

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**DESARROLLO DE UN CASETE DE RESISTENCIA A  
ANTIBIÓTICO EN *Xanthophyllomyces dendrorhous***

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



por

**MAURICIO ALEJANDRO NIKLITSCHK OYARZÚN**

2007

Santiago, Chile.

Director Seminario de Título: Dr. Víctor Cifuentes G.

UCH-FC  
Biotecnología  
V692  
c.1

ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE



## **“DESARROLLO DE UN CASETE DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICO EN *Xanthophyllomyces dendrorhous*”**

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

### **MAURICIO ALEJANDRO NIKLITSCHKE OYARZÚN**

*Dr. Víctor Cifuentes Guzmán*  
**Director Seminario de Título**

Handwritten signature of Víctor Cifuentes Guzmán over a horizontal line.



### **Comisión de Evaluación Seminario de Título**

*Dr. Carlos Jerez Guevara*  
**Presidente Comisión**

Handwritten signature of Carlos Jerez Guevara over a horizontal line.

*Dr. Nicolás Guiliani*  
**Corrector**

Handwritten signature of Nicolás Guiliani over a horizontal line.

Santiago de Chile, Noviembre de 2007



Puertomontino de nacimiento, toda mi vida académica la realicé alejado de mis padres. Vivir en el campo, a 28 Km de Puerto Varas, hizo que desde muy pequeño haya tenido que estar en pensión, obligándome a ser independiente, responsable y perseverante frente a los problemas y dificultades. Estos valores me han ayudado a lograr los desafíos que me he planteado, siendo uno de ellos ser Ingeniero en Biotecnología Molecular.

*"Los problemas son un desafío, no una dificultad"*

***A mi familia, que esto es nuestro.***

## AGRADECIMIENTOS

Ya finalizado mi trabajo, me doy tiempo para mirar atrás y observar el camino que he recorrido para lograrlo. Allí aparecen las penas y alegrías, los éxitos y fracasos, las cosas buenas y malas que he hecho y lo más importante, las personas que han estado conmigo para apoyarme y acompañarme en cada uno de estos momentos.

Primero que todo, agradezco a mi mamá María Antonieta y a mi papá Ubald por su esfuerzo, comprensión y apoyo. Sé que no fue fácil entender mi decisión de venirme desde Puerto Varas a Santiago a estudiar Biotecnología, pero siempre su apoyo y ayuda fue incondicional. También agradezco a mis hermanos Karinne y Oscar, y a mis sobrinos Joseph y Camila por su cariño y apoyo a la distancia. Gracias a toda mi familia, en especial a mi tía Eva, por haberme dado más que un lugar donde vivir, un hogar fuera de mi casa.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio Salvador, Patricio, Rafael, Carla, Jenny, Dony, Marisela, Aniela, Andrés, Mario y Oriana por su amistad, apoyo y colaboración tanto dentro como fuera del laboratorio. Gracias a Marcelo por el tiempo invertido en la discusión de los experimentos y resultados.

Agradezco de manera especial al profe Víctor por su apoyo incondicional, por sus consejos y tirones de oreja, y por su preocupación y guía más allá del laboratorio.

Gracias a toda mi familia, amigos y profesores por ayudarme a ser un mejor profesional y una mejor persona.

Gracias a los proyectos FONDECYT N° 1040450 y MECESUP UCH-0106 por el financiamiento para desarrollar este trabajo.



Gracias.

## ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE TABLAS .....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	v
RESUMEN .....	vii
ABSTRACT .....	viii
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
1.1. Carotenoides. ....	10
1.2. Antecedentes. ....	11
1.3. <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> . ....	11
1.4. Utilización de <i>X. dendrorhous</i> como fuente de astaxantina. ....	12
1.5. Problema a abordar. ....	13
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
2.1. Cepas y plasmidios. ....	19
2.2. Cultivo de microorganismos. ....	19
2.2.1. Cultivo de <i>E. coli</i> . ....	19
2.2.2. Cultivo de <i>X. dendrorhous</i> . ....	19
2.3. Técnicas de biología molecular. ....	19
2.3.1. Extracción de DNA genómico de <i>X. dendrorhous</i> . ....	19
2.3.2. Extracción de DNA plasmidial. ....	21
2.3.3. Electroforesis de DNA. ....	21
2.3.4. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa. ....	22
2.3.5. Digestiones de DNA con enzimas de restricción. ....	22
2.3.6. Ligaciones de DNA. ....	22
2.3.7. Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> . ....	22
2.3.8. Electrotransformación de <i>E. coli</i> . ....	23
2.3.9. Preparación de células electrocompetentes de <i>X. dendrorhous</i> . ....	23
2.3.10. Electrotransformación de <i>X. dendrorhous</i> . ....	24
2.3.11. Amplificación por PCR. ....	24
2.3.11.1. Diseño de partidores. ....	24
2.3.11.2. Amplificación de DNA. ....	24
2.3.12. Elongación de fragmentos. ....	27



2.4.	Extracción y análisis de pigmentos. ....	27
2.4.1.	Extracción de carotenoides. ....	27
2.4.2.	Análisis cualitativo y cuantitativo de los pigmentos por HPLC. ....	28
2.5.	Análisis de secuencias. ....	28
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
3.1.	Elección y clonamiento de la región promotora de la transcripción. ....	31
3.1.1.	Clonamiento del promotor <i>TEF-1<math>\alpha</math></i> . ....	32
3.1.1.1.	Diseño de partidores específicos. ....	32
3.1.1.2.	Búsqueda del gen <i>TEF-1<math>\alpha</math></i> . ....	35
3.1.2.	Análisis de secuencias. ....	38
3.2.	Elección y clonamiento de la región terminadora de la transcripción. ....	41
3.2.1.	Elección de la región terminadora. ....	41
3.2.2.	Clonamiento del terminador del gen <i>GPD</i> . ....	41
3.3.	Elección y clonamiento del gen marcador de selección. ....	42
3.3.1.	Elección del marcador de selección. ....	42
3.4.	Construcción del casete de resistencia a higromicina B. ....	43
3.5.	Utilización del casete de resistencia en <i>X. dendrorhous</i> . ....	47
3.5.1.	Inserción en el locus <i>crtI</i> . ....	48
3.5.2.	Transformación de <i>X. dendrorhous</i> . ....	50
3.5.2.1.	Preparación del DNA transformante. ....	50
3.5.2.2.	Electrotransformación de <i>X. dendrorhous</i> . ....	50
3.5.3.	Análisis de transformantes. ....	51
3.5.4.	Análisis de pigmentos. ....	51
<b>4.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>55</b>
4.1.	Elección del promotor del gen <i>TEF-1<math>\alpha</math></i> . ....	56
4.2.	Análisis de las secuencias. ....	57
4.2.1.	Análisis de la región codificante del gen <i>TEF-1<math>\alpha</math></i> . ....	57
4.2.2.	Análisis del promotor del gen <i>TEF-1<math>\alpha</math></i> . ....	63
4.3.	Resistencia a higromicina B. ....	64
4.4.	Transformación de <i>X. dendrorhous</i> . ....	64
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>66</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>68</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas y plasmidios utilizados en este trabajo.....	20
Tabla 2. Partidores utilizados en este trabajo.....	25
Tabla 3. Sensibilidad de la cepa silvestre a higromicina B.....	45



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales pigmentos producidos por la levadura <i>X. dendrorhous</i> .....	14
Figura 2. Alineamiento múltiple de secuencias de la región codificante del gen <i>TEF-1α</i> . .....	34
Figura 3. Chequeo de los partidores para el gen <i>TEF-1α</i> . .....	36
Figura 4. Búsqueda del gen <i>TEF-1α</i> en la genoteca de DNA genómico de <i>X. dendrorhous</i> en <i>E. coli</i> .....	37
Figura 5. Comparación de la secuencia obtenida de los clones pBR60 y TEF2-2 con la base de datos.....	39
Figura 6. Análisis de la región de 3,5 kb que contiene al gen <i>TEF-1α</i> .....	40
Figura 7. Determinación de la sensibilidad de <i>X. dendrorhous</i> a higromicina B. ....	44
Figura 8. Construcción del casete de resistencia a higromicina B de <i>X. dendrorhous</i> . 46	
Figura 9. Inserción del casete de resistencia a higromicina B de <i>X. dendrorhous</i> en el locus <i>crf1</i> .....	49
Figura 10. Transformación de dos cepas de <i>X. dendrorhous</i> con el plasmidio pIH que contiene el casete de resistencia a higromicina B.....	52
Figura 11. Cromatograma a 450 nm de pigmentos separados por HPLC.....	54
Figura 12. Árbol filogenético obtenido a partir de la comparación de las secuencias de los genes <i>TEF-1α</i> de diferentes hongos. ....	58
Figura 13. Comparación entre las secuencias del DNA genómico del gen <i>TEF-1α</i> de <i>X. dendrorhous</i> y del cDNA de <i>C. neoformans</i> .....	61
Figura 14. Análisis del cDNA del gen <i>TEF-1α</i> .....	62





## ABREVIATURAS

A	absorbancia
aá.	aminoácidos
Amp	ampicilina
D.O.	densidad óptica
Da	Dalton
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
gDNA	DNA genómico
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
Hyg	higromicina
IPP	isopentenil pirofosfato
Kan	kanamicina
kb	kilobases
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
ppm	partes por millón ( $\mu\text{g/g}$ )
rpm	revoluciones por minuto
TAE	amortiguador Tris-acetato-EDTA
TE	amortiguador Tris-EDTA
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
UV	ultra violeta
pl	punto isoeléctrico
x-gal	5-bromo-4-cloro-3-indóilo- $\beta$ -D-galactopiranosido
YM	Medio de cultivo extracto levadura-malta



## RESUMEN

La biotecnología, en un sentido amplio se puede definir como la aplicación de organismos, componentes o sistemas biológicos para la obtención de bienes y servicios. En este sentido, ya en el año 1976 se describió una levadura con un alto potencial biotecnológico dada su extraordinaria capacidad de producir naturalmente el carotenoide astaxantina, la que se denominó *Phaffia rhodozyma* (posteriormente renombrada *Xanthophyllomyces dendrorhous*). La levadura *X. dendrorhous* es una de las fuentes naturales más importantes de astaxantina, siendo ésta utilizada en acuicultura como colorante para salmones y truchas. Sin embargo, los bajos niveles de astaxantina (300 ppm) de la cepa silvestre, hacen inviable su producción a nivel industrial. Los esfuerzos por aumentar la producción de astaxantina de esta levadura, tienen dificultades principalmente por la carencia de marcadores moleculares para la manipulación genética de *X. dendrorhous*.

En el presente trabajo se diseñó una herramienta molecular que permite la selección positiva de transformantes, facilitando el estudio del sistema carotenogénico de *X. dendrorhous*. Para ello, el gen *hph* (higromicina B fosfotransferasa) de *E. coli* se puso bajo el control del promotor del gen *TEF-1 $\alpha$*  y el terminador transcripcional del gen *GPD* de *X. dendrorhous* mediante clonamiento por PCR. Este casete fue clonado en el sitio *EcoRV* del plasmidio pL22, reemplazando el gen *crtI* (fitoeno desaturasa) de *X. dendrorhous*. Se transformó esta levadura por integración y reemplazo del gen *crtI*, obteniéndose colonias transformantes resistentes a higromicina B. El análisis por HPLC de los pigmentos de las cepas obtenidas, muestra que la biosíntesis de astaxantina en *X. dendrorhous* es dependiente de la dosis de los genes que participan en ella, evidenciando la condición diploide de ésta levadura.

## ABSTRACT

Biotechnology is defined in general terms as the application of organisms, biological components or systems to produce goods and services. In this sense, by 1976 a yeast with a high biotechnological potential had already been described, given its extraordinary capacity to naturally produce the carotenoid astaxanthin. It was denominated *Phaffia rhodozyma* and later renamed *Xanthophyllomyces dendrorhous*. The yeast *X. dendrorhous* is one of the most important natural sources of astaxanthin, which is used in aquaculture as a colorant for salmons and trouts. Nevertheless, the low levels of astaxanthin (300 ppm) produced by the wild-type strain make its industrial production non-viable. Efforts to increase the production of astaxanthin have been difficult mainly by the lack of molecular markers for the genetic manipulation of *X. dendrorhous*. In the present work, a molecular tool was designed which allows the positive selection of transformants, facilitating the study of the carotenoid system of *X. dendrorhous*.

For this purpose, the gene *hph* (hygromycin B phosphotransferase) from *E. coli* was inserted under the control of the promoter of the gene *TEF-1 $\alpha$*  and flanked by the transcriptional terminator of the gene *GPD* of *X. dendrorhous* by PCR cloning. This cassette was cloned into the *EcoRV* site of the plasmid pL22, to replace the gene *crtI* (phytoene desaturase) of *X. dendrorhous*. This yeast was transformed by integration and replacement of the gene *crtI*, obtaining transformant colonies resistant to hygromycin B. The HPLC analysis of the pigments obtained of these strains indicates that the biosynthesis of astaxanthin in *X. dendrorhous* is dependent on the dose of genes participating, thus demonstrating the diploid condition of this yeast.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### 1.1. Carotenoides.

Los carotenoides constituyen el grupo más amplio de pigmentos que se encuentran en la naturaleza. Se han descrito más de 600 estructuras químicas diferentes (Takaichi y cols., 1996) que poseen intensos colores amarillo, naranja y rojo por su capacidad de absorber la luz entre los 400 y 500 nm. En la naturaleza, son sintetizados por bacterias fotosintéticas y no fotosintéticas, algas, plantas y hongos (Karnaukhov, 1990; Armstrong, 1994).

Todos los carotenoides derivan de la ruta de biosíntesis de los isoprenoides, que son compuestos sintetizados a partir de un precursor común de 5 átomos de carbono denominado isopentenil pirofosfato (IPP) (Hirschberg, 1998). Por su estructura química, se han clasificado en dos grupos: los carotenos, que no presentan átomos de oxígeno en su estructura y las xantófilas, que si poseen átomos de oxígeno.

Debido a las características químicas de los carotenoides, se le han encontrado numerosas aplicaciones y usos. Éstos, son utilizados como colorantes y suplementos alimenticios en animales, especialmente salmónidos y crustáceos (Johnson, 1977; Johnson y Lewis, 1979; Schroeder y Johnson, 1993). Además, existen evidencias de que estos compuestos cumplen un papel importante en la prevención de enfermedades cardiovasculares y el cáncer, catalogándose como productos nutracéuticos (Canfield y cols., 1992; Edge y Truscott, 1999; Schmidt-Dannert, 2000).

La astaxantina (3, 3'-dihidroxi- $\beta$ ,  $\beta$  caroteno-4, 4'-diona) posee muchas de las propiedades de los carotenoides anteriormente mencionadas. Es sintetizada por bacterias marinas como *Agrobacterium aurantiacum*, *Pseudomonas sp.* y *Flavobacterium sp.* (Liaaen-Jensen, 1998), el alga *Haematococcus pluvialis* (Lorenz y

Cysewski, 2000) y la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Andrewe y cols., 1976).

### **1.2. Antecedentes.**

A fines del siglo XIX, se describió que el color rojo de los exudados de heridas de árboles, especialmente del género *Betula ssp.*, era otorgado por la presencia de una levadura pigmentada denominada *Rhodomycetes dendrorhous*. Medio siglo después, Herman Phaff aisló levaduras de color rojo desde los exudados de árboles heridos en regiones montañosas de Japón y Alaska, corroborando tales observaciones. Así, en 1976, a la levadura dominante en estos exudados se le asignó el nombre de *Phaffia rhodozyma*.

