente conservados en todas las CPRs (Yadav y Loper, 2000 a y b). Las regiones de unión a citocromo P450 están situadas en el dominio de unión a FMN, lo que es coherente con el flujo de electrones desde el NAD(P)H a FAD, luego a FMN y, por último, a la enzima citocromo P450 monooxigenasa.

En relación a lo anterior, la generación del modelo tridimensional de CrtR, permitió localizar estas dos regiones (P450-1 y P450-2) en la estructura terciaria de la proteína y se observó que ambas regiones se encuentran en distintas caras de la superficie de CrtR (Figura 29). Además, se observó que la región P450-2 coincide espacialmente con la zona de unión a FMN por lo que posiblemente es más importante para la unión con citocromo P450 que la región P450-1. Esto concuerda con los resultados experimentales obtenidos por experimentos de entrecruzamiento entre la CPR de rata y citocromo c de caballo, en donde se observó que la región correspondiente a P450-2 se unió covalentemente con citocromo c (Nisimoto, 1986). Posteriormente, mediante experimentos de mutagénesis sitio dirigida en la región P450-2 de la CPR de rata, se demostró la importancia de los residuos acídicos de esta región en la actividad reductasa (Shen y Kasper, 1995), especialmente el residuo D²⁰⁸, que corresponde a D²¹¹ en CrtR.

También se realizó un análisis filogenético con las secuencias aminoacídicas de

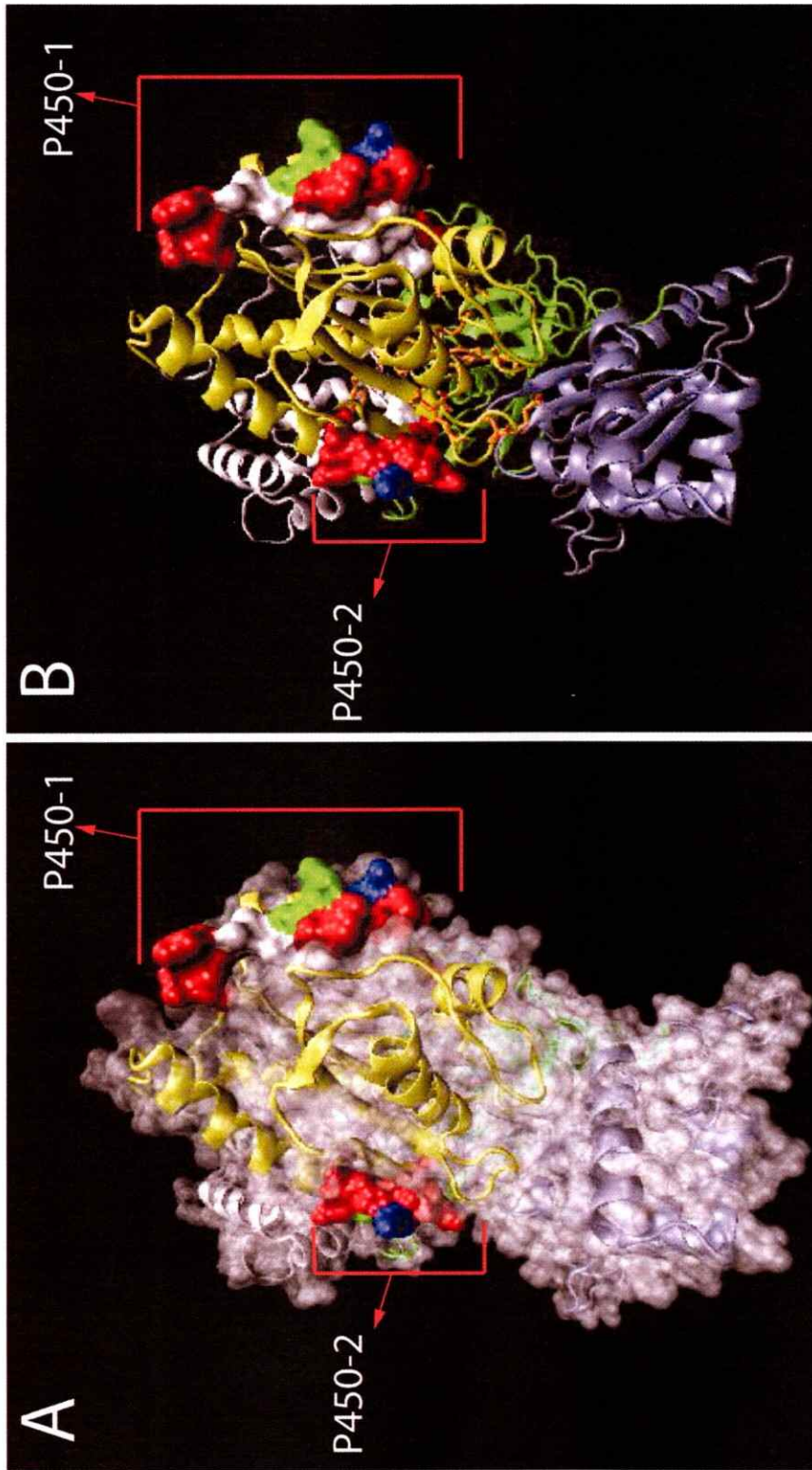


Figura 29. Superficie de la proteína CrtR. **A:** Modelo de superficie proteína CrtR. **B:** Modelo de “cintas” proteína CrtR. Dominios en proteína CrtR, amarillo: de unión a FMN, blanco: conector, verde: de unión a FAD y azul: de unión a NAD(P)H. En las regiones P450-1 y P450-2 se indican los residuos ácidos en rojo, básico en azul, apolares en blanco y polares en verde. En **B** se muestran en naranja las cadenas laterales de los residuos conservados en el dominio de unión a FMN.

proteínas CPR de hongos disponibles en las bases de datos mediante el método de “Neighbor Joining” y 1.000 repeticiones de “Bootstrap” (Figura 30). El árbol filogenético demostró la relación evolutiva de CrtR y se observó la diferenciación de los tres grupos de hongos; Basidiomycota, Zygomycota y Ascomycota. La proteína CrtR de *X. dendrorhous* se relaciona principalmente con las CPR de los basidiomicetes *C. versicolor* y *P. chrysosporium*, con porcentajes de identidad de 60,2 % y 58,3 %, respectivamente.

En cuanto al estudio de formación de astaxantina desde beta-caroteno en el sistema heterólogo bacteriano en la presencia del producto génico del gen *crtR*, no se logró formar astaxantina. A diferencia de los resultados obtenidos por otro grupo de trabajo, no se produjo xantófilas en la bacteria. Aunque, en el trabajo de Ojima sólo lograron producir cantaxantina (β -caroteno-4,4'-diona), ésta fue en muy bajas cantidades. En su sistema, ellos utilizaron al gen de la CPR de *S. cerevisiae* y concluyeron que las astaxantina sintasa de *X. dendrorhous* presenta muy baja actividad en *E. coli* (Ojima y col., 2006). Respecto a este punto, es importante tener en cuenta que tanto CrtS como CrtR son proteínas de membrana y consecuentemente el sistema de expresión heterólogo procarionte no sería el más adecuado para su funcionalidad. De igual manera, recientemente se reportó que en varios intentos por producir carotenoides de manera heteróloga en *E. coli* utilizando los genes carotenogénicos de *X. dendrorhous*, resultaron en una pobre expresión de las enzimas y en la producción de carotenoides (Verwaal y col., 2007).

Por estas razones para producir astaxantina, un sistema eucariótico sería más

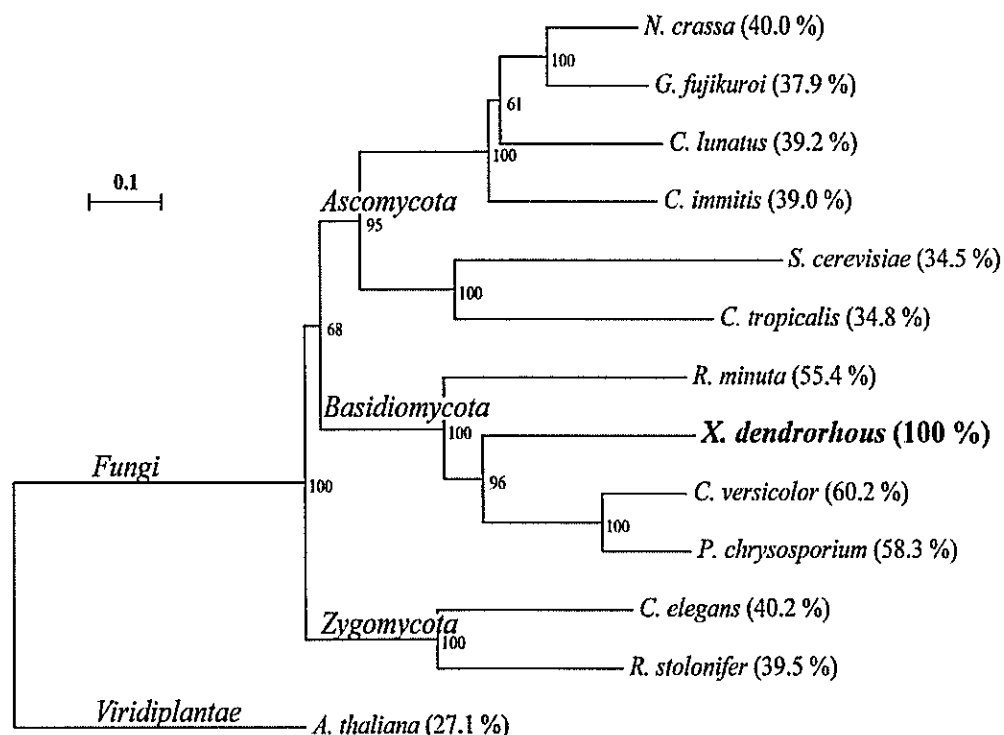


Figura 30. Árbol filogenético de citocromos P450 Reductasas. El análisis de las distancias y la construcción del árbol se realizó a través del método "Neighbor Joining". Los números en cada nodo indican el porcentaje de apoyo de cada nodo, luego de 1.000 repeticiones de análisis de "bootstrap". La escala de barras indica un 10 % de cambio estimado. Entre paréntesis se ilustra el porcentaje de identidad con la proteína CrtR de *X. dendrorhous*. Los números de acceso a la base de datos del GenBank son: *Neurospora crassa*: XP_964443; *Gibberella fujikuroi*: AJ576025; *Cochliobolus lunatus*: ABW86977; *Coccidioides immitis*: XP_001246449; *S. cerevisiae*: D13788; *Candida tropicalis*: M35199; *Rhodotorula minuta*: AB055119; *Xanthophyllomyces dendrorhous*: EU884134 y EU884133; *Coriolus versicolor*: AB065368; *P. chrysosporium*: AF193060; *Cunninghamella elegans*: AF195659; *Rhizopus stolonifer*: AF290425; *A. thaliana*: A75959.

apropiado debido a que presentaría un ambiente celular similar al de *X. dendrorhous* para intentar la expresión de sus genes carotenogénicos. En relación a esto, se construyó una cepa de la levadura *S. cerevisiae* productora de beta-caroteno, que contiene los genes *crtE*, *crtI* y *crtYB* de *X. dendrorhous* (Verwaal y col., 2007). Sin embargo, aún no se ha podido producir astaxantina en esta levadura, ya que probablemente todavía no se ha publicado la secuencia del gen *crtR* identificado en esta tesis. Sin duda alguna, este trabajo deja una puerta abierta para intentar producir astaxantina en *S. cerevisiae* lo cual sería muy interesante desde el punto de vista biotecnológico.

