

UCH-FC
Biotecnología
R763
C1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**PARTICIPACIÓN DEL GEN *Farnesil Pirofosfato Sintasa (FPS)*
EN LA BIOSÍNTESIS DE ASTAXANTINA 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
Ignacio Andrés Romero Hinrichsen
Junio, 2010



Director de Seminario de Título:
Dr. Víctor Cifuentes Guzmán
Co-Director de Seminario de Título:
Mg. Mauricio Niklitschek



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. Ignacio Andrés Romero Hinrichsen.

“PARTICIPACIÓN DEL GEN *Farnesil Pirofosfato Sintasa (FPS)* EN LA BIOSÍNTESIS DE ASTAXANTINA EN *Xanthophyllomyces dendrorhous*.”

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

Dr. Víctor Cifuentes
Director Seminario de Título

Mg. Mauricio Niklitschek
Co-Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Presidente Comisión

Evaluador

[Firma]

[Firma]

[Firma]

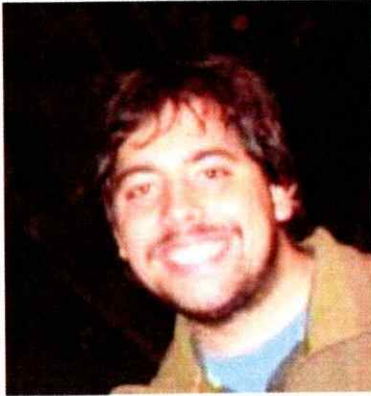
[Firma]



Santiago de Chile, 8-10-2010



BIOGRAFÍA



Nací el 5 de noviembre de 1986 en Santiago, viví hasta los 5 años en Santiago. Luego, durante 1 año, por motivos de trabajo de mi padre, me fui junto con mi familia a Londres, Inglaterra. En este lugar asistí a clases, teniendo que aprender inglés, para poder entenderme con mis compañeros de colegio. Junto a mi papá (Leopoldo Romero), mamá (Mónica Hinrichsen) y mis 2 hermanos (Pía y Francisco), recorrí algunos lugares de Europa, los cuales dejaron difusos recuerdos en mi memoria. Al volver a Santiago y pasar el tiempo estudié en 3 colegios distintos: colegio Clerck (el cual no existe en la actualidad), colegio Terranova y colegio Sto. Domingo de Guzmán (ex San Juan de la Cruz). Mis más grandes amigos (Pablo, Nico, Krüger, Cony, Tomás, Javier) los hice en este último colegio donde pase desde segundo a cuarto año de enseñanza media. Acá reafirmé mi interés por la biología y donde tomé la decisión de estudiar biotecnología.

En la Universidad conocí a muchos compañeros entre ellos uno de mis mejores amigos, Bryan, y mi actual pareja, Valentina. Con ellos compartí fiestas, estudio y "aventuras" acampando en distintos lugares de Chile. El tiempo pasó rápido e ingresé al laboratorio del Dr. Víctor Cifuentes, con quien conversé a menudo en el pasillo sobre cómo iban las cosas en la carrera y cuyo curso, genética, me motivó en mi elección. En el laboratorio conocí a muchos compañeros de trabajo, entre ellos Mauricio, quien se encargó de guiarme y enseñarme en el laboratorio. Actualmente sigo trabajando en el mismo lugar y mi estadía se alargará por un tiempo más.

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a mi profesor tutor Víctor Cifuentes por acogerme en su laboratorio, en el cual he conocido a un montón de personas agradables, con las cuales he compartido mi tiempo de trabajo y libre también. Quiero agradecer a las personas del laboratorio que me enseñaron como realizar los experimentos. Particularmente agradezco a Mauricio Niklitschek quien me guió durante todo este trabajo, enseñándome gran parte de las técnicas que utilizo, los fundamentos detrás de estas y finalmente por la paciencia y disponibilidad que siempre tuvo para atender mis dudas.

Quiero agradecer a mi familia por apoyarme en este proceso, en los momentos buenos y en aquellos difíciles. A mi mamá, a mi papá, a mi hermano y a mi polola, Valentina, que es la que más cerca mío ha estado en los momentos en que necesité apoyo para continuar con ánimo esta tarea.

Finalmente quiero agradecer a todos mis amigos, los del colegio y mis amigos de la universidad. Los primeros por su apoyo incondicional, sin entender mucho en lo que trabajo, pero apoyándome siempre y los segundos por estar ahí inventando panoramas con los cuales distraernos y prestándome ayuda como lo es un lugar donde dormir cuando el trabajo se extendía hasta muy tarde.

Gracias a todos por su ayuda, por estar ahí y por haber hecho este trabajo posible.

Financiada por Fondecyt 1100324 e Innova Corfo 07CN13PZT-17.



2.3.13. Transformación de <i>X. dendrorhous</i>	17
2.4. Extracción y análisis de pigmentos	17
2.4.1. Extracción de pigmentos	17
2.4.2. Análisis de pigmentos	18
2.4.2.1. Cuantificación de pigmentos por espectrofotometría	18
2.4.2.2. Análisis de composición de pigmentos por cromatografía líquida de fase reversa	19
2.5. Análisis de secuencias	19
2.6. Obtención de cepas mutantes homocigotas de <i>X. dendrorhous</i>	20
3. RESULTADOS	21
3.1. Secuenciación del gen <i>FPS</i> de <i>X. dendrorhous</i>	21
3.2. Obtención de plásmido con el gen <i>FPS</i> interrumpido por el módulo de resistencia a higromicina	23
3.1. Obtención de cepas mutantes del gen <i>FPS</i> de <i>X. dendrorhous</i>	25
3.1.1. Transformación de <i>X. dendrorhous</i> y selección de transformantes	25
3.1.2. Análisis de cepas transformantes	28
3.1.1. Obtención de cepas homocigotas mediante método del doble recombinante.....	28
3.2. Análisis de pigmentos	37
3.3. Curva de crecimiento	39
4. DISCUSIÓN.....	42
4.1. Secuenciación del gen <i>FPS</i> de <i>X. dendrorhous</i>	43
4.2. Análisis de cepas mutantes para el gen <i>FPS</i> en <i>X. dendrorhous</i>	43
4.2.1. Obtención de cepas mutantes homocigotas para el gen <i>FPS</i>	43
4.2.2. Crecimiento de cepas mutantes para el gen <i>FPS</i>	45
4.3. Participación del gen <i>FPS</i> en la biosíntesis de carotenoides.	45
5. CONCLUSIONES	47
6. REFERENCIAS	48



INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cepas y plasmidios utilizados en este trabajo.	11
Tabla 2: Partidores utilizados en este trabajo	13



INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Rutas de biosíntesis del GGPP.	3
Figura 2: Ruta de biosíntesis de la astaxantina.	6
Figura 3: Mapa del plasmidio pFPS.....	22
Figura 4: Obtención de gen <i>FPS</i> mutante mediante deleción parcial del gen e inserción de un módulo de higromicina.	24
Figura 5: Chequeo de pFPS-H mediante digestión con enzimas de restricción.	26
Figura 6: Recombinación y reemplazo del alelo silvestre del gen <i>FPS</i> por una versión mutada del mismo.....	27
Figura 7: Obtención de cepa mutante para el gen <i>FPS</i>	29
Figura 8: Análisis de cepas transformantes portadores del gen <i>FPS</i> mutado.	30
Figura 9: Método del doble recombinante.....	31
Figura 10: Obtención de cepas mutantes homocigotas para el gen <i>FPS</i>	33
Figura 11: Obtención de cepas mutantes homocigotas ⁵⁵⁴ para el gen <i>crtl</i>	34
Figura 12: Obtención de cepas homocigotas mediante el método del doble recombinante.	35
Figura 13: Amplificación por PCR de los alelos mutante y silvestre del gen <i>FPS</i> en colonias sometidas al MDR.	36
Figura 14: Pigmentos producidos por las cepas UCD67-385 (silvestre) y <i>FPS</i> -H, durante el cultivo en medio sólido.	38
Figura 15: Composición de pigmentos de las cepas UCD67-385 y <i>FPS</i> -H.....	40
Figura 16: Curva de crecimiento de las cepas UCD67-385 y <i>FPS</i> -H.....	41

INDICE DE ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
D.O.	Densidad óptica
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EtOH	Etanol
FPP	Farnesil pirofosfato
FPS	Farnesil pirofosfato sintasa
GPP	Geranil pirofosfato
GGPP	Geranilgeranil pirofosfato
GGPS	Geranilgeranil pirofosfato sintasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
Hyg	Higromicina B
IPP	Isopentenil pirofosfato
kb	kilobases
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
min	Minuto(s)
pb	pares de bases
ORF	Marco abierto de lectura
pBS	Plasmidio Bluescript SKM
ppm	partes por millón (μg pigmentos/g biomasa)

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	revoluciones por minuto
s	segundos
STM	tampón Sacarosa-Tris-MgCl ₂
TAE	Tampón Tris-acetato-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tampón Tris-EDTA
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U	Unidades enzimáticas
UV	Ultravioleta
YM	Medio de cultivo extracto de levadura-malta

RESUMEN

Los terpenos son una amplia familia de moléculas orgánicas caracterizadas por su diversidad estructural y funcional, así como por su biosíntesis, la cual comienza con la síntesis del isopentenil pirofosfato (IPP) (5C) y su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (5C). Estos son condensados para formar el primer terpeno, el geranil pirofosfato (GPP) (10C). Luego, la adición secuencial de moléculas de IPP al GPP dan lugar al farnesil pirofosfato (FPP) (15C) y geranilgeranil pirofosfato (GGPP) (20C). Condensaciones y otras modificaciones generan los distintos grupos de terpenos, como los pigmentos carotenoides. Entre ellos destaca la astaxantina un pigmento que es sintetizado por unos pocos organismos, particularmente por la levadura basidiomicete *Xanthophyllomyces dendrorhous*. En esta los estudios han sido enfocados principalmente a la síntesis del pigmento. Sin embargo, los pasos tempranos del proceso carotenogénico, no han sido estudiados con mayor énfasis. Recientemente, se ha descrito la existencia del gen *farnesil pirofosfato sintasa (FPS)* en el genoma de la levadura, el cual codificaría para una enzima farnesil pirofosfato sintasa, la cual participaría en etapas tempranas de la carotenogenesis, sintetizando FPP a partir de IPP y DMAPP, producto que luego sería usado como sustrato por la enzima codificada por el gen *crtE*, para formar el GGPP.

En esta tesis se estudió la participación del gen *FPS* en la carotenogénesis en *X. dendrorhous*. Para ello, se obtuvo una cepa mutante heterocigota para gen el *FPS* y mediante el método del doble recombinante también se intentó obtener una cepa mutante homocigota pero sin éxito, sugiriendo que este gen cumpliría una función esencial en la levadura. La cepa mutante heterocigota se creció para determinar la cantidad y composición de pigmentos, en comparación con la cepa de silvestre. La

cepa mutante presentó una disminución en la cantidad de pigmentos totales, especialmente en etapas iniciales del crecimiento. Además, mostró una reducción en la proporción de astaxantina en favor de otros carotenoides, particularmente el β -caroteno. De esta manera, las alteraciones observadas en la composición y la cantidad de pigmentos producidos por la cepa mutante para el gen *FPS*, sugieren la participación de este gen en la biosíntesis de astaxantina.

ABSTRACT

Terpenes are a broad family of organic molecules characterized by their structural and functional diversity, as well as biosynthesis, which begins with the synthesis of isopentenyl pyrophosphate (IPP) (5C) and its isomer dimethylallyl pyrophosphate DMAPP (5C). These are condensed to form the first terpene, the geranyl pyrophosphate (GPP) (10C). Then, the sequential addition of IPP to GPP molecules give rise to the farnesyl pyrophosphate (FPP) (15C) and geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) (20C). Condensation and other modifications generate the different groups of terpenes, such as carotenoids. Among them the pigment astaxanthin is synthesized by a few agencies, particularly the basidiomycete yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. In it, studies have been primarily focused on the synthesis of the pigment. However, the early steps of the carotenogenic process have not been studied with greater emphasis. Recently the existence of the *farnesyl pyrophosphate synthase (FPS)* gene in the yeast genome, which encode for an enzyme farnesyl pyrophosphate synthase was described, which participate in early stages of carotenogenesis, synthesizing FPP from IPP and DMAPP, a product that would later be used as substrate for the enzyme coded by the *crtE* gene, to form GGPP.

In this thesis we studied the involvement of the *FPS* gene in carotenogenesis in *X. dendrorhous*. To this end, we obtained a mutant strain heterozygous for the *FPS* gene and by double recombinant method we also tried to obtain a homozygous mutant strain ,but without success, suggesting that this gene may play an essential role in yeast. The heterozygous mutant strain was grown to determine the amount and composition of pigments, in comparison with the wild strain. The mutant strain showed a decrease in the amount of total pigments, especially in early stages of growth. It also showed a

reduction in the proportion of astaxanthin in favor of other carotenoids, particularly the β -carotene. Thus, the observed alterations in the composition and amount of pigments produced by the mutant strain for the *FPS* gene suggest the involvement of this gene in the biosynthesis of astaxanthin.

1. INTRODUCCIÓN

Los terpenos son una familia de moléculas orgánicas hidrocarbonadas que contienen más de 30.000 compuestos, los cuales han sido aislados principalmente a partir de plantas y microorganismos. Su función biológica es variada, siendo utilizados en la naturaleza, como pigmentos, hormonas, agentes defensivos, agentes fotoprotectores, constituyentes de la membrana celular, entre otras muchas funciones (Sacchetti y Poulter, 1997).