Inicialmente, *P. rhodozyma* fue clasificada como una levadura imperfecta, por desconocerse la fase sexual de su ciclo reproductivo, a pesar de las características observadas mediante estudios fisiológicos y análisis moleculares que sugerían un origen basidiomicete (Miller y cols., 1976; Yamada y Kawasaki, 1989). No obstante, en 1995 se describió su fase perfecta al observarse que después de la conjugación del núcleo de la célula madre con el de la célula hija (pedogamia) se desarrollaba un holobasidio que presentaba entre 4 y 6 basidiosporas terminales. Además, debido a que este ciclo de vida era desconocido en levaduras basidiomicetes, se propuso un nuevo género y especie, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, para el estado perfecto de *Phaffia rhodozyma* (Golubev, 1995).

### **1.3. *Xanthophyllomyces dendrorhous*.**

La levadura *X. dendrorhous* (ex. *Phaffia rhodozyma*) tiene como principal característica la capacidad de sintetizar carotenoides, entre los cuales se encuentran el

fitoeno, el licopeno, el  $\beta$ -caroteno y la astaxantina. La astaxantina es su principal carotenoide, el cual constituye entre el 83 - 87% del contenido total de pigmentos de la célula, generando un alto interés biotecnológico para su utilización en la industria acuícola como agente pigmentante (Miller y cols., 1976; Lorenz y Cysewski, 2000). Se ha descrito que debido a que *X. dendrorhous* es un simbiote en árboles, la carotenogénesis sería una respuesta a la presencia de compuestos antifúngicos fotoactivables producidos por el hospedero (Schroeder y Johnson, 1995). Además, ya que la levadura carece de algunos de los mecanismos de defensa frente a estrés oxidativo presentes en otros organismos, como Fe-SOD (superóxido dismutasa) y Cu/Zn-SOD (Schroeder y Johnson, 1993), se ha sugerido que estos pigmentos serían importantes para la protección contra las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas durante su crecimiento.

#### **1.4. Utilización de *X. dendrorhous* como fuente de astaxantina.**

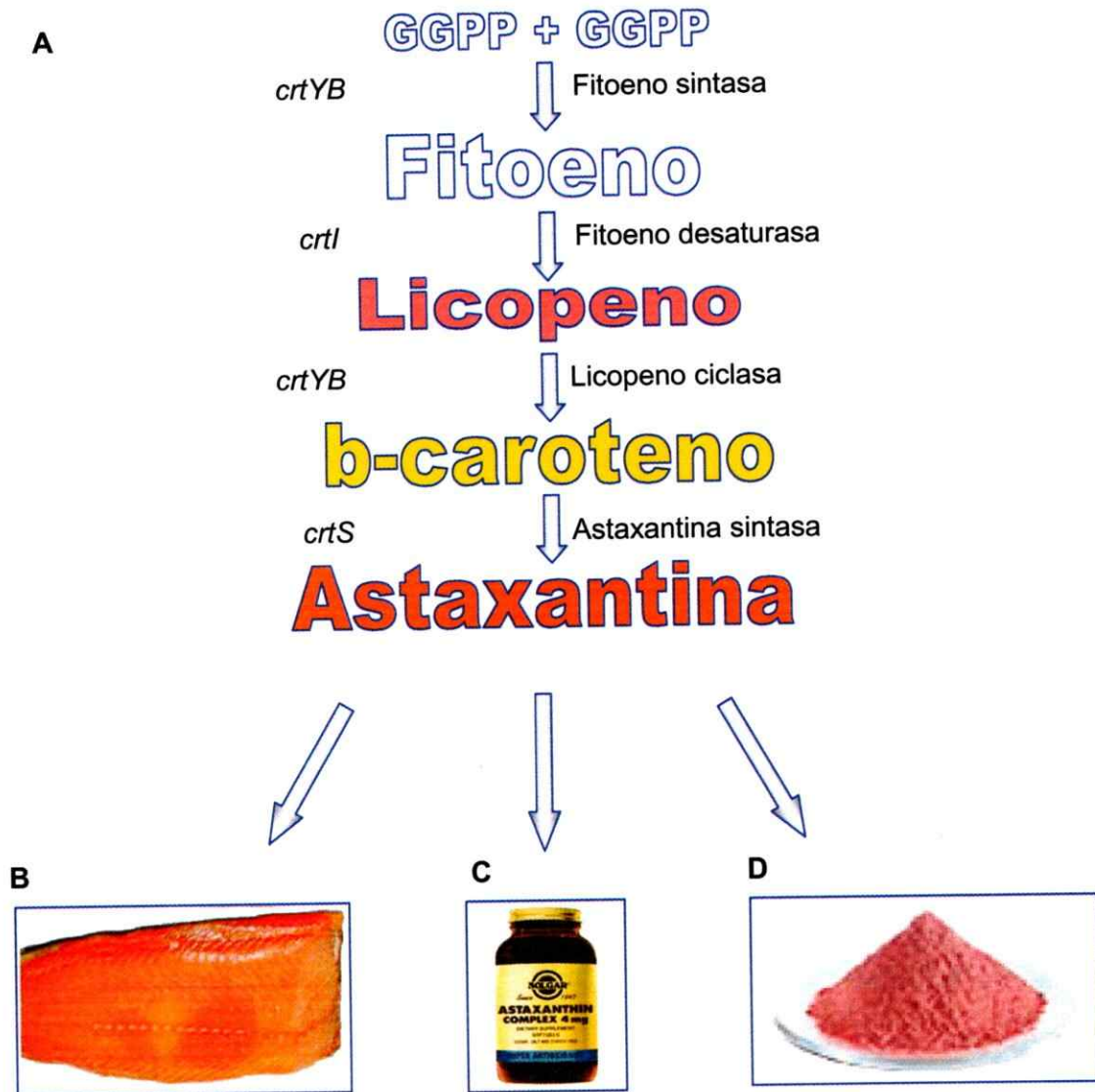
La producción de astaxantina de origen natural con fines industriales se ha centrado principalmente en el alga unicelular *H. pluvialis* y la levadura *X. dendrorhous*. Esta última, presenta algunas ventajas sobre *H. pluvialis* como fuente natural de astaxantina, debido a que la levadura puede proliferar en forma heterótrofa, a una alta velocidad, con una buena producción de biomasa y además puede utilizar sustratos de bajo costo para su crecimiento (Calo y González, 1995). Sin embargo, a pesar de estas ventajas, el principal problema para el uso de *X. dendrorhous* como fuente de astaxantina es la baja producción del pigmento en las cepas silvestres (200 y 400  $\mu\text{g}$  de astaxantina/g de peso seco), lo que resulta poco atractivo desde un punto de vista industrial.

Este hecho, ha motivado la generación mediante mutagénesis de cepas que puedan producir un mayor contenido de astaxantina, utilizando para ello tratamientos con luz ultravioleta (Retamales y cols., 1998) o con agentes químicos (nitrosoguanidina y etil-metano-sulfonato) (An y cols., 1989; Lewis y cols., 1990; An, 1997; Bon y cols., 1997; Retamales y cols., 1998).

### **1.5. Problema a abordar.**

Mediante la aplicación de técnicas tradicionales para el mejoramiento de las cepas silvestres de *X. dendrorhous*, se ha logrado obtener cepas sobreproductoras de pigmentos. Sin embargo, éstas han presentado limitaciones para desarrollar procesos productivos industriales. La mutación al azar ha generado efectos no deseados en las cepas obtenidas, como inestabilidad genética, falta de reproducibilidad en fermentaciones industriales y una menor producción de biomasa de las cepas sobreproductoras en comparación con las cepas silvestres (An y cols., 1989; Johnson y Schroeder, 1995; Visser y cols., 2003). Por este motivo, se ha propuesto que una manera de obtener cepas sobreproductoras de astaxantina que sean genéticamente estables, sería mediante la modificación específica de los genes participantes en la ruta de biosíntesis de ésta (figura 1). Sin embargo, para la modificación genética y transformación de microorganismos, se requiere de métodos que permitan la posterior selección de las cepas transformantes. Para esto, en la mayoría de los sistemas, se utilizan genes marcadores de selección que otorgan características fenotípicas dominantes que puedan ser seleccionadas. En otras levaduras, estos marcadores de selección corresponden principalmente a genes que codifican enzimas claves, involucradas en rutas de biosíntesis de aminoácidos, bases nitrogenadas y vitaminas.





**Figura 1. Principales pigmentos producidos por la levadura *X. dendrorhous*.**

**A)** Ruta de biosíntesis de astaxantina en *X. dendrorhous*. Se indican los genes y las enzimas participantes. La coloración de las letras para cada pigmento corresponde a la tonalidad del carotenoide puro. **B)** Utilización de la astaxantina como colorante para la pigmentación de salmónidos. **C)** Uso como antioxidante natural. **D)** Uso como colorante en la industria cosmética y alimenticia.

La transformación utilizando estos marcadores de selección requiere además, cepas receptoras auxótrofas para el nutriente en cuestión (Pronk, 2002). En *Saccharomyces cerevisiae* se han utilizado comúnmente los genes *URA3*, *HIS3*, *LEU2*, *TRP1* y *LYS2* que complementan específicamente las mutaciones alélicas de cepas auxótrofas *ura3-52*, *his3-Δ1*, *leu2-Δ1*, *trp1-Δ1* y *lys2-20*, respectivamente. Sin embargo, en *X. dendrorhous* se carece de cepas auxótrofas bien definidas y caracterizadas como receptoras de transformación.

La primera aproximación para disponer de un método de transformación para *X. dendrorhous* fue realizado por Adrio y Veiga (1995), en donde utilizaron 2 mutantes *ura3* de *X. dendrorhous* (ATCC 96220 y 96221) que transformaron con un vector que contenía el gen *URA3* de *S. cerevisiae*. Sin embargo, debido a la baja complementación del gen de *S. cerevisiae* en *X. dendrorhous*, hubo una baja eficiencia en la frecuencia de transformación y en la estabilidad de los transformantes. Estos problemas motivaron la búsqueda de otros métodos de transformación, utilizando genes de resistencia a antibióticos como marcadores de selección, independientes del genotipo de la cepa usada.

Estudios de la sensibilidad de *X. dendrorhous* frente a diferentes antibióticos, determinó que ésta era muy sensible a bajas concentraciones de geneticina (G-418), haciendo a este antibiótico un buen candidato como método de selección de transformantes. Así, se utilizó como marcador de selección el gen *neo* del transposón Tn903, que codifica la enzima aminoglucósido fosfotransferasa (APH), confiriéndoles a *E. coli* resistencia a kanamicina y a eucariontes resistencia a G-418 (Davies y Jiménez, 1980; Jiménez y Davies, 1980). Inicialmente, se utilizó este gen bajo el control de su propio promotor de origen bacteriano. Sin embargo, las cepas transformantes obtenidas de *X. dendrorhous* presentaron un nivel de resistencia bajo o casi nulo frente

al antibiótico, posiblemente debido a la baja transcripción del gen. Por este motivo, Wery y cols. (1997) fusionaron en fase, la porción 5' del gen de actina de *X. dendrorhous* con el gen *neo* proveniente del transposón Tn5 de *E. coli*. Además, para aumentar el número de copias de esta construcción en el genoma de la levadura y así aumentar la resistencia al antibiótico, se integró a una porción del rDNA 18S. Sin embargo, los resultados mostraron una baja eficiencia en la obtención de transformantes, posiblemente debido a la baja resistencia de estos. Así, para mejorar el sistema de transformación, Wery y cols. (1998) cambiaron el promotor de actina por el promotor del gen de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GPD*) de *X. dendrorhous* y además agregaron la región terminadora de la transcripción del mismo gen (Raué, 1994; Wery y cols., 1999). Este tipo de vector permitió obtener un sistema de transformación altamente eficiente en la obtención de cepas transformantes. Además, el clonamiento y la caracterización de los genes involucrados en la ruta de biosíntesis de astaxantina (Verdoes y cols., 1999a; Verdoes y cols., 1999b) permitieron el desarrollo de patentes para la obtención y utilización de cepas de *X. dendrorhous* sobreproductoras de pigmentos (Wery y cols., 1997; Hoshino y cols., 2000).

En experimentos posteriores realizados por Verdoes y cols. (2003), se utilizó esta herramienta molecular para aumentar el número de copia de los genes *crtYB* (fitoeno sintasa-licopeno ciclasa) y *crtI* (fitoeno desaturasa) involucrados en la ruta de biosíntesis de astaxantina, para obtener cepas de *X. dendrorhous* sobreproductora de ésta. Sin embargo, aunque los transformantes obtenidos presentaron diferencias en la composición de los pigmentos intermediarios, no hubo un aumento significativo en la cantidad final de astaxantina producida. Además, estos experimentos evidenciaron la condición diploide de las diferentes cepas de *X. dendrorhous* (Medwid, 1998. Hermosilla y cols., 2003).

El nivel de ploidía de las cepas de *X. dendrorhous* y la complejidad de su sistema carotenogénico, hace necesario tener otros marcadores de selección que permitan obtener las cepas transformantes requeridas. Actualmente, sólo se dispone del marcador de selección a G-418 como herramienta para la selección de transformantes, siendo esto insuficiente para el estudio de la biosíntesis de astaxantina en organismos diploides. Además, la relación de dependencia entre la síntesis de astaxantina y la dosis génica de los genes involucrados en su biosíntesis, hace necesario tener un sistema de modificación controlada de estos genes. Actualmente, el sistema de transformación utilizado, hace que el gen de interés se inserte en un número de copias variable en el genoma de *X. dendrorhous*, haciendo que la dosis génica no sea controlada y por lo tanto, los resultados de los experimentos sean difíciles de analizar.

El presente trabajo propone el desarrollo de una nueva herramienta para el manejo genético de la levadura *X. dendrorhous*, que permita el estudio de la ruta de biosíntesis de astaxantina y los mecanismos regulatorios que la gobiernan.

Para esto, se desarrollarán los siguientes objetivos específicos:

- Buscar y clonar un promotor fuerte de *X. dendrorhous*.
- Seleccionar un gen de resistencia a un antibiótico compatible con G-418.
- Construir el casete de resistencia a antibiótico para *X. dendrorhous*.
- Demostrar la funcionalidad del casete de resistencia a antibiótico mediante la modificación de la ruta de biosíntesis de astaxantina en *X. dendrorhous*.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

## **2.1. Cepas y plasmidios.**

En la tabla 1 se muestran los nombres y descripción de las cepas y plasmidios que se utilizaron en este trabajo.

## **2.2. Cultivo de microorganismos.**

### **2.2.1. Cultivo de *E. coli*.**

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

### **2.2.2. Cultivo de *X. dendrorhous*.**

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

## **2.3. Técnicas de biología molecular.**

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

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

Se realizó mediante el uso de perlas de vidrio según Sambrook y cols. (2001), modificado para *X. dendrorhous*. El pellet celular proveniente de células colectadas desde placas de cultivo o de 30 ml de cultivo líquido, se resuspendió en 500 µl de amortiguador TE (25 mM Tris- HCl, 10 mM EDTA) junto con un volumen de perlas de vidrio (Sigma, 425 - 600 µm) y se agitó en vórtex por 5 min.

Tabla 1. Cepas y plasmidios utilizados en este trabajo.