Por otro lado, la obtención de dos mutantes (T13 y CBSTr), que derivan de dos cepas silvestres (UCD 67-385 y CBS-6938, respectivamente) de la levadura, en los que se reemplazó una porción del gen *crtR* por un módulo de resistencia a higromicina B mediante recombinación homóloga, permitió demostrar la importancia del gen *crtR* en la biosíntesis de astaxantina de *X. dendrorhous*.

En relación a estos mutantes, la cepa UCD 67-385 es diploide (Hermosilla y col., 2003) y los resultados sugieren que el mutante T13 es heterocigoto para el gen *crtR*, ya que se identificó un alelo silvestre y uno mutante que se generó por un evento de doble recombinación homóloga. Debido a esto, es posible atribuir un efecto de dosis génica como la razón por la cual este transformante es pálido, ya que produciría menos enzima CrtR que su cepa parental silvestre cuyos dos alelos *crtR* son silvestres. Esta hipótesis se sustenta con el hecho de que el gen *crtR* se encuentra en al menos dos cromosomas de la cepa silvestre UCD 67-385, ya que la sonda del gen *crtR* hibridó con dos bandas cromosómicas del cariotipo electroforético de la cepa. No obstante, la relación genética

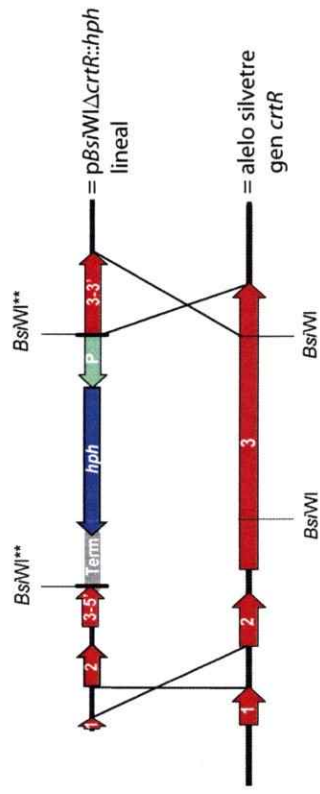
de estos dos cromosomas aún no ha sido determinada, pero es posible interpretar este resultado por la existencia de dos cromosomas homólogos polimórficos ya que esta cepa es diploide. De hecho, se ha encontrado que diferentes cepas de *X. dendrorhous* presentan un elevado polimorfismo cromosómico (Nagy y col., 1994). Por consiguiente, es posible especular que estos dos posibles cromosomas homólogos han sufrido algún tipo de reordenamiento genético que explicaría la diferencia en sus tamaños.

En contraste, el nivel de ploidía de la cepa CBS-6938 es desconocido. Sin embargo, resultados no publicados de nuestro laboratorio sobre ensayos de mutagénesis al azar con mutágenos físicos y químicos, como también los experimentos de transformación con genes carotenogénicos (Verdoes y col., 2003), indican que esta cepa es haploide. Por lo tanto, se postula que en el transformante CBSTr, que se obtuvo por un evento de recombinación homóloga simple, la única copia del gen *crtR* mutó y por esta razón fue incapaz de producir la enzima CrtR. Como consecuencia, no produce astaxantina y acumula beta-caroteno.

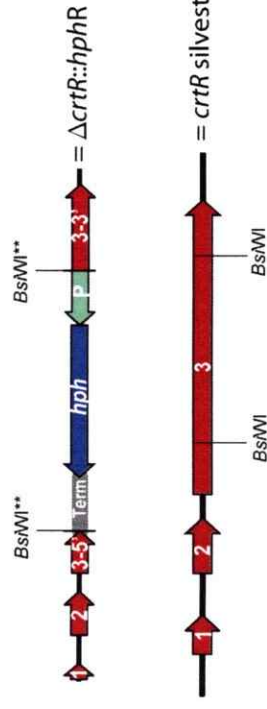
Con los resultados obtenidos, se construyó un modelo de los eventos de transformación por recombinación homóloga ocurridos en las cepas silvestres UCD 67-385 y CBS-6938 (Figura 31).

Con respecto a las mutaciones creadas en el gen de la citocromo P450 reductasa de otros organismos, la supresión del gen *cpr* de *S. cerevisiae* no fue letal y los autores sugirieron la existencia de un donador de electrones alternativo como sería el caso de una enzima citocromo b5, codificada por el gen *cytb5* (Truan y col., 1994). En ese

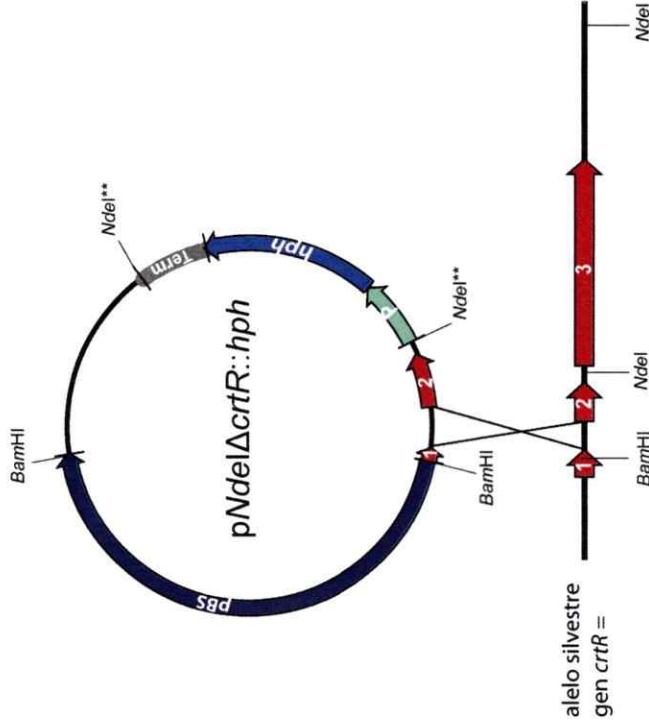
A: Transformación de UC67-385: Doble Recombinación Homóloga (Transformación con DNA lineal)



Transformante T13 ($crtR^{\Delta BsWI/hph^+} crtR^+$):



B: Transformación de CBS-6938: Recombinación Homóloga Simple (Transformación con DNA circular)



Transformante CBSTR ($crtR^{\Delta NdeI/hph^-}$):

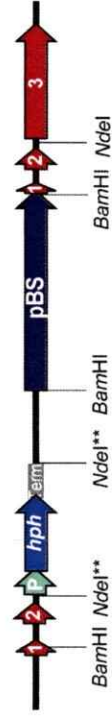


Figura 31. Eventos de mutación del gen *crtR* por recombinación homóloga en las cepas silvestres UCD 67-385 y CBS-6938 de *X. dendrorhous*. **A:** Transformación de la cepa UCD 67-385: La cepa UCD 67-385 se transformó con un fragmento de DNA lineal que contiene la delección del gen *crtR* y al módulo de resistencia a higromicina B. Este fragmento se obtuvo a partir de la digestión de *pBsiWIΔcrtR::hph* con las endonucleasas *SmaI* y *SpeI*. Por un evento de doble recombinación homóloga, un alelo del gen *crtR* de la cepa UCD 67-385 se reemplazó por la delección, obteniéndose una cepa heterocigota para el gen *crtR* (cepa T13). **B:** Transformación de la cepa CBS-6938: La cepa CBS-6938 se transformó con *pNdeIΔcrtR::hph* (DNA circular) que contiene la delección del gen *crtR* y al módulo de resistencia a higromicina B. Por un evento de recombinación homóloga, el gen *crtR* de la cepa CBS-6938 se interrumpió por el *pNdeIΔcrtR::hph*, obteniéndose una cepa mutante para el gen *crtR* (cepa CBSTr). Módulo de resistencia a higromicina B; P: promotor EF1 α , *hph*: gen *hph* de *E. coli*, Term: terminador de transcripción de gliceraldehido 3-deshidrogenasa. 1, 2, 3: Exones 1, 2 y 3 de gen *crtR*, pBS: pBluescript SK-.

trabajo, se observó que la supresión del gen *cytb5* en la levadura silvestre, no generaba un nuevo fenotipo. Sin embargo, fue letal cuando los genes *cpr* y *cytb5* se suprimieron simultáneamente. Este resultado demostró que mutaciones en los genes *cpr* o *cytb5* de manera independiente, pueden complementar funcionalmente entre sí (Truan y col., 1994). Del mismo modo, la interrupción del gen *cpr* en el *G. fujikuroi* tampoco fue letal, demostrando la existencia de otro posible donante de electrones (Malonek y col., 2004). Estas evidencias y el alto nivel de polimorfismo en diferentes cepas de *X. dendrorhous* (Nagy y col., 1994; Cifuentes y col., 1997; Hermosilla y col., 2003), sugieren que las cepas silvestres UCD 67-385 y CBS-6938 pueden presentar un fondo genético diferente. En relación a esto, probablemente en la cepa CBS-6938 existe un donador alternativo como una enzima citocromo b5, ya que la mutación del gen *crtR* no fue letal, pero este donador alternativo sería incapaz de asistir la síntesis de astaxantina. Éste no sería el caso en la cepa UCD 67-385, debido a la imposibilidad de obtener un mutante homocigoto mutante del gen *crtR*, sugiriendo que esta situación podría ser letal.

En cuanto al análisis de la composición de carotenoides en las dos cepas silvestres y las dos cepas transformantes, se observó que efectivamente la síntesis carotenoides en las cepas transformantes estaba afectada. De esta manera, aproximadamente un 90 % de los carotenoides del transformante CBSTr, corresponde a beta-caroteno y éste es incapaz de producir astaxantina. A diferencia de los mutantes para el gen *crtS* (Ojima y col., 2006; Carmona, 2007), CBSTr si produce, aunque en muy bajas cantidades, algunas xantofilas, principalmente equinenona. Ésta podría ser generada en respuesta a una baja actividad astaxantina sintasa, que podría ser originada

por la presencia de una enzima donadora de electrones alternativa en la célula. Sin embargo, esta enzima alternativa sería incapaz de sustentar la síntesis de astaxantina. En el caso de la cepa T13, ésta disminuyó notablemente su producción de astaxantina y su porcentaje de beta-caroteno es mayor con respecto a su cepa parental. La producción del resto de los carotenoides de T13 es similar la cepa silvestre UCD 67-385, no obstante, se observó un leve aumento en la producción de equinenona, el cual es el primer intermediario entre beta-caroteno y astaxantina. Esto podría deberse a una disminución en la actividad astaxantina sintasa producto de una menor concentración de la proteína CrtR que sería su donador principal de electrones.