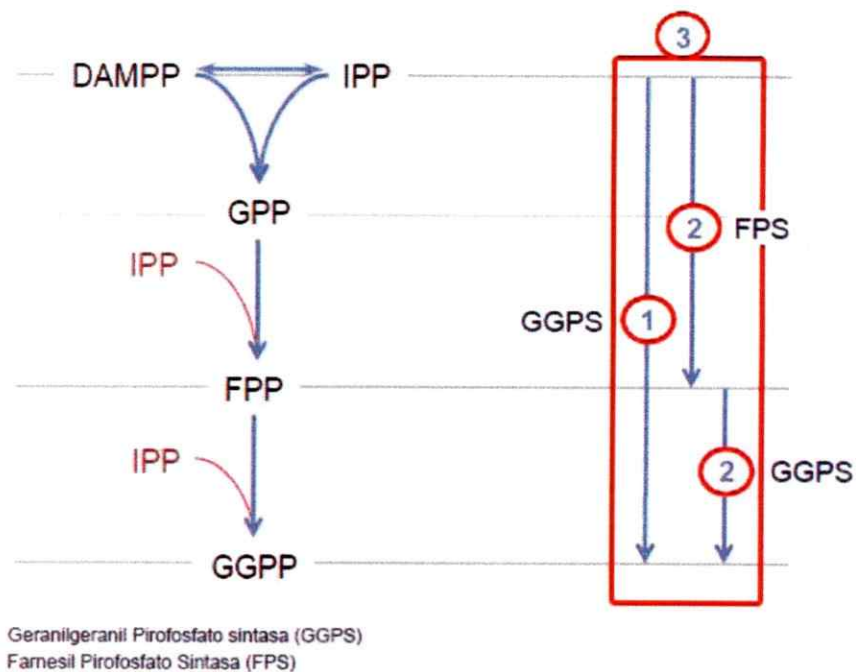
A pesar de su gran variedad, todos los terpenos son formados a partir de la condensación de moléculas de 2-metil-1,3-butadieno, una molécula de 5 átomos de carbono también denominada isopreno. La condensación de las moléculas de isopreno se realiza a través de sus formas activadas dimetilalil pirofosfato (DMAPP) e isopentenil pirofosfato (IPP), pudiendo ocurrir de 2 formas distintas, 1 - 4 (cabeza - cola) o 4 - 4 (cabeza - cabeza). (Ruzicka, 1994; McGarvey y Croteau, 1995).

La elongación de la cadena de terpenos se puede producir por la adición sucesiva de moléculas de IPP, o por la condensación de terpenos de mayor tamaño. No obstante, e independientemente del modo en que se generen los terpenos, éstos se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que componen la molécula. Es así como se pueden distinguir los hemi- (5C), mono- (10C), sesqui- (15C), di- (20C), tri- (30C), tetra- (40C) y otros terpenos de cadena más larga. La cadena de terpenos puede sufrir modificaciones posteriores como hidroxilaciones, metilaciones o

ciclaciones. Cuando esto sucede, la molécula resultante se denomina terpenoide. Sin embargo, por motivos de simplicidad también se llama terpenos a este conjunto de moléculas.

La biosíntesis de los terpenos se puede dividir en 4 etapas: (1) En la primera etapa se sintetiza el IPP y su isómero DMAPP. (2) Luego, se realiza la elongación de la molécula, mediante la adición sucesiva de moléculas de IPP. (3) Posteriormente, continua con la condensación, alquilación o ciclado de los terpenos que han sido generados en las etapas previas. (4) Finalmente, se realizan distintas modificaciones a la cadena de isoprenos, tales como oxidaciones, reducciones, isomerizaciones entre otras, las cuales confieren las distintas características y funciones a estas moléculas.

En la primera etapa, se conocen 2 vías para la síntesis del IPP: la vía del ácido mevalónico (MVA), presente en arqueas, hongos, plantas y animales, y la vía de la deoxi xilulosa 5-fosfato o DOXP/MEP descrita para bacterias y plastidios de plantas. (Lichtenthaler, 2000; Lee y Schmidt-Dannert, 2002). En hongos filamentosos y levaduras, se ha descrito que la síntesis del IPP ocurre a través de la vía mevalónica (Lange y cols., 2000), y que éste es isomerizado por la enzima isopentenil difosfato isomerasa (IDI) para dar lugar al DMAPP. Posteriormente ambas moléculas, IPP y DMAPP, son utilizadas para sintetizar el geranyl pirofosfato (GPP). Luego, adiciones sucesivas de IPP llevan a la formación de farnesil pirofosfato (FPP) y geranylgeranyl pirofosfato (GGPP). Para la síntesis de esta última molécula se ha descrito la existencia de 2 sistemas, los cuales difieren entre sí en el número de enzimas que participan (Liang y cols., 2002) (Figura 1).



Modificado de Niklitschek, 2008

Figura 1: Rutas de biosíntesis del GGPP.

Esquema de la biosíntesis del GGPP. Ésta puede ocurrir de 2 modos distintos. 1) Por la acción de una enzima GGPS que es capaz de catalizar todos los pasos desde el IPP y DMAPP hasta GGPP, 2) por la acción conjunta de las enzimas FPS y GGPS, donde la primera sintetiza el FPP que es tomado por la segunda para generar GGPP. Adicionalmente se ha descrito un tercer sistema 3) donde se encuentran los 2 mecanismos previamente mencionados en un único organismo, sintetizando el GGPP en forma paralela.

En el sistema I, el GGPP es sintetizado por acción de la enzima geranylgeranyl pirofosfato sintasa (GGPS), la cual cataliza todos los pasos desde la condensación del IPP con DMAPP hasta la síntesis de GGPP (Ohnuma y cols., 1994). En comparación en el sistema II, la síntesis del GGPP es llevada a cabo por la acción conjunta de dos enzimas: la enzima farnesil pirofosfato sintasa (FPS) y la GGPS. En este sistema, la primera enzima genera el FPP, sustrato de la enzima GGPS que le adiciona una molécula de IPP para producir GGPP (Okada y cols., 2000; Niklitschek, 2008)). Adicionalmente existe un sistema híbrido donde el GGPP es sintetizado en paralelo por ambos sistemas mencionados (Saito y cols., 2007). A continuación, los terpenos que se han generado, pueden ser utilizados en 4 procesos distintos: (1) Elongación adicional de la cadena mediante adición secuencial de moléculas de IPP, (2) condensación de los terpenos generados para formar terpenos de mayor tamaño, (3) ciclamiento de uno o ambos extremos de la cadena hidrocarbonada y (4) prenilación de proteínas. Finalmente se observa una etapa que comprende una serie de modificaciones tales como oxidaciones, reducciones, isomerizaciones u otras las cuales producen la diversidad de características de estas moléculas.

En las últimas etapas se sintetizan los carotenos. Estos comprenden a un conjunto de tetraterpenos, que se originan a partir de la unión de 2 moléculas de GGPP. En su estructura química poseen un alto número de enlaces conjugados que confieren a estas moléculas la particularidad de absorber la luz visible en un rango que va de los 400 a 500 nm de longitud de onda, razón por la cual los carotenoides presentan una coloración amarilla, naranja o roja. (Britton, 1995). Sus funciones son variadas pero destacan entre ellas su participación como pigmentos accesorios en la fotosíntesis y su poder antioxidante (Naguib, 2000). Entre los carotenoides se puede destacar la

astaxantina, una xantófila con una coloración rojo-anaranjado que posee un alto poder antioxidante. El número de organismos que son capaces de sintetizar este pigmento es reducido, entre ellos destaca la levadura basidiomicete *X. dendrorhous*. Ésta es capaz de sintetizar una amplia variedad de carotenos entre los cuales se encuentra el licopeno, el β -caroteno y el fitoeno por nombrar algunos. Sin embargo, la astaxantina ocupa un lugar privilegiado constituyendo entre un 83 - 87 % de los pigmentos totales de la célula. Por ésta razón la levadura ha sido objeto de estudios biotecnológicos dirigidos al esclarecimiento de la ruta de biosíntesis y la sobreproducción de la astaxantina (An y cols., 1989).

Los estudios realizados en *X. dendrorhous* han conducido a conocer los genes y enzimas involucradas en este proceso (Figura 2). Este comienza con la condensación cabeza/cabeza de 2 moléculas de GGPP formando fitoeno, reacción que es catalizada por una enzima bifuncional fitoeno- β -caroteno-sintasa (McCarthy y cols., 2004). Esta enzima, tiene actividades fitoeno sintasa y licopeno ciclasa (Verdoes y cols., 1999; Alcaíno, 2002) y está codificada en el gen *crtYB*, con una secuencia de 2,3 kb, interrumpida por 4 intrones.

El siguiente paso corresponde a la síntesis de licopeno. Para ello, 4 desaturaciones consecutivas son catalizadas por la enzima fitoeno desaturasa, la cual se encuentra codificada en el gen *crtI* de *X. dendrorhous* (Verdoes y cols., 1999). La región codificante de este gen en la levadura ha sido dilucidada y tiene una longitud de 2,8 kb, interrumpido por 11 intrones. Luego, el licopeno es ciclado en ambos extremos dando lugar al β -caroteno, por la actividad licopeno ciclasa de la enzima fitoeno- β -caroteno-sintasa.

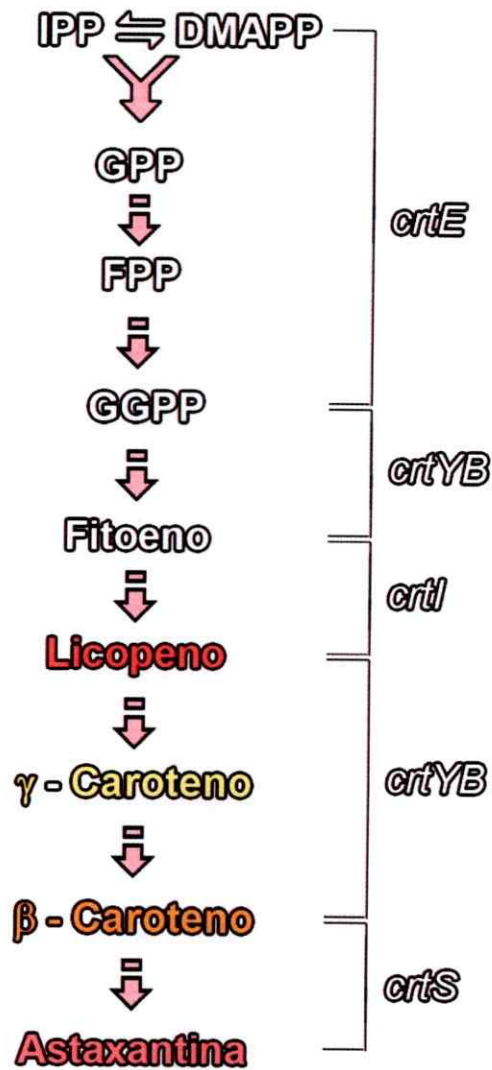


Figura 2: Ruta de biosíntesis de la astaxantina.

Esquema simplificado de la ruta de biosíntesis de astaxantina en *X. dendrorhous*. Se muestra los pasos en los que se encuentran involucrados los distintos genes de carotenogénesis.

El último paso consiste en la hidroxilación y adición de grupos ceto a los extremos del β -caroteno, para dar lugar a la astaxantina. En *X. dendrorhous* se ha reportado que este paso sería catalizado por una única enzima bifuncional codificada en el gen *crtS*.

A pesar de existir numerosos estudios dirigidos al análisis de la ruta de biosíntesis de los carotenos, existen pocos estudios enfocados a los pasos previos a ésta, específicamente en lo que refiere al ingreso de carbono a la vía. En *X. dendrorhous*, para la segunda etapa de síntesis de terpenos, en la síntesis de GGPP, se ha identificado la enzima geranylgeranyl pirofosfato sintasa codificada en el gen *crtE*, el cual tiene una región codificante con una longitud de 2 kb y está interrumpido por 8 intrones. Cepas mutantes para el gen *crtE* mostraron una disminución en la cantidad de pigmentos producidos, sin una alteración en la composición de estos. Adicionalmente en *X. dendrorhous*, se ha descrito la presencia del gen *FPS* el cual codificaría para una enzima con actividad farnesil pirofosfato sintasa (Niklitschek, 2008). La presencia de los genes *crtE* y *FPS* sugiere que el GGPP sería producido en 2 etapas (sistema II), por la acción conjunta de las enzimas FPS y GGPS. Sin embargo, cabe considerar la posibilidad de un sistema híbrido, donde se sintetizaría el GGPP por ambos sistemas, existiendo 2 vías paralelas conducentes a un mismo producto.

La enzima FPS cumple un rol importante en los organismos, dado que sintetiza el FPP. Esta molécula es utilizada en un proceso llamado prenilación de proteínas. Esto consiste en la adición de FPP o GGPP a algunas proteínas las cuales se ha reportado necesitan la adición de dichas moléculas para tener actividad biológica (Schafer y Rine, 1992). El FPP también es precursor del escualeno, el cual a su vez es precursor del

fitosterol, colesterol y ergosterol en plantas, animales y hongos, respectivamente (Rees y cols., 1968; Nes y cols., 1978; Do y cols., 2009). Dichas moléculas son constituyentes esenciales de la membrana celular determinando la fluidez de esta. Por último, el FPP es precursor del GGPP el cual da lugar a los carotenos.

La secuencia del gen que codifica la enzima FPS es conocida para muchos organismos. La comparación de secuencias aminoacídicas ha permitido encontrar 7 regiones conservadas y dentro de estas, 2 motivos FARM (first aspartate rich motif) y SARM (second aspartate rich motif) los cuales se han relacionado con la determinación del largo de la cadena de terpenos sintetizada por la enzima (Ashby y Edwards, 1990; Koyama y cols., 1993).

Actualmente no existen estudios en *X. dendrorhous* dirigidos a determinar la función de la enzima FPS en la carotenogénesis o a dilucidar cuál de los sistemas para la síntesis del GGPP se encuentra presente este organismo. Tampoco se conoce si su función es esencial, y por lo tanto intrínsecamente requerida para la viabilidad de las células de la levadura. Tomando en cuenta lo recién descrito, se ha propuesto que alteraciones en el gen *FPS* provocarían cambios en la cantidad de pigmentos y, posiblemente, alteraciones en el crecimiento de la levadura. Por ello en esta tesis se estudió la participación del gen en la síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*, mediante la generación de cepas mutantes para este gen.

Los objetivos específicos de este trabajo son:

- Obtención de una cepa de *X. dendrorhous* mutante para el gen *FPS*.
- Determinación cuantitativa y cualitativa de los pigmentos de las cepas mutantes de *X. dendrorhous* obtenidas.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Cepas y plásmidos

En este trabajo se utilizó la cepa DH5 α de *E. coli* para el clonado y replicación plasmidial.

Para *X. dendrorhous* se utilizó la cepa silvestre UCD67-385. A partir de ésta se generó la cepa mutante de delección para el gen *FPS*, denominada FPS-H.