Cepa/Plasmidio	Genotipo/Características relevantes	Fuente / Referencia
<b>Cepas</b>		
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F- $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169deoRrecA1 endA1hsdR17(rk-,mk+)phoAsupE44 $\lambda$ - thi-1gyrA96relA1	GIBCO BRL.
<i>X. dendrorhous</i> UCD 67-385 o ATCC 24230	Silvestre ( <i>crtI</i> / <i>crtI</i> ). Hyg <sup>S</sup>	American Type Culture Collection. EE.UU.
<i>X. dendrorhous</i> T5	Transformante heterocigoto gen <i>crtI</i> ( <i>crtI</i> / <i>crtI</i> ), obtenido por transformación de la cepa silvestre con el clon pL22 $\Delta$ EV. Hyg <sup>S</sup>	León (2000).
<i>X. dendrorhous</i> T21H	Transformante heterocigoto gen <i>crtI</i> ( <i>crtI</i> / <i>crtI</i> :: <i>hph</i> ), obtenido por transformación de la cepa silvestre con el plasmidio pIH. Hyg <sup>R</sup> .	Este trabajo.
<i>X. dendrorhous</i> T5-3H	Transformante homocigoto gen <i>crtI</i> ( <i>crtI</i> / <i>crtI</i> :: <i>hph</i> ), obtenido por transformación de la cepa T5 con el plasmidio pIH. Hyg <sup>R</sup> .	Este trabajo.
<b>Plasmidios</b>		
pBlueScript SK <sup>-</sup>	Vector de clonamiento. Amp <sup>R</sup>	Stratagene
YIp5	Vector usado para la construcción de la genoteca.	
pL22 $\Delta$ EV	pBlueScript que porta el gen <i>crtI</i> con una delección <i>EcoRV</i> .	León (2000)
pBR60	pBlueScript que porta 6.364 pb del gen <i>TEF-1<math>\alpha</math></i> .	Este trabajo.
TEF2-2	pBlueScript que porta 7.743 pb del gen <i>TEF-1<math>\alpha</math></i> .	Este trabajo.
pBgpdT	pBlueScript que porta 386 pb del terminador <i>GPD</i> .	Este trabajo.
pBS4	Plasmidio que porta el gen <i>hph</i> . Amp <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Goldstein y McCusker (1999).
pMN-Hyg	pBlueScript que porta el casete de resistencia a higromicina B de <i>X. dendrorhous</i> .	Este trabajo.
pIH	pL22 $\Delta$ EV que porta el casete de resistencia a higromicina B de <i>X. dendrorhous</i> .	Este trabajo.

Hyg<sup>S</sup> = Sensible a higromicina B a 10  $\mu$ g/ml en medio sólido.

Hyg<sup>R</sup> = Resistente a higromicina B a 10  $\mu$ g/ml en medio sólido.

Luego, se agregaron 500 µl de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se homogenizó en vórtex por 2 min. A la fase acuosa se le agregó 500 µl de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se homogenizó en vórtex por 2 min. Se extrajo la fase acuosa y el DNA se precipitó con 1 volumen de etanol absoluto frío (-20°C). El pellet se lavó con etanol 70% (v/v) y luego se secó a 37°C. Posteriormente, el DNA se resuspendió en 100 µl de amortiguador TE-RNAsa (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, RNAsa A 30 µg/ml) e incubó a 37°C por 1 h. El DNA se guardó a -20°C hasta su utilización.

### **2.3.2. Extracción de DNA plasmidial.**

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

### **2.3.3. Electroforesis de DNA.**

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



#### **2.3.4. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.**

Los productos de las reacciones de PCR que se clonaron, se recuperaron previamente de los geles de agarosa y se purificaron con dióxido de silicio (Sigma S-5631) según el protocolo descrito por Boyle y Lew (1995).

#### **2.3.5. Digestiones de DNA con enzimas de restricción.**

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

#### **2.3.6. Ligaciones de DNA.**

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

#### **2.3.7. Preparación de células electrocompetentes de *E. coli*.**

Se inoculó 500 ml de medio LB con 5 ml de un cultivo de 12 h y se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar una D.O.<sub>560nm</sub> de entre 0,5 - 0,8 (fase exponencial temprana-media). A partir de este momento, todos los procedimientos se realizaron a 4°C, manteniendo las soluciones y las células en hielo. Se colectaron las células centrifugando a 4.000 x g durante 15 min. Se removió el sobrenadante y las células se lavaron dos veces con agua destilada estéril, el primer lavado con 500 ml y el segundo con 250 ml. Luego, las células se resuspendieron en 20 ml de glicerol 10 % (v/v), se centrifugaron y resuspendieron nuevamente en un volumen final de 2 a 3 ml de glicerol 10 % (v/v). Esta suspensión, con una concentración celular de aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  céls/ml, se fraccionó en alícuotas de 40 µl las cuales se almacenaron a -70 °C hasta su utilización.

### **2.3.8. Electrotransformación de *E. coli*.**

Las alícuotas de células electrocompetentes se descongelaron a temperatura ambiente, y luego se enfriaron en hielo al igual que las cubetas de electroporación. A la suspensión de células se le agregó de entre 15 a 50 ng de DNA y la mezcla se electroporó con las siguientes condiciones (cubetas de 2 mm): 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$  y 2,5 kV. Inmediatamente, se adicionó 1 ml de medio LB precalentado a 37 °C y la suspensión de células se transfirió a un tubo Eppendorf, incubándose a 37 °C. Al cabo de 1 h, se plaquearon alícuotas de 100  $\mu$ l en placas Petri con agar LB, ampicilina (100  $\mu$ g/ml) y X-Gal (0,024 mg/ml). Las placas se incubaron a 37 °C toda la noche y luego se seleccionaron colonias blancas de las cuales se extrajo el DNA plasmidial para su posterior análisis.

### **2.3.9. Preparación de células electrocompetentes de *X. dendrorhous*.**

La transformación de *X. dendrorhous* se basó en los protocolos descritos por Adrio y cols. (1995) y Rubinstein y cols. (1996). Para ello, se inoculó 200 ml de medio YM, con 1 - 2 ml de un cultivo de *X. dendrorhous* de 48 h. Se incubó con agitación constante a 22 °C hasta alcanzar una D.O.<sub>560nm</sub> de entre 4,5 - 5 (fase exponencial temprana-media). Las células se centrifugaron a 6.500 rpm durante 5 min, se resuspendieron en 25 ml de amortiguador BD (50 mM amortiguador fosfato de potasio, pH 7.0, 25 mM ditioneitol [DTT]) e incubaron a 22 °C por 15 min. Las células se lavaron dos veces con 25 ml de amortiguador STM (270 mM sacarosa, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) frío y finalmente se resuspendieron en 1 ml de amortiguador STM. Esta suspensión, con una concentración celular de aproximadamente 1x10<sup>9</sup> céls/ml, se fraccionó en alícuotas de 60  $\mu$ l que se utilizaron inmediatamente.

### **2.3.10. Electrotransformación de *X. dendrorhous*.**

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

### **2.3.11. Amplificación por PCR.**

Los partidores fueron adquiridos en el Centro de Biotecnología de la Universidad de Chile. En la tabla 2 se muestran los nombres y descripción de los partidores que se utilizaron en este trabajo.

#### **2.3.11.1. Diseño de partidores.**

Los partidores se diseñaron a partir de las secuencias conocidas depositadas en el GenBank de las regiones a amplificar, o de las regiones conservadas de gen del factor de elongación de la traducción 1α de diferentes hongos.

#### **2.3.11.2. Amplificación de DNA.**

Las reacciones de PCR realizadas para el chequeo de clones y partidores, se hicieron con la enzima DNA polimerasa *Taq*. En el caso que los productos de PCR se requiriesen para su posterior clonamiento, se utilizó la enzima DNA polimerasa *Pfu*. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl, que contenía amortiguador de PCR 1X pH 8,4 (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 µM de cada partidador, entre 10 y 100 ng de DNA templado y 1 unidad de enzima.

**Tabla 2. Partidores utilizados en este trabajo.**

Nombre Partidor	Secuencia 5'→3'	Descripción	Posición en el gen
<b>Clonamiento</b>			
gpdT-F	AGGCCTACGGTCTCTCCAA	Terminador <i>GPD</i> directo.	Y08366 2.431-2.452→
gpdT-R	ATGAGAGATGACGGAGATG	Terminador <i>GPD</i> reverso.	Y08366 ←2.798-2.816
PEF-F-EV	<u>GATATCGGCTCATCAGCCGAC</u>	Promotor <i>TEF-1α</i> directo con sitio <i>EcoRV</i> .	1-21→
PEF-R-Hyg	<u>GCTTTTTCATGGTGAAGC</u> <u>TGTTTCGAGATAG</u>	Promotor <i>TEF-1α</i> reverso con adaptador gen <i>hph</i> .	←381-410
Hyg-F-PEF	<u>CAGCTTCACCATGAAAAAGCC</u> <u>TGAACTCACC</u>	Gen <i>hph</i> directo con adaptador Promotor <i>TEF-1α</i> .	1.174-1.189→
Hyg-R-gpdT	<u>CCGTAGGCCTCTATTCCTTTG</u> <u>CCCTCGGAC</u>	Gen <i>hph</i> reverso con adaptador terminador <i>GPD</i> .	←2.183-2.202
gpdT-F-Hyg	<u>AAAGGAATAGAGGCCTACGGT</u> <u>TCTCTCCAA</u>	Terminador <i>GPD</i> directo con adaptador gen <i>hph</i> .	1.511-1540→
gpdT-R-EV	<u>GATATCATGAGAGATGACGGA</u> <u>GATG</u>	Terminador <i>GPD</i> reverso con sitio <i>EcoRV</i> .	←1.894-1.918
<b>Chequeo</b>			
EF-aD	GGATCCTTCAAGTACGC	<i>TEF-1α</i>	6.359-6.375→
EF-aR	ACGTTCTTGACGTTGAA	<i>TEF-1α</i>	←7.389-7405
C13D5	CGAGGCTTACCTTGTCTCTC	Gen <i>crtI</i>	889-918→
Pha4-8R	GAAAGCAAGAACACCAACGG	Gen <i>crtI</i>	←5.024-5.043
<b>Secuenciación</b>			
T3	ATTAACCCTCACTAAAG	Secuenciar Inserto de pBS	←774-790
T7	AATACGACTCACTATAG	Secuenciar Inserto de pBS	627-643→
EFD1	ACTGCTGAATATGTTGCTGC	<i>TEF-1α</i> reverso	←13.863-13.882
EFD2	TGACACTGGTAGCAGATCGG	<i>TEF-1α</i> reverso	←13.636-13.655
EFD3	TGACCATCAGCTTCTGGAAC	<i>TEF-1α</i> reverso	←13.272-13.291
EFD4	GACAAGAACGATGATGGCAG	<i>TEF-1α</i> reverso	←12.893-12.912
EFD5	GAACACAACGTGCCCAAATG	<i>TEF-1α</i> reverso	←12.668-12.687
EFD6	TCTCGAACTTCAAAGAGCG	<i>TEF-1α</i> reverso	←6.430-6449
EFD7	TCAGCTGCACTTTCTTCTGC	<i>TEF-1α</i> reverso	←12.150-12.169
EFD8	AAGGATAGGGCGACTGATAC	<i>TEF-1α</i> reverso	←11.834-11.911
EFD9	TCCCTCGGATGAACTTTTAC	<i>TEF-1α</i> reverso	←8.477-8496
EFD10	GGTACTCGGAGAATGCATTG	<i>TEF-1α</i> reverso	←11.263-11.282
EFDR1	CATGCTTCTCCAGGCACTAC	<i>TEF-1α</i> directo	13.407-13.426→
EFDRT1	AGCAACATATTCAGCAGTCC	<i>TEF-1α</i> directo	13.865-13.884→
EFR2	TGCCTGTTCTGACTTGCTCTG	<i>TEF-1α</i> directo	6.555-6574→

EFR3	ATGGCACGGAGACAACATG	<i>TEF-1α</i> directo	6.942-6.960→
EFR4	AGACCGGAGTCATCAAGGC	<i>TEF-1α</i> directo	7.264-7.282→
EFR5	ACTCTCCCGTTCTTGATTGC	<i>TEF-1α</i> directo	7.531-7.550→
EFR6	AGACATGAGGCAGACCGTTG	<i>TEF-1α</i> directo	7.742-7761→
EFR7	TCTAGCCCTTTGACGTATGG	<i>TEF-1α</i> directo	7.938-7.957→
EFR8	TATGACCAGAACATCGACCG	<i>TEF-1α</i> reverso	←14.017-14.036
EFR9	ACTACGGGTCCGAACGTTG	<i>TEF-1α</i> directo	8.383-8.402→
EFR10	TCACCTTCGACTCTCGATAG	<i>TEF-1α</i> directo	8.917-8.936→
EFR11	TGGCTTGTTGCTACAAACCG	<i>TEF-1α</i> directo	9.464-9.483→
EFR12	CCAGTCAAGACAGAAAGTCC	<i>TEF-1α</i> directo	11.892-11.911→
EFR13	TATGTCGAAGAACACGAGGC	<i>TEF-1α</i> directo	9.655-9.674→
EFR14	CTGTATCGTCCTGCGATAGG	<i>TEF-1α</i> directo	9.123-9.142→
EFR15	AGAAGTAAACGTCCCCGTTG	<i>TEF-1α</i> directo	7.843-7.862→
EFR16	TGGTGGACGAGAAAGTTGAG	<i>TEF-1α</i> directo	10.224-10.243→
EFR17	TTTATTCGCGGTGTGAGCTG	<i>TEF-1α</i> directo	8.729-8.748→
EFRD1	TTGAAACCGACGTTGTCTCC	<i>TEF-1α</i> reverso	←7.374-7.393
EFRD2	AGTCAGACACAACGTCCTTC	<i>TEF-1α</i> reverso	←6514-6533

→: Partidor directo.

←: Partidor directo.

Para las reacciones de PCR se utilizó un termociclador Applied Biosystem 2720, con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineación de los partidores a 55°C por 30 segundos y elongación a 72 °C por 3 minutos. Finalmente, se dejó por 10 minutos a 72°C para una elongación final y la reacción luego se mantuvo a 4°C. En algunos casos, la temperatura de alineación de los partidores se modificó para aumentar la especificidad de la reacción.

### **2.3.12. Elongación de fragmentos.**

Las reacciones para la elongación de fragmentos se realizaron con la enzima DNA polimerasa *Pfu*. Éstas se realizaron en un volumen final de 25 µl, que contenía amortiguador de PCR 1X pH 8,4 (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), cantidades equimolares de cada uno de los fragmentos (entre 300 y 1000 ng) y 2 unidades de enzima. Se utilizó un termociclador Applied Biosystem 2720, utilizando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C por 1 min, 10 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineación de los fragmentos a 50°C por 45 segundos y elongación a 72 °C por 1 min. Finalmente, se dejó por 10 min a 72°C para una elongación final y luego se mantuvo a 4°C. En algunos casos, la temperatura de alineación de los fragmentos se modificó para aumentar la especificidad de la reacción. Luego, se utilizaron 8 µl para la reacción de PCR estándar.

## **2.4. Extracción y análisis de pigmentos.**

### **2.4.1. Extracción de carotenoides.**

Para la extracción de los carotenoides se utilizó el método descrito por An y cols. (1989) con algunas modificaciones. El pellet de células proveniente de 50 ml de

cultivo se lavó con 1 ml de agua y posteriormente se resuspendió en 1 ml de agua. Se le agregó 1/2 volumen de perlas de vidrio (Sigma, 425 - 600  $\mu\text{m}$ ) y se realizó la ruptura celular por agitación en vórtex por 2 min. Se incubó en hielo por 2 min y se le agregó 1 ml de acetona. Se homogenizó en vórtex por 2 min y posteriormente se centrifugó por 10 min a 12.100 x g a 4°C. La fase orgánica obtenida se transfirió a otro tubo.

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

Los extractos de acetona se juntaron y se les agregó 1/5 volumen de éter de petróleo. Se agitó en vórtex por 2 min y se centrifugó por 3 min a 12.100 x g. a 4°C. Se extrajo la fase de éter de petróleo y se determinó su absorbancia a 450 nm.

#### **2.4.2. Análisis cualitativo y cuantitativo de los pigmentos por HPLC.**

Los pigmentos disueltos en éter de petróleo se secaron con nitrógeno gaseoso y posteriormente se resuspendieron en 100  $\mu\text{l}$  de acetona. Los pigmentos se separaron por HPLC con una columna de fase reversa RP-18 Lichrocart 125-4 (Merck), utilizando una solución de acetonitrilo:metanol:isopropanol (85:10:5 v/v) como fase móvil con un flujo de 1 ml/min a temperatura ambiente, en condiciones isocráticas. Los espectros de cada máximo de elución fueron obtenidos utilizando un detector con arreglo de diodos. Los carotenoides fueron identificados de acuerdo a sus espectros de absorción, tiempos de retención y comparación con estándares específicos.