Finalmente, el estudio de la expresión del gen *crtR* reveló que su patrón de expresión a nivel de mRNA es diferente con respecto al de otros genes carotenogénicos. En otro estudio, la expresión de los genes *idi*, *crtE*, *crtYB*, *crtI* y *crtS* en la cepa silvestre UCD 67-385, mostró un aumento en la etapa temprana del crecimiento (fase exponencial) y se postuló que en este período ocurriría el ensamblaje de los complejos enzimáticos involucrados en la carotenogénesis (Lodato y col., 2007). En una segunda etapa al entrar en fase estacionaria, los recursos que inicialmente estaban destinados al aumento de la biomasa, se redireccionarían hacia estos complejos iniciándose de esta manera la carotenogénesis. Adicionalmente, se observó también que los niveles de los transcritos *crtYB*, *crtI* y *crtS* (genes exclusivamente carotenogénicos), disminuyen drásticamente durante la fase estacionaria, lo que no sería el caso de los genes *idi* y *crtE*. El nivel del transcrito *idi*, mostró una suave disminución durante la fase estacionaria y el del gen *crtE* se mantuvo constante en esta etapa, sugiriendo la presencia de mayores

niveles de las enzimas IPP isomerasa y GGPP sintasa en esta etapa lo que permitiría el flujo de los precursores de los isoprenoides hacia la carotenogénesis como también a otras vías metabólicas como la biosíntesis de ergosterol (Lodato y col., 2007). Similarmente, la inexistencia de una relación entre el patrón de expresión del gen *crtR* y el de los otros genes carotenogénicos, sugiere la participación de la enzima CrtR en otras vías metabólicas existentes en la levadura.

De esta manera, no es de extrañar que a pesar que las proteínas codificadas por los genes *crtS* y *crtR* están involucradas en la misma etapa de biosíntesis de astaxantina, éstos se regulen de manera diferente. Tal como se mencionó con anterioridad, en un organismo pueden existir muchos genes para proteínas citocromo P450 diferentes, pero generalmente existe un sólo gen para una CPR única. Por lo tanto, una compleja regulación para la expresión de la citocromo P450 reductasa, es necesaria para adaptar los niveles de actividad CPR en la célula con los distintos niveles de proteínas citocromo P450 diferentes.

Con relación a la regulación de un sistema P450-CPR, en un trabajo previo se estudio la hidroxilación del antiséptico benzoato por un sistema P450-CPR en *Aspergillus niger* (van den Brink y col., 2000). Los autores destacaron que la expresión de los genes *bphA* y *cprA*, que codifican a la citocromo P450 y CPR, respectivamente, es inducible por benzoato. Sin embargo, se observó que la expresión de la CPR es particularmente compleja, ya que además de la inducción por benzoato a nivel transcripcional, existirían otros mecanismos regulatorios como; uso diferencial de

promotores y regulación a nivel post-traducciona. En este sentido, el desacoplamiento de un sistema P450-CPR significaría una liberación de electrones al citoplasma lo que podría formar moléculas activas de oxígeno, entonces, una estricta regulación de la CPR es de vital importancia para la célula (van den Brink y col., 2000).

La biosíntesis de astaxantina de *X. dendrorhous* es un sistema muy interesante, complejo y existen muchas diferencias con respecto a otros organismos carotenogénicos. Hasta el momento, es el organismo en cuya vía de síntesis de astaxantina está el menor número de proteínas implicadas, siendo la vía más económica para la célula. Por ejemplo, existe un sólo gen (*crtYB*) que codifica para una proteína que presenta dos actividades enzimáticas; fitoeno sintasa y licopeno ciclasa (Verdoes y col., 1999 b; Alcaíno, 2002). Además, sólo una proteína astaxantina sintasa, CrtS, es capaz de formar astaxantina a partir de beta-caroteno. Esto no es así en otros organismos que requieren de dos enzimas: hidroxilasa y cetolasa para catalizar este paso. Más aún, CrtS es una enzima citocromo P450 (Alvarez y col., 2006; Ojima y col., 2006; Carmona, 2007), lo que es muy ventajoso para la célula, ya que como se mencionó, en la mayoría de los organismos existen varias proteínas citocromo P450, pero todas ellas son sustrato de un único donante de electrones: la enzima citocromo P450 reductasa (van den Brink y col., 1998).

Actualmente, se han clonado todos los genes que participan en la ruta de biosíntesis de astaxantina en *X. dendrorhous*. Sin embargo, en esta tesis se demostró que existe otra proteína, CrtR, que también participa en esta vía y que si bien tiene un rol

auxiliar, su participación es esencial, dado que su ausencia afecta dicho proceso metabólico. En relación a esto, en nuestro laboratorio se han obtenido dos cepas mutantes (ATX5 y ATX10) de la levadura que son incapaces de sintetizar astaxantina y que acumulan beta-caroteno. Sin embargo, el análisis molecular por clonación y secuenciación de los dos posibles genes candidatos, *crtS* y *crtR*, indicó que en la cepa ATX10 no hay cambios en ninguno de ellos. Adicionalmente, la secuencia del gen *crtR* de la cepa ATX5 es idéntica a la de la cepa UCD 67-385 y en el gen *crtS* hay un cambio que reemplaza una Gly por Asp en la posición 60 de la proteína CrtS. Mas aún, el mRNA del gen *crtR* se detectó en ambas cepas mediante RT-PCR, pero este ensayo aún no se ha realizado para el gen *crtS*. Éstas son evidencias de la posible existencia de un tercer gen que podría estar participando en esta etapa de la biosíntesis.

Para concluir, la información adquirida en esta tesis tal como; el aislamiento, caracterización y demostración de la funcionalidad de un nuevo gen que participa en la ruta de biosíntesis de astaxantina de *X. dendrorhous*, es un gran aporte para el conocimiento de la carotenogénesis de la levadura, el cual es proceso biológico muy atractivo. Luego de conocer todos los genes que participan y de comprender la regulación de la síntesis de astaxantina, la construcción de cepas de *X. dendrorhous* o de otras levaduras sobreproductoras del pigmento mediante ingeniería metabólica será posible, las cuales tendrán un gran atractivo biotecnológico.

CONCLUSIONES

En esta tesis, se aisló por primera vez al gen *crtR* de la levadura *X. dendrorhous*, se caracterizó y se demostró que es fundamental para la biosíntesis de astaxantina. Se concluye que este gen codifica la proteína CrtR, la cual presenta un rol auxiliar a la enzima astaxantina sintasa (gen *crtS*), ya que participaría en la transferencia de electrones desde el NAD(P)H necesarios para la oxidación del beta-caroteno. La regulación de la expresión de los genes *crtS* y *crtR* a nivel de sus mRNAs es diferente, siendo éste un primer antecedente para la comprensión del control de este sistema citocromo P450-citocromo P450 reductasa de *X. dendrorhous*.

PROYECCIONES

El aislamiento del gen *crtR* y la demostración de su participación en la síntesis de astaxantina de *X. dendrorhous*, es un gran aporte para el conocimiento de la carotenogénesis de esta especie de levadura. Teniendo en cuenta que la astaxantina es un pigmento que representa un gran interés desde el punto de vista biotecnológico, los genes de las enzimas que participan en la vía de síntesis en microorganismos productores naturales, tal como *X. dendrorhous*, podrían ser modificados. De esta manera, construir cepas de levadura con un mayor contenido de carotenoides, especialmente astaxantina, constituiría un interesante aporte desde el punto de vista biotecnológico. En este contexto, nuestro grupo de trabajo presentó una solicitud de patente para el uso del gen *crtR* en la producción de astaxantina (Alcaíno y Cifuentes, 2008).

Debido a que la síntesis de carotenoides de *X. dendrorhous* es un proceso complejo que podría estar regulado a distintos niveles, el estudio de los aspectos moleculares de su regulación será un paso importante para su comprensión. De acuerdo a lo anterior, una proyección natural de este trabajo es el estudio de los posibles elementos reguladores en la región promotora del gen *crtR*. De éste, se espera que presente un mecanismo complejo de regulación ya que también podría estar involucrado en otros procesos biológicos. En atención a que se ha demostrado que el tipo de fuente de carbono afecta la carotenogénesis, el estudio de la expresión del gen *crtR* comparada

con la de los otros genes carotenogénicos, tanto a nivel de mRNA como de proteína, en distintas etapas del crecimiento de la levadura y en distintas fuentes de carbono (fermentables o no fermentables), será un gran aporte para el conocimiento y comprensión de la regulación de la carotenogénesis en esta levadura. Adicionalmente, la síntesis de anticuerpos contra CrtR, como también de otras proteínas carotenogénicas, permitirá estudiar los tiempos de vida media, el momento de inicio de su síntesis, los niveles de éstas proteínas en los distintos mutantes carotenogénicos, etc.

Para concluir, los resultados obtenidos en esta tesis otorgan herramientas conceptuales y técnicas que permitirán la transformación de microorganismos, ya sea potenciando su capacidad natural de producir astaxantina o creando nuevas rutas metabólicas en otros organismos no carotenogénicos para permitir la producción de este pigmento. En este sentido, se propone la expresión de los genes carotenogénicos de *X. dendrorhous* en la levadura *S. cerevisiae*, la cual presenta ventajas tales como; el gran conocimiento de su genética, variadas herramientas moleculares para su modificación genética y el gran conocimiento de las condiciones óptimas que favorecen su crecimiento. Es así como, el vector pBS+Ura3GAC7 fue construido como un primer paso para la transformación y producción de astaxantina en *S. cerevisiae*, luego de obtener una cepa de la levadura productora de beta-caroteno.

BIBLIOGRAFÍA

- Adrio, J. y Veiga, M. 1995. Transformation of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *Biotech. Techniques* 9: 509-512.
- Aguila, M. 2006. Balance Salmonicultura Chilena en el 2005. Nadando con la corriente. *Aqua*. 105: 6-12.
- Alcaíno, J. 2002. Organización estructural del gen de la fitoeno sintasa en el genoma de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex *Phaffia rhodozyma*). Tesis para optar al grado de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile.
- Alcaíno, J. y Cifuentes, V. 2008. Uso de gen en síntesis de astaxantina. Número de solicitud de patente: CL-1669-2008, 9 de Junio. Departamento de Propiedad Industrial, DPI, Ministerio de Economía de 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.; Schuman, D. y Johnson, E. 1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 116-124.
- An, G. y Johnson E. 1990. Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 57: 191-203.
- An, G.; Jang, B. y Cho, M. 2001. Cultivation of the carotenoid-hyperproducing mutant 2A2N of the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) with molasses. *J. Biosci. Bioeng.* 92: 121-125.