Los nombres y descripciones de las cepas y plasmidios utilizados en este trabajo se encuentran en la Tabla 1.

2.2. Condiciones de cultivo

2.2.1. Cultivo de *E. coli*

Los cultivos de *E. coli* se realizaron a 37 °C en tubos de 15 ml con 7 ml de medio Luria-Bertani (Sambrook y Russell, 2001) compuesto de 1% triptona, 0,5% NaCl y 0,5% extracto de levadura. Los cultivos se crecieron durante la noche (12-16 h) en agitador a 200 rpm. Para cultivos en medio sólido se agregó 1,5% de agar - agar como agente gelificante.

2.2.2. Cultivo de *X. dendrorhous*

El cultivo de *X. dendrorhous* se realizó a una temperatura de 22 °C en matraces de 250 ml con 50 - 100 ml de medio (YM) para levaduras (An y cols., 1989) compuesto de 1% glucosa, 0,5% peptona, 0,3% extracto de malta y 0,3% extracto de levadura. Los cultivos se crecieron durante 3 – 5 días en agitador a 150 rpm. Para cultivos en medio sólido se agregó 1,5% de agar-agar como agente gelificante.

Tabla 1: Cepas y plasmidios utilizados en este trabajo.

Cepas		
Nombre	Genotipo / Características relevantes	Fuente / referencia
<i>E. coli</i> DH5 α	F ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZ</i> YA ⁻ <i>argF</i>)U169 <i>deoR</i> <i>recA</i> 1 <i>endA</i> 1 <i>hsdR</i> 17(<i>rk</i> ⁻ , <i>mk</i> ⁺) <i>phoA</i> <i>supE</i> 44 λ ⁻ <i>thi</i> ⁻ 1 <i>gyrA</i> 96 <i>relA</i> 1	GIBCO BRL.
<i>X. dendrorhous</i> UCD67-385	Silvestre, Hyg ^S	American Type Culture Collection. EE.UU.
<i>X. dendrorhous</i> FPS-H	Transformante heterocigoto para el gen <i>FPS</i> (<i>FPS/fps</i> ⁻ :: <i>hph</i>), obtenido por transformación de la cepa silvestre UCD67-385 con el plasmidio pFPS-H. Pigmentación pálida. Hyg ^R	Este trabajo.
<i>X. dendrorhous</i> tCIH	Transformante heterocigoto para el gen <i>crtI</i> (<i>crtI/crtI</i> ⁻ :: <i>hph</i>), obtenido por transformación de la cepa silvestre UCD67-385 con el plasmidio ptCIH. Pigmentación pálida. Hyg ^R	Centro de Biotecnología, Universidad de Chile
Plasmidios		
Nombre	Genotipo / Características relevantes	Fuente / referencia
pBluescript SK ⁻	Vector de clonamiento. Amp ^R .	Stratagene
pFPS	pBluescript que porta el ORF del gen <i>FPS</i> , con un tamaño de 2.635 pb.	Centro de Biotecnología, Universidad de Chile.
pMN-Hyg	pBluescript portador del módulo de resistencia a higromicina B.	Centro de Biotecnología, Universidad de Chile
pFPS-H	Derivado de pFPS portador de una deleción <i>BglII-EcoRV</i> de 2.038 pb y porta el módulo de resistencia a higromicina	Este trabajo.

2.3. Técnicas de biología molecular

2.3.1. Diseño de partidores

Los partidores utilizados en esta investigación se diseñaron a partir de secuencias conocidas del gen *FPS* presentes en la base de datos GenBank o de secuencias obtenidas en nuestro laboratorio. Los nombres y descripción de los partidores utilizados en este trabajo se encuentran en la Tabla 2.

2.3.2. Amplificación del DNA por PCR

El chequeo de clones y transformantes se realizó mediante amplificación del DNA de la región en estudio con la enzima DNA polimerasa *Taq* (obtenida en nuestro laboratorio). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μ l de una solución de Tris-HCl 200 mM pH 8,4, KCl 500 mM, MgCl₂ 2 mM, desoxirribonucleotidos dATP, dGTP, dCTP, dTTP a una concentración de 0,4 mM cada uno, partidores a 1 μ M cada uno, DNA molde 10 – 50 ng y 1 unidad enzimática de DNA polimerasa *Taq*. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Applied Biosystems 2720, utilizando un periodo de denaturación inicial a 95 °C por 3 min (o 5 min para PCR de colonias), 35 ciclos con denaturación a 95 °C por 30 s, unión de partidores a 55 °C por 30 s y elongación de la cadena a 72 °C por 3 min y por último una elongación final de la cadena a 72 °C por 10 min y mantención de la reacción a 4 °C hasta ser chequeada.

2.3.3. Digestiones enzimáticas

Las digestiones se realizaron utilizando las soluciones tampón y condiciones especificadas por los proveedores de las enzimas (New England Biolabs®, Fermentas, Invitrogen).

Tabla 2: Partidores utilizados en este trabajo

Partidores			
Nombre	Secuencia 5' - 3'	Ubicación en el gen	Dirección
Chequeo PCR			
FPSnewF	CTATGTCGATCTGCTAGAGC	(FPS) 913 - 932 →	Directo
FPSnewR	TCGAGCACATCATCCTGAAC	(FPS) ← 1472 - 1491	Reverso
FPS-O1R	TACTTGCTTCGCTTATAGACC	(FPS) ← 2030 - 2051	Reverso
HF	ATGAAAAAGCCTGAACTCACC	(FPS-H) 1438 - 1458 →	Directo
HR	CTA TTC CTT TGC CCT CGG AC	(FPS-H) ← 2538 - 2557	Reverso
Secuenciación			
FPSsecFor1	ACTATCTCCCTGCGTGCATC	521 - 542 →	Directo
FPSsecFor2	TCATCCCGATGGGTGAATAC	1446 - 1465 →	Directo
FPSsecRev1	AGCTTGGAGCTACCATCCGAG	← 606 - 626	Reverso
FPSsecRev2	ACAGAACGTAGAAGGAAGGAAC	← 1551 - 1572	Reverso

2.3.4. Extracción de DNA plasmidial de *E. coli*

La extracción de DNA plasmidial de *E. coli* se realizó a partir de un cultivo crecido con el antibiótico de selección (generalmente ampicilina a 100 µg/ml) a 37 °C, con agitación constante a 200 rpm durante la noche. En caso de ser necesario obtener plásmidos con alto grado de pureza se utilizó los kits Axygen AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit o AxyPrep™ Plasmid Midiprep Kit, dependiendo de la cantidad de DNA plasmidial que se desease obtener.

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

La extracción de DNA genómico se realizó según el método de perlas de vidrio (Sambrook y Russell, 2001), modificado para *X. dendrorhous* (Niklitschek, 2008). Se colectó un cultivo de 2 días, a partir de placas o medio líquido, en un tubo eppendorf. El precipitado obtenido se resuspendió en 500 µl de tampón Tris-EDTA (Tris 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM) y se realizó rompimiento mecánico mediante agitación, con perlas de vidrio, en vórtex. Luego, se lavó dos veces con fenol : cloroformo : alcohol isoamílico (25:24:1) y una vez con cloroformo : alcohol isoamílico (24:1). Se recuperó el sobrenadante, se agregó 2 volúmenes de etanol absoluto y se dejó precipitar el DNA durante la noche a -20 °C. Posteriormente, se centrifugó el DNA eliminándose el etanol y finalmente el precipitado de DNA seco se resuspendió en Tris-EDTA (10 mM: 1 mM) con RNasa A o agua bidestilada estéril.

2.3.6. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

El DNA extraído, amplificado o digerido se sometió a electroforesis en geles de agarosa para su chequeo y purificación en caso de ser necesario. Estos fueron preparados a una concentración de 0,7-1% de agarosa, dependiendo del tamaño del

DNA a visualizar, y teñidos con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml. Como estándar de peso molecular se usó DNA del fago lambda digerido con la enzima de restricción HindIII (Lambda DNA/HindIII Marker 2, de fermentas).

2.3.7. Purificación de DNA desde geles de agarosa

El DNA sometido a electroforesis, para su visualización y análisis, se purificó a partir del gel utilizando dióxido de silicio (Sigma S-5631) (Boyle y Lew, 1995). Para ello, se cortó un bloque de agarosa que contuviera el DNA, y se depositó en un tubo eppendorf, luego se agregó 3 volúmenes de KI 6M, respecto al bloque extraído y se incubó a 55 °C hasta que el bloque se disolviese por completo. Posteriormente, se agregó al tubo 10 µl de glassmilk (dióxido de silicio en KI 6M a una concentración de 100 µg/µl). Se agitó e incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y luego se centrifugó el tubo a 14.000 x g por 1 minuto, eliminándose el sobrenadante. Luego, se lavó el precipitado obtenido 3 veces, con solución "New wash" (Tris-HCl pH 7,5 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA pH 7,5 2,5 mM, EtOH 50%). Finalmente, se eliminó el sobrenadante, se dejó secar el precipitado, se resuspendió en agua bidestilada y se incubó a 55 °C durante 15 minutos para eluir el DNA.

2.3.8. Cuantificación y determinación de tamaño del DNA

La cuantificación y determinación del tamaño de las bandas observadas mediante electroforesis se realizó por comparación de intensidad y migración de las bandas de DNA, respecto al estándar de peso molecular utilizado. El análisis se realizó a través del programa "Kodak® 1D Analysis Software".

2.3.9. Ligado de DNA

Para el ligado de DNA se utilizó la enzima T4 DNA ligasa Invitrogen®. La reacción se realizó según lo indicado por el fabricante, con una relación molar inserto:vector 3:1 y 2,5 U de ligasa en un volumen final de reacción de 20 µl.

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

Se realizó un cultivo de *E. coli* en medio LB con ácido nalidíxico (15 µg/ml) durante la noche (12-16 h). Se inoculó 5 ml de éste, en un matraz con 500 ml de medio LB con ácido nalidíxico (15 µg/ml). Se creció el cultivo a 37 °C, con agitación a 200 rpm, hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0,5 - 0,8. Se colectó las células mediante centrifugación a 4 °C y 4.000 x g por 15 min. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado celular se lavó 2 veces, la primera con 500 ml y luego con 250 ml de agua estéril fría. Luego del segundo lavado, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 20 ml de glicerol 10% (v/v), se centrifugaron y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 2-3 ml de glicerol 10% (v/v). La suspensión se dividió en alícuotas de 40 µl cada una y se almacenó a -80 °C para su posterior utilización.

2.3.11. Transformación de *E. coli* mediante electroporación

La transformación de *E. coli* se realizó mediante electroporación en un electroporador Bio Rad, Genepulser Xcell™. Para ello, se mezcló el DNA transformante con 40 µl de células electrocompetentes en una cubeta de electroporación fría de 2 mm de apertura. Los parámetros de electroporación fueron 2,5 kV, 25 µF y 200 Ω. Luego de la electroporación se agregó 1 ml de medio LB a la cubeta de electroporación y se traspasó el contenido a un tubo eppendorf nuevo estéril.

Este se incubó a 37 °C durante 1h. Luego de ello, se procedió a sembrar las células en placas LB con el antibiótico de selección adecuado.

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

Las células electrocompetentes de *X. dendrorhous* fueron preparadas según fue descrito previamente (Adrio y cols., 1995). Para ello, se inoculó un matraz con 200 ml de medio YM, con un cultivo de *X. dendrorhous* de 48 h a una dilución de 1:100 y se creció a 22 °C con agitación constante hasta una D.O._{600nm} de 4 – 5. Se colectaron las células por centrifugación a 4.000 x g durante 5 min y se resuspendió en 25 ml de tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 7.0 y 25 mM ditioneitol (DTT). Se incubó a 22 °C por 10 minutos. Luego, se lavó las células 2 veces con tampón STM frío compuesto de 270 mM Sacarosa, 10 mM Tris-HCL pH 7.5, 1 mM MgCl₂. Finalmente, se resuspendió en 500 µl de tampón STM frío y las células se mantuvieron en hielo hasta su utilización.

2.3.13. Transformación de *X. dendrorhous*

60 µl de células electrocompetentes de *X. dendrorhous* se mezclaron con 10 - 20 µg de DNA transformante y se depositaron en cubetas de electroporación frías de 2 mm de apertura. Los parámetros de electroporación fueron 450 V, 125 µF, 600 Ω. Luego de electroporar, se agregó 1 ml de medio YM y se transfirió a un tubo eppendorf. Se incubó a 22 °C por 6 horas y se sembró entre 100 - 200 µl en placas YM con higromicina-B (12,5 µg/ml).

2.4. Extracción y análisis de pigmentos

2.4.1. Extracción de pigmentos

La extracción de pigmentos se realizó según el protocolo descrito previamente (An y cols., 1989), modificado en nuestro laboratorio (Niklitschek, 2008). Se colectó las

células, provenientes de 50 ml de cultivo de *X. dendrorhous*, mediante centrifugación a 4.000 x g durante 5 minutos. Posteriormente se lavó 1 vez el precipitado celular con agua destilada y se resuspendió en 1 ml de agua destilada. Luego, se realizó el rompimiento celular mediante agitación en vórtex, con 0,5 ml de perlas de vidrio de 0,5mm. A continuación, se agregó 1 ml de acetona y se agitó en vórtex 5 minutos más. Se centrifugó el tubo a 4.000 x g por 5 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. Posteriormente, se realizaron extracciones sucesivas, con 2 ml de acetona, hasta que los restos celulares quedaron blancos. El sobrenadante obtenido en cada extracción se adicionó al tubo donde se colectó la primera extracción. Luego, a este tubo se le adicionó 1/5 del volumen colectado de éter de petróleo, se agitó en vórtex por 5 minutos y se centrifugó a 4.000 x g por 5 minutos. Finalmente, la fase superior se recuperó en un tubo limpio.

2.4.2. Análisis de pigmentos

2.4.2.1. Cuantificación de pigmentos por espectrofotometría

Los pigmentos se cuantificaron por espectrofotometría en cubetas de infrasil utilizando un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV-150-02. Para ello, se determinó el volumen de éter de petróleo en el cual se extrajeron los pigmentos y se midió su absorbancia a una longitud de onda de 474 nm. La cantidad de carotenoides obtenidos se determinó mediante la siguiente fórmula:

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

Donde:

Abs = Absorbancia medida a 474 nm

10^4 = Constante de conversión de unidades $\mu\text{g} / \text{g}$

cem = Coeficiente de extinción molar de astaxantina (2.100).