#### **2.5. Análisis de secuencias.**

Las secuencias nucleotídicas se determinaron en nuestro laboratorio con el kit de Applied Biosystems "DNA Sequencing Kit Big Dye™ Terminator v3.0". Las secuencias se analizaron con los programas Chromas versión 1.43, Genetics

Computer Group (GCG) versión 10.0 de la Universidad de Wisconsin y ContigExpress 2003. Las secuencias de nucleótidos se alinearon con el programa CLUSTAL W, versión 1.8 y AlignX 2003, ajustadas manualmente para incrementar la identidad. Además, todas estas herramientas se complementaron con el uso del paquete de programas Vector NTI 10.3.



### **3. RESULTADOS**

El sistema utilizado actualmente para obtener transformantes de *X. dendrorhous* tiene como base un casete de resistencia a G-418 estructurado de la siguiente forma: promotor gen *GPD* – gen de resistencia a G-418 – terminador gen *GPD*, integrado en una porción del rDNA 18S. Al estructurarse de esta forma, la transformación de esta levadura presenta 3 falencias que pueden ser mejoradas: **1)** al encontrarse el gen de resistencia a G-418 flanqueado por regiones homólogas al DNA genómico de *X. dendrorhous*, se ha observado la inserción de éste en el locus *GPD*, dando transformantes falsos positivos, **2)** las cepas transformantes han presentado bajos niveles de resistencia al antibiótico, posiblemente por la fuerza del promotor utilizado, **3)** la inserción en multicopia de esta construcción en el genoma de la levadura, no permite el estudios de procesos dependientes de la dosis de los genes que participan en estos, especialmente la biosíntesis de astaxantina.

Por estos motivos, se desarrolló una nueva metódica de selección de transformantes en *X. dendrorhous*.

### **3.1. Elección y clonamiento de la región promotora de la transcripción.**

La iniciación de la transcripción de los genes, depende principalmente de la región promotora (“promotor”) de éstos, la cual tiene como función reclutar toda la maquinaria transcripcional, además de regular aumentado (“enhancers”) o disminuyendo (“silencers”) su transcripción.

En base a los estudios realizados en hongos filamentosos y levaduras (Guldener y cols., 1996; Kitamoto y cols., 1998; Rösel y Kunze, 1998; Nakazato y cols., 2006), se decidió utilizar el promotor del gen que codifica para el factor de elongación de la traducción 1- $\alpha$  (*TEF-1 $\alpha$* ), por ser éste uno de los promotores eucarióticos más fuerte.

### 3.1.1. Clonamiento del promotor *TEF-1 $\alpha$* .

#### 3.1.1.1. Diseño de partidores específicos.

Para el clonamiento de la región promotora del gen *TEF-1 $\alpha$* , se buscó en la base de datos la secuencia de la región codificante de este gen, en todos los hongos disponibles y se realizó un alineamiento múltiple de secuencia para dilucidar las regiones más conservadas en todos estos organismos. Este alineamiento fue analizado y corregido manualmente utilizando las secuencias de los 25 hongos siguientes: *Ajellomyces capsulatus* (U14100), *Aureobasidium pullulans* (U19723), *Arxula adenivorans* (Z47379), *Benjaminiella poitrasii* (AF157234), *Candida albicans* (M29935), *Chaetocladium brefeldii* (AF157236), *Cokeromyces recurvatus* (AF157242), *Cryptococcus neoformans* (U81803), *Dichotomocladium elegans* (AF157245), *Dissophora decumbens* (AF157247), *Echinosporangium transversale* (AF157248), *Echinosporangium transversale* (AF157248), *Eremothecium gossypii* (X73978), *Fennellomyces linderi* (AF157250), *Helicostylum elegans* (AF157254), *Mortierella chlamydospora* (AF157259), *Mucor indicus* (AF157266), *Mycotypha africana* (AF157271), *Phycomyces blakesleeana* (AF157275), *Pilaira anomala* (AF157276), *Piriformospora indica* (AJ249912), *Protomyocoladus faisalabadensis* (AF157280), *Radiomyces spectabilis* (AF157281), *Syncephalastrum monosporum* (AF157294), *Thamnostylum piriforme* (AF157298) y *Yarrowia lipolytica* (AF054510).

El resultado de este alineamiento múltiple permitió seleccionar 2 regiones altamente conservadas, desde las cuales se diseñó un juego de partidores (EF-aD y EF-aR) para amplificar el gen *TEF-1 $\alpha$*  (figura 2).



**Figura 2. Alineamiento múltiple de secuencias de la región codificante del gen *TEF-1α*.**

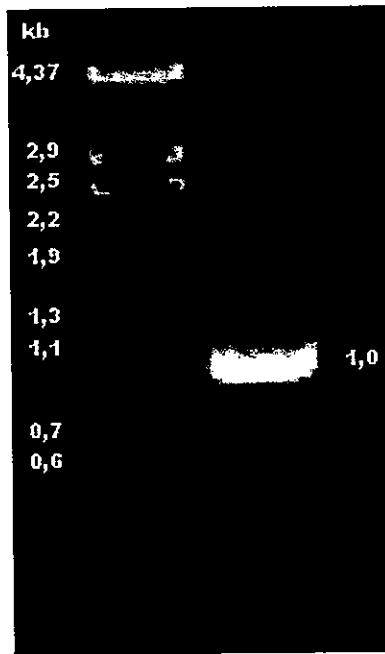
Se alinearon y compararon las secuencias de la región codificante del gen *TEF-1α* de 25 hongos. En **amarillo** se destaca aquella base que tiene un 100% de identidad en todas las secuencias. **A)** primera región conservada en el alineamiento múltiple de secuencias desde donde se diseñó el partidor directo EF-aD. **B)** segunda región conservada en el alineamiento múltiple de secuencias desde donde se diseñó el partidor reverso EF-aR. Las flechas indican la dirección de los partidores.

### 3.1.1.2. Búsqueda del gen *TEF-1 $\alpha$* .

Para chequear la especificidad de los partidores diseñados, se realizó una reacción de PCR utilizando como templado el DNA genómico de *X. dendrorhous*. Se obtuvo un único amplificado de aproximadamente 1 kb específico para el gen *TEF-1 $\alpha$*  (figura 3).

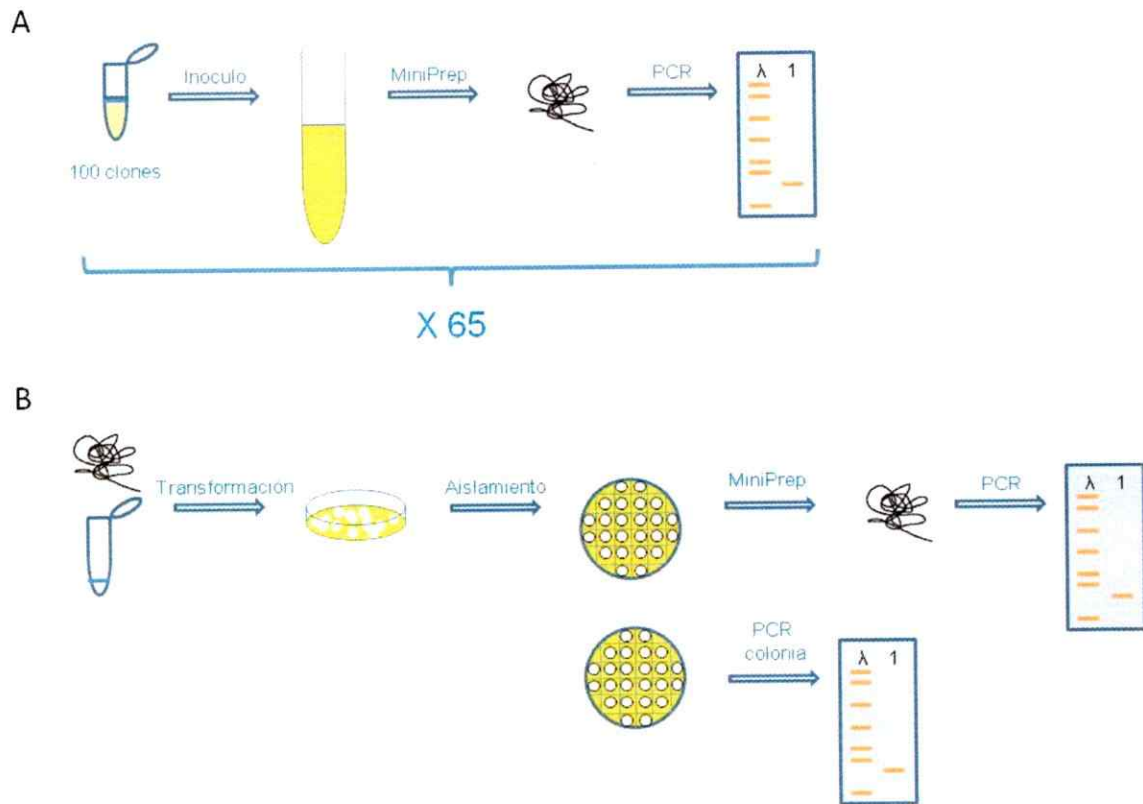
Posteriormente, se buscó mediante PCR el gen *TEF-1 $\alpha$*  en una genoteca de DNA genómico de *X. dendrorhous*. Esta genoteca había sido construida previamente en nuestro laboratorio mediante la digestión parcial del DNA genómico de *X. dendrorhous* con la enzima de restricción *Bam*HI y posterior ligado de estos fragmentos en el vector YIp5 pre-digerido con la misma enzima. Esta genoteca está constituida por 6.500 clones, agrupados en grupos de 100 clones cada uno, con un tamaño de inserto entre 4 a 21 kb.

Para la búsqueda del gen *TEF-1 $\alpha$*  en la genoteca, se siguió el protocolo esquematizado en la figura 4. Finalmente, se aislaron 2 clones positivos para la reacción de PCR, cuyos insertos se sub-clonaron en el plasmidio pBlueScript SK (pBS) pre-digerido con *Bam*HI. Los 2 sub-clones obtenidos (pBR60 y TEF2-2) se secuenciaron completamente, obteniéndose un fragmento de DNA genómico de un tamaño total de 14.107 pb.



**Figura 3. Chequeo de los partidores para el gen *TEF-1 $\alpha$* .**

La reacción de PCR se realizó con DNA genómico de *X. dendrorhous* utilizando los partidores EF-aD y EF-aR diseñados a partir de regiones conservadas de diferentes organismos. Se observó un único amplificado de 1 kb correspondiente al gen *TEF-1 $\alpha$* .



**Figura 4. Búsqueda del gen *TEF-1α* en la genoteca de DNA genómico de *X. dendrorhous* en *E. coli*.**

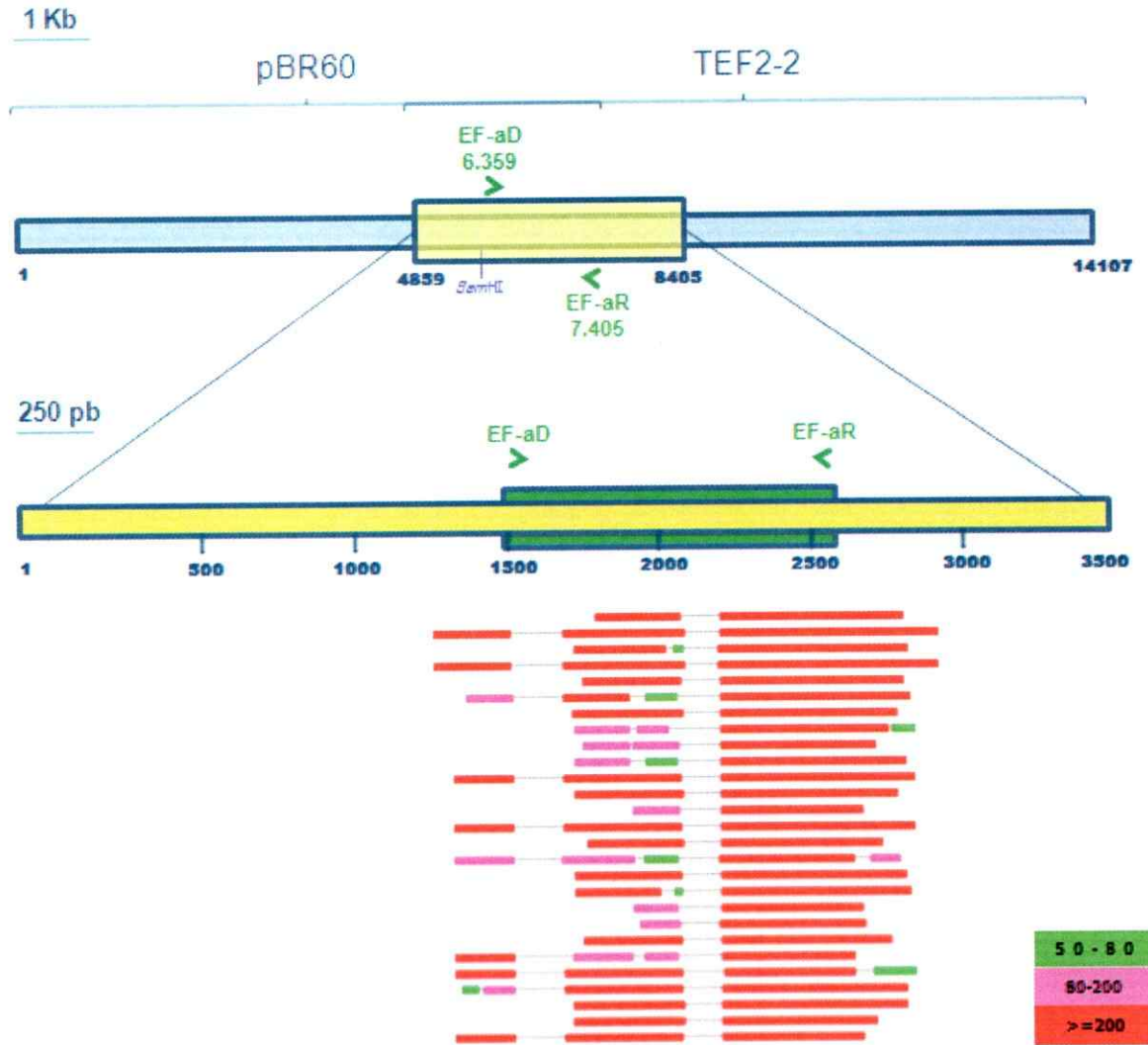
**A)** Se creció por separado cada uno de los 65 grupos de 100 clones cada uno y se les extrajo DNA plasmidial. Este DNA plasmidial fue utilizado como templado para la reacción de PCR con los partidores específicos del gen *TEF-1α*. **B)** El DNA positivo para la reacción de PCR se utilizó para transformar *E. coli*. Los clones transformantes se aislaron en placas de agar LB por duplicado. Se colectaron los clones de cada placa y se le extrajo DNA plasmidial. A los clones de la placa que dio positiva para la reacción de PCR, se les realizó PCR de colonia para ubicar el gen *TEF-1α*. Se obtuvieron los clones pBR60 y TEF2-2.



### 3.1.2. Análisis de secuencias.

El análisis de las secuencias obtenidas se realizó para ubicar el gen *TEF-1 $\alpha$*  y así definir su región promotora. Para esto, se ubicó en la secuencia los partidores utilizados en la búsqueda del gen *TEF-1 $\alpha$*  en la genoteca (EF-aD y EF-aR). Luego, se tomó una región de 3.547 pb, correspondiente a 1.500 pb de la región río arriba del partidor EF-aD, la región entre ambos partidores (1.047 pb) y 1.000 pb río abajo del partidor EF-aR, y se comparó con la base de datos (figura 5). Paralelamente se realizó la búsqueda del marco abierto de lectura en la secuencia, mediante la herramienta bioinformática "ORF Finder". Finalmente, el marco abierto de lectura encontrado se comparó con la base de datos protéica. La comparación con otros organismos permitió definir el codón de inicio de la traducción ATG en la posición 6.206 y el codón de término de la traducción TAA en la posición 7.848.