- Andrewes, A.; Phaff, J. y Starr, M. 1976. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*. A red pigmented fermenting yeast. *Phytochem.* 15: 1003-1007.
- Armstrong, G. 1994. Eubacteria show their true colors: genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *J. Bacteriol.* 176: 4795-4802.
- Barahona, S.; Alcaíno, J.; Lodato, P.; Retamales, P. y Cifuentes V. 2001. Aislamiento de genes de carotenogénesis de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Ex. *Phaffia rhodozyma*) mediante PCR. *Bol. Micol.* 16: 65-69.
- Bernhardt, R. 2006. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J. Biotechnol.* 124: 128-145.
- Birnboim, H. y Doly, J. 1979. A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 3: 2303-2308.
- Boyle, J.S. y Lew A.M. 1995. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends Genet.* 11: 8.
- Britton, G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* 9: 1551-1558.
- Britton, G.; Liaaen-Jensen, S. y Pfander H. 1998. Carotenoids. Ed by G. Britton. Birkhäuser Verlag. Basel. Boston. Berlin.
- Carmona, M. 2007. Caracterización estructural del gen *ast* de *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas c/m Genética. Universidad de Chile.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- Chu, G.; Vollrath, D. y Davis, R. 1986. Separation of large molecules by contour-clamped homogeneous electric field. *Science.* 234: 1582-1585.

- Cifuentes, V.; Hermosilla, G.; Martínez, C.; León, R.; Pincheira, G. y Jiménez, A. 1997. Genetics and electrophoretic karyotyping of wild type and astaxantin mutants strains from *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 72: 111-117.
- Creighton, T. 1999. *Encyclopedia of molecular biology*. John Wiley and Sons, Inc. N.Y.
- Cunningham, F. y Gantt, E. 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 557-583.
- Domínguez-Bocanegra, A.R.; Ponce-Noyola, T. y Torres-Muñoz, J.A. 2007. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: 783-791.
- Estabrook, R.W. 2003. A passion for P450s (remembrances of the early history of research on cytochrome P450). *Drug Metab. Dispos.* 31: 1461-1473.
- Fraser, P.; Miura, Y. y Misawa, N. 1997. *In vitro* characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes. *J. Biol. Chem.* 272: 6128-6135.
- Fraser, P.D. y Bramley, P.M. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid. Res.* 43: 228-265.
- Girard, P.; Falconnier, B.; Bricout, J. y Vladescu, B. 1994. β -Carotene producing mutants of *Phaffia rhodozyma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 183-191.
- Golubev, W. 1995. Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Yeast*. 11: 101-110.
- Guengerich, F.P.; Martin, M.V.; Guo, Z. y Chun, Y.J. 1996. Purification of functional recombinant P450s from bacteria. *Methods Enzymol.* 272: 35-44.
- Hermosilla, G.; León, R.; Martínez, C. y Cifuentes, V. 1995. Formación y regeneración de protoplastos de *Phaffia rhodozyma*. *Bol. Micol.* 10: 71-75.
- Hermosilla, G.; Martínez, C.; Retamales, P.; León, R. y Cifuentes, V. 2003. Genetic determination of ploidy level in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Antonie van*

Leeuwenhoek. 84: 279-287.

Higuera-Ciapara, I.; Félix-Valenzuela, L. y Goycoolea, F.M. 2006. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 46: 185-196.

Hoshino, T.; Ojima, K. y Setoguchi, Y. 2000. Astaxanthin synthase. Hoffman-LaRoche; European patent no.1035206-A3.

Ichinose, H.; Wariishi, H. y Tanaka, H. 2002. Identification and heterologous expression of the cytochrome P450 oxidoreductase from the white-rot basidiomycete *Coriolus versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 658-664.

Johnson, E.; Conklin, D. y Lewis, M. 1977. The yeast *Phaffia rhodozyma* as a dietary pigment source for salmonids and crustaceans. *J. Fish. Res. Board Can.* 34: 2417-2421.

Johnson, E. y Lewis, M. 1979. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* 115: 173-183.

Kajiwara, P.; Fraser, P.D.; Kondo, K. y Misawa, N. 1997. Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 324: 421-426.

Kim, I.; Nam, S.; Sohn, J.; Rhee, S.; An, G.; Lee, S. y Choi, E. 1998. Cloning of the ribosomal protein L41 gene of *Phaffia rhodozyma* and its use as a drug resistance marker for transformation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1947-1949.

Lah, L.; Krasevec, N.; Trontelj, P. y Komel, R. 2008. High diversity and complex evolution of fungal cytochrome P450 reductase: cytochrome P450 systems. *Fungal. Genet. Biol.* 45:446-458.

Laskowski, R.A.; MacArthur, M.W.; Moss D.S. y Thornton, J.M. 1993. Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26: 283-291.

León, R. 2000. Caracterización de determinantes genéticos de la síntesis de astaxantina

en *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex *Phaffia rhodozyma*). Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias c/m en Biología. Universidad de Chile.

Linden, H. 1999. Carotenoid hydroxylase from *Haematococcus pluvialis*: cDNA sequence; regulation and functional complementation. *Biochim. Biophys. Acta* 1446: 203–212.

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 c/m en Biología. Universidad de 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 gene 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.

Lüthy, R.; Bowie, J.U. y Eisenberg, D. 1992. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature.* 356: 83-85.

Malonek, S.; Rojas, M.C.; Hedden, P.; Gaskin, P.; Hopkins, P. y Tudzynski, B. 2004. The NAD(P)H-cytochrome P450 reductase gene from *Gibberella fujikuroi* is essential for gibberellin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 279: 25075-25084.

Marcoleta, A. 2007. Identificación y caracterización de genes que se expresan en el metabolismo fermentativo de *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Seminario de Título para optar al grado de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile.

Martín, J.F.; Gudiña, E. y Barredo, J.L. 2008. Conversion of beta-carotene into astaxanthin: Two separate enzymes or a bifunctional hydroxylase-ketolase protein? *Micro. Cell. Fact.* 7: 3.

Meyer, P.S. y du Preez, J.C. 1994 a. Effect of culture conditions on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma* in batch and chemostat culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 780-785.

Meyer, P.S. y du Preez, J.C. 1994 b. Astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant on grape juice. *W. J. Microbiol. & Biotechnol.* 10: 178-183.

Miller, M.; Yoneyama, M. y Soneda, M. 1976. *Phaffia*; a new yeast genus in the Deuteromycotina (Blastomycetes). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26: 286-291.

Nagy, A.; Garamszegib, N.; Vágvölgyib, C. y Ferenczyb, L. 1994. Electrophoretic karyotypes of *Phaffia rhodozyma* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 123: 315-318.

Ngiam, C.; Jeenes, D.J.; Punt, P.J.; van den Hondel, C.A. y Archer, D.B. 2000. Characterization of a foldase; protein disulfide isomerase A; in the protein secretory pathway of *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 775-782.

Niklitschek, M. 2007. Desarrollo de un casete de resistencia a antibiótico en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Seminario de Título para optar al grado de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile.

Niklitschek, M.; Alcaíno, J.; Barahona, S.; Sepúlveda, D.; Carmona, M.; Wozniak, A.; Marcoleta, A.; Lodato, P.; Baeza, M. y Cifuentes, V. 2008. Genomic organization of the structural gene controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biol. Res.* 41: 93-108.

Nisimoto, Y. 1986. Localization of cytochrome c-binding domain on NAD(P)H-cytochrome P-450 reductase. *J. Biol. Chem.* 261: 14232-14239.

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.

Paiva, S.A. y Russell, R.M. 1999. Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *J. Am. Coll. Nutr.* 18: 426-433.

Parajo, J.C.; Santos, V.V. y Vazquez, M. 1998. Production of carotenoids by *Phaffia rhodozyma* growing on media made from hemicellulosic hydrolysates of *Eucalyptus globulus* wood. *Biotechnol. Bioeng.* 59: 501-506.

Phaff, H.J.; Miller, M.W.; Yoneyama, M. y Soneda, M. 1972. A comparative study of the yeast flora associated with trees on the Japanese Islands and on the West Coast of North America; p759-774. In Terui (ed.). *Proceedings of the 4th IFS: Fermentation Technology today*. Kyoto. Society of Fermentation Technology. Osaka.

Porter, T.D. y Kasper, C.B. 1986. NAD(P)H-cytochrome P-450 oxidoreductase: flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide domains evolved from different flavoproteins. *Biochem.* 25: 1682-1687.

Porter, T.D. y Coon, M.J. 1991. Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms; substrates; and catalytic and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.* 266: 13469-13472.

Ramírez, J.; Nuñez, M.L. y Valdivia, R. 2000. Increased astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant grown on date juice from *Yucca fillifera*. *J. of Industrial Microbiol. & Biotechnol.* 24: 187-190.

Retamales, P.; León, R.; Martínez, C.; Hermosilla, G.; Pincheira, G. y Cifuentes, V. 1998. Complementation analysis with new genetic markers in *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73: 229-236.

Retamales, P.; Hermosilla, G.; León, R.; Martínez, C.; Jiménez, A. y Cifuentes, V. 2002. Development of the sexual reproductive cycle of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *J. Microbiol. Methods*. 48: 87-93.

Reyes, E.; Barahona, S.; Fischman, O.; Niklitschek, M.; Baeza, M. y Cifuentes, V. 2004.

Genetic polymorphism of clinical and environmental strains of *Pichia anomala*. Biol. Res. 37: 747-757.

Sambroock, J. y Russell, D.W. 2001. Molecular cloning. A laboratory manual; 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor; N.Y.

Schietd, K.; Leuenberger, F.J.; Vecchi, M. y Glinz, E. 1985. Absorption; retention and metabolic transformations of carotenoids in rainbow trout; salmon and chicken. Pure & Appl. Chem. 57: 685-692.

Schwartz, D. y Cantor, C. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulse field gradient gel electrophoresis. Cell. 37: 67-75.

Shen, A.L. y Kasper, C.B. 1995. Role of acidic residues in the interaction of NAD(P)H-cytochrome P450 oxidoreductase with cytochrome P450 and cytochrome c. J. Biol. Chem. 270: 27475-27480.

Sommer, T.R.; Potts, W.T. y Morrissy, N.M. 1991. Utilization of microalgal astaxanthin by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture. 94: 79-88.

Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517.

Truan, G.; Epinat, J.C.; Rougeulle, C.; Cullin, C. y Pompon, D. 1994. Cloning and characterization of a yeast cytochrome b5-encoding gene which suppresses ketoconazole hypersensitivity in a NAD(P)H-P-450 reductase-deficient strain. Gene. 142: 123-127.

van den Brink, H.M.; van Gorcom, R.F.; van den Hondel, C.A. y Punt, P.J. 1998. Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. Fungal Genet Biol. 23: 1-17.

van den Brink, J.M.; Punt, P.J.; van Gorcom, R.F. y van den Hondel, C.A. 2000. Regulation of expression of the *Aspergillus niger* benzoate para-hydroxylase cytochrome P450 system. Mol. Gen. Genet. 263: 601-609.