2.4.2.2. Análisis de composición de pigmentos por cromatografía líquida de fase reversa

Los pigmentos disueltos en éter de petróleo se secaron a temperatura ambiente, resuspendidos en 100 μ l de acetona y separados en un equipo de HPLC (High-Performance Liquid Chromatography), con una columna de fase reversa RP-18 Lichrocart 125-4 (Merck), utilizado acetonitrilo: metanol: isopropanol (85:10:5 v/v) como fase móvil, con un flujo de 1 ml/min a temperatura ambiente y en condiciones isocráticas. Los espectros de cada máximo de elución se obtuvieron utilizando un detector con arreglos de diodos. Los carotenoides se identificaron de acuerdo a sus espectros de absorción, tiempos de retención y comparación con estándares específicos.

2.5. Análisis de secuencias

Las secuencias nucleotídica se determinaron mediante el uso del kit "BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit" de Applied Biosystems y análisis con un secuenciador ABI 3100 Avant. El procesamiento de los datos se realizó con los programas Chromas versión 1.43 y Sequencing análisis V 3.7. El empalme de secuencias, alineamiento y análisis posterior se realizó con los programas contigexpress 2006, alignX 2006 y vector NTI 10.3, los cuales forman parte del paquete de programas Vector NTI 10.3. Para una mayor exactitud se realizó ajustes manuales a los empalmes y alineamientos realizados.

2.6. Obtención de cepas mutantes homocigotas de *X. dendrorhous*

La obtención de cepas mutantes homocigotas, a partir de cepas mutantes heterocigotas de *X. dendrorhous*, se realizó mediante el método del doble recombinante (MDR) (Niklitschek, 2008). Para esto, se inoculó la cepa mutante heterocigota en 5 ml de medio YM con higromicina B y se incubó durante 2 días a 22 °C con agitación. Luego, se inoculó 100 µl de este cultivo en 5 ml de medio YM con higromicina a una concentración mayor y se incubó durante 2 días a 22 °C con agitación. Se repitió estos pasos partiendo de una concentración de 10 µg/ml de higromicina-B hasta una concentración final de 800 µg/ml. Adicionalmente, 100 µl de las diluciones -2 y -3 de cada cultivo realizado se sembraron en placas YM con higromicina B y crecidas durante 3 días. Aquellas colonias que presentaron diferencias fenotípicas, por ejemplo ser más pálidas, se tomaron y rayaron en placas YM higromicina para posterior análisis.

3. RESULTADOS

3.1. Secuenciación del gen *FPS* de *X. dendrorhous*

En trabajos anteriores se determinó la presencia del gen *FPS* en *X. dendrorhous* (Niklitschek, 2008). Se buscó la existencia del gen *FPS* de la levadura en las bases de datos existente, sin resultados positivos. Posteriormente, se comparó la secuencia aminoacídica de la proteína *FPS* de *Saccharomyces cerevisiae* con la de otros hongos basidiomicetes filogenéticamente relacionados y a partir de éstas se obtuvo a una secuencia consenso a partir de la cual se diseñaron partidores, los cuales se utilizaron para amplificar un pequeño fragmento del posible gen *FPS* en *X. dendrorhous*. El amplificado obtenido se secuenció y comparó con otras secuencias existentes en las bases de datos mediante la herramienta BLAST. En la base de datos de patentes se encontraron aciertos con una identidad de 100%, correspondientes a “producción mejorada de isoprenoides en *Phaffia rodozyma*” y una patente para *X. dendrorhous* (NA: AX012404.1), ninguna de las cuales nombraba de alguna manera al gen obtenido. Posteriormente, el marco abierto de lectura (ORF) de este gen se clonó en el plásmido pBluescript SK, amplificando el gen completo de 2635 pb mediante PCR y posteriormente ligando al vector en el sitio EcoRV, el cual se pierde al ligar el gen (Niklitschek, resultados no publicados)(Figura 3).

En este trabajo el gen se secuenció en su totalidad. Para ello, se utilizaron los partidores *FPSsecFor1*, *FPSsecFor2*, *FPSsecRev1*, *FPSsecRev2*, proporcionando cobertura total del gen *FPS*. Al comparar las secuencias de *X. dendrorhous* ya mencionadas con la secuencia obtenida reveló muy pocas diferencias. Se analizaron 3 sustituciones nucleotídicas encontradas en la región codificante del gen *FPS*. La

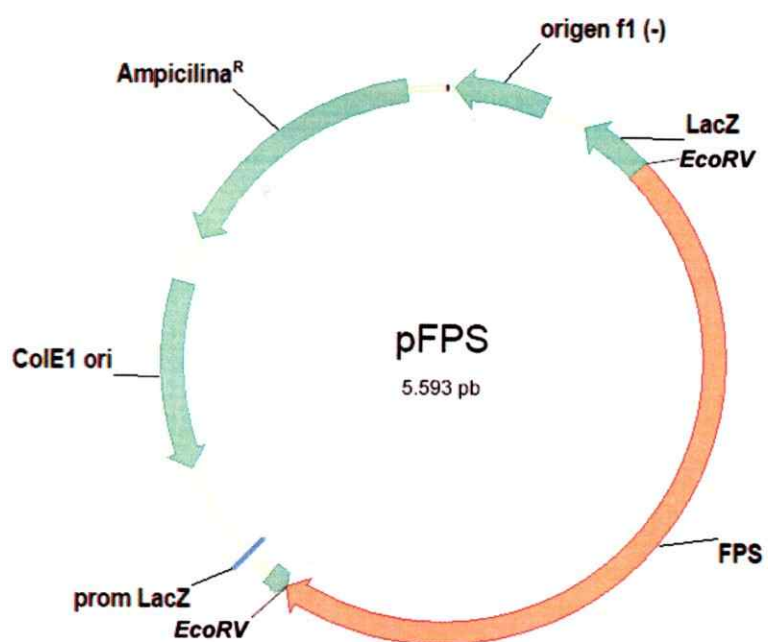


Figura 3: Mapa del plasmidio pFPS.

Esquema del plasmidio pFPS, el gen FPS, con 2.635 pb se encuentra clonado en un sitio de restricción *EcoRV*.

traducción de la secuencia nucleotídica reveló que de las 3 sustituciones encontradas, 2 implican sustituciones aminoacídicas respecto a la secuencia de referencia (NA: AX012404.1). Las sustituciones encontradas fueron 149Q→E y 221E→D.

La secuencia de las zonas FARM y SARM, las cuales se ha descrito que son fundamentales en la determinación del largo de la cadena sintetizada, fue comparada respecto a otros organismos como *S. cerevisiae* y *Bacillus stearothermophilus*. Se observó que la secuencia FARM es idéntica a la de *S. cerevisiae*. En contraste el motivo SARM presenta un cambio importante en la secuencia aminoacídica, observándose una sustitución V→Y. Esto supone un cambio mayor en el tamaño del residuo aminoacídico.

3.2. Obtención del plásmido con el gen *FPS* interrumpido por el módulo de resistencia a higromicina

El plásmido pFPS se digirió simultáneamente con las enzimas de restricción BglII y *EcoRV*, escindiéndose un fragmento de 2,03 kb del gen *FPS*. El plásmido digerido se purificó y se sometió a una reacción con el fragmento Klenow de la enzima DNA polimerasa I de *E. coli* (Fermentas), para dejar los extremos romos. Luego, se volvió a purificar el DNA a partir de gel y se realizó una reacción de ligamiento con un módulo que confiere de resistencia a higromicina-B a las cepas que lo portan (Figura 4). El ligado se utilizó como DNA para transformar *E. coli* por electroporación. La transformación se sembró en placas LB con ampicilina y se incubó durante la noche a 37 °C. Posteriormente, las colonias transformantes se sembraron en placas LB ampicilina con gradilla para 50 colonias cada una. Se realizó PCR de colonias de cada placa, utilizando los partidores HF/HR, para determinar la presencia del plásmido portador del gen *FPS* interrumpido por el módulo de resistencia a higromicina-B.

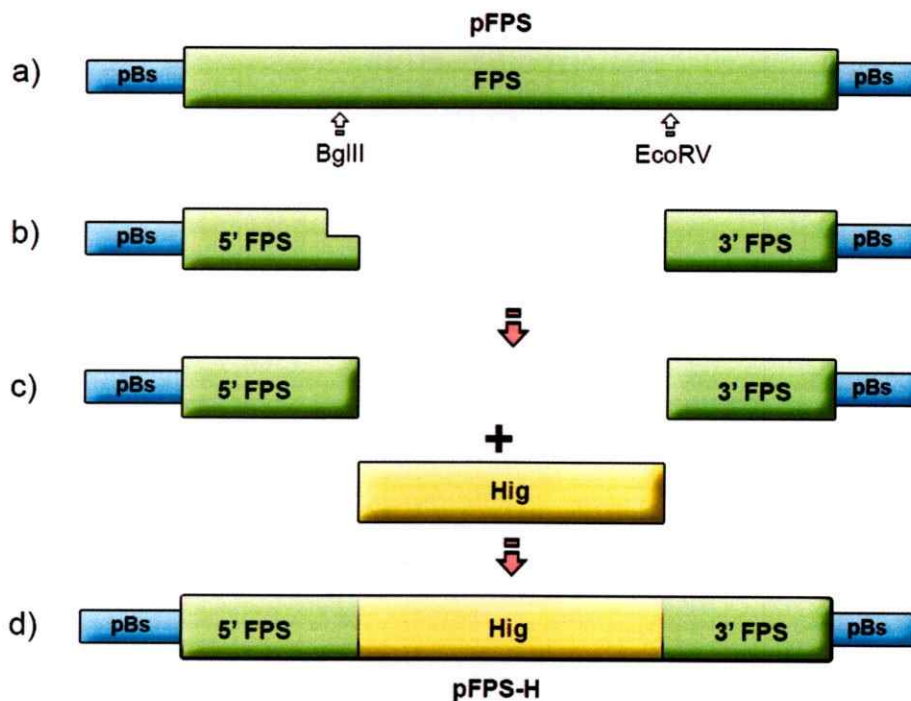


Figura 4: Obtención de gen *FPS* mutante mediante deleción parcial del gen e inserción de un módulo de higromicina.

a) El plasmido pFPS se digirió con las enzimas de restricción *BglIII* y *EcoRV*. b) Debido a que la enzima *BglIII* deja extremos cohesivos se rellenó el extremo, para dejarlo como, con el fragmento Klenow de la enzima DNA polimerasa. c) Se insertó el módulo de resistencia a higromicina mediante una reacción de ligado con la enzima T4 DNA ligasa d) Obtención de plasmido con el gen *FPS* interrumpido por el módulo de resistencia a higromicina. En verde se representa el gen *FPS*. En azul se representa el plasmidio pBluescript. En amarillo se representa el módulo de resistencia a higromicina.

Finalmente, las colonias positivas para el PCR de colonias se inocularon en 5 ml de medio LB con ampicilina y se crecieron durante la noche, para realizar extracción de DNA plasmidial.

A cada cultivo se le realizó extracción de DNA plasmidial mediante kit de miniprep. Los plásmidos se analizaron mediante enzimas de restricción, para determinar si los fragmentos generados son los esperados para el plásmido con el modulo de resistencia a higromicina-B (Figura 5). Una vez comprobado que el plasmidio con el fragmento clonado presenta el patrón de restricción esperado, se secuenció confirmándose la obtención de éste, el cual se denominó pFPS-H.

3.1. Obtención de cepas mutantes del gen *FPS* de *X. dendrorhous*

Las cepas mutantes para el gen *FPS* se obtuvieron mediante recombinación y reemplazo de este gen por la versión interrumpida con el módulo de resistencia a higromicina (Figura 6).

3.1.1. Transformación de *X. dendrorhous* y selección de transformantes

Se purificó el plásmido pFPS-H mediante kit de midiprep, a partir de 100 ml de un cultivo de *E. coli* portadora del plásmido. Se transformó la cepa UCD67-385 de *X. dendrorhous* mediante electroporación con 20 µg de DNA linearizado previamente con la enzima *AvaI*, enzima que permite la liberación del gen *FPS* del plásmido. Una vez aplicado el pulso de electroporación e incubadas en medio YM, las células se sembraron en placas YM con higromicina-B.

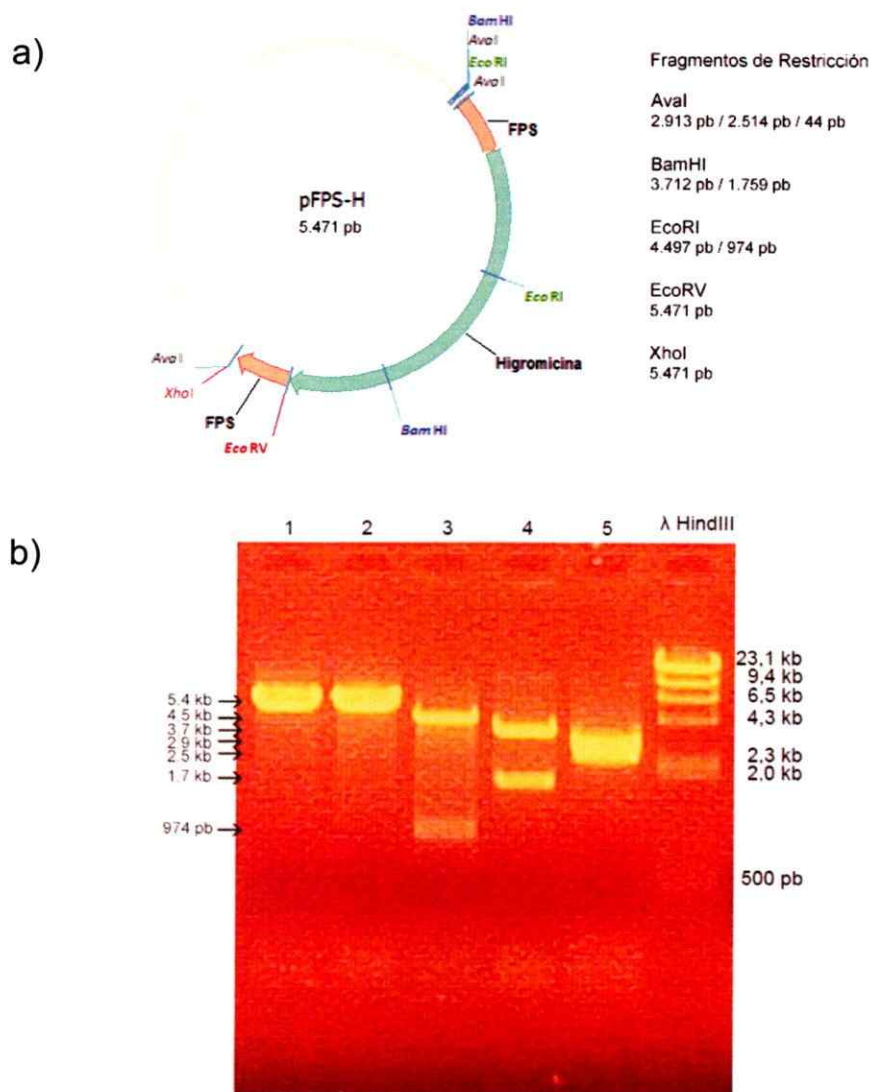


Figura 5: Chequeo de pFPS-H mediante digestión con enzimas de restricción.

a) Mapa de restricción del plásmido pFPS-H. b) Electroforesis de la digestión del plásmido con las enzimas de restricción 1) *XhoI*, 2) *EcoRV*, 3) *EcoRI*, 4) *BamHI*, 5) *Aval*.