Una vez definido el codón de inicio de la traducción, se tomó 1.000 pb de la región río arriba de éste y mediante un análisis visual, ayudado de herramientas bioinformáticas de predicción y análisis de promotores eucarióticos, se pudo ubicar una potencial caja TATA en la posición 5.952 y el sitio de inicio de la transcripción 30 pb río abajo de ésta, en la posición 5.982. Además, se pudo definir la presencia de potenciales cajas reguladoras del tipo RPG en la posición 5.876 a 5.889, HOMOL1 en la posición 5.910 a 5.922 y una región rica en CT en la posición 6.041 a 6.071 (figura 6) (Larkin y cols., 1987; Vignais y cols., 1987; Moehle y Hinnebusch, 1991). Estos análisis permitieron definir la estructura del promotor del gen *TEF-1 $\alpha$*  y su potencial región mínima de funcionamiento.



**Figura 5. Comparación de la secuencia obtenida de los clones pBR60 y TEF2-2 con la base de datos.**

Se ubicaron los partidores específicos del gen *TEF-1 $\alpha$*  en la secuencia. Se tomó una región de 3.547 pb correspondiente a 1.500 pb de la región río arriba del partidor EF-aD, la región entre ambos partidores (1.047 pb) y 1.000 pb río abajo del partidor EF-aR y se comparó con la base de datos. En el recuadro inferior se indica el tamaño en pb de las diferentes regiones homólogas.



### **3.2. Elección y clonamiento de la región terminadora de la transcripción.**

#### **3.2.1. Elección de la región terminadora.**

Debido a los problemas para definir la región terminadora de la transcripción en la síntesis de los RNA mensajeros en eucariontes, actualmente se utiliza una región de tamaño variable, ubicada río abajo del codón de término de la traducción (Inagaki y Doolittle, 2000).

En los sistemas de expresión en levaduras, se ha utilizado la región terminadora de diferentes genes y no se ha descrito si existe dependencia de los niveles transcripcionales asociados a la región terminadora utilizada. Sin embargo, se ha observado que la carencia de ésta disminuye considerablemente la expresión del gen que controla (Wery y cols., 1998).

Para definir el terminador a utilizar, se buscó en la base de datos las secuencias de todos los genes publicados de *X. dendrorhous*. Sin embargo, sólo en 4 de los 12 genes publicados [actina (*ACT*) (X89898), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GPD*) (Y08366), isopentenil difosfato isomerasa (*idi*) (Y15811) e imidazol glicerol fosfato hidratasa (*HIS3*) (AF114492)], se había definido el codón de término de la traducción en la versión genómica del gen. Por lo tanto, debido a que también en otras levaduras basidiomicetes se había utilizado el terminador del gen *GPD*, para la confección de este casete marcador de selección se decidió utilizar este terminador.

#### **3.2.2. Clonamiento del terminador del gen *GPD*.**

Para el clonamiento del terminador del gen *GPD*, se diseñó un juego de partidores (*gpdT-F* y *gpdT-R*) a partir de la secuencia publicada en la base de datos (Y08366). Estos partidores permiten amplificar 386 pb de la región 3' del gen *GPD* a partir del codón de término de la traducción.

Mediante PCR, se amplificó el terminador del gen *GPD* desde DNA genómico de *X. dendrorhous* obteniendo un amplificado único que posteriormente se purificó y clonó en el plasmidio pBS pre-digerido con la enzima *EcoRV*. El clon resultante pBgpdT se secuenció completamente.

### **3.3. Elección y clonamiento del gen marcador de selección.**

La selección de transformantes es un paso crítico para la obtención de organismos modificados genéticamente. Así, la utilización de antibióticos para la selección de éstos tiene grandes ventajas comparativas con respecto a los marcadores nutricionales, ya que no se requiere un trasfondo genético determinado.

Actualmente, la obtención de cepas transformantes de *X. dendrorhous* se realiza mediante el reemplazo del gen que se desea mutar por un gen que le confiere al transformante resistencia al antibiótico geneticina (G-418). Sin embargo, debido a que esta levadura es diploide y por lo tanto existen al menos 2 alelos de cada gen en su genoma, para lograr cepas mutantes homocigotas es necesario disponer de otro marcador de selección.

#### **3.3.1. Elección del marcador de selección**

Para la selección de colonias transformantes en levaduras, se utilizan principalmente los antibióticos blasticidina S, zeocina, higromicina B y G-418, ya que se han clonado y caracterizado los genes que confieren resistencia a tales antibióticos (Invitrogen™ Life technologies). Sin embargo, la utilización conjunta de 2 o más antibióticos para la selección de transformantes está limitada, ya que se ha observado sinergia o inhibición en sus mecanismos de acción. Debido a que actualmente se utiliza la resistencia a G-418 como método de selección, se requiere de un antibiótico que pueda utilizarse conjuntamente con éste. En este sentido, se ha descrito la compatibilidad con higromicina B, haciendo de esta mezcla una buena opción de

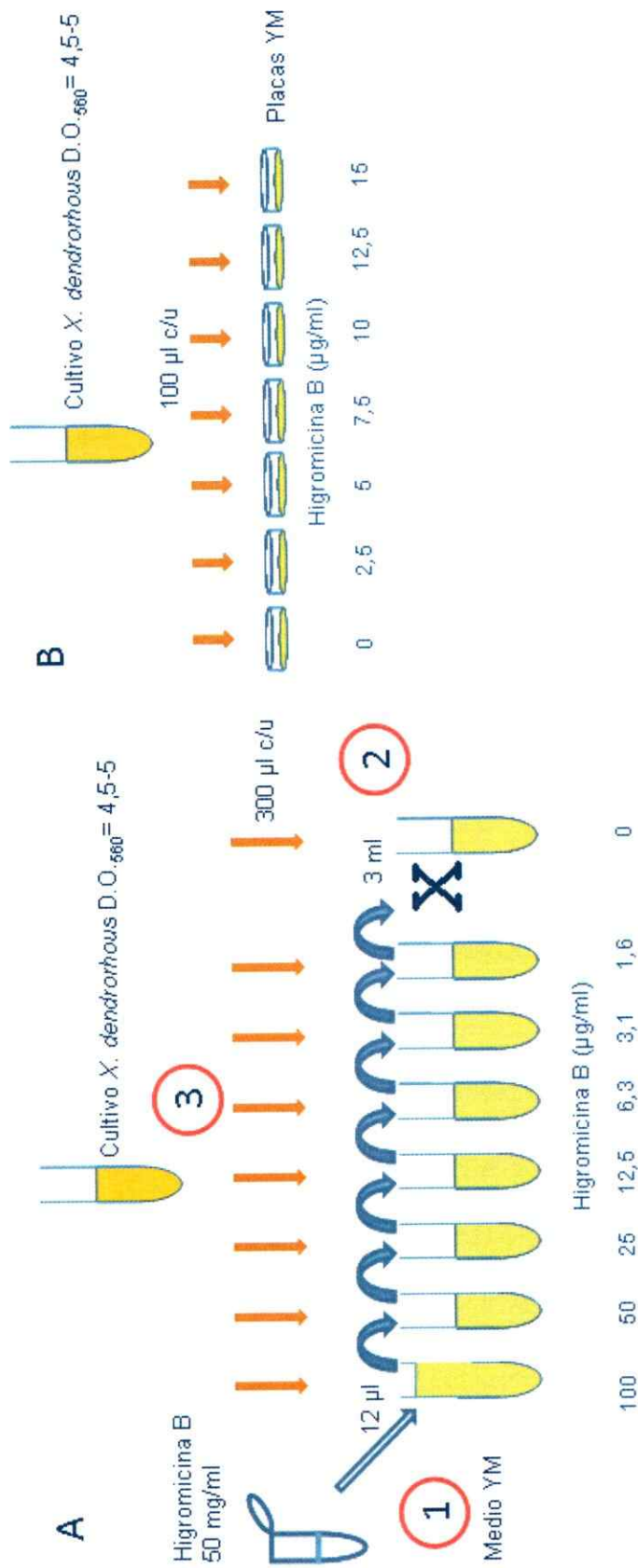
selección (Burland y cols., 1991; Hua y cols., 2000; Hansen y cols. 2003; Sato y cols., 2005).

La higromicina B es un antibiótico aminoglucósido, producido por *Streptomyces hygrosopicus* que inhibe la síntesis de proteínas, interfiriendo con la translocación del ribosoma. Es efectivo frente a la mayoría de las bacterias, hongos y eucariontes superiores y su resistencia está dada por la enzima higromicina B-fosfotransferasa, codificada por el gen *hph* de *E. coli*. Para determinar el potencial uso de la higromicina B como método de selección, primero se determinó la sensibilidad a éste antibiótico en medio YM líquido y sólido de la cepa silvestre de *X. dendrorhous* según el esquema de la figura 7.

Los resultados muestran que la cepa silvestre es altamente sensible a bajas concentraciones de higromicina B (tabla 3) y confirman que la utilización de este antibiótico debería ser un buen método de selección. Por este motivo se procedió a clonar el gen *hph* a partir del plasmidio comercial pBS4 que porta dicho gen como sistema de selección. Debido a que el primer paso de selección de transformantes se realiza en medio sólido, se estableció la concentración de trabajo de higromicina B a 10 µg/ml.

#### **3.4. Construcción del casete de resistencia a higromicina B.**

La construcción del casete de resistencia a higromicina B de *X. dendrorhous*, se realizó siguiendo el esquema de la figura 8. Para ello, se amplificó mediante PCR la región promotora del gen *TEF-1α*, el gen de resistencia a higromicina B y la región terminadora de la transcripción del gen *GPD*. Los productos de PCR se chequearon por electroforesis en un gel de agarosa, purificándose la banda de interés.



**Figura 7. Determinación de la sensibilidad de *X. dendrorhous* a higromicina B.**

**A)** Determinación de la sensibilidad de *X. dendrorhous* en medio YM líquido. **1)** Se agregó 12 µl de higromicina B (50 mg/ml) a 6 ml de medio YM, quedando a una concentración final de 100 µg/ml. **2)** Se diluyó secuencialmente el antibiótico en 6 tubos de cultivo con 3 ml de medio YM hasta alcanzar una concentración final de 1,6 µg/ml **3)** Los 7 tubos de cultivo con antibiótico más un tubo control, se inocularon con un cultivo de *X. dendrorhous* en fase exponencial de crecimiento D.O.<sub>560</sub> = 4,5 - 5 a una dilución 1/100. Se incubaron por 7 días y luego se observó si había crecimiento. **B)** Determinación de la sensibilidad de *X. dendrorhous* en medio YM sólido. Se plaquearon alicuotas de 100 µl de un cultivo en fase exponencial de crecimiento D.O.<sub>560</sub> = 4,5 - 5 en placas agar YM con concentraciones variables de higromicina B. Se incubaron por 7 días y se observó la presencia de colonias.

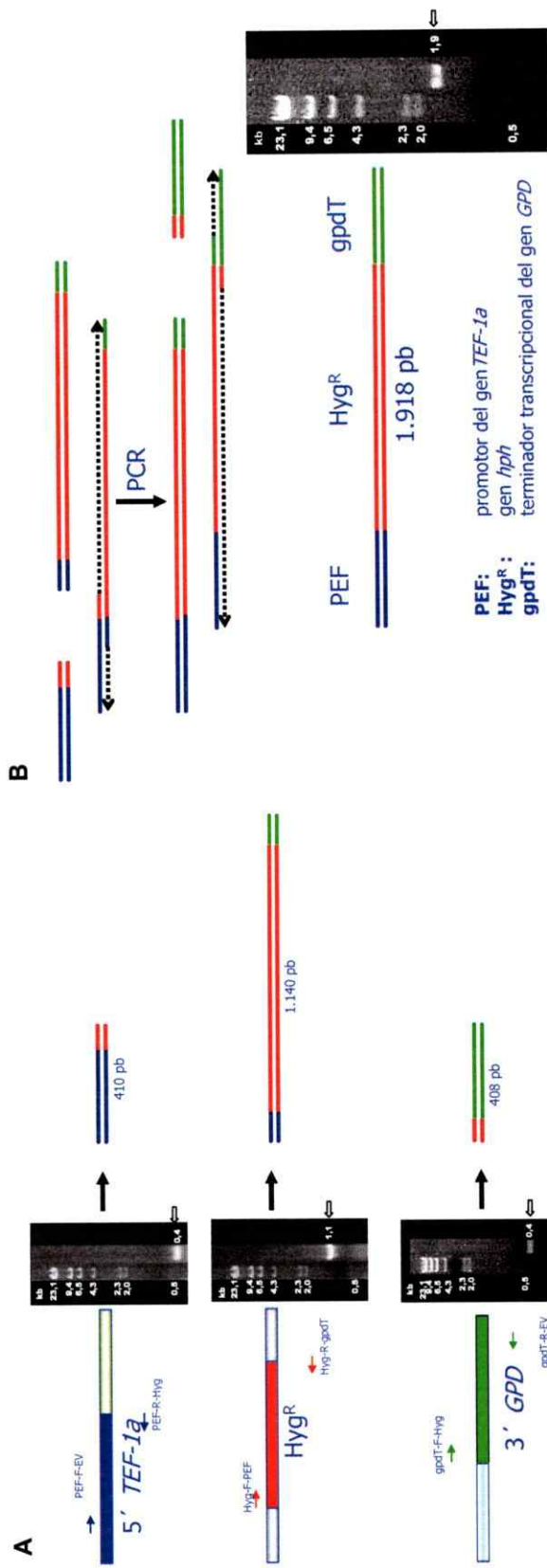
**Tabla 3. Sensibilidad de la cepa silvestre de *X. dendrorhous* a higromicina B.**

Medio Líquido		Medio Sólido	
Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Crecimiento <sup>(1)</sup>	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Crecimiento <sup>(2)</sup>
0	++	0	+
1,6	++	2,5	+
3,1	+	5	+
6,3	-	7,5	+
12,5	-	10	-
25	-	12,5	-
50	-	15	-
100	-		

<sup>(1)</sup> ++ crecimiento igual que el control sin antibiótico, + crecimiento menor que control sin antibiótico, - sin crecimiento.

<sup>(2)</sup> + presencia de colonias, - ausencia de colonias.





**Figura 8. Construcción del casete de resistencia a higromicina B de *X. dendrorhous*.**

**A)** Amplificación mediante PCR de la región promotora del gen *TEF-1α* con los partidores PEF-F-EV y PEF-R-Hyg; el gen de resistencia a higromicina B con los partidores Hyg-F-PEF e Hyg-R-gpdT; y la región terminadora de la transcripción del gen *GPD* con los partidores gpdT-F-Hyg y gpdT-R-EV. **B)** Unión de los fragmentos mediante la extensión de estos y posterior PCR, para la construcción del casete de resistencia a higromicina B de *X. dendrorhous*.

Cantidades equimolares del fragmento correspondiente al promotor del gen *TEF-1 $\alpha$*  y al fragmento del gen de resistencia, se mezclaron para su posterior elongación. Después del protocolo de elongación, el producto fue amplificado con los partidores PEF-F-EV e Hyg-R-gpdT. La reacción de PCR se chequeó por electroforesis en un gel de agarosa y se purificó la banda de interés. Luego, este fragmento se mezcló con el fragmento de la región terminadora del gen *GPD* y se realizó el protocolo de elongación. Después del protocolo de elongación, el producto se amplificó con los partidores PEF-F-EV y gpdT-R-EV. La reacción de PCR fue chequeada por electroforesis en un gel de agarosa y se purificó la banda de interés. Luego, el casete completo se clonó en el plasmidio pBS pre-digerido con la enzima de restricción *EcoRV* obteniéndose el plasmidio pMN-Hyg, el que se secuenció completamente.