Verdoes, J.C.; Krubasik, P.; Sandmann, G. y van Ooyen, A.J.J. 1999 a. Isolation and

functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Mol. Gen. Genet. 262: 453-461.

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

Verdoes, J.C.; Sandmann, G.; Visser, H.; Diaz, M.; van Mossel, M. y van Ooyen, A.J.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.

Wach, A.; Brachat, A.; Pöhlmann, R. y Philippsen, P. 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 10: 1793-1808.

Wallner, B. y Elofsson, A. 2003. Can correct protein models be identified? Protein Sci. 12: 1073-1086.

Wang, M.; Roberts, D.L.; Paschke, R.; Shea, T.M.; Masters, B.S. y Kim, J.J. 1997. Three-dimensional structure of NAD(P)H-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. PNAS. 94: 8411-8416.

Wery, J.; Dalderup, M.J.; Ter Linde, J.; Boekhout, T. y van Ooyen, A.J.J. 1996. Structural and phylogenetic analysis of the actin gene from the yeast *Phaffia rhodozyma*.

Yeast. 12: 641-651.

Wozniak, A. 2008. Influencia del metabolismo aerobio en la expresión de los genes de carotenogénesis y la biosíntesis de pigmentos en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias c/m en Biología. Universidad de Chile.

Yadav, J.S. y Loper, J.C. 2000 a. Cytochrome P450 oxidoreductase gene and its differentially terminated cDNAs from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Curr. Genet. 37: 65-73.

Yadav, J.S. y Loper J.C. 2000 b. Cloning and characterization of the cytochrome P450 oxidoreductase gene from the zygomycete fungus *Cunninghamella*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 268: 345-353.

Yamane, Y.; Higashida, K.; Nakashimada, Y.; Kakizono, T. y Nishio, N. 1997. Influence of Oxygen and Glucose on Primary Metabolism and Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma* in Batch and Fed-Batch Cultures: Kinetic and Stoichiometric Analysis. Appl. Environ. Microbiol. 63: 4471-4478.

ANEXOS

Anexo 1. Secuencia completa del fragmento de DNA de cepa UCD 67-385 que contiene al gen *crtR*. Los tres exones del gen *crtR* se encuentran destacados en amarillo. Los sitios dadores y receptores para procesos de empalme se encuentran en negritas y subrayados. Se indican algunos sitios de restricción en cursiva y colores que se utilizaron en esta Tesis: *Bam*HI: *ggatcc*, *Sal*I: *gtcgac*, *Bsi*WI: *cgtacg*, *Nde*I: *catatg*.

Anexo 2. Secuencia completa del cDNA del gen *crtR*. En letras cursivas y minúsculas: exon 1 gen *crtR*, mayúsculas y subrayadas: exon 2 gen *crtR* y mayúsculas y en negritas: exon 3 gen *crtR*.

Anexo 1. Secuencia completa del fragmento de DNA de cepa UCD 67-385 que contiene al gen *crfR*.

1
 101 *ggaTcc*GAGA TAGCAGAGAC ACGAAAATGA AGAAAGACGG ACCAGATCCA AAAGATGAAC ATCCCGAAAC CGATTCCAG CCATAGACA GCATCCGACT
 201 CCCAGAACGG CTCTCGGTC GATCCGGTCC GATCGAGTCC GTGAGATGAG GCCGAGCTGA CCGGAGCTCG TTTGTGACGG GATGCCATTC
 301 CAAGCGCTTG AAAGGCTATG CGAATGACAA GACATGCCAG GACATGCCAG CAAAGCCCA GCGAGAGTG GATTGATCGG CCAGCGCATG
 401 CTAAACCGC ACGAAGACGG AGAGAGGAAG AGACTGTATG AAATCGCAAG ACGCAACCTC AATCTTTCAA CCGTGTCAA AGAGAAAAG TAGCAGAGAG
 501 GAGAAACCT CTTTACCCTTT TTAACCACTAG GCAAGCCTCC AATTCGGCG GTGCAAGAAT CCGTACAGAG CACATCGGCA AATCGCTCGT ACGTTGAGAC
 601 CCGGATATGA CTAGGATCG GAGCGATATG TCAGAGAACG GCTTTCAGT TGGGGCATGT CAAACGTCAAC ATGGAACAAG ATTTTGGATC TTACTTTGAC
 701 TACTATGCGT GTTTTAACCA ATCTACTACC ATCTCCGAGC CCAAGACAAC CAAGGCCGCG AATTTCAAGG TAGCAGCAAG AGATGAAACA GTAGGCAACT
 801 ACACCTTCA GGACCGTCAAT ATCGAARAAT AAGAGAGAG AGAACCATGT CAGAAAGAAA GAAAGACTG ACCGAAAGCA TAGCTTCCAC ATGGCTAGCA
 901 CCTTTCATGA AGCTCCTGG TAAGCTTGA AAATCTGAAC CACTCAGTTC GACTAGATTT CGGAAAGCGA TAATGGCGAG CATCAGACC AGCTGAAAAC
 1001 GTTCGACGAT ATCTGAAGTT ACGGGCGATA GGGGAAGTA GAAGTTGAAA ACTTTTAAA CACAGCTATT GAAGAAGAA CAGAAGCAAT CAGAAGCAAG
 1101 AGACACGGAC GAACCTGCG AAGCAATCTG AAACAAGTTT TCTTCTCAA GTCAGGTAGG TGTGAATGGA CAGCCCTTGA TCTCGACAAA CTGGTTCGAG ACGAGCAAGG
 1201 TAGAGTTGT TTAGACAAGA AAAACCTAA AGGAGATGAA AAGATCGGA AAAACACTGA CAGCCCTTGA TCTCGACAAA CTGGTTCGAG ACGAGCAAGG
 1301 TGAGGAGAGC GTTGTGAAA GAGTTAATAG CCACGTTGAG CGAGATCAAC TGGAAAAGAA AGACCAAGT ATGCCAGAAA GAAAAAAGCG
 1401 TCCATGAGC GTTGTGGTAC CCTCTTGTG TCGTTRACG GCTATPAAACA ATTPAGGCC TCCAGCAGCA CACCGACGCA TCCGAGCCTG AAAAAAGG
 1501 GCGATCTGAG GGGCGACAGA CATTTGGGAG CATTTGGGCG CTTGACAGA GTTATPAAACA ATTPAGGCC TCCAGCAGCA CACCGACGCA TCCGAGCCTG
 1601 AAGCTCAA AGATGACGAC CAGCTTGTATG TATCTTGTG TCGATGATGAA GAGAGATGAA TATAAGGATA GCGCTGCC GAAAAGATC GATCGATGGA ACATCTTGG
 1701 GGTTCTGTG GAAACATTAAT TGACGAAACC TCTAATPAGAA TGGTGTGAT AACTTGCCTC AGTTCCTCCG ATGCCAGTGA CACAATAAA CAAGCAAGG
 1801 AGAACTTGA TGAATCAAT CCGCTGGTA GGCCAGAT GGTTCGAGG AAGCAAGAA AGCAATATGT GAGCCAAA AGAGTAAAG TTAGTTAAG
 1901 TTTATTACTC GACCGAGGAG AAGGGGAAAG AAAACGCAA AGACGATTGG GCGCACCGA CTGGCTCC GATGATGAG CCGCTCCAG TATGTTGCA
 2001 GCAGACGCA GAGCGCGATA AAAATCTGA TGGTAGGAT GGTAAACAC TAGAATAACG AATCGAGCA GACGATGAT CCGAATGTGA TCAACTGAGA
 2101 TGACACCGA GAAAGAAAAT GATGGGTTT TCCCTCTTGC GATTAAGAAG AAGTAAAGAG AACATGATCT TPACTCCGA TATGTTACCT TTTGATGCA
 2201 AGCAATGG AGAGAAAAG GAAAGACTTT GGTGTCAA AAACGCTTTA AGACACTGAA GCAACCCAG TGAATGAGAA AGAGAGCG CACCTCGAG TCAGCCCGAG
 2301 TTCAATAGC TTTTCCCGA TCTCTTCTG GAGATGTTCC CACAGACTGG CCTTTGGCT AGTTCGGCA AACTCTAGT AGGGAGGGT GGGAGAGAG AGTATCGGGC
 2401 GCGCGAGCT CGCCTCTC GTGAGTTGA TCCCTGCTA GTTCCGGG AGATTCGTC AGTTCGGCA AACTCTAGT AGGGAGGGT GGGAGAGAG AGTATCGGGC
 2501 TTTGAGGAT GCTGAGATCC AGAGTGTCTA GTTCCGGG GCGAAGGAC GAAGAACTAG AATCTGAGA GCGACTCTG CFTGCCCTG AGAGTCCGGC CTGGAAGAG GTTTGGTAGG
 2601 GGGCGAGCT CGCTGAGTCA GAAAGATGTT CTAGGATTA CCGTCTAG ATCTGAGAG CCGTCTAG CCGTCTAG TGGACTTGG GATGCTCGAG TGTCTACT
 2701 GGGAGGCTC CTGTGGTCA TGTGGTGA GAAAGATGTT CTAGGATTA CCGTCTAG ATCTGAGAG CCGTCTAG AGTTCGGCA AACTCTAGT AGGGAGGGT GGGAGAGAG AGTATCGGGC
 2801 GTCTCAAGT AGGTGACA GAAAGATGTT CTAGGATTA CCGTCTAG ATCTGAGAG CCGTCTAG AGTTCGGCA AACTCTAGT AGGGAGGGT GGGAGAGAG AGTATCGGGC
 2901 TCGATTCGAC ATTCGAGAA GCCGAAACGG ACGTCTCTG CTAGGATTA CCGTCTAG ATCTGAGAG CCGTCTAG AGTTCGGCA AACTCTAGT AGGGAGGGT GGGAGAGAG AGTATCGGGC
 3001 AGGCCGGTAG GATAGTGAGC TGTGTGAGC ATCTGAGAG GAGCGAGT GGTGTGAGC ATCTGAGAG GAGCGAGT GGTGTGAGC ATCTGAGAG GAGCGAGT GGTGTGAGC
 3101 GCAGCGAAG ATGGCTGTTG AGAGAACAG AGAGTCTGAT CTGCTCGTT CAGCGAGT GGTGTGAGC ATCTGAGAG GAGCGAGT GGTGTGAGC ATCTGAGAG GAGCGAGT
 3201 GTGAGGTTGA TCTGTAGGT GATGTTGAGC CAACGCGCAA GAGATGTGCG ACCACAGAG CCGGAAAGT AACGGATAG AACGGATAG AACGGATAG AACGGATAG
 3301 TSSGAGCTG ACAAGATCAC GATGAGGTTG TGGAGGTTG TGGAGGTTG TGGAGGTTG TGGAGGTTG TGGAGGTTG TGGAGGTTG TGGAGGTTG TGGAGGTTG
 3401 TSSGAGGTTG TGGAGGTTG TGGAGGTTG TGGAGGTTG TGGAGGTTG TGGAGGTTG TGGAGGTTG TGGAGGTTG TGGAGGTTG TGGAGGTTG TGGAGGTTG
 3501 ATAGATGAAT ATAGAGGTT TGAAGAAT ATATAAGCT ATATAAGCT ATATAAGCT ATATAAGCT ATATAAGCT ATATAAGCT ATATAAGCT ATATAAGCT
 3601 ACAGATAGAT GAATACTTAT ACAGACCAA GGCAGATAT GCCCTGTCT GCGGGGAA TACTTGTTC TCGAACAAG CATATATAC AGATGAGTAG
 3701 ACAGACGAA GTTGGTTGGA TGGTGAATG AACCGGTTA AGCGTAGAT ATGATGAGT AGATGAGT AGATGAGT AGATGAGT AGATGAGT AGATGAGT
 3801 TCATCTACT ATCACCTATG CATCACCTAT GTGCTATCG GTGCTATCG CATCACCTAT AGATGAGT AGATGAGT AGATGAGT AGATGAGT AGATGAGT
 3901 GCGGATGCT AACCAAACT TGGGTTTTG TAGCCAAAAT TACGCTCAG TCGCTCAG TCGCTCAG TCGCTCAG TCGCTCAG TCGCTCAG TCGCTCAG
 4001 AAGTCTGCTG ATCGAGAAA CTATCAAAA ACAITTCATCA ATCTTTCAGG CAACACCTTAA CACAACCTT AACCAACCTT AACCAACCTT AACCAACCTT
 4101