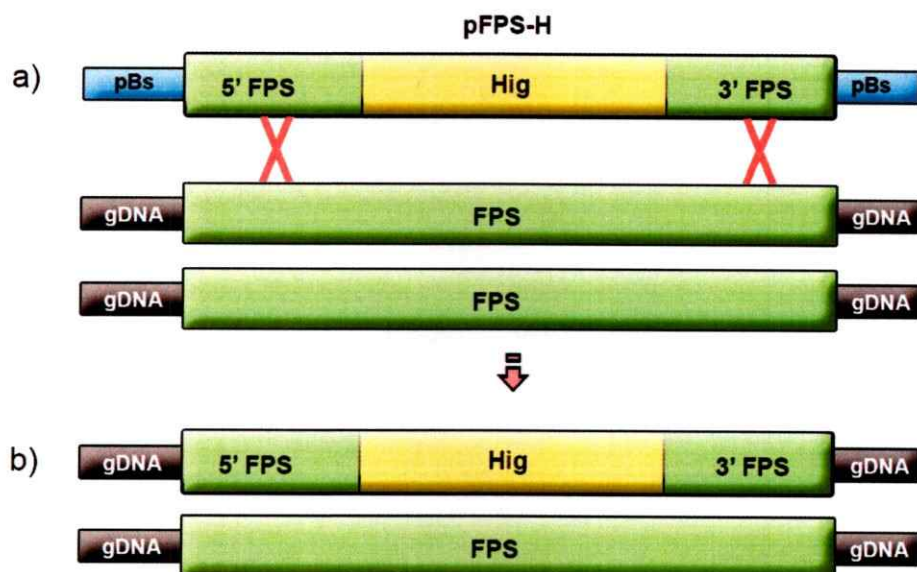


Figura 6: Recombinación y reemplazo del alelo silvestre del gen *FPS* por una versión mutada del mismo.

a) Esquema de la recombinación en un sitio específico del alelo del gen *FPS* mutado con su versión silvestre en *X. dendrorhous*. **b)** Obtención del mutante heterocigoto para el gen *FPS*. En verde se representa el gen *FPS*. En azul se representa el plasmidio pBluescript. En amarillo se representa el módulo de resistencia a higromicina. En negro se representa el DNA genómico flanqueante al gen *FPS* en la levadura.

Luego, se incubaron las placas a 22 °C durante 3 días, tiempo en el cual se pudo observar la aparición de colonias transformantes resistentes a higromicina. Estas se sembraron en placas YM con higromicina con plantillas de 50 colonias cada placa para su posterior análisis

3.1.2. Análisis de cepas transformantes

Una inspección visual de las cepas mutantes obtenidas reveló que las colonias transformantes presentaron una coloración más pálida que la cepa parental UCD67-385. También, demostraron ser resistentes a higromicina-B (Figura 7). No se observaron otros cambios fenotípicos, tales como tamaño de la colonia o velocidad de crecimiento. Se inocularon varias colonias en 10 ml de medio YM con higromicina (10 µg/ml) para realizar extracción de DNA genómico. Este se chequeó mediante PCR para comprobar la presencia e inserción del módulo de resistencia a higromicina en el genoma de *X. dendrorhous*. Para esto, se utilizaron las parejas de partidores HF / HR, FPS-O1R / HF (Figura 8). La primera pareja de partidores amplifica el gen *hph*, la segunda se une al gen *FPS* y al módulo de resistencia a higromicina.

3.1.1. Obtención de cepas homocigotas mediante método del doble recombinante (MDR)

Se utilizó el MDR para obtener una cepa de *X. dendrorhous* mutante homocigota para el gen *FPS* (*fps/fps*). Para ello, se realizaron cultivos sucesivos, a concentraciones crecientes de higromicina, con las cepas FPS-H y tCIH. Las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} de cada cultivo realizado se sembraron en placas YM con higromicina (Figura 9).

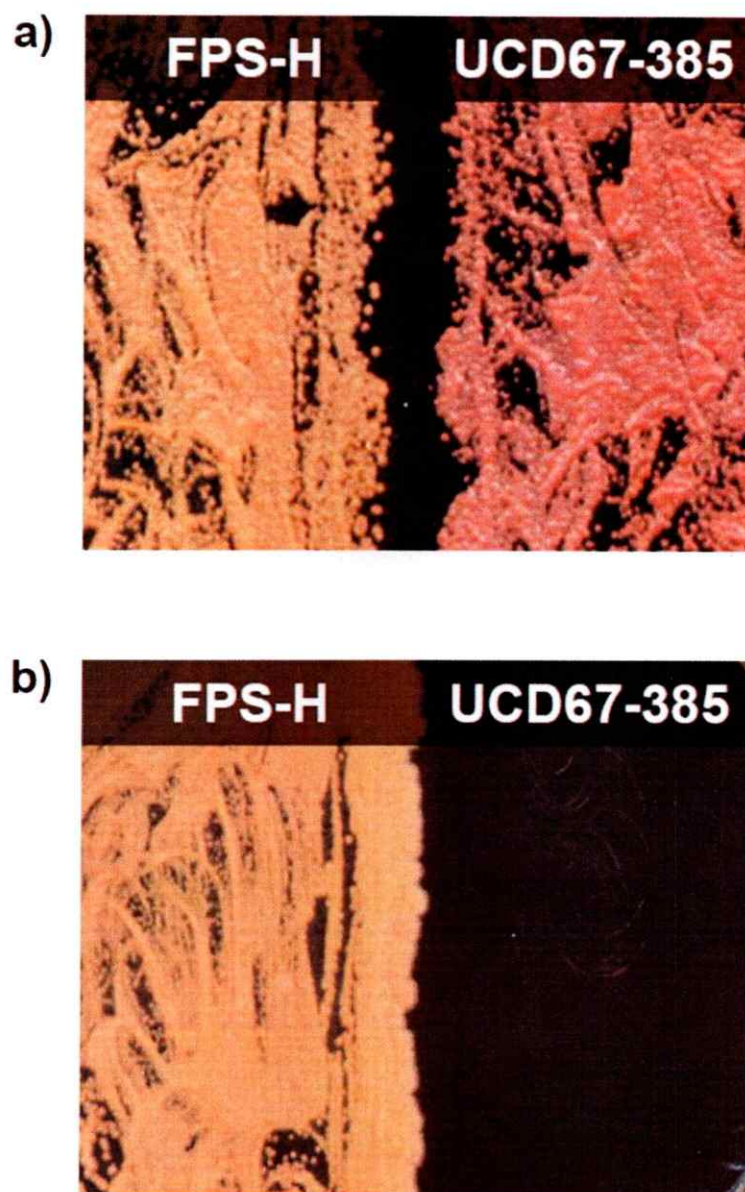


Figura 7: Obtención de cepa mutante para el gen *FPS*.

Sembrado de cepas FPS-H (izquierda) y UCD67-385 (derecha) en placas a) YM e b) YM con higromicina. Se puede observar la diferencia en la pigmentación de las cepas. La cepa FPS-H es capaz de crecer en medio con higromicina, mientras que la cepa parental es sensible al antibiótico.

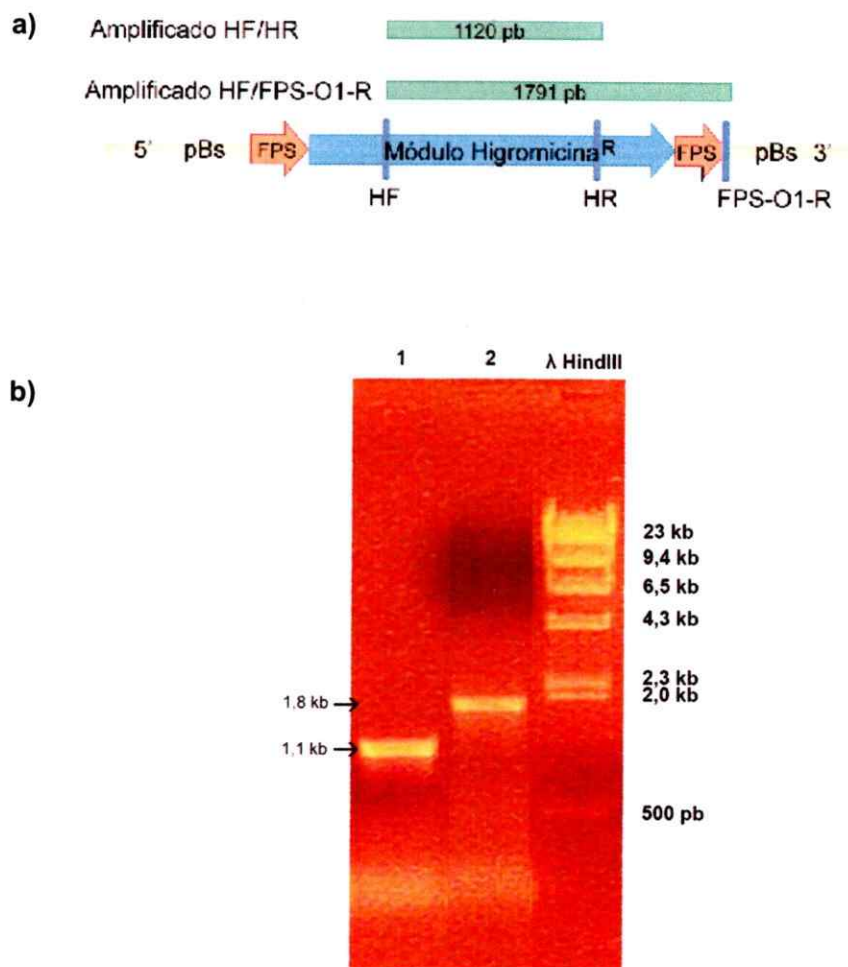


Figura 8: Análisis de cepas transformantes portadores del gen *FPS* mutado.

Se realizó una reacción de PCR utilizando como molde DNA genómico de la cepa FPS-H de *X. dendrorhous*, para comprobar la inserción del módulo de resistencia a higromicina en el gen *FPS*. **a)** Esquema de la posición de partidores y amplificadores esperados. **b)** Amplificación mediante PCR. Carril **1)** partidores HF y HR que amplifican el gen *hph* y carril **2)** los partidores FPS-O1R y HF que amplifican desde el gen *hph* hacia el extremo 3' del gen *FPS*.

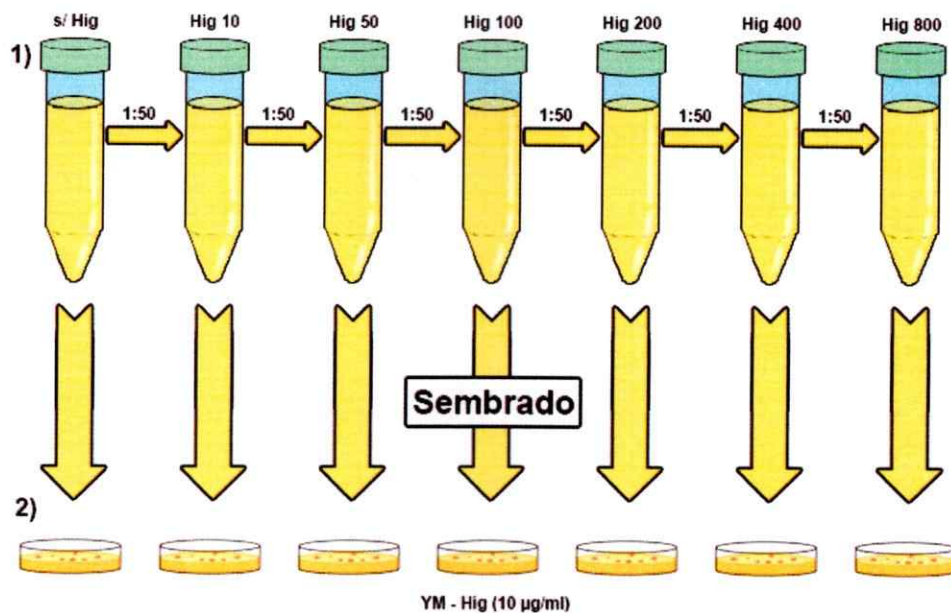


Figura 9: Método del doble recombinante.

1) 100 µl de un cultivo de 2 días de *X. dendrorhous*, se inoculó en 5 ml de medio YM con higromicina (10 µg/ml) con. Se creció el cultivo durante 2 días y se inoculó 5 ml de medio de cultivo a mayor concentración de higromicina con 100 µl del cultivo anterior. Los cultivos se realizaron en sucesión partiendo de una concentración de 10 µg/ml hasta una concentración final de 800 µg/ml. Todos los cultivos se sembraron en placas YM con higromicina para su posterior análisis.