### **3.5. Utilización del casete de resistencia en *X. dendrorhous*.**

La carencia de vectores episomales para transformar *X. dendrorhous*, hace necesaria la inserción en el genoma de la levadura el fragmento con el cual se desea transformar. En levaduras, esto se logra mediante la recombinación homóloga entre el fragmento y su genoma. Sin embargo, la eficiencia de transformación por recombinación es baja debido a la baja frecuencia con la que ocurre este proceso. Así, para aumentar la eficiencia de transformación, los sistemas actuales utilizan regiones que se encuentran repetidas muchas veces en el genoma, como es el caso del rDNA 18S. La desventaja de la utilización de esta región, es que la inserción del fragmento ocurre en multicopia, lo que imposibilita el estudio de procesos, por ejemplo la biosíntesis de astaxantina, que son dependientes de la dosis génica de los genes que participan en ella.

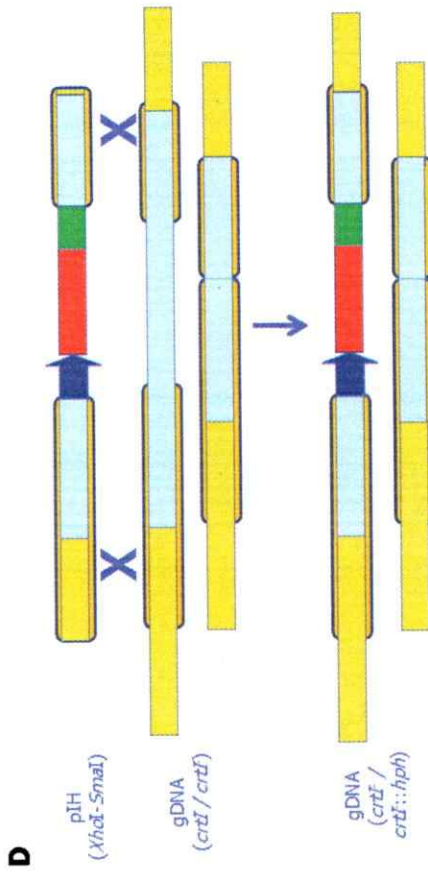
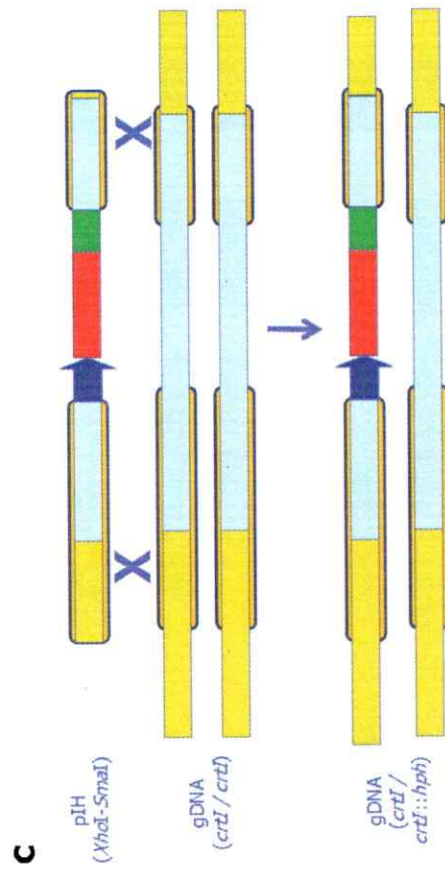
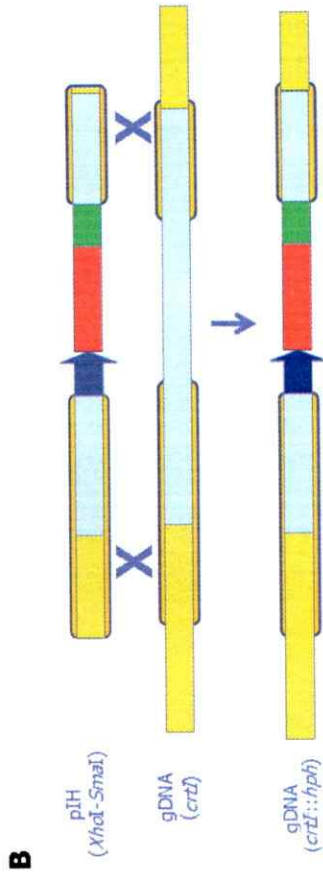
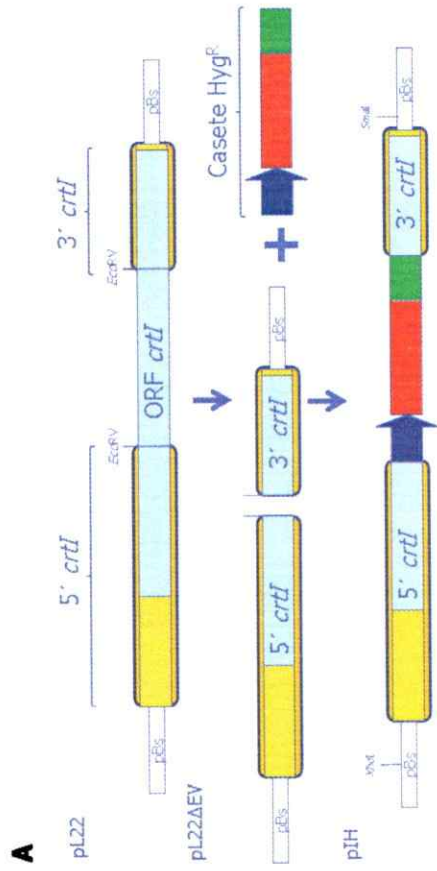
Por lo tanto, para contar con una herramienta que permita el estudio del sistema carotenogénico de *X. dendrorhous*, se decidió utilizar como región homóloga de recombinación para la transformación con el casete de resistencia a higromicina B, el locus *crtI* que se encuentra en copia única en el genoma haploide de la levadura.

### 3.5.1. Inserción en el locus *crtI*.

Para chequear la funcionalidad del casete de resistencia a higromicina B en *X. dendrorhous*, se decidió mutar por delección y reemplazo el gen *crtI*, que participa en la ruta de biosíntesis de astaxantina. De esta manera, se lograría un doble fenotipo marcador para la selección de transformantes, ya que estos presentarían resistencia a higromicina B y cambio de color. Para ello, por un lado se utilizó el plasmidio pL22ΔEV, que tiene como inserto un fragmento de DNA genómico de 2.432 pb al cual se le ha eliminado un fragmento *EcoRV* de 1.128 pb correspondiente a parte del gen *crtI*. Este plasmidio había sido utilizado previamente para transformar la cepa silvestre (*crtI* / *crtI*) de *X. dendrorhous*, obteniendo el transformante heterocigoto T5 (*crtI* / *crtI*) que presentaba niveles de pigmentación menores a los de su cepa parental, indicando la dependencia de la dosis génica en la biosíntesis de astaxantina (León, 2000).

Por otro lado, el clon pMN-Hyg se digirió con la enzima *EcoRV*, liberándose el casete de resistencia a higromicina B de *X. dendrorhous*. El fragmento de 1.912 pb resultante se purificó desde el gel de agarosa y luego se introdujo en el sitio *EcoRV* del plasmidio pL22ΔEV, obteniéndose el plasmidio pIH (figura 9).

Posteriormente, la orientación del inserto se chequeó mediante su patrón de restricción y PCR.



**Figura 9. Inserción del casete de resistencia a higromicina B de *X. dendrorhous* en el locus *crtI*.**

**A)** El casete de resistencia a higromicina B de *X. dendrorhous* fue insertado en el sitio *EcoRV* del plasmidio pL22 $\Delta$ EV, reemplazando 1.128 pb del gen *crtI*. El clon resultante pIH fue utilizado para la transformación de *X. dendrorhous*. **B)** Esquema del mecanismo de inserción del casete de resistencia a higromicina B por recombinación homóloga en el locus *crtI* de *X. dendrorhous*. **C)** Resultado esperado en la transformación de la cepa silvestre. **D)** Resultado esperado en la transformación de la cepa T5 heterocigota para el gen *crtI*. Se esquematiza la condición diploide de las cepas utilizadas y el mecanismo de inserción del casete en esa región del genoma.

### **3.5.2. Transformación de *X. dendrorhous*.**

La transformación de *X. dendrorhous* se realizó mediante electroporación, utilizando como cepas receptoras de transformación la cepa silvestre y la cepa heterocigota T5. El DNA utilizado como dador correspondió al plasmidio pH pre-digerido con las enzimas de restricción *XhoI* y *SmaI* (figura 9).

#### **3.5.2.1. Preparación del DNA transformante.**

Se purificó el DNA plasmidial del clon pH mediante MIDI-Prep, y se chequeó por electroforesis en un gel de agarosa. Luego, para cada transformación se utilizó 15 µg de este DNA plasmidial digerido con las enzimas *XhoI* y *SmaI*, cuyos cortes permiten la liberación de su inserto. Una muestra de la reacción de digestión se chequeó por electroforesis en un gel de agarosa y el resto de la reacción de digestión se trató con un lavado fenólico y luego se precipitó con etanol. El pellet resultante se resuspendió en 10 µl de agua y luego se utilizó para transformar.

#### **3.5.2.2. Electrotransformación de *X. dendrorhous*.**

Para la transformación de *X. dendrorhous*, se utilizaron 60 µl de células electrocompetentes, a las que se les agregó los 10 µl del DNA digerido (15 µg). Posterior a la electroporación, las células se resuspendieron en 1 ml de medio YM y se incubaron por 5 h a 22°C. Después de este periodo de incubación, se plaquearon 100 µl en placas YM con higromicina a una concentración final de 10 µg/ml. Después de 4 días, se observó la presencia de colonias transformantes Hyg<sup>R</sup> en la placa.

A partir de la transformación de la cepa silvestre de *X. dendrorhous*, se obtuvo clones transformantes resistentes a higromicina B, con una pigmentación similar al T5 y menos intensa que la cepa silvestre. En la transformación de la cepa T5 se obtuvieron 2 tipos de colonias resistentes a higromicina B. Por un lado, se obtuvieron colonias cuya pigmentación fue similar a la cepa T5 y por otro lado se obtuvieron

colonias albinas (figura 10). Las colonias transformantes se aislaron para su posterior análisis.

### **3.5.3. Análisis de transformantes.**

A los clones transformantes se les extrajo DNA genómico y mediante PCR se chequeó la presencia del casete de resistencia a higromicina B y su inserción correcta en el genoma de *X. dendrorhous*.

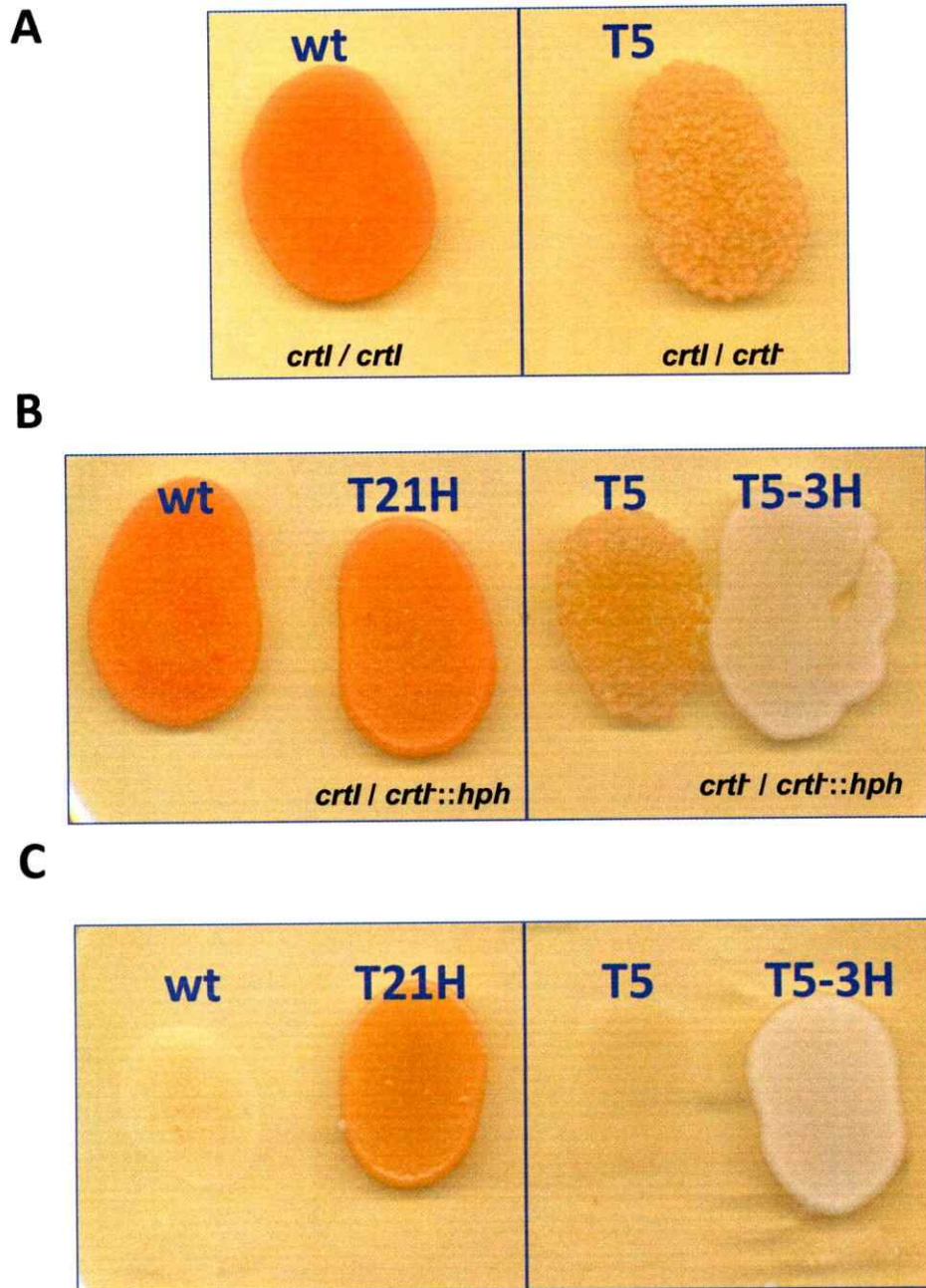
Para la amplificación del casete de resistencia al antibiótico, se utilizaron 2 juegos de partidores, uno correspondiente al casete completo (PEF-F y gpdT-R) y otro correspondiente sólo al gen de resistencia (Hyg-F e Hyg-R). Se obtuvo como amplificado, para el casete completo, un fragmento de aproximadamente 1,9 kb, y del gen de resistencia, un fragmento de aproximadamente 1,1 kb, comprobando la inserción del casete de higromicina B en el genoma de *X. dendrorhous*.

Además, para chequear si la inserción del casete en el locus *crtI* era correcta, se amplificó con los partidores C13D5 y pha4(8R) ubicados fuera de la deleción *EcoRV* y los partidores Hyg-R e Hyg-F ubicados en el casete. Los tamaños de los productos de amplificación esperados fueron de 2.283 pb para la reacción C13D5 - Hyg-R y 2.990 pb para la reacción pha4(8R) – Hyg-F.

Los resultados de las reacciones de PCR demostraron la presencia y correcta inserción del casete en el locus *crtI*. Esto, sumado al hecho de la resistencia a higromicina otorgada a *X. dendrorhous* por parte del casete, demuestra la funcionalidad de éste.

### **3.5.4. Análisis de pigmentos.**

Finalmente, para demostrar que esta herramienta permite modificar de manera controlada la síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*, se realizaron análisis en la pigmentación de los clones resultantes.



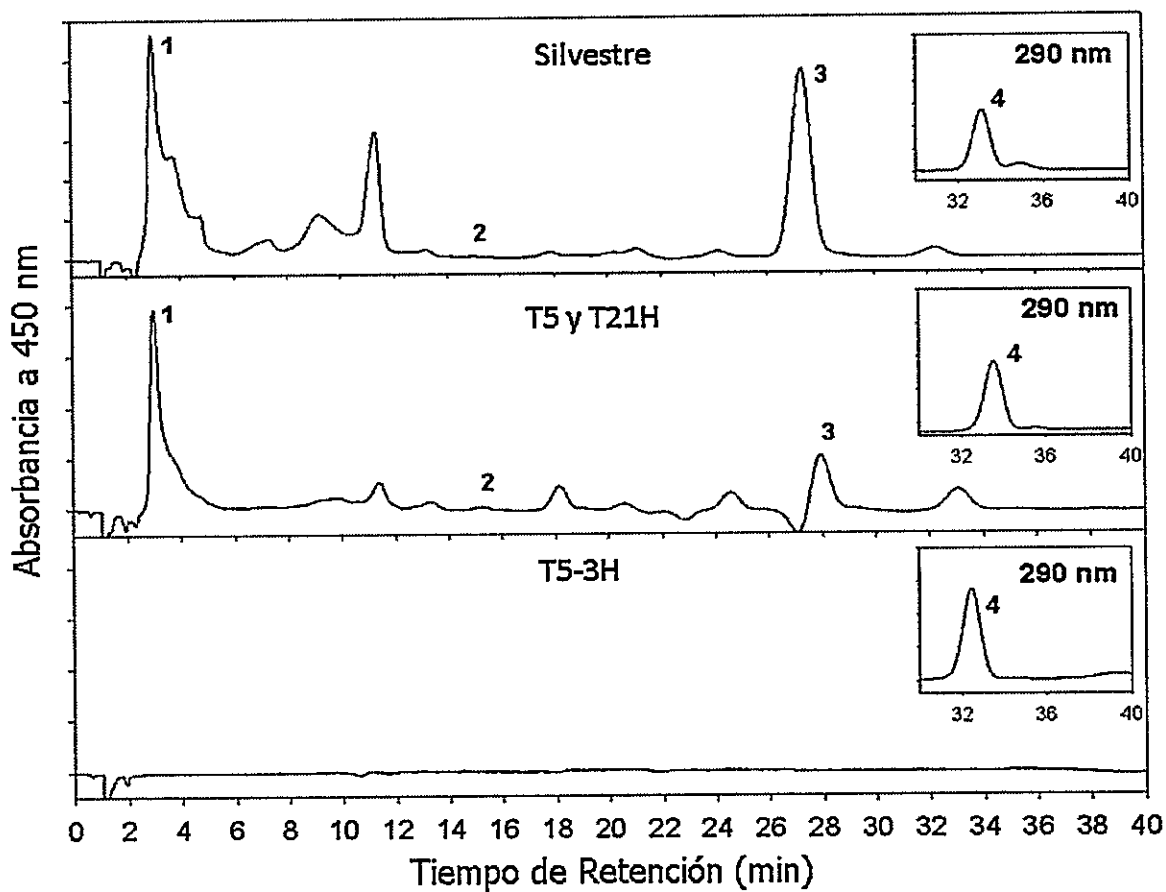
**Figura 10. Transformación de dos cepas de *X. dendrorhous* con el plasmidio pH que contiene el casete de resistencia a higromicina B.**

**A)** Cepas parentales crecidas en medio YM. **B)** Cepas parentales y transformantes resistentes a higromicina B crecidas en medio YM. **C)** Cepas parentales y transformantes resistentes a higromicina B crecidas en medio YM-higromicina a 10 µg/ml. Las cepas parentales no crecen en presencia del antibiótico a diferencia de las cepas transformantes.

La comparación visual entre los clones transformantes y sus respectivas cepas parentales, mostraban diferencias en su pigmentación. Por este motivo, se les extrajo pigmentos a las cepas parentales (silvestre y T5) y a las cepas transformantes (T21H y T5-3H), los cuales se separaron mediante HLPC y se analizaron por su espectro de absorción.

En el caso del clon T21H, que es heterocigoto para el gen *crtI* (*crtI / crtI::hph*), se observó una disminución de todos los pigmentos, en comparación con la cepa silvestre. Para el caso del clon T5-3H, que es homocigoto recesivo para el gen *crtI* (*crtI / crtI::hph*), no se observó la presencia de pigmentos, indicando el bloqueo de la ruta de biosíntesis de astaxantina en el paso desde fitoeno a licopeno (figura 11).





**Figura 11. Cromatograma a 450 nm de pigmentos separados por HPLC.**

Análisis mediante HPLC de los pigmentos de las diferentes cepas obtenidas. Los máximos de absorción indicados corresponden a los siguientes compuestos: 1) astaxantina, 2) licopeno, 3)  $\beta$ -caroteno y 4) fitoeno. Se indican las cepas utilizadas para el análisis de pigmentos.

## 4. DISCUSIÓN

#### 4.1. Elección del promotor del gen *TEF-1α*.

Los promotores pueden clasificarse dependiendo de los niveles transcripcionales de los genes que regulan, pudiéndose diferenciar de esta manera 2 tipos. Por un lado, se encuentran los promotores constitutivos, ya que los genes que regulan mantienen relativamente constantes sus niveles transcripcionales y por otro lado, se encuentran los promotores regulados, en los cuales los niveles transcripcionales varían dependiendo de las condiciones fisiológicas o ambientales en las que se encuentra el organismo.

Los promotores utilizados para la expresión de genes homólogos o heterólogos en levaduras como *S. cerevisiae*, dependen exclusivamente del objetivo final al que se desee llegar. En aquellos casos en los que se necesita tener obtener altos niveles de expresión, se utilizan promotores constitutivos fuertes propios de la levadura. Los promotores más usados para la expresión de genes homólogos y heterólogos son los siguientes (Mumberg y cols., 1995): citocromo C oxidasa (*CYC1*), alcohol deshidrogenasa (*ADH*), gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa (*GPD*) y del factor de elongación de la traducción 1- $\alpha$  (*TEF-1α*).

Estudios posteriores han indicado que los niveles de expresión obtenidos con los promotores de los genes *GPD* y *TEF-1α* son mayores que la de los promotores de otros genes, por lo que la utilización de éstos se ha generalizado (Mumberg y cols., 1995).

En *X. dendrorhous* se ha utilizado el promotor del gen *ACT* y *GPD* para la expresión de genes de resistencia a antibióticos (Wery y cols., 1997; 1998). Sin embargo, los resultados no han sido satisfactorios, posiblemente porque los promotores utilizados no son lo suficientemente fuertes para obtener los niveles de transcrito necesarios. Así, para obtener mejores resultados, se decidió utilizar el

promotor del gen que codifica para la sub-unidad alfa del factor de elongación de la traducción 1 (*TEF-1 $\alpha$* ) de *X. dendrorhous*, debido a que éste es un promotor constitutivo fuerte propio de la levadura. El *EF-1* es una de las pocas proteínas requeridas directamente en la síntesis de todas las proteínas celulares, siendo necesaria la transcripción activa de este gen para la viabilidad celular (Cottrelle y cols., 1985; Janssen y cols., 1994).

## **4.2. Análisis de las secuencias.**

### **4.2.1. Análisis de la región codificante del gen *TEF-1 $\alpha$* .**

La búsqueda del gen *TEF-1 $\alpha$*  en la genoteca de DNA genómico de *X. dendrorhous* tuvo como resultado el aislamiento de 2 clones (pBR60 y TEF2-2) que eran positivos para la reacción de PCR. El sub-clonamiento y la posterior secuenciación de éstos permitieron ubicar al gen *TEF-1 $\alpha$*  en un fragmento de DNA genómico de 14.107 pb. El análisis del patrón de restricción de estos clones mostró la presencia de un sitio de restricción *Bam*HI que interrumpía el gen *TEF-1 $\alpha$* , siendo posteriormente confirmado por secuenciación. Debido a que la genoteca había sido construida digiriendo el DNA genómico con la enzima *Bam*HI, estos clones fueron el resultado de la digestión parcial de este DNA.

Se realizó la búsqueda del sitio *Bam*HI en la secuencia del gen *TEF-1 $\alpha$*  de los 25 hongos utilizados en el diseño de los partidores específicos (figura 2), encontrando que sólo en *D. decumbens* (zigomicete) se encontraba este sitio de restricción. El análisis del alineamiento múltiple de estas secuencias, permitió construir un árbol filogenético que muestra las relaciones que hay entre los diferentes organismos (Matheny y cols., 2006). Se pudo observar la separación de 3 agrupamientos, que se correlacionaron con los *phylum* basidiomicete, zigomicete y ascomicete (figura 12).

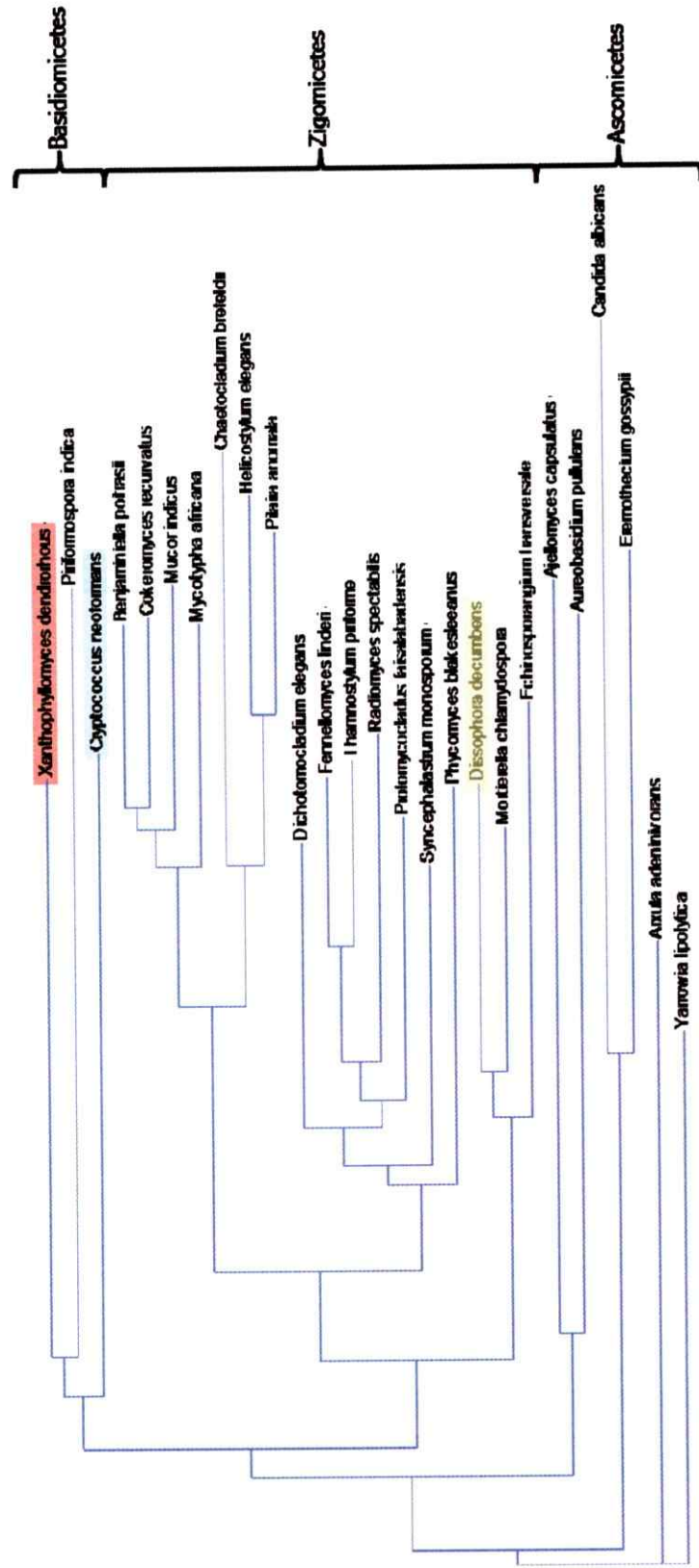


Figura 12. Árbol filogenético obtenido a partir de la comparación de las secuencias de los genes *TEF-1α* de diferentes hongos.

Se observa un agrupamiento de los organismos a partir de las secuencias de los genes *TEF-1α* de manera correspondiente con los distintos *phylum*. Se destaca en rojo *X. dendrorhous*, en celeste *C. neoformans* y en verde *D. decumbens*.

Este resultado, además de otros análisis filogenéticos entre diferentes levaduras basidiomicetes, ha indicado una alta cercanía entre *X. dendrorhous* y *C. neoformans* (Wery y cols., 1996; Verdoes y cols., 1997), permitiendo utilizar la información genética disponible de este último como base para los estudios de *X. dendrorhous*. Por este motivo, se comparó la secuencia del cDNA del gen *TEF-1 $\alpha$*  de *C. neoformans* con la versión genómica del gen *TEF-1 $\alpha$*  de *X. dendrorhous*, permitiendo establecer la posible relación exón-intrón de éste (figura 13). Así, por comparación se encontró que la región codificante del gen *TEF-1 $\alpha$*  correspondería a 1.645 pb, que estarían estructuradas en 3 exones de 254, 411 y 718 pb y 2 intrones de 158 y 104 pb. Recientemente, en nuestro laboratorio se ha clonado y secuenciado completamente el cDNA del gen *TEF-1 $\alpha$*  de *X. dendrorhous*, corroborando estos resultados (Marcoleta, 2007).

De esta manera, se obtuvo el ORF del *TEF-1 $\alpha$*  de 1.383 pb que codificaría para una proteína de 460 aminoácidos, con un peso molecular predicho de 50,3 kDa y un punto isoeléctrico de 9,15. El análisis de la secuencia aminoacídica deducida, permitió identificar tres dominios altamente conservados entre factores de elongación de la traducción (figura 14) (Marchler-Bauer y Bryant, 2004).

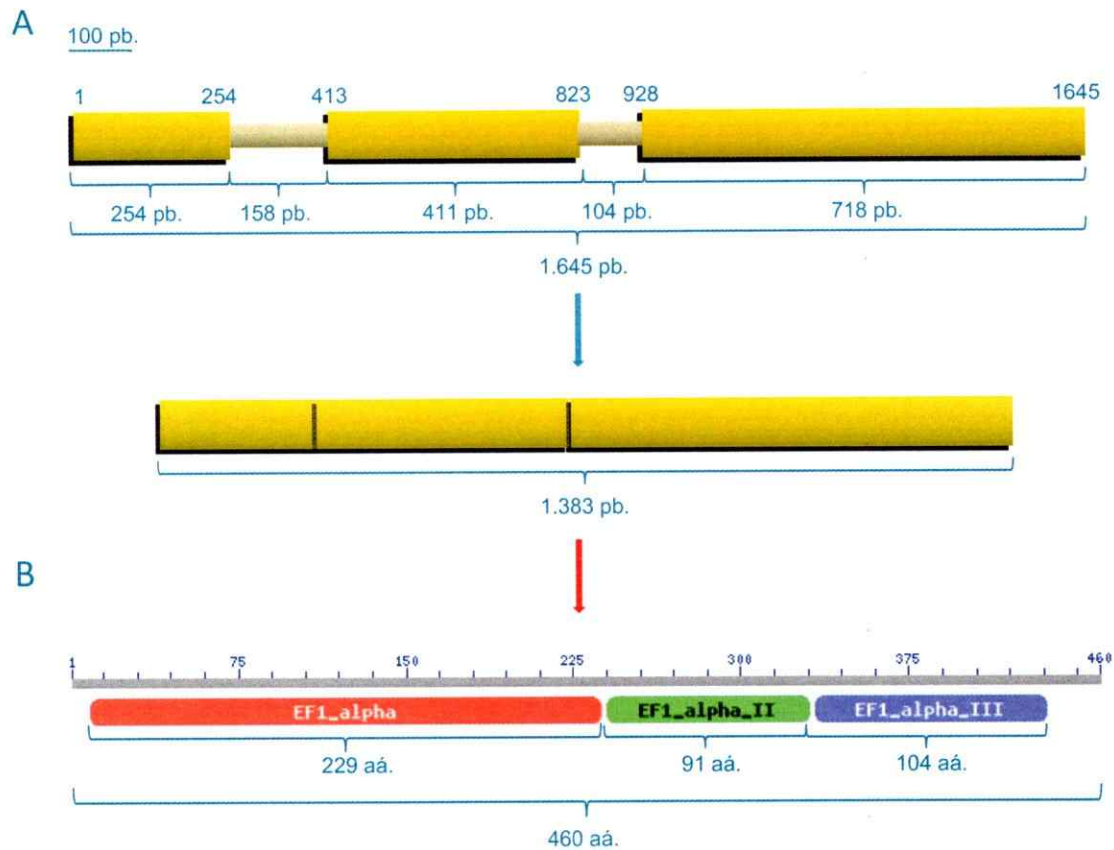
La comparación de la secuencia protéica con la base de datos, indicó un alto grado de similitud de gen *TEF-1 $\alpha$*  de *X. dendrorhous* con los genes ortólogos de *S. comune*, *P. indica*, *C. neoformans* y *C. cinerea*, con una identidad de 92, 91, 90 y 90%, respectivamente.



**Figura 13. Comparación entre las secuencias del DNA genómico del gen *TEF-1 $\alpha$*  de *X. dendrorhous* y del cDNA de *C. neoformans*.**

En **amarillo** se indican las bases idénticas de la región codificante del gen *TEF-1 $\alpha$*  y en **verde** los potenciales intrónes. La comparación de secuencia permitió definir la relación exón-intrón. El posterior clonamiento del cDNA del gen *TEF-1 $\alpha$*  de *X. dendrorhous* corroboró estos resultados.





**Figura 14. Análisis del cDNA del gen *TEF-1α*.**

Estructura exón-intrón del gen *TEF-1α*. **A)** La región codificante tiene un tamaño de 1.645 pb y está interrumpida por 2 intrones de 158 y 104 pb., generando un ORF de 1.383 pb. **B)** Comparación de la secuencia aminoacídica deducida del gen *TEF-1α* con la base de datos. Se observan 3 dominios altamente conservados en los factores de elongación.

Por otro lado, se buscó una potencial región codificante de otro(s) gen(es) en la secuencia del fragmento genómico que contenía el gen *TEF-1 $\alpha$* . La comparación de esta secuencia con la base de datos nucleotídica (blastn), no permitió definir ningún posible gen. Sin embargo, la búsqueda de potenciales marcos abiertos de lectura con la herramienta "ORF Finder", además de una comparación de la secuencia traducida con la base de datos traducida (tblastx), permitió definir en la posición 4.708 el posible inicio de la traducción del gen *HMGCL* que codificaría para la enzima 3 hidroxil-3-metilglutaril-coenzima A liasa.

#### **4.2.2. Análisis del promotor del gen *TEF-1 $\alpha$* .**

El análisis de la región río arriba del codón de inicio de la traducción del gen *TEF-1 $\alpha$* , permitió definir una potencial caja TATA, además de varias cajas reguladoras. Por un lado, se encontró una caja tipo UAS<sub>RPG</sub>, (Upstream Activation Sequences for Ribosomal Protein Genes) que se encuentra predominantemente en la región promotora de genes que codifican para componentes del aparato traduccional (Huet y Sentenac, 1987; Idrissi y Piña, 1999). Esta región funciona como un elemento "enhancer" en *S. cerevisiae*, siendo esencial en los promotores de los genes que son altamente transcritos (Woudt y cols., 1986; 1987). Por otro lado, se encontró una caja tipo HOMOL1, que posee una función similar a la región UAS<sub>RPG</sub> (Rotenberg y Woolford, 1986; Vignais y cols., 1990). Ambas regiones, permitieron definir el promotor en un fragmento de 400 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción.

#### **4.3. Resistencia a higromicina B.**

El antibiótico higromicina B se utiliza para la selección de un gran número de organismos, que va desde bacterias hasta células de mamíferos. En levaduras, generalmente se utilizan concentraciones que varían desde los 50 µg/ml hasta los 1.000 µg/ml, ya que se ha observado la alta resistencia de éstas. Sin embargo, *X. dendrorhous* mostró una gran sensibilidad a bajas concentraciones del antibiótico. Este resultado permite postular que el uso de este método de selección podría ser más sensible y efectivo que el uso de otros antibióticos. Además, actualmente se utiliza la selección al antibiótico G-418, pero se ha observado que se requiere que este marcador de selección se encuentre en multicopia en el genoma de *X. dendrorhous* para que se puedan seleccionar las cepas transformantes de las no transformantes (Wery y cols., 1998).

#### **4.4. Transformación de *X. dendrorhous*.**

Estudios acerca de la estructura del rDNA en *X. dendrorhous*, han demostrado la presencia de 3 agrupaciones en 3 cromosomas distintos, repetidas 12, 14 y 35 veces (Wery, 1998). Por este motivo, para aumentar la eficiencia de transformación, se ha utilizado esta región como blanco para la inserción de los genes marcadores de selección, así como también de los genes de la ruta de biosíntesis de astaxantina. Sin embargo, debido a la dependencia que existe entre la biosíntesis de astaxantina y la dosis génica de los genes que participan, este método no permite hacer un estudio minucioso de este proceso.

El estudio genético de esta levadura, ha indicado que los genes estructurales de la ruta de biosíntesis de astaxantina se encuentran en copia única en el genoma haploide de ésta. Por lo tanto, la utilización de alguno de estos genes como blanco de

transformación, permite controlar el número de copias en que se encuentra el gen marcador. Además, debido a que la mutación de estos genes interrumpe la biosíntesis de astaxantina en diferentes pasos, las colonias transformantes presentan cambios en su pigmentación, permitiendo tener otro mecanismo de selección y chequeo de los transformantes por cambio de color de sus colonias.

## **5. CONCLUSIONES**

1. 400 pb de la región río arriba del codón de inicio de la traducción del gen *TEF-1 $\alpha$*  son suficientes para controlar la transcripción eficiente del gen *hph* de *E. coli* en *X. dendrorhous*, confiriéndole resistencia al antibiótico higromicina B a las colonias transformadas con este casete.
2. El origen bacteriano del gen *hph* no afecta significativamente su expresión en la levadura *X. dendrorhous*, permitiendo su utilización directa como marcador de selección.
3. La utilización de regiones reguladoras propias de la levadura, otorgan una mayor eficiencia a los sistemas de transformación.
4. La transformación de *X. dendrorhous* por recombinación homóloga dirigida, permite la modificación controlada del genoma de la levadura, facilitando el estudio de procesos que dependen de la dosis de los genes que participan en estos.
5. Para obtener mutantes de *X. dendrorhous* que carecen de la actividad fitoeno desaturasa, se requiere de dos eventos integrativos mutacionales en el locus *crtI*, evidenciando la condición diploide de la levadura.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

- Adrio J. y Veiga M. 1995. Transformation of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Tech.* 9:509-512.
- Andrewes A., Phaff J. y Starr M. 1976. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*. A red pigmented fermenting yeast. *Phytochem.* 15:1003-1007.
- 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. 1997. Photosensitization of the yeast *Phaffia rhodozyma* at a low temperature for screening carotenoid hyperproducing mutants. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 66:263-268.
- Armstrong G. 1994. Eubacteria show their true colors: genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *J. Bacteriol.* 176:4795-4802.
- Bon J., Leathers T. y Jayaswal R. 1997. Isolation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Lett.* 19:109-112.
- Britton G. 1998. Overview of carotenoid biosynthesis. *En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.), Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism.* pp 13-147. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin.
- Burland T., Pallotta D., Tardif M., Lemieux G. y Dove W. 1991. Fission yeast promoter-probe vectors based on hygromycin resistance. *Gene.* 100:241-245.
- Calo P. y González T. 1995. The yeast *Phaffia rhodozyma* as an industrial source of astaxanthin. *Microbiología.* 11:386-388.
- Canfield L., Forage J. y Valenzuela J. 1992. Carotenoids as cellular antioxidants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 2000:248-254.
- Cottrelle P., Thiele D., Price V., Memet S., Micouin J., Marck C., Buhler J., Sentenac A. y Fromageot P. 1985. Cloning, nucleotide sequence, and expression of one of two genes coding for yeast elongation factor 1 alpha. *J. Biol. Chem.* 260:3090-3096.
- Davies J. y Jimenez A. 1980. A new selective agent for eukaryotic cloning vectors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29:1089-92.
- Edge R. y Truscott T. 1999. Carotenoid radicals and the interaction of carotenoids with active oxygen species. *En H. A. Frank, A. J. Young, G. Britton y R. G. Cogdell (eds.), The photochemistry of carotenoids.* pp. 223-234. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- 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.
- Goldstein A. y McCusker J. 1999. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 15:1541-1553.



- Golubev W. 1995. Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Yeast*. 11:101-110.
- Guldener U., Heck S., Fielder T., Beinhauer J. y Hegemann J. 1996. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 24:2519-2524.
- Hansen J., Felding T., Johannesen P., Piskur J., Christensen C. y Olesen K. 2003. Further development of the cassette-based pYC plasmid system by incorporation of the dominant *hph*, *nat* and *AUR1-C* gene markers and the *lacZ* reporter system. *FEMS Yeast Res.* 4:323-327.
- Hirschberg J. 1998. Molecular biology of carotenoid biosynthesis. *En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.), Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism.* pp 149-194. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin.
- Hoshino T., Ojima K., y Setoguchi Y. 2000. Astaxanthin synthetase. Hoffman-LaRoche, European Patent No. 1035206-A3
- Hua J., Meyer J. y Lodge J. 2000. Development of positive selectable markers for the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7:125-128.
- Huet J. y Sentenac A. 1987. TUF, the Yeast DNA-Binding Factor Specific for UASrpg Upstream Activating Sequences: Identification of the Protein and Its DNA-Binding Domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:3648-3652.
- Idrissi F. y Piña B. 1999. Functional divergence between the half-sites of the DNA-binding sequence for the yeast transcriptional regulator Rap1p. *Biochem. J.* 341:477-482.
- Inagaki Y. y Doolittle W. 2000. Evolution of the eukaryotic translation termination system: origins of release factors. *Mol. Biol. Evol.* 17:882-889.
- Janssen G., van Damme H., Kriek J., Amons R., y Moller W. 1994. The subunit structure of elongation factor 1 from *Artemia*. Why two alpha-chains in this complex?. *J. Biol. Chem.* 269:31410-31417.
- Jiménez A. y Davies J. 1980. Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. *Nature.* 287:869-871.
- Johnson E. y Lewis M. 1979. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* 115:173-183.
- Johnson E. 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 Schroeder W. 1995. Astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Stud. Mycol.* 38:81-90.

Karnaukhov V. 1990. Carotenoids: recent progress, problems and prospects. *Comp. Biochem. Physiol.* 95:1-20.

Kitamoto K., Matsui J., Kawai Y., Kato A., Yoshino S., Ohmiya K. y Tsukagoshi N. 1998. Utilization of the TEF1-alpha gene (*TEF1*) promoter for expression of polygalacturonase genes, *pgaA* and *pgaB*, in *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50:85-92.

Larkin J., Thompson J. y Woolford J. 1987. Structure and expression of the *Saccharomyces cerevisiae* *CRY1* gene: a highly conserved ribosomal protein gene. *Mol. Cell. Biol.* 7:1764-1775.

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.

Liaaen-Jensen S. 1998. Carotenoids in chemosystematics. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen y H. Pfander (eds.), *Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism*. pp 217-247. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin.

Lorenz R. y Cysewski G. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *TIBTECH.* 18:160-167.

Marchler-Bauer A. y Bryant S. 2004. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.* 1;32.

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

Matheny P. et al. 2006. Contributions of *rpb2* and *tef1* to the phylogeny of mushrooms and allies (Basidiomycota, Fungi). *Mol. Phylogenet. Evol.* doi:10.1016/j.ympev.2006.08.024.

Medwid R. 1998. *Phaffia rhodozyma* is polyploidy. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 21:228-232.

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

Moehle C. y Hinnebusch A. 1991. Association of *RAP1* binding sites with stringent control of ribosomal protein gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 11: 2723-2735.

Mumberg D., Muller R., y Funk M. 1995. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene.* 156:119-122.

- Nakazato L., Dutra V., Broetto L., Staats C., Vainstein M. y Schrank A. 2006. Development of an expression vector for *Metarhizium anisopliae* based on the tef-1alpha homologous promoter. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72:521-528.
- Pronk J. 2002. Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2095-2100.
- Raue H. 1994. Metabolic stability of mRNA in yeast—a potential target for modulating productivity?. *Trens. Biotechnol.* 12:444-449.
- Retamales P., León R., Martínez C., Hermosilla G., Pincheira G., y Cifuentes V. 1998. Complementation analysis with new genetics markers in *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 73:229-236.
- Rösel H. y Kunze G. 1998. Integrative transformation of the dimorphic yeast *Arxula adenivorans* LS3 based on hygromycin B resistance. *Curr. Genet.* 33:157-163.
- Rotenberg M., y Woolford J. 1986. Tripartite upstream promoter element essential for expression of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal protein genes. *Mol. Cell. Biol.* 6:674-687.
- Sambrook J. y Russell D. 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sato M., Dhut S. y Toda T. 2005. New drug-resistant cassettes for gene disruption and epitope tagging in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast.* 22:583-591.
- Schmidt-Dannert C. 2000. Engineering novel carotenoids in microorganism. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:255-261.
- Schroeder W. y Johnson E. 1993. Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* 139:907-912.
- Schroeder W. y Johnson E. 1995. Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage. *J. Ind. Microbiol.* 14:502-517.
- Song J., Picologlou S., Grant C., Firoozan M., Tuite M. y Liebman S. 1989. Elongation factor EF-1 alpha gene dosage alters translational fidelity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 9:4571-4575.
- Verdoes J., Krubasik P., Sandmann G. y van Ooyen A. 1999a. Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Mol. Gen. Genet.* 262:453-461.
- Verdoes J., Misawa N. y van Ooyen A. 1999b. Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnol. Bioeng.* 63:750-755.

- Verdoes J., Sandmann G., Visser H., Diaz M., van Mossel M., y van Ooyen A. 2003. Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). Appl. Environ. Microbiol. 69:3728-3738.
- Vignais M., Woudt L., Wassenaar G., Mager W., Sentenac A. y Planta R. 1987. Specific binding of TUF factor to upstream activation sites of yeast ribosomal protein genes. EMBO J. 6:1451-1457.
- Vignais M., Huet J., Buhler J. y Sentenac A. 1990. Contacts between the factor TUF and RPG sequences. J. Biol. Chem. 265:14669-14674.
- Visser H., van Ooyen A. y Verdoes J. 2003. Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. FEMS Yeast Res. 4:221-231.
- Wery J., Gutker D., Renniers A., Verdoes J. y van Ooyen A. 1997. High copy number integration into the ribosomal DNA of the yeast *Phaffia rhodozyma*. Gene. 184:89-97.
- Wery J. 1998. Genetics of the yeast *Phaffia rhodozyma*. Yeast. 47:7-8.
- Wery J., Verdoes J. y van Ooyen A. 1998. Efficient transformation of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. Biotechnol. Tech. 12:339-405.
- Woudt L., Smit A., Mager W. y Planta R. 1986. Conserved sequence elements upstream of the gene encoding yeast ribosomal protein L25 are involved in transcription activation. EMBO J. 5:1037-1040.
- Woudt L., Mager W., Beek J., Wassenaar G. y Planta R. 1987. Structural and putative regulatory sequences of the gene encoding ribosomal protein L25 in *Candida utilis*. Curr. Genet. 12:193-198.
- Yamada Y. y Kawasaki H. 1989. The genus *Phaffia* is phylogenetically separate from the genus *Cryptococcus* (Cryptococcaceae). Agric. Biol. Chem. 53:2845-2846.