4201 TAACATTTCC AGTCCTTCTT TTGTTTCTTT TTTTATATTA ATTCCTTTT TTTCTTTTAA TCCTTTCTTT CTTCCTCAT ATCATCATCA TCCTCTCTCG
4301 TCTCTCTCGT GCATCTCCCT TTATCTCCCT ACTCAGTCA CTCTCTGCC CTTCGATCC ATRAACAAGC TGACAGTCTT GCAGAACCTT CCTTCAGTAT CCAATTTAAA TGGCCACACT
4401 CTCCGATCTT TCATATCCCTT TCCCTCTGCC TCTCTCTGCC CTTCGATCC ATRAACAAGC TGACAGTCTT GCAGAACCTT CCTTCAGTAT CCAATTTAAA TGGCCACACT
4501 TCAGSCTCTT CGGAGCCAC CGCCAATGGA TCCAAAGCCCA CATATCTTAA CGGGAACGC TCGACTTTCA AAGGCGATTC AAGGCGATTC CAGAGATTTT GTCGGCGGAA
4601 TGAARAATCA GATACTCTT TTTTCTTCTT TTTTCTTCTT TCCCACTCTG ATGGCAACG AAAAAACGAT TFAACCTGCT CTGTGCACCG ATACTAAACC TTTTGTGTGTTG
4701 TTTCTCTCTT CCCAACAGT CCCCAACAGT ATGGCAACG AAAAAACGAT TFAACCTGCT CTGTGCACCG ATACTAAACC TTTTGTGTGTTG
4801 TCGTCTCTCT CTTCTCTCTT TCCCTTCACT CCGCTTGC ATGGCAACG AAAAAACGAT TFAACCTGCT CTGTGCACCG ATACTAAACC TTTTGTGTGTTG
4901 ATATGCCACC CGGATGCCA AAGAGCCAA TGCCCGTCTT TCCCTGTTG CGACATCGAA GAGTATGACT TTGAAAAGCT TTGAAAAGCT CGGACAGGTC
5001 CCAGAAGACT GTGCGATCT GTTCTGATG GCCACTACG GCGAGGGTGA ACCCACGGAC AAGCCCGTTC CCCTCTGTTG GATGATPCGA GATGATPCGA CAGGATGATC
5101 TCCAGTTTTC AGAAGGGTCT ACTCTGATG CCCTCAAGTA TGTGTGTGTT GGCTGGGAA ACAAGACTG AGTATCTTTC AGTATCTTTC TTTTGTCTGCT TCCTTTCTCT
5201 TCCCTTCTCT TCCCTCACTGT TACATATCTT CATGTAACCT Ccatalgct AATATCTGCG CTTCCTACAC CCATCCACT ACCCAGCTC ATCCGTTGCA
5301 CAGCTACGAG CAGTACRAG TCGTCTGATG ACAGCTTAC CCGCCCTGG TCCACCCGA CCGGCGAAC GGGGTGAAGG AGAGGATGAC
5401 AAGTCAATGG AAGAAGACTA CCTCGCTTTG AAGGAGACA TGTTCGCGC CTTCGGGACC ACGTCTCTGT TTGAGGAAGG CGTTCGGGG GAGACCCCTG
5501 ACTTTGTCTT AACCGAGTT CCTAACCCAC CGATCGAGAA AGTCTTCCAG GGGGAGCTCT CCTCCAGAGC GCTCTCGGC AGCAAAGGTT TGCATGACGC
5601 GAAGAACCeg tagcOCTCCC CCGTACTTTC TCGAGAGAA CTCTTACCG GGGCGACCG AACTTGCAT TACTCGAGT TCGACATCAC CGTTCGCGA
5701 ATCACTTACC AGACCGGCGA TCACGTGCGA GTCTGGCTT CCAACCCCTG TGTGAGGTC GAGCGGCTGT TGGCCCTCTT CCGTCTCACT TCCTCCAGAA
5801 AACGGCGAT GATCATCCAG GTTGTCTCG TCGATCCGAC GTTGGCCAA GTTGGCCGAT GTCACCCGAC CACGTACGAC GCCGTCTTCA GACACTACCT
5901 CGACATATCT GCGTGGCT CAAGGACAG ACTCGGCTG CTGCAAAAT ACCTCCCTC TGTCCAGT GGTACAGAT GAAACAGAT CACCTGCAT CCCACGGCG
6001 AAGCAGGCTT ACCACACCGA GGTCTGCGG GGCATCTTC ACCAGTCTT TCCAGACTTC AGCCGAGT TTACCTGATC TCGTCTTCT CGAAACTTCA
6101 AGACACACAC GGTGTGAAAT ATTCGTTTG ACCAGTCTT CCTCAAGTAT GAATCACAG CGACTGACCG ACACCCGGCC AGGTGGTCT TCGGAATGG CAAAACTAC
6201 CCCAAACTC ATCCACGTTA CCGCCCTCAT CCTCAAGTAT GAATCACAG CGACTGACCG ACACCCGGCC AGGTGGTCT TCGGAATGG CAAAACTAC
6301 TGTGTAACG TCAAGCAGC CGCCGATCC TACAAGCAG ACAGCAACT CTCTCAAGT GAATCACAG CGACTGACCG ACACCCGGCC AGGTGGTCT TCGGAATGG CAAAACTAC
6401 CCGGTAACG ATGATCGTC CCGTACCGG ATCCCGCTG CTTTTCTCG ATCCGGCCCT AGAAAGCCAG GATTTCTCTT ACAGGAGGA ATGGCCAGCTT CCAAAAGCT
6501 CCAGATGCG TCGCCGATG GGCACCGATC TATCTGTCTT CTTTTCTCG ATCCGGCCCT AGAAAGCCAG GATTTCTCTT ACAGGAGGA ATGGCCAGCTT CCAAAAGCT
6601 AAGTCCAAG AAAATTTAAG ATCCAGTCTG CTTTTCTCG ATCCGGCCCT AGAAAGCCAG GATTTCTCTT ACAGGAGGA ATGGCCAGCTT CCAAAAGCT
6701 AAAAGAGTG ATCAAGAGG CGATCTGCGA GAAACGAGC AGCGTGTATA TTTTGTGTTG TGGGCGAAT ATGTCGAAGG ATGTCGAAGG AAGTTGGT
6801 GCCATGTTGG CCGAGTCAA GAAAGGTTG GCAAGGTTG TGAAGTCAAG TCGCTCAAAG TGGGCGAAT ATGTCGAAGG ATGTCGAAGG AAGTTGGT
6901 CGTAGACTTT TCGCCTTTTA TCCCTGATG TTTTCAATTT TATTTCTTCC TCTTTCTCTT GCCTTCTCTT TCTTCAAAT TATTTGCCCT TCCCTTCTT
7001 TCTTCTGTTT CTTCCTCTCT CTAGATGTTT TCCGATCGAA TAGCAACRAC ACAACAGCAT ATACAACGAG CGTCTCTTCTT CCTGTGTTTC CGTCACTAT
7101 AGATCTCTTA TACCTCTTTG TCACCTCTCT CGTTTTCTCTT GCAACTCTT TCTCTTGTCT TTTCTTTTTC TTTTTCGGAG ACTCAATCGA
7201 TCGAACCTCT TTTCTCAAAC ACGTTCACTG GTCCGATCAG TCGCTTTTTC TGGTTGATCA GATTCACAT GTAGGCAAAA AGACCGGACT GAACAGAAA
7301 ACCATCAT TAAGTCAAAC TAACAAGTGA AGGTTAAGCA CCGAGGAAGA AAGCAAGAGG AAAGAAGAA CAAGAAGTGA AAGAAAGCA AGCCTCTCT
7401 CCGACCCCA CACCCCTCTC CCGTGGCCG ATCTTCTCG GCGACCTTTA GACACAGTA TACCTCCCTC TACCTCCCTC CGGACCCCG CGCTTTCTC TGTTCCTGG
7501 CGAGCCCTG GATGTTACT TCGACCAACA ACCTGGTAT CTCTTTGAG GCCAGCTGA CCTTCAATC CCGTCTGCG TCGACCAACA CCGAGAGCTT
7601 TGGTCTGCC CCCGGGGTG GCTTTTGTG AGAACAAG AAATGGGAAG AGACAAATC AAACACAGT AGTCAATCAG TTTTGTCTG GATGAAATC AGGATGCGAG
7701 AAGTGGTGC ATGAGTGA AAAACAAG AAATGGGAAG AAAGGGGTTG AGGGGGGTTG ATACGACT ATACGACT CGGTTGGTAA CCATCCATC AGCTTTCTGA
7801 AGAAAGCAA TCCCTGTGAA AAAAAAGAA AAATCTGTC GATCCGCTT TTTCTGTTCC CTTCTGTGTC AGATCTGTTT TCGAGCCCG CCTCCGGAG
7901 AGAAATCTT TGATCTGGAC GACCGGTGG AAATCTGTC GATCCGCTT TTTCTGTTCC CTTCTGTGTC AGATCTGTTT TCGAGCCCG CCTCCGGAG
8001 GTTACTGTT TGATCTGGAC GACCGGTGG AAATCTGTC GATCCGCTT TTTCTGTTCC CTTCTGTGTC AGATCTGTTT TCGAGCCCG CCTCCGGAG
8101 GFTGAGACT TCTTGTGTC GTCCAGATC TTGCAGAGCG GGTGGCGCA CAGGGGACG CCGTCTGCT TTTCTGTTCC CTTCTGTGTC CCGTCCGGAG
8201 CFTGGAGCTT TCTTGTGTC GTCCAGATC TTGCAGAGCG GGTGGCGCA CAGGGGACG CCGTCTGCT TTTCTGTTCC CTTCTGTGTC CCGTCCGGAG
8301 CFTGGAGCTT TCTTGTGTC GTCCAGATC TTGCAGAGCG GGTGGCGCA CAGGGGACG CCGTCTGCT TTTCTGTTCC CTTCTGTGTC CCGTCCGGAG
8401 CFTGGAGCTT TCTTGTGTC GTCCAGATC TTGCAGAGCG GGTGGCGCA CAGGGGACG CCGTCTGCT TTTCTGTTCC CTTCTGTGTC CCGTCCGGAG
8501 GAAACCGGTG TGGTGTGTC ACTTGGCAG TCCGATCGG ACTTGGCA GGAAGCTTAG GGAAGGAAA AAGAAGAAA GGAAGGAAA GGTTCAGACT
8601 TCAATAAGT TCAATGCTCAC AACACGGAA CATCAAAAAC ACCAGAGAAA AGGAAAACCC CAAGAAGG CCGACTCAC TTTCCGACT GCTTTCACT