La cepa tCIH corresponde a una cepa de *X. dendrorhous* mutante heterocigota para el gen *crtI* (*crtI/crtI*⁻), la cual se obtuvo mediante recombinación y reemplazo del alelo silvestre por una versión interrumpida con un módulo de resistencia a higromicina (Niklitschek, 2007), de manera similar a lo realizado para el gen *FPS* en este trabajo. Ésta se utilizó como control para determinar el número de mutantes homocigotos esperados para cada concentración de antibiótico utilizado, debido a que el gen *crtI* no es esencial, por lo cual los mutantes homocigotos para este gen no son letales y presentan un fenotipo blanco. Como resultado, se observó que la cepa FPS-H no presentó diferencias fenotípicas importantes en las colonias generadas después de aplicado el MDR, a ninguna de las concentraciones de higromicina utilizadas (Figura 10). No obstante, la cepa tCIH cuyas colonias presentan un fenotipo anaranjado, dio como resultado un 100% de colonias blancas a 800 µg/ml de higromicina (Figura 11, Figura 12). A pesar de no observarse diferencias fenotípicas importantes en las colonias de la cepa FPS-H, se seleccionaron 20 colonias post tratamiento del MDR provenientes de los cultivos a 800 µg/ml de higromicina-B y se crecieron en 10 ml de medio YM durante 3 días a 22 °C con agitación constante. Con el fin de determinar si las colonias elegidas eran homocigotas o heterocigotas para el alelo mutante del gen *FPS*, el DNA genómico de cada uno de los cultivos se utilizó para realizar una reacción de PCR. Para ello, se utilizó las parejas de partidores FPS-O1R/HF y FPSnewF/FPSnewR. La segunda pareja, amplifica la zona del gen eliminada en la deleción, permitiendo detectar la presencia del alelo silvestre. El PCR realizado reveló la existencia de amplificados para las dos parejas de partidores FPS-O1F / HR y FPSnewF/FPSnewR (Figura 13), demostrando su condición heterocigota.

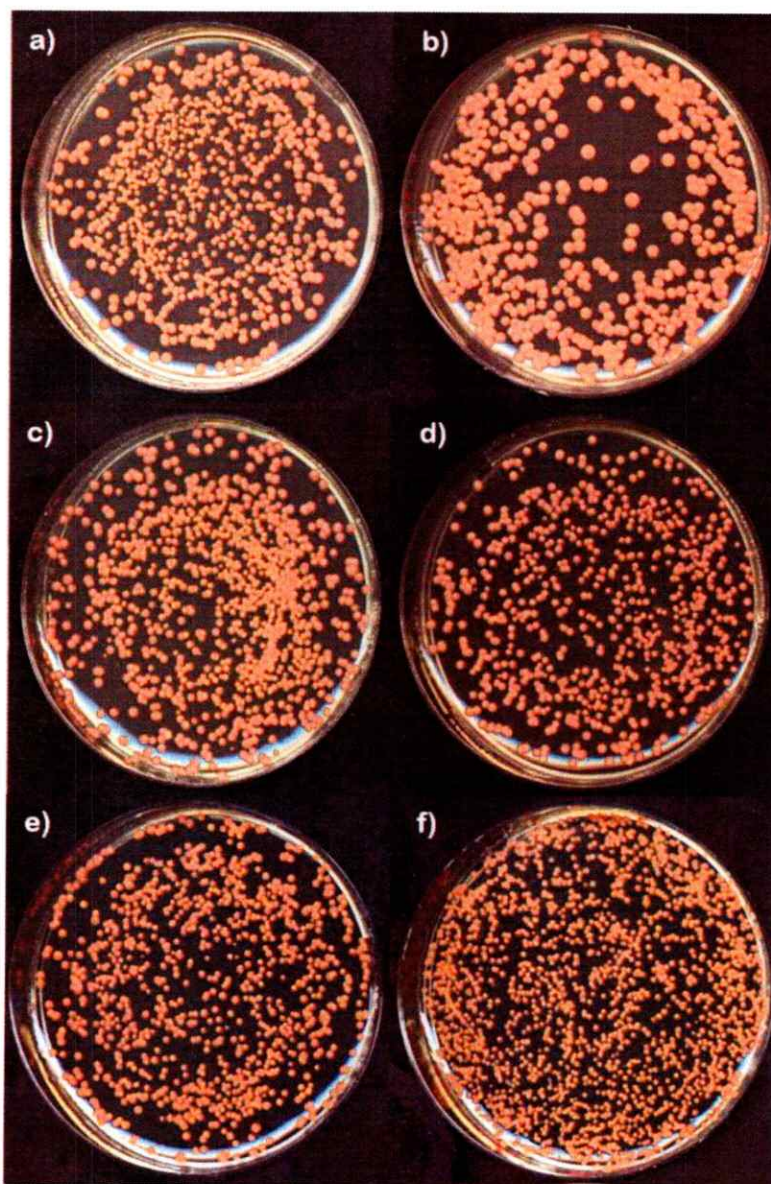


Figura 10: Obtención de cepas mutantes homocigotas para el gen FPS.

Sembrado de los distintos cultivos realizados para la cepa FPS-H durante el enriquecimiento de homocigotos mediante el método del doble recombinante. No se observó cambios fenotípicos importantes a ninguna concentración de higromicina utilizada. Las placas fueron sembradas a partir de cultivos **a)** sin higromicina y con higromicina a una concentración de **b)** 50 $\mu\text{g/ml}$, **c)** 100 $\mu\text{g/ml}$, **d)** 200 $\mu\text{g/ml}$, **e)** 400 $\mu\text{g/ml}$, **f)** 800 $\mu\text{g/ml}$

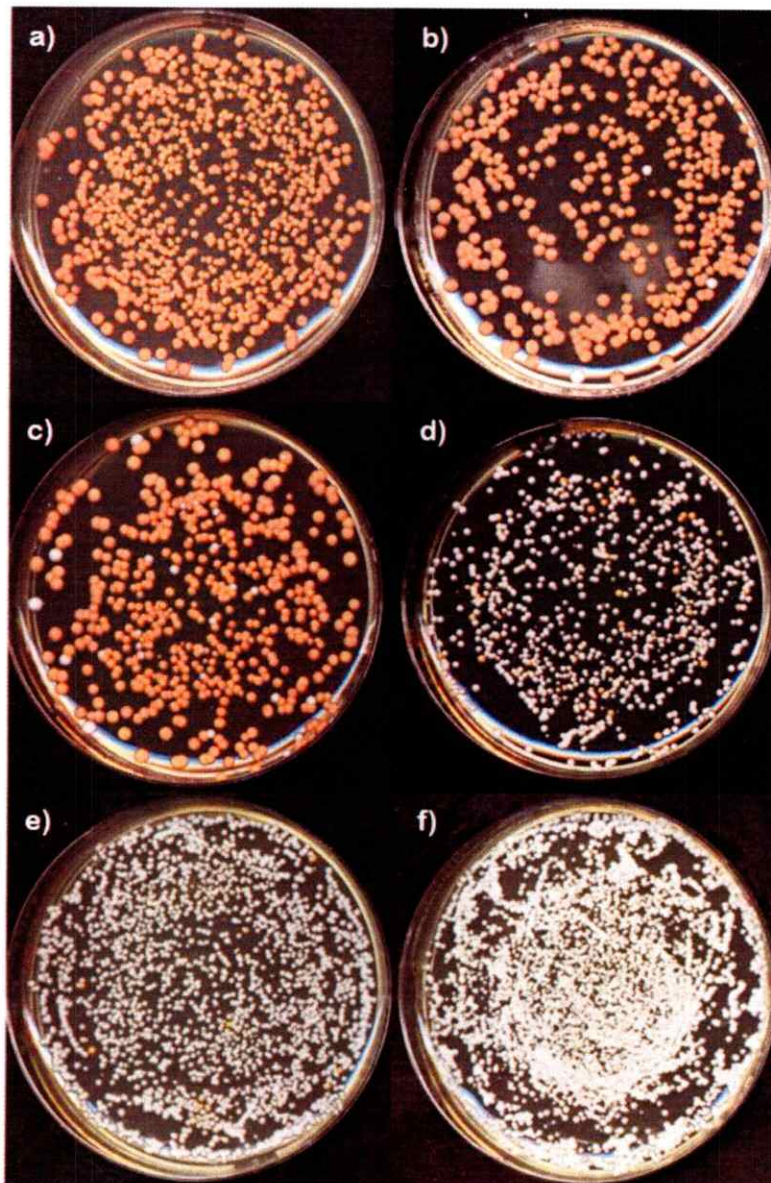


Figura 11: Obtención de cepas mutantes homocigotas para el gen *crtI*.

Sembrado de los distintos cultivos realizados para la cepa control tCIH durante el enriquecimiento de homocigotos mediante el método del doble recombinante. Se observó una disminución en el número de colonias heterocigotas (blancas) pasando de placas con colonias pigmentadas solamente a placas con colonias blancas solamente. Las placas fueron sembradas a partir de cultivos **a)** sin higromicina y con higromicina a una concentración de **b)** 50 $\mu\text{g/ml}$, **c)** 100 $\mu\text{g/ml}$, **d)** 200 $\mu\text{g/ml}$, **e)** 400 $\mu\text{g/ml}$, **f)** 800 $\mu\text{g/ml}$

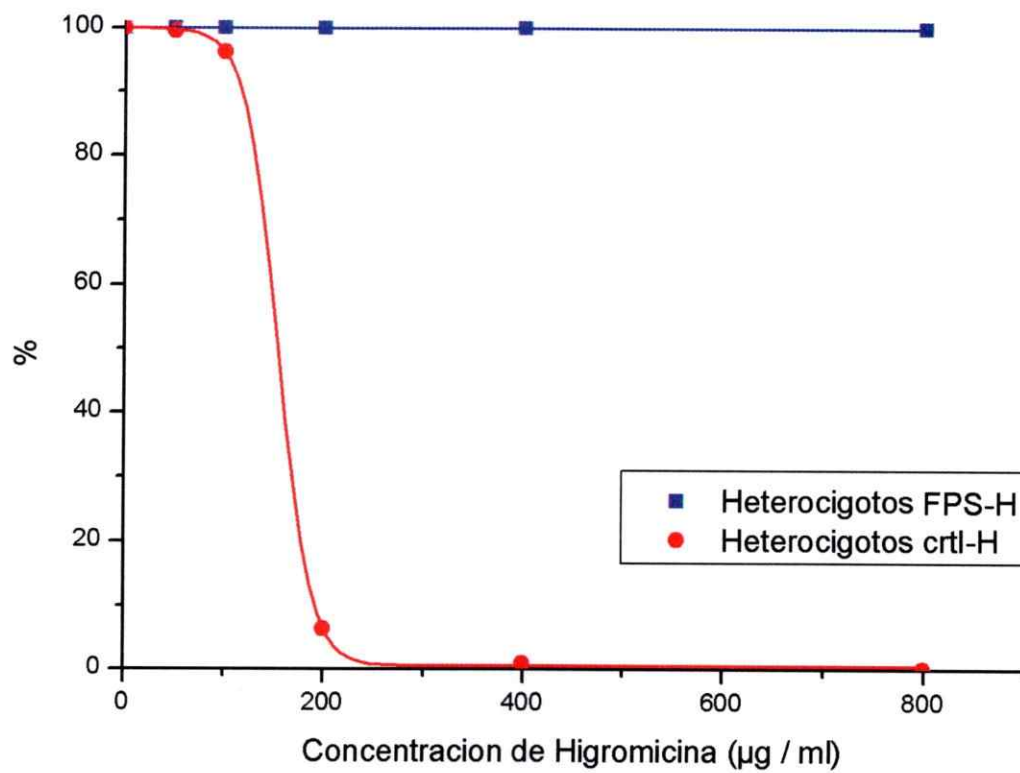


Figura 12: Obtención de cepas homocigotas mediante el método del doble recombinante.

Proporción de colonias heterocigotas observadas en las placas sembradas a partir de cultivos a distintas concentraciones de higromicina, durante el protocolo de obtención de homocigotos mediante el método del doble recombinante.

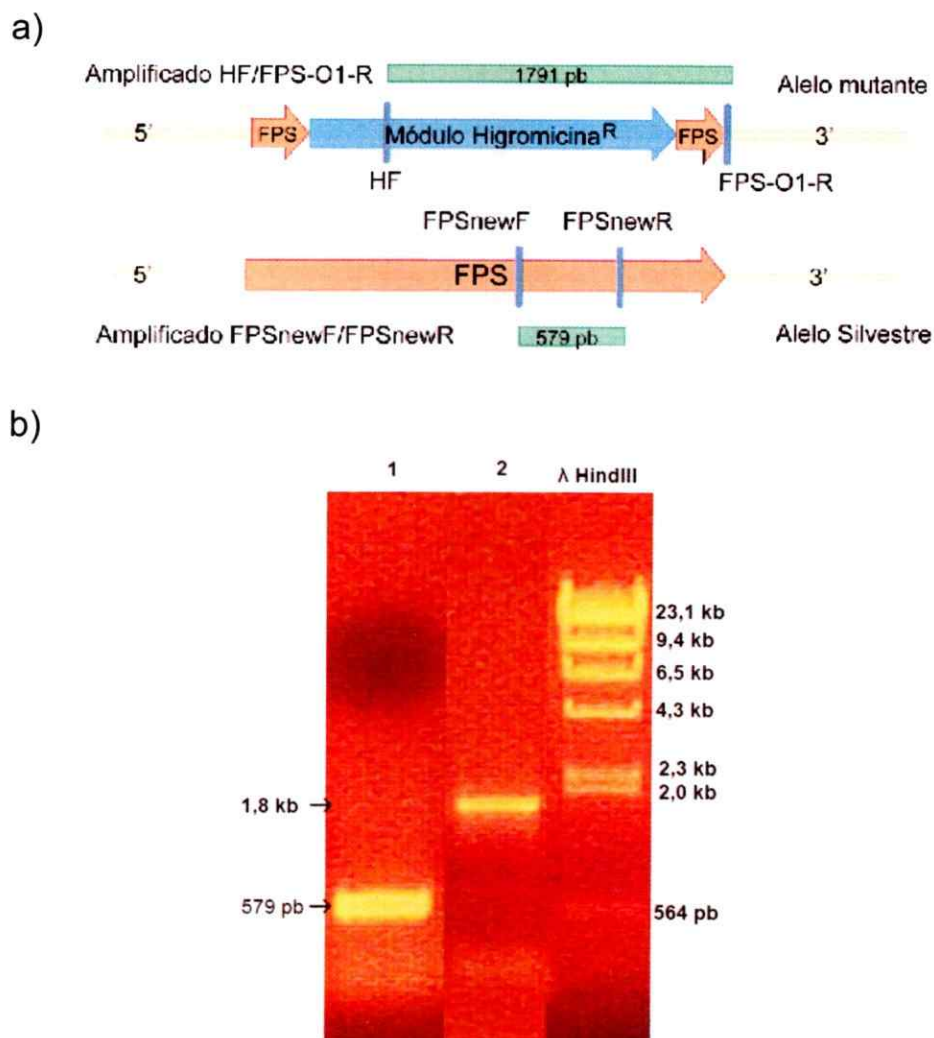


Figura 13: Amplificación por PCR de los alelos mutante y silvestre del gen FPS en colonias sometidas al MDR.

Se realizó una reacción de PCR utilizando como molde DNA genómico de las colonias FPS-H de *X. dendrorhous* obtenidas mediante el método del doble recombinante, para determinar la homocigosis o heterocigosis, mediante la presencia de los alelos silvestres y mutantes del gen FPS. **a)** Esquema de los amplificados esperados, la pareja de partidores FPSnewF y FPSnewR amplifican la zona del gen FPS eliminada en el alelo mutante. Los partidores HF y FPS-O1-R amplifican desde el módulo de resistencia a higromicina-B hacia la zona 3' del gen FPS. **b)** Electroforesis de los amplificados obtenidos mediante amplificación de DNA genómico de la cepa FPS-H con las parejas de partidores 1) FPSnewF / FPSnewR y 2) FPS-O1R / HF.

3.2. Análisis de pigmentos

Se realizaron cultivos de las cepas UCD67-385 (silvestre) y FPS-H, para analizar las diferencias en cantidad y composición en los pigmentos. Para esto, se sembró 200 µl de un cultivo de 2 días, en un total de 9 placas YM, por cada cepa. Estas se incubaron durante 5 días a 22 °C. El césped celular de cada placa se colectó luego de 1, 3 y 5 días de crecimiento, agregando 15 ml de agua bidestilada estéril. Las células fueron resuspendidas con un rastrillo de vidrio y luego transferidas a un tubo de 15 ml. Del volumen anterior, se colectaron 3 ml de células para medir el peso seco, en tanto que el resto se utilizó para la extracción de los pigmentos. En cada extracción se colectaron las células provenientes de 3 placas para cada cepa las cuales fueron procesadas y analizadas en forma separada, de esta forma se contó con triplicados para cada medición realizada. Los pigmentos extraídos fueron cuantificados por espectrofotometría y analizados en su composición mediante HPLC. La cuantificación de pigmentos mostró que la cepa FPS-H produce 51, 257 y 357 ppm de pigmentos a 1, 3 y 5 días de crecimiento, lo cual es menor a lo observado en la cepa silvestre la cual produjo un promedio de 110, 447 y 490 ppm de pigmentos respectivamente (Figura 14). De acuerdo a esto, la producción de pigmentos de la cepa mutante, respecto a la cepa silvestre, sufrió una reducción de un 54%, 42% y 27% para los días 1, 3 y 5 de crecimiento.

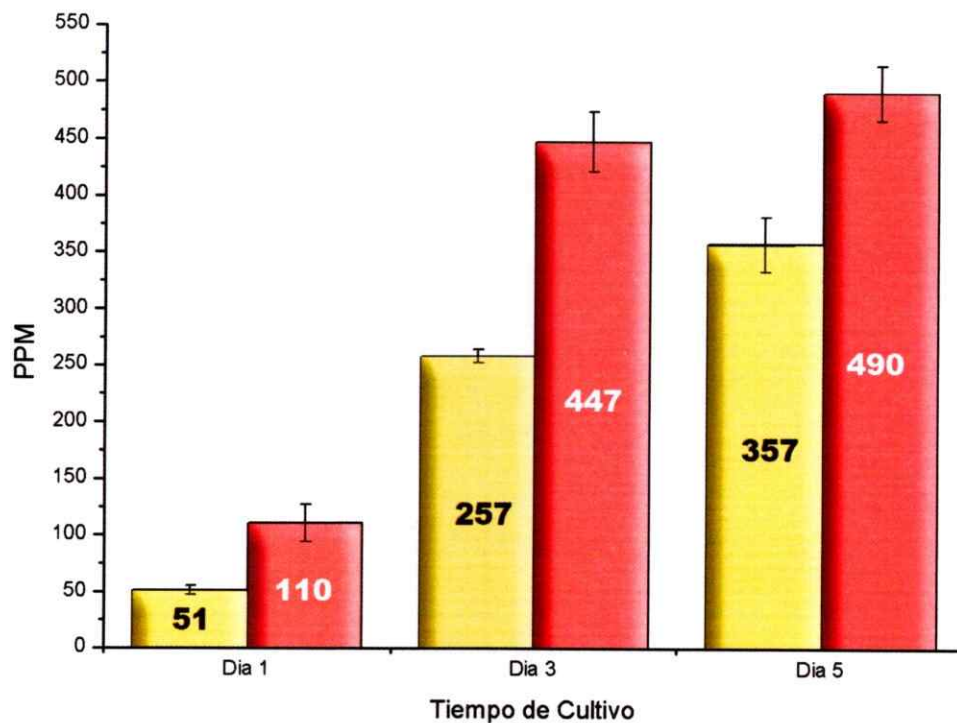


Figura 14: Pigmentos producidos por las cepas UCD67-385 (silvestre) y FPS-H, durante el cultivo en medio sólido.

Medición de los pigmentos totales (PPM) producidos por las cepas FPS-H (amarillo) y UCD67-385 (rojo) a 1, 3 y 5 días de incubación.

El análisis de la composición de pigmentos reveló cambios importantes en la composición de éstos (Figura 15) observándose, en la cepa mutante una reducción de astaxantina, acompañada de un aumento importante en los niveles de β -caroteno y otros carotenos intermedios. Por otra parte, la composición de pigmentos totales de la cepa pFPS-H se mantiene relativamente constante durante los días de cultivo. En contraste, la cepa silvestre presenta un incremento sostenido de astaxantina y una disminución progresiva del β -caroteno y otros carotenoides intermedios.

3.3. Curva de crecimiento

Con el objetivo de analizar las diferencias en el crecimiento entre las cepas UCD67-385 y FPS-H, se crecieron durante cinco días en matraces con 100 ml de medio YM, previamente inoculados con 1 ml de un cultivo de 2 días. A partir de las curvas de crecimiento obtenidas (Figura 16) se determinó el tiempo generacional de ambas cepas, el cual fue 4,48 horas para la cepa silvestre y 4,54 horas para la cepa mutante. De estos datos se infiere que no existe una diferencia significativa entre en las tasas de crecimiento de las cepas analizadas.

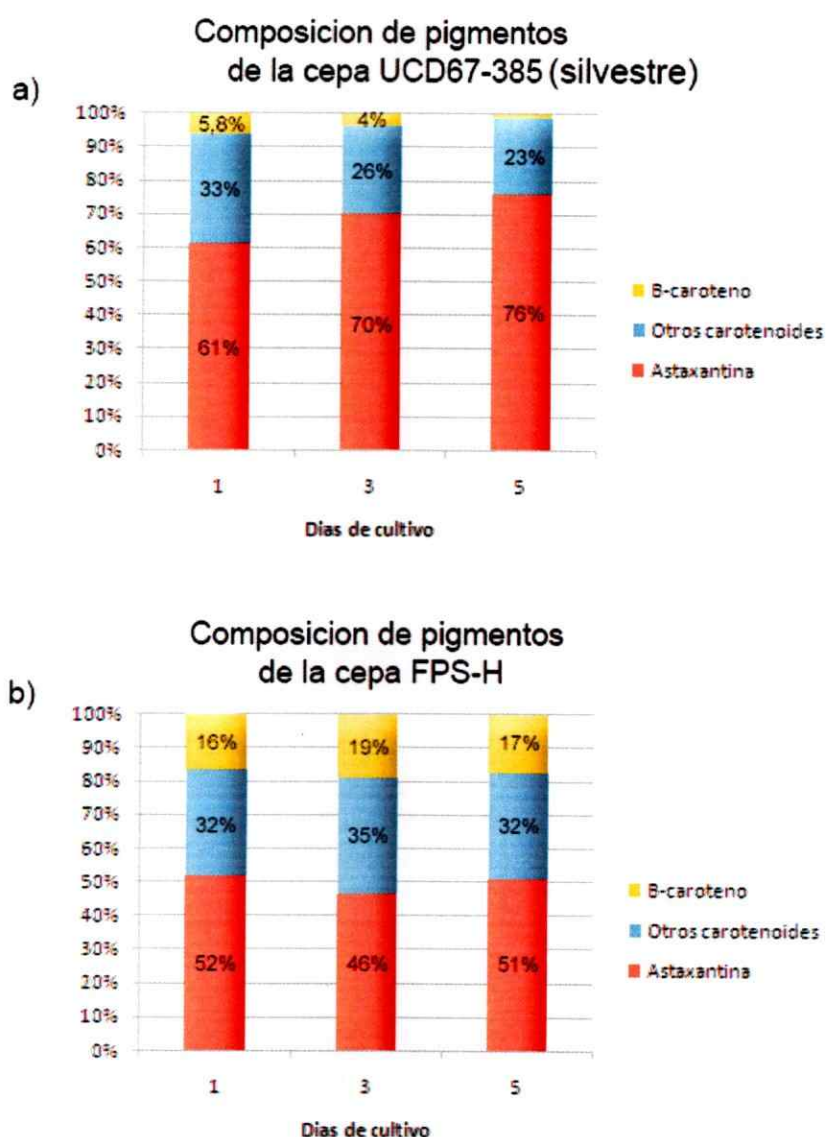


Figura 15: Composición de pigmentos de las cepas UCD67-385 y FPS-H.

Composición de pigmentos totales (%) producidos por las cepas a) UCD67-385 y b) FPS-H a 1, 3 y 5 días de incubación.

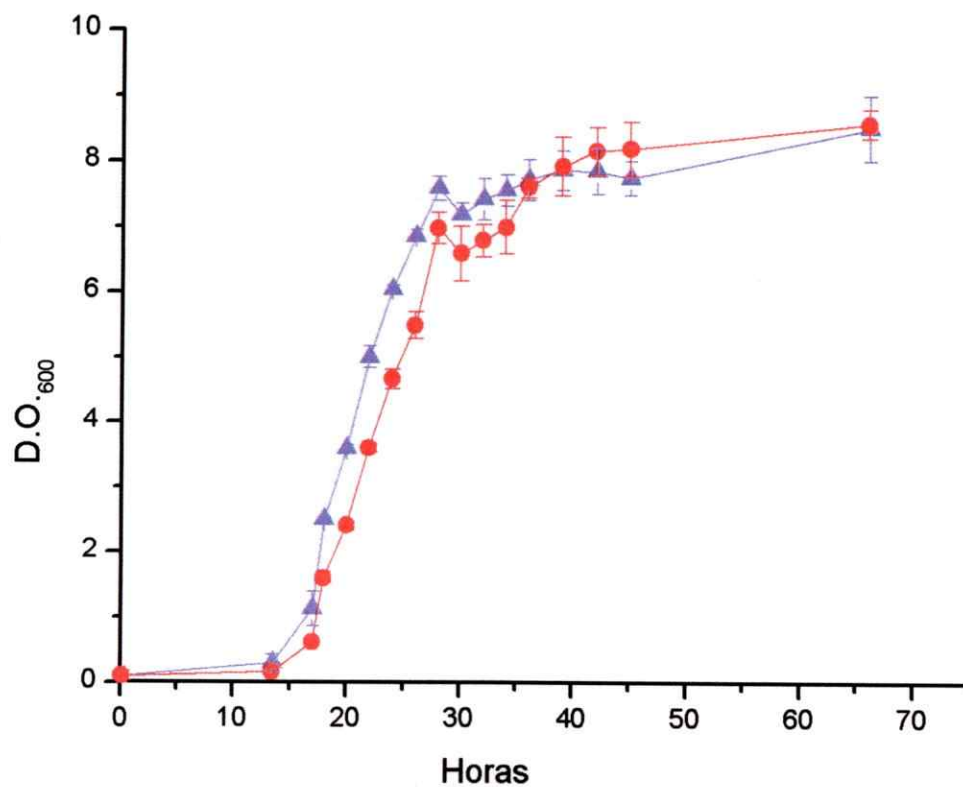


Figura 16: Curva de crecimiento de las cepas UCD67-385 y FPS-H.

Se midió el crecimiento de las cepas UCD67-385 (●) y FPS-H (▲) en medio YM mediante turbidez a una longitud de onda de 600 nm.

4. DISCUSIÓN

4.1. Secuenciación del gen *FPS* de *X. dendrorhous*

La secuencia del gen *FPS* obtenida en este trabajo no difirió en gran medida de la secuencia de este gen para *X. dendrorhous* disponible en la base de datos (NA: AX012404.1), observándose un 99,9% de identidad en la secuencia nucleotídica. La mayor parte de las diferencias encontradas se situaron en zonas no codificantes del gen y solo se encontraron 3 cambios nucleotídicos situados en la región codificante. Estos fueron descartados como mutaciones, producto del procedimiento de clonado, mediante comparación con el cDNA del gen *FPS* obtenido en el laboratorio (Niklitschek, resultados no publicados), el cual presentó las mismas diferencias. El primero no implica un cambio en la secuencia aminoacídica, el segundo conduce a una sustitución 149Q→E lo cual genera un cambio en la polaridad pero, sin alteraciones importantes en el tamaño del residuo aminoacídico. La sustitución no debería tener un efecto importante en la función de la proteína, debido a que el residuo alterado se encuentra orientado hacia el exterior de la proteína. La tercera sustitución 221E→D produce un intercambio entre aminoácidos similares en tamaño y polaridad. Adicionalmente, en ambos casos la sustitución no ocurre dentro de algún dominio conservado para esta proteína.

En el análisis del gen *FPS* se compararon los motivos FARM y SARM. Estas son secuencias aminoacídicas altamente conservadas, las cuales han sido identificadas como los motivos determinantes del largo de la cadena de terpenos sintetizada por las enzimas preniltransferasas. La secuencia aminoacídica del sitio FARM para

X. dendrorhous, DDMMD, es idéntica a la secuencia en *S. cerevisiae*. Por otro lado, la secuencia encontrada para el sitio SARM, DDVLD, presenta una única diferencia respecto a la secuencia de *S. cerevisiae*, DDYLD. La sustitución aminoacídica Y→V encontrada implica un cambio considerable en el tamaño del residuo aminoacídico. Sin embargo, se ha reportado que el motivo SARM de *B. stearrowthermophilus* presenta la secuencia aminoacídica DDILD. En este caso la sustitución I→V no genera un cambio importante en los residuos aminoacídicos. Las diferencias encontradas en la secuencia nucleotídica no suponen cambios importantes a nivel aminoacídico y la alta identidad obtenida confirman el clonamiento exitoso del gen *FPS*.

4.2. Análisis de cepas mutantes para el gen *FPS* en *X. dendrorhous*

4.2.1. Obtención de cepas mutantes homocigotas para el gen *FPS*

En atención a que la cepa silvestre parental (UCD76-385) utilizada para el protocolo de transformación del gen *FPS* es diploide, el método de transformación de *X. dendrorhous*, por recombinación y reemplazo del gen por una versión mutada permite generar cepas mutantes heterocigotas de esta levadura. Para el caso de la mutagénesis del gen *FPS*, el análisis genético realizado a las cepas mutantes reveló la presencia de 2 alelos del locus, uno correspondiente al alelo mutante (*fps*::*hph*) y el otro al silvestre, indicando la condición heterocigota para este gen. La estrategia experimental utilizada para la obtención de un mutante homocigoto para el gen *FPS* (*fps*⁻/*fps*⁻), no resultó efectiva, a pesar de dar resultados positivos con la cepa mutante para el gen *crtI*, la cual fue usada como control. Ello sugiere que el gen *FPS* podría corresponder a un gen esencial. Debido a que el FPP cumple diversos roles, tales como precursor de lípidos de membrana o de grupos prostéticos de distintas moléculas y proteínas, es posible que la obtención de cepas deficientes en esta proteína no sea

posible. Adicionalmente, la presencia de una enzima GGPS capaz de sintetizar el GGPP en forma independiente (sistema I o III) permitiría suplir la deficiencia de la enzima FPS en cepas mutantes homocigotas para el gen *FPS*. Debido a que lo anterior no ocurrió se sugiere que el GGPP sería sintetizado por la acción conjunta de las enzimas FPS y GGPS (sistema II).

En contraste a lo recién mencionado, se ha reportado la obtención de cepas mutantes deficientes en la enzima FPS para la levadura *S. cerevisiae* y la bacteria *E. coli*. En esta última, el gen *ispA*, el cual codifica para una enzima FPS, se eliminó sin causar letalidad (Fujisaki y cols., 2005). Sin embargo, esto sería posible gracias a la existencia de una enzima prenil difosfato sintasa de cadenas cortas que es capaz de sintetizar FPP y GGPP (Saito y cols., 2007), supliendo la deficiencia de la enzima FPS con un sistema híbrido (sistema III) para la síntesis tanto de FPP como de GGPP. En el caso de la levadura *S. cerevisiae* se ha obtenido cepas mutantes deficientes, del gen *ERG20*, que codifica la enzima FPS. Sin embargo, para que la levadura pueda crecer, el medio de cultivo debe ser suplementado con ergosterol. Adicionalmente, se ha observado que esta cepa mutante es capaz de obtener ergosterol del medio en aerobiosis (Chambon y cols., 1990), lo cual no es posible para una cepa silvestre de *S. cerevisiae*. El estudio de un posible mecanismo que permita la obtención de ergosterol del medio en *X. dendrorhous* podría ser un método para obtener cepas mutantes homocigotas para el gen *FPS*. Sin embargo, estudios previos sugieren que no sería posible obtener cepas deficientes para el GGPP (Niklitschek y cols., 2008), lo cual implicaría que la adición de ergosterol no sería suficiente para superar este obstáculo.

4.2.2. Crecimiento de cepas mutantes para el gen *FPS*.

El FPP es un precursor importante en la ruta de biosíntesis del ergosterol. Es posible que ésta sea la razón por la cual la estrategia utilizada para obtener cepas mutantes deficientes para el gen *FPS*, no fue exitosa. Debido a esto, una disminución en el flujo de FPP debería tener como consecuencia una disminución en la tasa de crecimiento de la cepa mutante. En contraste con lo anterior, las cepas mutantes obtenidas presentaron una tasa de crecimiento similar a la cepa parental UCD67-385. Esto podría deberse a que la síntesis de FPP no es un paso limitante en la síntesis del ergosterol o que se está obteniendo carbono en desmedro de otros procesos o vías.

4.3. Participación del gen *FPS* en la biosíntesis de carotenoides.

El gen *FPS* se encuentra involucrado en la biosíntesis del FPP, molécula precursora tanto de los carotenoides, como del ergosterol. Con esto en mente, se esperaba que las cepas de *X. dendrorhous* mutantes para este gen produjeran una menor cantidad de pigmentos, sin cambios en la composición de éstos. Debido a que el gen *FPS* se encuentra involucrado en la síntesis del ergosterol se planteó la posibilidad de un ingreso tardío a la carotenogénesis en la levadura, debido a que el flujo de carbono podría estar siendo dirigido en favor del crecimiento celular. Para considerar esto en el análisis, los pigmentos se obtuvieron a 1, 3 y 5 días de cultivo. La comparación entre la cepa silvestre y mutante reveló una reducción en la cantidad de pigmentos totales la cual fue más pronunciada en etapas tempranas de crecimiento. También se observó un cambio importante en la composición de pigmentos.

Tal como fue planteado, la disminución en la cantidad de pigmentos podría deberse a una redirección del flujo de carbono hacia la síntesis de ergosterol de la

levadura. Debido a que en una etapa posterior el cultivo ingresa a una fase estacionaria, se produciría una recuperación en la cantidad de carotenoides. Los resultados mostraron que la cepa mutante presentó una reducción en la cantidad de pigmentos totales, respecto a la cepa silvestre, de un 54% al día 1, 42% al día 3 y 27% al día 5. La recuperación observada en la cantidad de pigmentos producidos concuerda con la hipótesis planteada, sugiriendo que bajo condiciones limitantes de FPP, en una etapa inicial, el flujo de carbono sería dirigido en favor del crecimiento celular y en una etapa posterior se favorecería la síntesis de pigmentos.

En contraste a los resultados anteriores la composición de pigmentos fue distinta a lo esperado. Debido a que el FPP es precursor de los carotenos, pero no está involucrado directamente en la síntesis de estos, se esperaba que la composición de pigmentos no cambiara en forma significativa. Sin embargo, se observó una disminución importante en la cantidad de astaxantina, en favor de β -caroteno y otros carotenoides intermediarios de la síntesis de astaxantina. Al igual que con los pigmentos totales se esperaba que la composición de pigmentos en la cepa mutante se acercase a la observada para la cepa silvestre, en etapas tardías de cultivo. Esto no se observó, en su lugar los pigmentos mantuvieron una composición relativamente constante a lo largo del periodo de incubación utilizado. En contraste, en la cepa silvestre los pigmentos cambiaron a lo largo de toda la incubación, observándose un aumento sostenido de la astaxantina y disminución progresiva de otros carotenoides, particularmente el β -caroteno. Estos resultados sugieren que el cambio en la composición de pigmentos no se debería a un ingreso tardío de la levadura a la carotenogénesis, si no que podrían estar actuando otros procesos metabólicos no identificados, relacionados con el FPP.

5. CONCLUSIONES

- El gen *FPS* de la cepa UCD67-385 (silvestre) presenta un 99,9% de identidad nucleotídica respecto a la secuencia del mismo gen en otra cepa silvestre de la levadura, disponible en Genebank. Confirmando el clonamiento exitoso del gen.
- La imposibilidad de obtener cepas mutantes homocigotas para el gen *FPS*, sugiere que este gen sería esencial, no existiendo una vía alternativa para la síntesis de FPP o GGPP, postulando que este último sería generado por la acción conjunta de las proteínas codificadas en los genes *FPS* y *crtE*.
- Cepas de *X. dendrorhous*, mutantes heterocigotas para el gen *FPS*, no ven alterada su tasa de crecimiento, pero producen una menor cantidad de pigmentos totales, respecto a la cepa silvestre. También se ve alterada la composición de pigmentos, observándose un aumento en los niveles de β -caroteno y otros carotenoides intermediarios y una disminución en los niveles de astaxantina.
- Los resultados sugieren que el cambio en la composición de pigmentos observado, en la cepa mutante para el gen *FPS*, se debería a mecanismos metabólicos no identificados, asociados al FPP.
- La reducción en los pigmentos producidos es más pronunciada durante los primeros días de crecimiento, que a tiempos finales. Esto sugiere que el flujo de carbono sería dirigido inicialmente al crecimiento celular y luego hacia la carotenogénesis. De lo anterior, se puede sugerir la existencia de un mecanismo regulador, capaz de redirigir el flujo de carbono hacia la síntesis de ergosterol o a la carotenogénesis, según se vea necesario.

6. REFERENCIAS

- Adrio, J. L., M. Lopez, J. Casqueiro, C. Fernandez and M. Veiga. 1995. "Electrophoretic karyotype of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*." *Curr Genet* 27: 447-50.
- Alcaíno, J. 2002. Organización estructural del gen de la fitoeno sintasa en el genoma de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex. *Phaffia rhodozyma*). Seminario de título para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- An, G. H., D. B. Schuman and E. A. Johnson. 1989. "Isolation of *Phaffia rhodozyma* Mutants with Increased Astaxanthin Content." *Appl Environ Microbiol* 55: 116-124.
- Boyle, J. S. and A. M. Lew. 1995. "An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification." *Trends Genet* 11: 8.
- Britton, G. 1995. "Structure and properties of carotenoids in relation to function." *FASEB J* 9: 1551-8.
- Chambon, C., V. Ladeveze, A. Oulmouden, M. Servouse and F. Karst. 1990. "Isolation and properties of yeast mutants affected in farnesyl diphosphate synthetase." *Curr Genet* 18: 41-6.
- Do, R., R. S. Kiss, D. Gaudet and J. C. Engert. 2009. "Squalene synthase: a critical enzyme in the cholesterol biosynthesis pathway." *Clin Genet* 75: 19-29.
- Fujisaki, S., I. Takahashi, H. Hara, K. Horiuchi, T. Nishino and Y. Nishimura. 2005. "Disruption of the structural gene for farnesyl diphosphate synthase in *Escherichia coli*." *J Biochem* 137: 395-400.
- Lange, B. M., T. Rujan, W. Martin and R. Croteau. 2000. "Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13172-7.
- Lee, P. C. and C. Schmidt-Dannert. 2002. "Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms." *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 1-11.
- Liang, P. H., T. P. Ko and A. H. Wang. 2002. "Structure, mechanism and function of prenyltransferases." *Eur J Biochem* 269: 3339-54.
- Lichtenthaler, H. K. 2000. "Non-mevalonate isoprenoid biosynthesis: enzymes, genes and inhibitors." *Biochem Soc Trans* 28: 785-9.
- McCarthy, S. S., M. C. Kobayashi and K. K. Niyogi. 2004. "White mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* are defective in phytoene synthase." *Genetics* 168: 1249-57.
- McGarvey, D. J. and R. Croteau. 1995. "Terpenoid metabolism." *Plant Cell* 7: 1015-26.
- Naguib, Y. M. 2000. "Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids." *J Agric Food Chem* 48: 1150-4.
- Nes, W. R., B. C. Sekula, W. D. Nes and J. H. Adler. 1978. "The functional importance of structural features of ergosterol in yeast." *J Biol Chem* 253: 6218-25.
- Niklitschek, M. 2007. Desarrollo de un casete de resistencia a antibiotico en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Seminario de título para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile. Santiago, Chile.

- Niklitschek, M. 2008. "Estudio genético molecular del gen *crtE* involucrado en la ruta de biosíntesis de astaxantina en *Xanthophyllomyces dendrorhous*." Tesis para optar al Título de Magister en Ciencias Biológicas. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- Niklitschek, M., J. Alcaino, S. Barahona, D. Sepulveda, C. Lozano, M. Carmona, A. Marcoleta, C. Martinez, P. Lodato, M. Baeza and V. Cifuentes. 2008. "Genomic organization of the structural genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *Biol Res* 41: 93-108.
- Ohnuma, S., M. Suzuki and T. Nishino. 1994. "Archaeobacterial ether-linked lipid biosynthetic gene. Expression cloning, sequencing, and characterization of geranylgeranyl-diphosphate synthase." *J Biol Chem* 269: 14792-7.
- Okada, K., T. Saito, T. Nakagawa, M. Kawamukai and Y. Kamiya. 2000. "Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in *Arabidopsis*." *Plant Physiol* 122: 1045-56.
- Rees, H. H., L. J. Goad and T. W. Goodwin. 1968. "Studies in phytosterol biosynthesis. Mechanism of biosynthesis of cycloartenol." *Biochem J* 107: 417-26.
- Ruzicka, L. 1994. "The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. 1953." *Experientia* 50: 395-405.
- Sacchettini, J. C. and C. D. Poulter. 1997. "Creating isoprenoid diversity." *Science* 277: 1788-9.
- Saito, K., S. Fujisaki and T. Nishino. 2007. "Short-chain prenyl diphosphate synthase that condenses isopentenyl diphosphate with dimethylallyl diphosphate in *ispA* null *Escherichia coli* strain lacking farnesyl diphosphate synthase." *J Biosci Bioeng* 103: 575-7.
- Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schafer, W. R. and J. Rine. 1992. "Protein prenylation: genes, enzymes, targets, and functions." *Annu Rev Genet* 26: 209-37.
- Verdoes, J. C., K. P. Krubasik, G. Sandmann and A. J. van Ooyen. 1999. "Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *Mol Gen Genet* 262: 453-61.
- Verdoes, J. C., N. Misawa and A. J. van Ooyen. 1999. "Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *Biotechnol Bioeng* 63: 750-5.