8701 CTTCCGGAGC AGTCACATCCA CTGGCCTCCA CAGCTCTGca ta^gTCCTACA GAGTACTTTT CCTGATCAGG CGTGATAAAC GTCACACACG TTCCCTTGT
8801 TCCTGCCCGT CCGCTTCGAC CCGCTCGATG AACATAGTCC TCCATGTGAT TCCGGACATC ATAGTTCATG ACCAACACCA ATTGCTTGAT ATCTAATCCT
8901 CTGGCAGGA CAGACGTGGC GATCAGATG GGGATCACAC CAGATTTGAA GCGGTGATC GTCTGGTCC Tgt^{gac}TTG Tt^{gac}TTCCA CCGTGAAGAG
9001 AGTTTCGCCG TCGGTACCGT CGTTGATGAA GCTCGAGTAA CAGATATCC GCGGTATCTT GTCGTTCCAC AAAGATCAAC GTTCGCTGG TGTCCAGGTC
9101 TTCTTCAGTC TGATAGGTTT CACCCAAATG CTCAAGCAAC CGATGGAAC TTGTGTCCTC CGTTCGAACT TCGACAACCT GAGTATCTC TTTGGCGACA
9201 ACCGACCAC CCGCCACTGT CACTCAAGA GCTTCAGTAA GATCTTTCCG CGCCAGCCCG TCCATCTGTT TGGGAAACGT CGCAGAGAAC AAGACGACTT
9301 ATGAAAGCGT CTCTGATPAA ACAACAATT GAAATGTTCA ATAGAAACAT GCTTATTTAG GCTTATTTAG ATFACGTTTC TTTTTCTCC TCACAGGTTG
9401 GFACGCTACT CGTTTTAGGT TTGTRACTCT TCCAGAGTTG GCGTTTAA GAATGTTTCA ATGACGTTTC TCGACTCAT CCAGCTCAT CCAGCACCAT
9501 AACCTCGCGA TTTGCTCCGA GATCGGAGC CCTCCGTATG CGCATGTC CGCTTACCA TCGACCAGGG GTGCAGACCA CGATCTCCG TCCCTTTTTC
9601 CAGATAGAC GAGAGATPAA AAACGTACAG TAATACCCAA GACTTTTCCA ACCTCCTAAC ACTCCCTAAC GATCTCCAAA GCTAATCTC TGGTCCGAGT
9701 CATATGACC GCCATGGTTC CTTCCTCAGA TTTCAAGAGG CTCTGATCTT TCGATGTGCT CAAAAGAGG AATGTCAAA CAATGGTAA CAAGACAAA AAGTTGAAT
9801 GTCTTGGGA CTCCGATTAC ATCTCGACCA GACATATGG ATGGGATGG TTGGCCTTGA ATFAGCAGTC GAGAGTATA GCCTAGTCGT TTGATGACTT
9901 CCAAACTAAA GGCCACAGGA AAAAGAGTC TACAGAGAGA GTTGTTAATC GCTTCGAC TA GACCTACTA TGACCCTACG AGACAACACA GTTACGACCA
10001 AGRAAAAGAG GATACGAAC ATCTCCGGG TAGACCAGG ATTCCTCCATC GCTTCGAC TTCTGGAC TCCCGAATG TCCACTCTC TGATCTTGAT ACCATCCATC
10101 TCAGACCTCA TCAGGTCCG CTTCTCTCCG GTCATTTCCG ATATTTCCAT TGGAGCGGTG TAGAATGCTT TCCCGAATGG CTAATACGTC ATTTTTTTGAT
10201 GGTCCGACTGT TGGTAGATCT TTACGTCAT TTCCGTTAGC TCCAGTCCG CATCTCCTC CATCTGACC TAGTTCGCTT ACGCCATGAT ATGATTCAGT GAACAGAAAG
10301 GAAAGAGTGA AACATGCAAA ACATAGTAA CGAATGCTAG GAGAAAGCTC AGATGACTT AGATGACTT ACGCCATGAT ATCTTCGGCT GTGAGAGGA GATCTCCCTC
10401 TTTAGGCTTT TGCTCTTCTT ACCTCTTACC TATCCGAGC AGACTCGAA TCGATGTCCA TCGTTCCTG TCCCGAAGGAT CCTCTCCCTC CCTTTCACT
10501 AGATGTGCC GAGATACTT CCTCTCCCC ACCTTTGACA CTGGGACTG GCTGGTAGTC CAGTTCTCCG TCGTCACTCT CCACATGAC ATATGTCCTG
10601 CTGAACCTTC GCAAGTTCG TTGGTTGAG TTGATCTCC TAGCGGATG CAGGCGGTC AAGCGAAG CGATTCAGT CAATCCAGT CACTCTCCCTG TCCCTCCGCT
10701 GGCAGACGAC GAGAAGGAGA ACCGACTCT CTCTGTTGTT GCCTTCTTGA GGGGAGAC CATACTGTTA GACTGAGTT GACTGAGTT GAGGAGATA CTTGGCAGAA
10801 CCAAGGCCG GGGAGCTCC CCGTTTGA GCAGGGATG CACTGGACAG ACCTTGTGTT GCTTCGCTT AAGCGAAG CGATTCAGT CAATCCAGT GAGGAGATA CTTGGCAGAA
10901 TTTCTTCTTC TGCTGTAAG TTGGGAGCAG CTGTTGTCCG AGCCGAACA GAGCCCAAAA CCGGGTTGG AACAGAGGTT GCTTCGAGT CTTCTTCTG GTRAAATGAG
11001 GGAAGCAGGT ATCGATGCCA CCGAAGGAAG ACGCTCGAG GTGCAATAT CCGAAGAAGA CTTAGGAGAT TGGTCGGTTG GAACCTGCTT CGTTTCTGAT
11101 GTGACCGGTT TGGGTTATGC AGATGAGGAG GACGAAGAT AGAAGGATA GGAATGATA TCTCTGCTCC GTTCTCTATC CTAATCTCTC CTCCATCCG
11201 TCGGAGTAG TCCCCTTCCG GTTCCGGTTC ACGTTTCCG TCGTAGTCTC CACTCAGACT GGACTGCT CATCAGACT GAGCTGCT CGATGATGAG AATACTCGTC
11301 CAGACAAAAT GACCTACAG CTGTCCGCTT GATCTCGAG AGACTGGAG AGCTTCTGA GAGTTCCTA GAGTTCCTA GAGCTGCTT GACCGGTTG GAAGATGAGG
11401 CTTGGAGCG AGAGCGGCC ATGACTGTGA CCGTCCGGAT TCGTATCTAT GAGTTCCTGA ACGTAGGCT GACCGGTTG ATACAAGATG GAAGATGAGG
11501 AAACCTCGGT CGATPAGAT GGTCAAAAG CAAAAGTCT AAGGTTTTAA TTTTCGCTGT TCTTCTCAA CACCATCAT CAACCATCT GGTCCGAGG
11601 GCGCTTGT CCGACAGAC CCGACATGG AACGATCCA GATCACTCG ACAAGATTGA AGTATCTGT TCTCTGTTT TCTCTGTTG TCTCTGCTG
11701 GTGTTTACT CAACATGGC TGAATGATCT CTCCTTGTCC ACCTATCTAT GTTGAATGTC TCTCTGTC CTCTGAGCTT TGTCTTACC CATCCGTTCA CCGCACCTG
11801 CCGCCGCTC GGGGAGCAC AACCTAAGA TCACGTTCAA CCGCTGTC AGGCTCAATG TCCGCTGTT TCGAAGCTT TCGAAGCTT CCGTACTTTC TGCCTGCTG
11901 CGATGCAATG ACTCTCAAAG CTCACTAGC AGBRACTGA CCGCTCAAT AAGCGGCCA GCCTCTGTT TCGAAGCTT CCGTACTTTC CCGTACTTTC TGCCTGCTG
12001 GGAACATCTG CTTTGGCATC CTCTCCGCG AGGCTCAATG GAGTCCCAA ACGCTTCC TACAGCTCTC TCCAGCTCTT TCGAAGCTT CCGTACTTTC TGCCTGCTG
12101 CGAACGGAT CTCCGCCAGT TTTGACTCGA CTGTGAAATC AGRAACACA GATGTCTGA CCGACTTCC CCGACTCTC TCCAGAAAC AAAACCCAAAG
12201 CAGATGTGA TCCGCTCAT TGAATTTGTT CGTCCCGC CATCTGAGT CCAAGCCGC CAACTGATG ATGCCAGTT CTGGGAAGG AGAGGTTG AAGTTCTG TCAAGAAATCC
12301 CGAAATCCTC TACTCAATCA CCGGTCGGT CCTCGTCAAT TGAATGAGA TCGTTGCTCT GCCAATTTCT TGAATTTCT TCGAAGCTT CCGTACTTTC AATTTCTCT
13101 GCTCAAGCGC AGGCAGATC TCTCTCAC TCAGATCTCAT CAGAGATATC TTTGATGAGT TCCCTGAGGT GATGAAAGCT CACAAGGAG ACCTGCCAAA

13201 GGTGTGTGCA GTTTTCCCTTC GTACTCGCCA AAGAAACGGG GGTATTGACA GAATGTTGAT GTCGAAATCA ATGTTTCAAT TTCTTAGAAA GTCAACGAGA
13301 CACAGTTCCTG GTCGAGATAC TTCAATVCCA GACTCTGGGA AAGACACAGA GCGTCCGTTTC GAAGTCTCAA ACAAGGCACT GCTTAAACCGG ACGCGATGTT
13401 TGATAAATAT CTCGAAGATC CTGATGATGG TTCTGCTTTGC CTACTTGATTT GGGTTGATTT ACATPACATG ACCTCGGAAA CAACACATGG GTCATATCAT
13501 GATATCACTC CTGACACAGT ACCTCGAGCT GTCAAGAACC GCTTTCTCGA TCTAGCAGCC ACAGAAGAAG GTTGATTTACT TTCCCTTCTTG
13601 TGTCTTTTTC TTCTTTTTC CCCCAGACC TTGATGTTG AGTTCATATG TCAATCTTTC CGGACTTCTC CAATPACATG AGGAAATGCT AGAGACATCA
13701 CAATGCAGGC AGGAAACAA CGAAGCTCCC TGCCCTTAT GAGGAGTAT AATGAGCACT AATGAGCACT CCGAGAAACT CTTGAAGCGG ATCGATAATG GGTGAGTCT
13801 TTCTGTTTAA TCGGGGTTTG CTCAATATTT GTTGAATCAG ATCTAATTTG AGACTGCACA CATCATGCTT CCGTCAATGCT TCTTCCGATG GCTGACGGT
13901 ACGGTAATCT CTATACAGAA TCAACGATGG AATCAAAATCA GAAGAACCCTT CTGCTAAGCG CATPACACT CAACAAGCTA ACGTCAATTA ACAAAGACAAG
14001 GTTAGCCAAC CATTCATGTC TATCACTCGT TTCCGTCGT CATPACACGC GAGAAAGCAA CAACAAGACT GATCGTCTGA TCTTTCTGAA ATCATCTTGT
14101 ACTTGTACGT GATCTGTGA TCGCTCAGGA TCGATATGCC GAACCTGACC TGGACGATCT TCACACGAACT ACACCCTCTA CTGAGATACA TCTCGATCTG
14201 GCGATGCAGG ATCGGAGAA ATACTTTGAG GCGCATCGA CTGGAGTGGT CCGAGAGGAT GGTACCCTAG ATGGCAAAGC CTTTAGAGG GAGGAGTTC
14301 GTTCCACTA CTTCGGCTA GTGCTGTCA CTCAATGACG AATTTGGTGA CCCGTTTTAC CTTCTTCTCGA TAAACAACAGG AGGTATCGGA
14401 TATCATGAAC GCAATGCGAA GTCCGTTTTC GATCATCTG TAGATGCGC TTGAAAAGAA AGCGGCGGAG GAACTCATGT TGGGCTTGCAC GTCAAGTGA
14501 GTTGTCCCTC GGCTCTGACA AATTTATCTT GATCAGTCTC TACTCAGCAT ACGATCCACA GTTTCTTCTGTT CCTCTTACTT TATATAGATC CCTGTACTAA
14601 CGAGCTCGAG TCGAGTCCA ATCCAAAAG AGTCAGTCTC TACTCAGCAT TACTCAGCAT ACGATCCACA GTTTCTTCTGTT CCTCTTACTT TATATAGATC CCTGTACTAA
14701 CATCCACAG ACTTGGTTTC AAAGACGAT ATCCCTCCTA TACTCCTCAA GAAAACGACG ACTTTTCTAAT CAACAATCAA CGAGTTTCTT CTTCTAGTCT
14801 GGCAGGCCAT TCTCCCTCCC CCACCTTCTT TCCCTTACTT TGCCAACTCC TCAGTCTCTG GACAAGGGA AAGTGTCTGTT CCGCGGTGGA AGAATAGGTT CAACCAAGAC
14901 TCCAGCAGAG AAACAAGCCA AAGTCAATAA GATGATCAA TGGTTGGGG AGTTGAGG ACCGATTCAG GCTTTGGTCA TCGAAGCAGG AGAGGAGGT
15001 ACAAAGTCC GATTTGGTATG TAAATTCGTA TCGTCTGTA TTTTACCGAT CTGTTCCCGTT CTTAAAGGTT GTGATTTACT CAGTTGTTTC CCGCCATATA TTTCCAGGT
15101 CTTACTCCGA CTGTGGAATC GGTTCGAAA GCTCTTCTGTT TTTTACCGAT TTTTACCGAT GAGAAAAGAA TAGAACCTT TCAGAGCAAA ACTCTCCAGC GCATCGTTCCG
15201 ATGTCTTGTAT CTCTGCTACG TTTCTTTTGGT CAATCGTCAA ACCTCTTTTAC ATATATTTT CGTGTATCAC TGTATTTCTA TCTCGATTTTC TTCCAGATAC
15301 TATTTCTGTT TGTTCGCAAT CAAGCATGT AGAGATTAC CAAGTATTA CAACAAGGGA AATTCATGTG TGTCAATGTC GTCCGGCACCA GCTAAAGGTT
15401 TCGTTTCTGGA AAAGCCAAG GTTTTCAATCT GTCCATTTCTG AAGTTTGTGT CTGTAGCCCTT CCGGGGGGCT Tggatcc

Anexo 2. Secuencia completa del cDNA del gen *cr1R*.

1 TCCCTTTATC TCCTCACTCA GGTCACTCAG GACCTCTGTAC AGTCAGCAGA ACCCTCCTTC AGTATCCAAT TAAAATGGCC acactctccg atcttgtcat
 101 cctctctc ggtgctctc tcgctcttg atctataac aagatcgac tglgtggatc ctctctctc tcggctcca ccactcag cctctggca
 201 gccaccgca atggatccaa gccacatat tctaacggga acgcaacgc cttaaagc gatccagag atttltcgc gcaatgaag gatcagAAA
 301 AACGATTGC CGTCTTAC CGGTCCTGAC CGGTCCTGAC CGGTCCTGAC CGGTCCTGAC CGGTCCTGAC CGGTCCTGAC CGGTCCTGAC CGGTCCTGAC
 401 CGTGTGCGC ATCGAAGAGT ATGACTTTGA AAGCTCGAC CAGTCTGAC CAGTCTGAC CAGTCTGAC CAGTCTGAC CAGTCTGAC CAGTCTGAC
 501 ACCGACAACG CCGTCCAGT TATCGAGATG ATCAGCCAG ATGATCCAGA GFTTTCAGAA GGTCTACTC TCGATGGCT CAAGTATGTT GTGTTGGCC
 601 TGGGAAACA GACCTACGAG CAGTACAACG TCCTCGGTAG ACAGCTGAC GCCCGCTGA CGCCCTGGG TGCCACCCGA GTCCGCGAAC GGGGTGAAGG
 701 AGACGATGAC AAGTCAATGG AAGAAGACTA CCTCGCTGG AAGACGACA TGFTTCGCGC CGCCCTGGG CCGCCCTGGT TCGAGGAGG CGCTTCGGG
 801 GAGACCCCTG ACTTTGTGTT AACCGAGGTT CTRAACCCACC CGATCGAGAA AGTCTTCCAG GCGGAGCTCT CCTCCAGAG AGCAAAATG
 901 TGCAATGACG GAAGAACCCTG TACGCTCCC CGGTACTTGC CTGAGAGAA CTCTTACC GCGGCGACG AAAGTCAAT CATCTGAGT TCGACATCAC
 1001 CGTCTCCGGA ATCACTTACC AGACCGCGA TCACGTGCA GTCTGGCTT CCAACCTGTA TGTCGAGGTC GAGCGCTGT TGCCGTCTCT CGGTCTCAT
 1101 TCTCCAGAG AACCGGCGAT GATATCCAG GTTGTCTGCG TCATCCGAC GFTGGCCAAAG GTGCCCTTCC CGACCCGAC CACGTCAGC GCCGTTTCA
 1201 GACACTACT CGACATATCT GCGGTGCGT CAAGCGAGC ACTCGGGTG GGCATCTTC GACTAGCGA GFTTCTCCAG TTGGCCGCTG GAAACGAT CACTCGACT
 1301 CGGAACAGC AAGCAGGCTT ACCACACCGA GGTCTGCGG ACCACGCTT ACCACGCTT CCAAGCTGAC GACTAGCGA GFTTCTCCAG TTGGCCGCTG GAAACGAT CACTCGACT
 1401 CCACAGCGG AGAACACCAC GGTGTGGAAT ATTCGTTG ACCACGCTT ACCACGCTT CCAAGCTGAC GACTAGCGA GFTTCTCCAG TTGGCCGCTG GAAACGAT CACTCGACT
 1501 CGAAACTCA CCCAACTCC ATCCAGTTA CCGCCGTCT CCAAGCTGAC GACTAGCGA GFTTCTCCAG TTGGCCGCTG GAAACGAT CACTCGACT
 1601 CACAACTAC CTGTTGAACG TCAAGCAGG CCGCAACAAC GAGACACC CCAAGCTGAC GACTAGCGA GFTTCTCCAG TTGGCCGCTG GAAACGAT CACTCGACT
 1701 AAGTATAC TCGAAGTCC GAGAGTCC TACAAGCAG CCGCAACAAC GAGACACC CCAAGCTGAC GACTAGCGA GFTTCTCCAG TTGGCCGCTG GAAACGAT CACTCGACT
 1801 CGCCAAAGT CCGGTCTATC ATGATCGGT CCGGTACCAG AGTCCCGCCT TCCAGAGGAT TCCAGAGGAT TCCAGAGGAT TCCAGAGGAT TCCAGAGGAT TCCAGAGGAT
 1901 TAGAACGGG CCAGATGGC TCGCCGATG GGCACCGAT TATCTGTTCT ATCTGTTCT ACCTGCTCCG AGACGAGAA GATTTCTCT ACCTGCTCCG ATGCTCCAGG
 2001 TACGAGGGG AGCTCCAAG AAAATTCAG ATCCAGTCC CTTTCTCTG ATCTGTTCT ACCTGCTCCG AGACGAGAA GATTTCTCT ACCTGCTCCG ATGCTCCAGG
 2101 TGTGGGACA AAAAGAGTG ATCAAGAGG CAGTCTGCA GAAACGAGG AGCGTGTATA TTTGTGTGTA TGGGCAAA ATGTCAAGG ATGTGGAACA
 2201 AAAGTTGGT GCATGTTGG CCGAGTCAA GAACGGTCC GACGGGTCG GACGGGTCG AAGGAGCGC TGAAGTCAA TCGCTCAAAG AACGATCTAG ATTTGTGATG
 2301 **GACTCTGGT** CGTAGACTTT TCGCCTTTTA TCCCTTGATG TCCCTGATG TCCGATCGAA TAGCAACAAC ACAACGACAT ATACACGAG CGTCTCCTTT CTTGCCCCC
 2401 TCCCCCTTC TCTTCTGTTT CTTTCTCTCT CTAGATGTT TCCGATCGAA TAGCAACAAC ACAACGACAT ATACACGAG CGTCTCCTTT CTTGCCCCC
 2501 CGTCAACCTAT AGAGTCTCTA TACCCTCTTG TCACCTCTCT CGTTTATTCT CTTCAACTTTT GCAACTCTCT TTCTCTGCT TTTTTCGGAG
 2601 ACTCAATCGA TCGAACCTTG TTTCTCCAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA