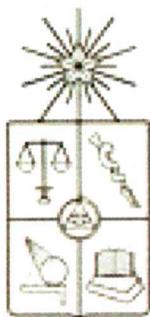


UCH-FC
MAG-B
C287
C.1



CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL GEN *AST*
de *Xanthophyllomyces dendrorhous*
(*Ex. Phaffia rhodozyma*)

Tesis

Entregada a la Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos para optar

al título de Magíster en Ciencias Biológicas Mención en Genética

Facultad de Ciencias

Por

Marisela Carmona Concha

2007

Director de Tesis: Dr. Víctor Cifuentes Guzmán.

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGISTER**

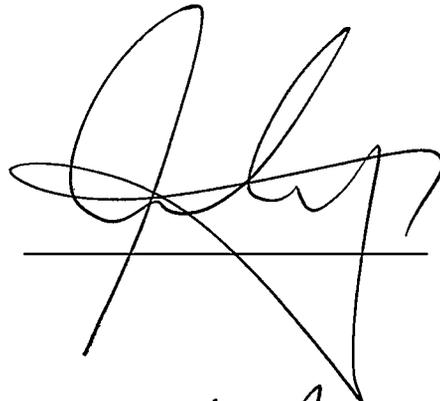
Se informa a la escuela de postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de Magíster presentada por la candidata.

Marisela Carmona Concha

Ha sido aprobada por la comisión Informante de Tesis como parte de los requisitos para optar al grado de magíster en Ciencias Biológicas con mención en Genética, en el examen de defensa de tesis rendido el día 19 de Julio del 2007.

Director de Tesis

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke, positioned above a horizontal line.

Comisión Informante de Tesis

Dra. Blanca Urzúa O

A handwritten signature in black ink, featuring a large loop and a horizontal stroke, positioned above a horizontal line.

Dr. Germán Hermosilla D.

A handwritten signature in black ink, with a large loop and a horizontal stroke, positioned above a horizontal line.

A mi familia.....

AGRADECIMIENTOS

Sin duda en este largo proceso, han sido muchas las personas que han aportado de una u otra forma a concluir esta tarea y a las cuales quiero dedicarles estas breves líneas.

Primero que todo, a mis padres Graciela y Hugo por confiar en mí y ayudarme incondicionalmente durante todos estos años.

A mis hermanos Claudio y Hugo, por apoyarme en todo sentido en este largo camino de preparación y por supuesto a mi sobrino Dieguito simplemente por ser como es...

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Salvador y Dony, quienes sin duda fueron el pilar fundamental de este trabajo, Andrés, Mauricio, Jennifer, Mario, Oriana, Pilar, Vicente por sus valiosos y críticos comentarios y muy especialmente a mis amigas durante todos estos años de Magíster, Carla y Aniela por su amistad y lealtad y por supuesto al Rafita por su excelente disposición para ayudarnos.

A mis amigas del Doctorado en Acuicultura, Pamela y Maria Isabel por sus palabras de motivación y cariño y a mis demás compañeros que también de una u otra forma se involucraron en esta etapa que hoy concluye.

A mis amigos de la vida Mario, Fabianny y Alejandro por estar siempre presentes.

Y en especial a mi tutor, Dr. Víctor Cifuentes por sus palabras de apoyo, por su confianza y por ser un guía en muchos aspectos de la vida. Como también, al Dr. Marcelo Baeza por su excelente disposición y acertados comentarios a mi trabajo.

INDICE GENERAL

	Página
Agradecimientos	i
Índice general	ii
Lista de tablas	vi
Lista de figuras	vii
Abreviaturas	x
Resumen	xi
Abstract	xiii
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Características generales de los carotenoides.....	1
1.2 <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> como fuente natural de astaxantina	4
1.3 Carotenogénesis y Biosíntesis de astaxantina	8
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	14
1. Objetivo General	14
2. Objetivos Específicos	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
1. Materiales.....	15
1.1 Reactivos biológicos.....	15
1.2 Reactivos químicos.....	15
1.3 Medios de cultivo.....	15
1.4 Cepas y plásmidos.....	16
2. Métodos.....	16

2.1	Condiciones de cultivo y mantención de cepas.....	16
2.2	Métodos de Purificación.....	16
2.2.1	DNA plasmidial.....	16
2.2.2	DNA genómico.....	17
2.2.3	Extracción de DNA desde geles de agarosa.....	18
2.2.4	Extracción de RNA de <i>X. dendrorhous</i>	19
2.3	Construcción de una genoteca parcial de <i>X. dendrorhous</i>	19
2.3.1	Construcción de un mapa de restricción genómico	19
2.3.2	Hibridación con la sonda ast2.5.....	20
2.3.3	Digestión con la enzima de restricción <i>PstI</i>	20
2.4	Cariotipo Electroforético.....	20
2.4.1	Preparación de DNA cromosómico intacto de <i>X. dendrorhous</i>	20
2.4.2	Electroforesis de Campo Pulsado.....	21
2.5	Análisis de DNA.....	22
2.5.1	Digestión con endonucleasas de restricción.....	22
2.5.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	22
2.5.2.1	Diseño de partidores.....	22
2.5.2.2	Amplificación de DNA.....	23
2.5.3	Transcripción Reversa acoplada a la reacción de la polimerasa en cadena (RT-PCR).....	23
2.5.3.1	Síntesis de cDNA.....	23
2.5.3.2	PCR.....	23
2.6	Transformación genética por electroporación.....	24
2.6.1	Preparación de células electrocompetentes: <i>Escherichia coli</i>	24
2.6.2	Transformación de <i>Escherichia coli</i>	24
2.6.3	Transformación de <i>X. dendrorhous</i>	25
2.7	Hibridación DNA-DNA.....	25

2.7.1	Preparación de las membranas.....	25
2.7.2.	Transferencia.....	26
2.7.3	Montaje de la transferencia.....	26
2.7.4	Fijación del DNA a la membrana.....	26
2.7.5	Marcaje de la sonda.....	27
2.7.6	Prehibridación.....	27
2.7.7	Hibridación.....	27
2.7.8	Lavados.....	27
2.8	Secuenciación.....	28
2.9	Construcción de mutantes de delección de <i>X. dendrorhous</i>	28
2.10	Extracción de carotenoides.....	29
2.11	Análisis cualitativo y cuantitativo de los pigmentos por HPLC...	29
RESULTADOS		30
1.	Búsqueda en genotecas parciales del gen <i>ast</i> mediante PCR.....	30
2.	Análisis de restricción de DNA genómico de la cepa UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i>	30
3.	Construcción de una genoteca parcial de la cepa UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i>	33
4.	Secuenciación del inserto de 4.0 kb portador del gen <i>ast</i> que codifica la enzima astaxantina sintasa.....	41
5.	Clonado del cDNA del gen <i>ast</i> de <i>X. dendrorhous</i>	47
6.	Secuenciación del cDNA del gen <i>ast</i>	51
7.	Ubicación del gen <i>ast</i> en el cariotipo electroforético de <i>X. dendrorhous</i> ..	51

8.	Construcción de una deleción del plásmido pC19.19 portador del gen <i>ast</i> de <i>X. dendrorhous</i>	55
9.	Transformación de la cepa silvestre UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i> con una deleción del gen <i>ast</i>	56
10.	Análisis de pigmentos por HPLC.....	58
DISCUSION		60
1.-	Clonamiento y secuenciación del gen <i>ast</i> que codifica la enzima astaxantina sintasa de la cepa silvestre UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i>	60
2.-	Ubicación del gen <i>ast</i> en el cariotipo electroforético de la cepa silvestre UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i>	61
3.-	Análisis estructural del gen <i>ast</i> de <i>X. dendrorhous</i> y su proteína.....	62
4.-	Sistema citocromo P450.....	67
5.-	Transformación de la cepa silvestre UCD 67-385 con una deleción del gen <i>ast</i>	69
CONCLUSIONES		71
BIBLIOGRAFIA		72

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1.- Secuencia de partidores utilizados para amplificar el gen <i>ast</i> de <i>X. dendrorhous</i> , diseñados a partir de la secuencia para el gen de la astaxantina sintasa publicada en base de datos (AX034665).	31
Tabla 2.- Lista de partidores y secuencias nucleotídicas utilizados para secuenciar el gen <i>ast</i> en su versión genómica y cDNA. Las flechas indican la orientación (→) directa y (←) reversa.	42
Tabla 3.- Partidores para amplificar el cDNA del gen <i>ast</i> de <i>X. dendrorhous</i> para el gen de la astaxatina sintasa diseñados a partir de la secuencia publicada en base de datos (Nº AX034665).	47
Tabla 4.- Tamaño de las bandas cromosómicas de la cepa silvestre UCD 67-385 (extraído de Hermosilla G, 1997).	62
Tabla 5. Comparación de secuencias genómicas para el gen de la astaxantina sintasa de <i>X. dendrorhous</i> publicadas en base de datos.	65

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Síntesis de compuestos isoprenoides a partir de isopentenil pirofosfato (IPP).	2
Figura 2: Fuentes endógenas y exógenas que generan especies reactivas de oxígeno y provocan daño a diferentes niveles celulares.	3
Figura 3: Cepa de <i>X. dendrorhous</i> UCD 67-385 crecida en medio YM.	5
Figura 4: Isómeros configuracionales de la molécula de astaxantina.	7
Figura 5: Comparación de la ruta de síntesis de astaxantina en algas, bacterias, plantas y en la levadura <i>X. dendrorhous</i> .	11
Figura 6: Detalle de la secuencia de reacciones que conducen a la síntesis de astaxantina a partir de β -caroteno.	12
Figura 7: (A) Análisis de restricción en gel de agarosa del DNA genómico de la cepa silvestre UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i> digerido con distintas enzimas de restricción. (B) Autoradiografía.	32
Figura 8: Digestión total de DNA genómico de la cepa silvestre UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i> con la enzima de restricción <i>Pst</i> I.	35
Figura 9: Análisis mediante PCR del DNA plasmidial obtenido de colonias transformantes en gel de agarosa.	36
Figura 10: Análisis mediante PCR de colonia de los transformantes pertenecientes a la placa N° 19. Utilizando los partidores CP450-F y CP450-R que amplifican un producto de 2.5 kb. La flecha en rojo indica el amplificado esperado de 2.5 kb.	37

Figura 11:	Digestión con <i>Pst</i> I del DNA plasmidial aislado de varias colonias transformantes perteneciente a la placa N° 19.	38
Figura 12:	Análisis de restricción con <i>Pst</i> I del plásmido pC19.19.	39
Figura 13:	Análisis por restricción del plásmido pC19.19 e inserto de 4.0 kb portador del gen <i>ast</i> con distintas enzimas de restricción en gel de agarosa.	40
Figura 14:	Secuencia genómica del gen <i>ast</i> de <i>X. dendrorhous</i> y análisis de la región promotora.	43
Figura 15:	Mapa de restricción de la secuencia genómica del plásmido pC19.19 del gen <i>ast</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	46
Figura 16:	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación del cDNA del gen <i>ast</i> mediante RT-PCR.	48
Figura 17:	Análisis por PCR de las colonias transformantes de <i>E. coli</i> portadores del gen <i>ast</i> .	49
Figura 18:	Análisis de restricción con <i>Bam</i> HI de las colonias transformantes que mostraban el tamaño de amplificado esperado.	50
Figura 19:	Secuencia del cDNA del gen <i>ast</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	52
Figura 20:	Resultados del BLAST-P para la secuencia traducida del gen <i>ast</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	53
Figura 21:	Electroforesis de campo pulsado (CHEF) de los cromosomas de <i>X. dendrorhous</i> .	54

- Figura 22: (A) Esquema del plásmido pC19.19. Se indica la región de 2.485 pb que fue eliminada. (B) Inserción del casete de resistencia a higromicina en el sitio *HpaI-StuI* del plásmido pC19.19. 55
- Figura 23: Esquema general del mecanismo de inserción del casete de resistencia a *hyg* en el genoma de *X. dendrorhous*, por recombinación homóloga con el *locus ast*. A: Mutante homocigoto. B: Mutante heterocigoto de *X. dendrorhous*. 56
- Figura 24: Análisis por PCR de las colonias transformantes obtenidas a partir de la transformación de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* con el plásmido portador de la delección. 57
- Figura 25: Cromatogramas y fenotipos de (A) cepa silvestre, (B) cepa homocigota Tr10, (3) cepa heterocigota Tr31. Los números indican los diferentes pigmentos que acumulan. 59
- Figura 26. Estructura tridimensional de la proteína astaxantina sintasa codificada por el gen *ast* de *X. dendrorhous*. 67
- Figura 27: Representación del sistema citocromo P450 de clase II. 68

ABREVIATURAS

CHEF	Campo eléctrico de contorno homogéneo.
DMAPP	dimetilalil pirofosfato
DNA	ácido desoxirribonucleico
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
FPP	farnesil pirofosfato
GPP	geranil pirofosfato
GGPP	geranilgeranil pirofosfato
IPP	isopentenil pirofosfato
MVA	Vía del ácido mevalónico
HMGR	hidroximetilglutarato reductasa
HMG	hidroximetilglutarato
SOD	superóxido dismutasa
kb	kilobases
MM _v	medio mínimo Vogel
NaOH	hidróxido de sodio
pb	pares de bases
PCR	Reacción de la Polimerasa en Cadena
RT-PCR	Reacción de la Transcriptasa Reversa acoplado a PCR
RNA	ácido ribonucleico
RNAsa A	ribonucleasa A
SDS	dodecil sulfato de sodio
TAE	tampón tris-acetato-EDTA
TE	tampón tris-EDTA
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
UV	luz ultravioleta
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β D-galactopiranosido
Hyg ^R	Resistencia al antibiótico higromicina B

RESUMEN

Los carotenoides son un grupo de pigmentos sintetizados *de novo* por diferentes organismos, tales como: Algas, algunas plantas, hongos y bacterias. Sin embargo, el resto de los animales son incapaces de producirlos y deben adquirirlos a través de la dieta. Estos compuestos son importantes por su función biológica, como también por su directa aplicación industrial. Dentro de los carotenoides encontramos a la astaxantina que es reconocida por sus propiedades antioxidantes (Nakato, T y cols., 1999) y su utilización como pigmento en la industria de la acuicultura para la coloración de salmónidos (Gary and Setsuko, 1994). Actualmente, la industria salmoniculora utiliza un pigmento sintetizado químicamente, el cual es importado y corresponde a uno de los aditivos más caros en los costos de producción. Es por esto, que una de las alternativas más promisorias para la obtención de astaxantina natural, es la utilización de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex. *Phaffia rhodozyma*), que tiene la capacidad de producir hasta un 85 – 90 % de astaxantina. Si bien, este microorganismo sintetiza el pigmento, las cantidades normales son bajas (200 y 400 µg de astaxantina/g de peso seco) para ser utilizadas como fuente industrial, sin embargo mediante mutagénesis clásica se ha logrado desarrollar cepas sobreproductoras, pero tienen la desventaja de ser cepas genéticamente inestables.

En general, la mayoría de los estudios en esta especie están dirigidos especialmente al conocimiento de la carotenogénesis (An G. H y cols., 1989) y a la identificación de los genes que codifican para las diferentes enzimas de la ruta metabólica de astaxantina. En este trabajo, se caracterizó el gen *ast* que codifica para la enzima astaxantina sintasa, la cual cataliza la formación de astaxantina a partir de β-caroteno. Para ello, se elaboró una estrategia de clonación del gen *ast*, la cual consistió inicialmente en la construcción mediante hibridación, de un mapa de restricción

genómico de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*. El análisis de restricción permitió ubicar el gen en un fragmento *PstI* de aproximadamente 4,0 kb, lo que permitió la construcción de una genoteca parcial en el sitio *PstI* del vector pBluescript SK⁻ y la selección de clones portadores de este gen mediante PCR. Paralelamente, se clonó el cDNA de este gen a partir del RNA, mediante RT-PCR. Ambas versiones cDNA y genómico del gen *ast* fueron secuenciadas completamente y su análisis permitió determinar que la versión genómica posee un tamaño de 3,995 kb y está constituida por 18 exones y 17 intrones, de diferentes longitudes. El análisis bioinformático de la secuencia nucleotídica del gen, indicó un alto grado de similitud con enzimas del tipo citocromo P450 hidroxilasa, sugiriendo que se trata de un gen diferente al observado en otros organismos productores de astaxantina. Posteriormente, con el objetivo de determinar la localización del gen *ast* en el genoma de la levadura, los cromosomas fueron separados mediante electroforesis de campo pulsado, determinándose mediante hibridación que este gen se encontraría en 2 bandas cromosómicas. Finalmente, se realizó una delección de gran parte del gen *ast*, se insertó un casete de resistencia al antibiótico higromicina B como método de selección y se transformó *X. dendrorhous* por integración y reemplazo del gen *ast*, obteniéndose colonias transformantes resistentes al antibiótico y de fenotipo amarillo. El análisis por HPLC de los pigmentos producidos por estos transformantes, indicó que no producen astaxantina, acumulando solo β -caroteno, lo que demostraría la funcionalidad del gen *ast*.

ABSTRACT

The carotenoids are a group of pigments that can be synthesized *de novo* by different organisms such as plants, algae, fungi and bacteria, as opposed to the animals that are unable to synthesize these compounds and must acquire them through their diet. These compounds are important for their biological function, as well as for their direct industrial application. Inside this group we find the astaxanthin that is recognized for its antioxidant properties (Nakato, T *et al.*, 1999) and as a pigment in the aquaculture industry for the coloration of salmonids (Gary W. S and Setsuko O. J, 1994). Currently, the pigment used by the salmon industry is chemically synthesized and corresponds to one of the most expensive preservatives in the production costs. It is for this reason that one of the most promissory alternatives for the obtaining of natural astaxanthin, is the use of the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Ex. Phaffia rhodozyma*) that has the capacity to produce astaxanthin between among 85-90%. Although this microorganism synthesizes the pigment, the natural quantities are too low (200 and 400 µg of astaxanthin of dry weight) to be used as an industrial source. Although, overproducing strains have been obtained through classic mutagenesis, they have the disadvantage of being genetically unstable.

In general, most of the studies on this species are directed towards the knowledge of the carotenogenesis (An G.H *et al.*, 1989) and the identification of the genes that code for the different enzymes of the metabolic pathway of astaxanthin. It is the objective of this thesis therefore, to characterize the gene involved in the last step of the pathway that transforms the β-carotene to astaxanthin. This step would be controlled by the gene *ast* that codes for the enzyme astaxanthin synthase, an enzyme of the family cytochrome P450 that has hidroxilase and oxigenase activities. The strategy used to clone the *ast*

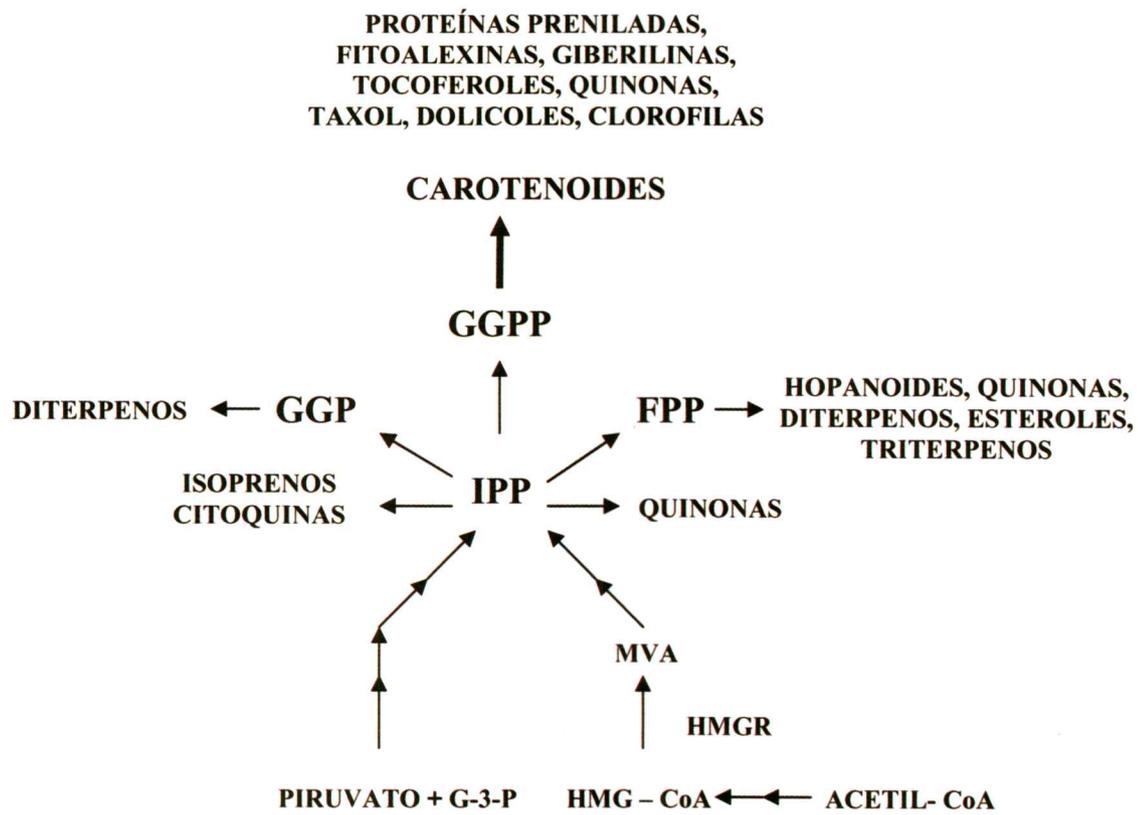
gene, consisted of the construction of a genomic restriction map of the wild type strain UCD 67-385 of *X. dendrorhous* by means of hybridization. The results located the gene on a *Pst*I fragment of approximately 4,0 kb, that allowed the construction of a partial DNA library in the *Pst*I site of the pBluescript SK- vector and the selection of clones carrying this gene. Likewise, the cDNA was cloned from the RNA using RT-PCR. The gene sequence analysis and their cDNA determined that it has a size of 3,995 kb and is constituted by 18 exons and 17 introns, of different lengths. With the objective of determining their localization in the genome of this yeast, an electrophoretic karyotype was carried out. Therefore, the chromosomes of the yeast were separated by pulsed field electroforesis and through hybridization, it was determined that the *ast* gene would be in two chromosomal bands. Finally, a great portion of the *ast* gene, was deleted and inserted into a genetycin and hygromycin resistant cassette and transformed into *X. dendrorhous* by integration and replacement of the gene *ast*, obtaining resistant transforming colonies. The analysis by HPLC of pigments of these transformants indicated that they are unable to produce astaxanthin, accumulating β - carotene, which would be demonstrating the functionality of the *ast* gene.

INTRODUCCION

Características generales de los carotenoides

Los carotenoides son una clase de pigmentos ampliamente distribuidos en la naturaleza, identificándose más de 600 moléculas con diferentes estructuras químicas (Ong and Tee, 1992). De acuerdo a su composición química pueden ser clasificados en carotenos y xantófilas. Los primeros no presentan átomos de oxígeno en su estructura y las xantófilas sí. La mayoría de estos compuestos están formados por una cadena poliénica que contiene entre 3 y 15 dobles enlaces conjugados, responsables del color de la molécula, el cual oscila entre el amarillo, naranja y rojo. Los carotenoides sintetizados por algunos hongos, bacterias y plantas cumplen una función fisiológica importante en muchos organismos, principalmente en animales como insectos, aves y peces. Estos últimos, no tienen la capacidad de sintetizarlos y deben ser obtenidos a través de la dieta (Sandmann G, 2001).

Desde el punto de vista de su biosíntesis, los carotenoides son derivados de la ruta general de isoprenoides y son sintetizados como producto de la condensación de varias unidades de isopreno, llegando a constituir moléculas de 30 a 40 carbonos. Comparten sustratos elementales con otros compuestos tales como esteroides, giberelinas, ácido retinoico y quinonas (Bramley and Mackenzie, 1988; Sandmann, 1991) (Figura 1).



**Figura 1.- Síntesis de compuestos isoprenoides a partir de isopentenil pirofosfato (IPP)
 (Modificado de Cunningham. F.X and E. Gantt, 1998).**

Los carotenoides tienen la propiedad de reaccionar con los radicales libres derivados del oxígeno implicados en el envejecimiento, actuando como potentes antioxidantes contra la peroxidación lipídica (Palozza and Krinsky, 1992), y participando en la prevención de enfermedades neurodegenerativas (Candfield y cols., 1992; Schroeder and Johnson, 1995) y cancerígenas (Nishino H, 1998; Harumi Jyonouchi y cols., 2000, Hughes D. A, 2001) (Figura 2).

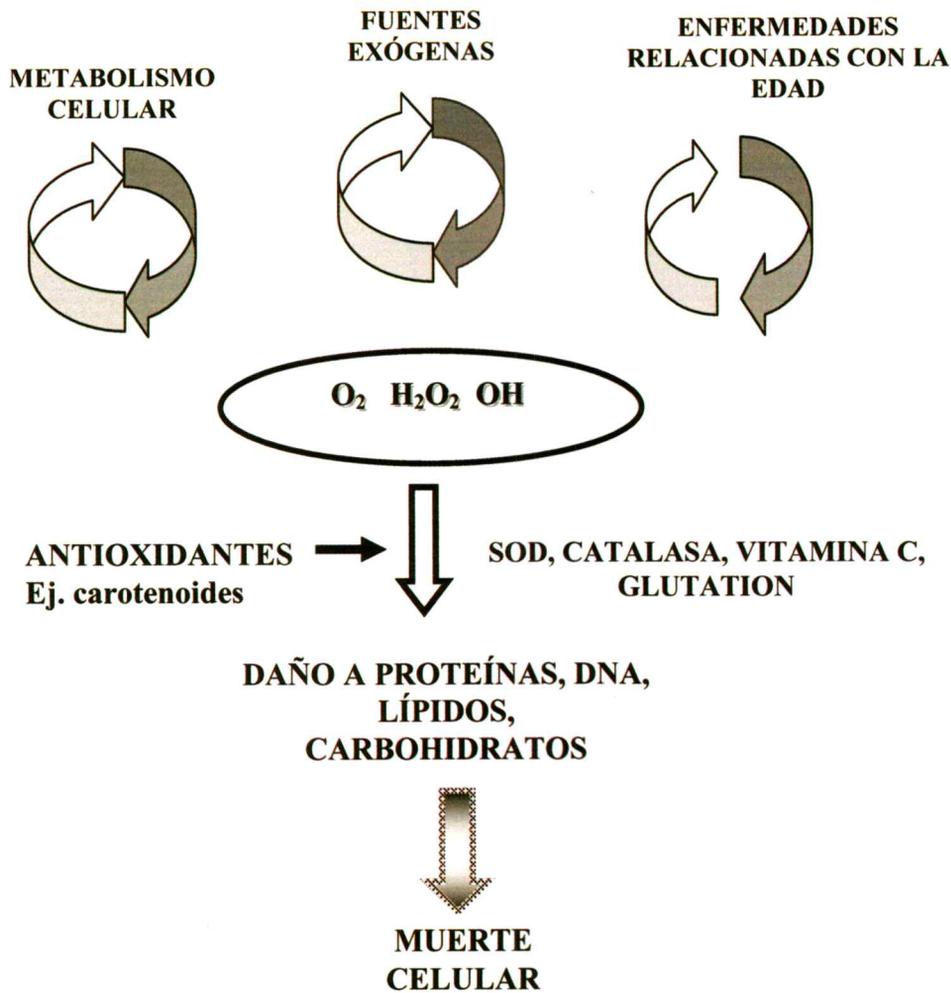


Figura 2.- Fuentes endógenas y exógenas que generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que provocan daño a diferentes niveles celulares.

La actividad antioxidante de los carotenoides se ha focalizado durante un largo tiempo en una de las moléculas mejor conocidas, el β -caroteno, pero actualmente se ha observado que la astaxantina tiene propiedades antioxidantes hasta 10 veces más efectiva que otros carotenoides, tales como zeaxantina, luteína, cantaxantina y β -caroteno (Yousry M. A, 2000). Esta xantófila es utilizada ampliamente en la industria de la salmonicultura como pigmento de alto valor nutricional, cumple un rol protector en la salud de los peces, en sus procesos reproductivos, crecimiento, y madurez como también es valorada por sus propiedades organolépticas en su uso alimentario. Además, se ha demostrado que evita la peroxidación de los lípidos, retardando la rancidez oxidativa de los productos almacenados para su comercialización (Sanderson and Setsuko, 1994; Nakato T y cols., 1999).

Pocos organismos producen astaxantina naturalmente y entre ellos podemos mencionar algunas bacterias marinas y plantas del género *Adonis* (Renstrom *et al.*, 1988). Sin embargo, las especies con mayor potencial biotecnológico siguen siendo la microalga *Haematococcus pluviales*, que en su fase de cisto y bajo ciertas condiciones de estrés (Nitrógeno, salinidad, luminosidad) produce aproximadamente un 85% astaxantina y la levadura Basidiomicete *Phaffia rhodozyma*, ahora *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

***Xanthophyllomyces dendrorhous* como fuente natural de astaxantina.**

Xanthophyllomyces dendrorhous, es una levadura carotenogénica de color rojo-anaranjado que produce astaxantina (Figura 3). Fue aislada al inicio de la década de los 70 a partir de exudados de árboles de las regiones montañosas de Japón y Alaska. Originalmente, se la llamó *Rhodozyma montanae* y más tarde Miller y colaboradores la clasificaron en un único género denominado *Phaffia*, en honor al Dr. Herman Jean Phaff, que estaría representado por una sola especie, *Phaffia rhodozyma* (Johnson, E.A, 2003).

Esta levadura a pesar de poseer características morfológicas y fisiológicas que corresponderían a un basidiomicete, tales como la presencia de una pared celular estructurada en multicapas, capacidad de fermentar glucosa y sintetizar pigmentos carotenoides (Miller M y cols., 1976; Yamada Y y cols., 1989; Golubev W, 1995). Fue considerada por un largo tiempo como una levadura imperfecta clasificándose como deuteromicete, ya que carecía de fase sexual. Sin embargo, en 1995 Golubev describe por primera vez la formación de estructuras sexuales, producto de la inducción con medios que contenían polioles. El autor sugiere que la conjugación entre una célula madre y su célula hija conduce a la formación de estructuras alargadas, llamadas holobasidios con basidiosporas terminales ovaladas. Estos estudios permitieron definirla como una levadura basidiomicete que fue clasificada definitivamente como *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Golubev W, 1995).

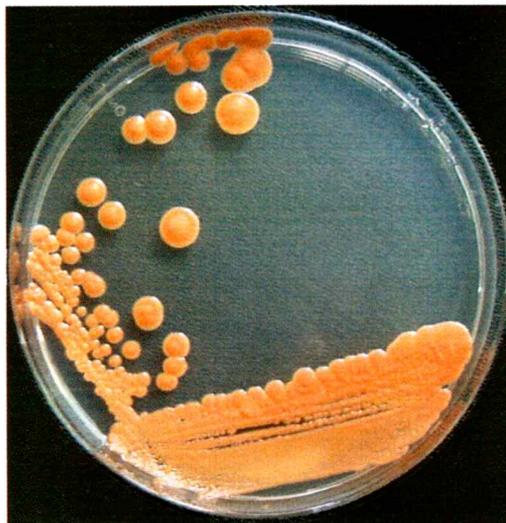


Figura 3.- *X. dendrorhous* UCD 67-385 crecida en medio YM.

X. dendrorhous tiene la capacidad de producir astaxantina, una molécula de 40 carbonos ($C_{40}H_{32}O_4$) que puede estar presente en tres configuraciones: dos enantiómeros (3R, 3'R y 3S, 3'S) y una forma meso (3R, 3'S), siendo el isómero 3S, 3'S el más abundante en la naturaleza (Parajo y cols., 1996; Higuera-Ciapara I y cols., 2006). No obstante, la astaxantina de *X. dendrorhous* solo se encuentra en la configuración 3R 3R' (Figura 4). La producción de astaxantina de esta levadura alcanza valores entre un 83 a un 87% del total de pigmentos carotenoides por célula, lo que le confiere un enorme potencial biotecnológico para su aplicación en la salmonicultura. Sin embargo, el principal inconveniente para su utilización como fuente de astaxantina es la baja producción del pigmento en las cepas silvestres (200 y 400 μg de astaxantina/g de peso seco), lo que resulta poco atractivo desde un punto de vista industrial.

Estas características condujeron a que la mayoría de los estudios genéticos iniciales estuvieran orientados hacia la obtención de cepas sobreproductoras de astaxantina, mediante luz ultravioleta (Retamales y cols., 1998) o con agentes químicos como nitrosoguanidina y etilmetano-sulfonato (Bielich y cols., 1991; Retamales y cols., 1998). También, la aplicación de ingeniería metabólica ha estado enfocada al mejoramiento de la carotenogénesis (Misawa and Shimada, 1997; Ojima y cols., 2006) y como complemento a los análisis genéticos se realizaron estudios fisiológicos y bioquímicos para mejorar la productividad de esta levadura, optimizando las metodologías de fermentación (Vásquez y cols., 1998; Flores-Cotera y cols., 2001).

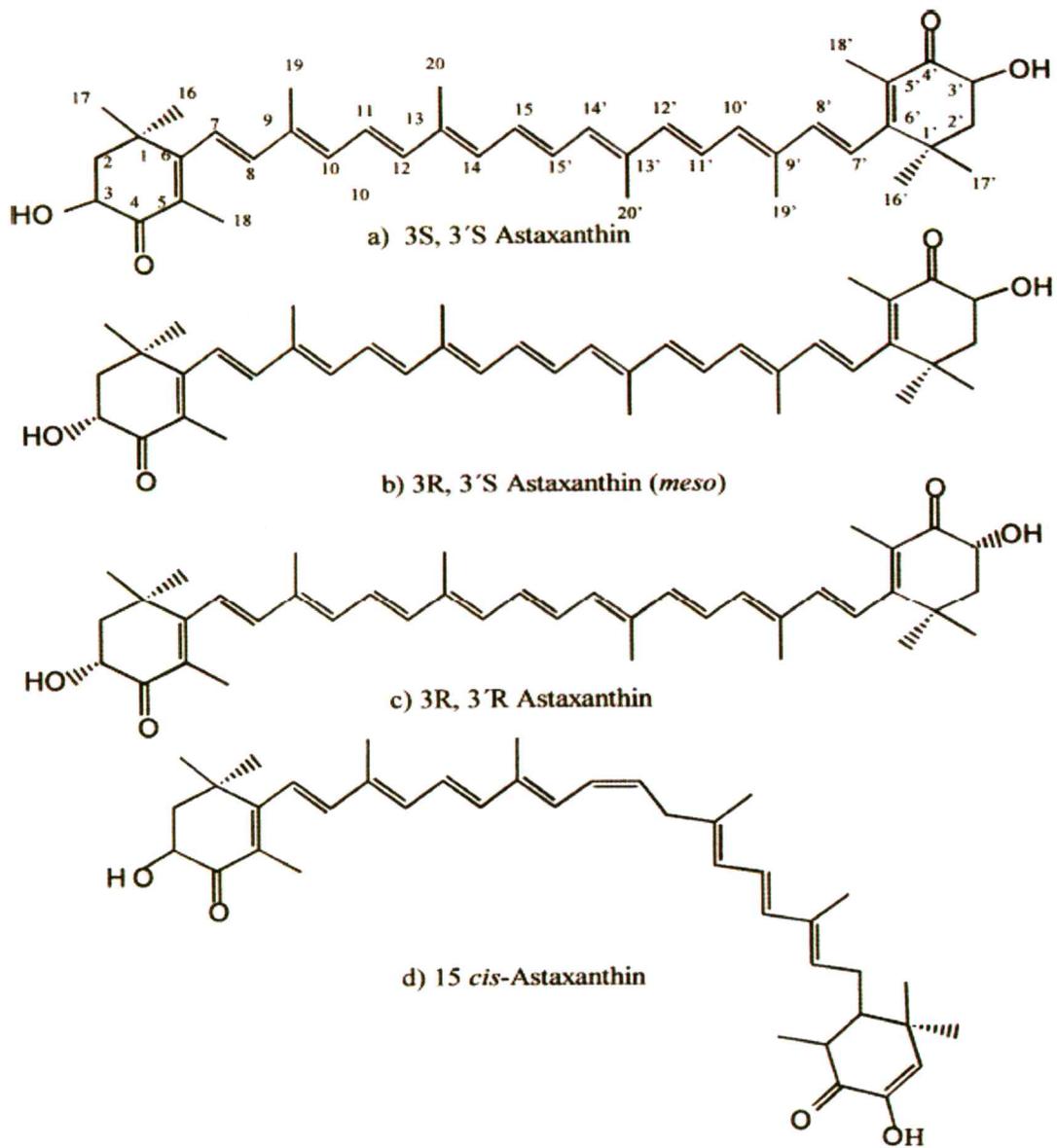


Figura 4.- Isómeros configuracionales de la molécula de astaxantina.

Carotenogénesis y Biosíntesis de Astaxantina

La síntesis de astaxantina, y en general la síntesis de carotenoides es un proceso complejo desde el punto de vista de los genes que están involucrados, como de sus mecanismos de regulación. Actualmente, los genes que codifican las enzimas involucradas en la biosíntesis de astaxantina de *X. dendrorhous* han sido clonados y secuenciados completamente en su versión genómica y cDNA. Evidencias obtenidas en nuestro laboratorio han demostrado que existiría procesamiento alternativo en dos genes de la ruta de biosíntesis (*crtYB* y *crtI*), proceso no descrito para otros organismos carotenogénicos (Lodato y cols., 2003). La presencia de mensajeros alternativos sería, probablemente, una forma de regulación de la carotenogénesis durante el ciclo de crecimiento de esta levadura.

También, ha sido descrito que el estrés oxidativo debido a especies reactivas de oxígeno (ROS), estarían regulando la síntesis y composición de los carotenoides, fenómeno observado en varios microorganismos productores de pigmentos, entre ellos microalgas, levaduras y bacterias. Además, se ha comprobado experimentalmente que la adición de agentes ROS, por ejemplo peróxido de hidrogeno (H_2O_2) al medio de cultivo aumenta la concentración de astaxantina y disminuye la de β -caroteno (Yuan S. L and J. Y Wu, 2006). En *X. dendrorhous* aún no existe evidencia experimental que demuestre este mecanismo de regulación, aunque se sugiere que la activación de genes y proteínas reguladoras podría ser debido a la presencia de oxígeno (Schroeder and Jonhson, 1995).

El análisis genético de la carotenogénesis ha permitido establecer que las primeras etapas de la síntesis de carotenoides son altamente conservadas en la mayoría de los organismos estudiados. Los pasos hasta licopeno e incluso hasta β -caroteno están bien definidos y muestran poca variación entre los diferentes organismos productores de pigmentos. Sin embargo, dependiendo del organismo se observan diferencias en cuanto al número de genes estructurales

que participan en las distintas etapas, se ha observado que en plantas y algas participan más genes en la biosíntesis de carotenoides que en hongos. Se han clonado más de 150 genes *crt* a partir de estos organismos, los cuales codifican para 27 enzimas carotenogénicas diferentes (Lee P.C and Schmidt-Dannert, 2002).

En *X. dendrorhous*, la carotenogénesis se puede separar en dos etapas, la primera corresponde a la formación de β - caroteno a partir de isopentenil pirofosfato (IPP) y la segunda a la síntesis de astaxantina a partir de β -caroteno. La formación de estos compuestos proviene de la ruta general de isoprenoides, cuyas primeras etapas no son específicas de la carotenogénesis, sino que están relacionadas con varias otras vías que producen compuestos de importancia biológica para los organismos (esteroles, hormonas, giberelinas, retinol, entre otras). Comienza con la isomerización del isopentenil pirofosfato (IPP) a dimetilalil pirofosfato (DMAPP), catalizado por la enzima IPP isomerasa, producto del gen *idi*. Luego, el siguiente paso es la síntesis de geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) reacción catalizada por la enzima GGPP sintasa, codificada por el gen *crtE*. Más tarde, se produce la condensación de dos moléculas de geranylgeranyl pirofosfato, catalizado por una enzima bifuncional con actividad fitoeno sintasa y licopeno ciclasa, codificada por el gen *crtYB* (Verdoes J. C y cols., 1999; Alcaíno J, 2002). Posteriormente, ocurren 4 desaturaciones sucesivas del fitoeno para dar licopeno, paso catalizado por la enzima fitoeno desaturasa, codificado por el gen *crtI*. La ruta de biosíntesis continúa con la reacción de ciclización de los extremos del licopeno para dar β -caroteno catalizado por la enzima bifuncional fitoeno β -caroteno sintasa. Luego, al β -caroteno, se le agregan dos grupos hidroxilos en las posiciones 3 y 3' y dos grupos ceto en las posiciones 4 y 4' para formar la molécula de astaxantina (Figura 5). Se postula que esta última reacción sería catalizada por un complejo

multienzimático o por una enzima con dos actividades C-4 β -caroteno cetolasa y C-3 β -caroteno hidroxilasa (Figura 6).

Principalmente, en bacterias es donde se han logrado aislar y caracterizar con más detalle las enzimas y los genes involucrados en este último paso. Se ha clonado el gen *crtW* a partir de las bacterias marinas *Agrobacterium aurantiacum* y *Alcaligenes sp*, el gen *crtO* a partir de la eubacteria *Synechococcus*, y el gen *bkt* desde la microalga *Haematococcus pluviales*, estos genes codificarían para enzimas con actividad β -C-4-oxigenasa. Por otro lado a partir de bacterias como *Erwinia uredovora*, *A. aurantiacum* y *Arabidopsis thaliana* se ha clonado el gen *crtZ* que codificaría para una enzima con actividad β -caroteno hidroxilasa (Siero C y cols., 2003; Prakash B and Bernstein S, 2005), ambos genes necesarios para la formación de astaxantina.

En todos los casos mencionados, se describe la existencia de dos proteínas diferentes codificadas por los genes *crtW* y *crtZ*, sin embargo en la levadura *X. dendrorhous* los antecedentes apuntan a la existencia de un único gen que codificaría para una única enzima con las dos actividades, oxigenasa e hidroxilasa. Esto debido principalmente a la imposibilidad de obtener mutantes en esta levadura que acumulen algún pigmento intermedio entre β -caroteno y astaxantina.

En relación a los antecedentes descritos, el propósito de esta tesis fue caracterizar estructuralmente el gen *ast*, que codifica para la enzima astaxantina sintasa, de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*, el cual participa en la última etapa de la vía de síntesis del pigmento.

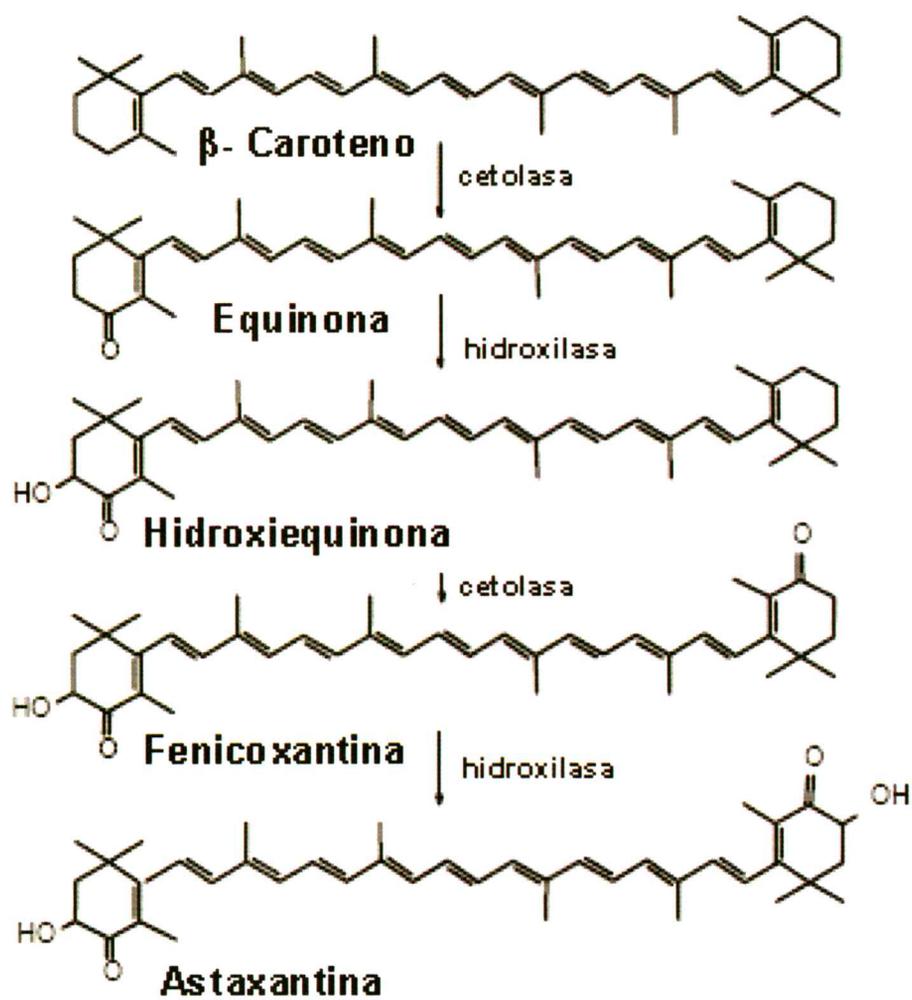


Figura 6.- Detalle de la secuencia de reacciones que conducen a la síntesis de astaxantina a partir de β-caroteno (Modificado de Visser y cols., 2003).

HIPÓTESIS

En la ruta de biosíntesis de astaxantina de *X. dendrorhous* el paso de β -caroteno hasta astaxantina estaría controlado por un solo gen *ast* que codifica una enzima del tipo citocromo P450 hidroxilasa, bifuncional con dos actividades, β -caroteno-C-4 oxidasa y β -caroteno-C-3 hidroxilasa.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar genética y molecularmente el gen *ast* de *X. dendrorhous*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1.- Clonar el gen *ast* de *X. dendrorhous* mediante PCR.
- 2.- Caracterizar estructuralmente el gen *ast*, mediante secuenciación y mapeo de restricción.
- 3.- Clonar el cDNA del gen *ast* de *X. dendrorhous* a partir de su RNA mensajero.
- 4.- Ubicar el gen *ast* en el cariotipo electroforético de *X. dendrorhous*.
- 5.- Construir mutantes de delección del gen *ast* en la cepa silvestre y determinación su fenotipo de carotenogénesis.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- MATERIALES

1.1. Reactivos biológicos

La endonucleasas de restricción, DNA ligasa del bacteriófago T4, DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq Polimerasa), Transcriptasa reversa de M-MLV, DNasa, RNasa A, Novozima, Proteinasa K, Lisozima, DNA del bacteriófago lambda digerido con la enzima de restricción *HindIII* (*NHindIII*), los antibióticos ampicilina e higromicina B y X-Gal fueron adquiridas de compañías tales como: Fermentas, Promega, New England Biolabs, GenLab, Amersham Biosciences, U.S Biological, Sigma, BioLabs Inc.U.S.A y Best Pharma S.A.

1.2. Reactivos químicos

Los productos químicos utilizados para la preparación de las soluciones y los medios de cultivo fueron adquiridos de las siguientes compañías: Merck Química Chilena Soc. Ltda., Sigma Chemical Co. ST. Louis, Missouri U.S.A., Difco Laboratories, Detroit, Michigan U.S.A.

1.3.- Medios de cultivo

Las cepas de *X. dendrorhous* fueron crecidas en Medio YM que contenía 1% de glucosa, 0.3% de extracto de levadura, 0.3% de extracto de malta y 0.5% de bactopectona (An y cols., 1989). Para realizar las extracciones de DNA genómico se utilizó medio mínimo Vogel 1X (MM_v), que contenía diferentes oligoelementos en distintas concentraciones y glucosa al 2% (Retamales y cols., 2002). Las cepas de *E. coli* fueron cultivadas en medio LB (Luria Bertani) que contenía Triptona 1%, extracto de levadura 0.5% y Cloruro de Sodio 0.5%, suplementadas con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml. Para la selección de transformantes de *X. dendrorhous* se utilizó el antibiótico higromicina B a una concentración de 30 µg/ml.

1.4.- Cepas y plásmidos

Las cepas de *X. dendrorhous* utilizadas en los diferentes experimentos fueron: Cepa silvestre UCD 67-385 (ATCC24230) obtenida del American Type Culture Collection, Washington D.C. U.S.A. Cepas mutantes atx5 y atx10 que acumulan β -caroteno, obtenidas mediante mutagénesis clásica y derivadas de la cepa silvestre UCD 67-385 (Martínez, 1995).

La cepa DH5 α de *E. coli* utilizada como huésped para los experimentos de transformación fue adquirida de la compañía Gibco-BRL y el plásmido pBluescript SK- utilizado como vector de clonamiento fue adquirido de la compañía Stratagene.

2.- MÉTODOS

2.1. Condiciones de cultivo y mantención de cepas

Los cultivos de *X. dendrorhous* se crecieron a una temperatura de 22 °C con agitación constante. La cepa DH5 α de *E. coli* fue crecida a una temperatura de 37 °C con agitación constante durante toda la noche. Las colonias transformantes fueron cultivadas en medio LB líquido o sólido, ambos medios suplementadas con el antibiótico ampicilina. Para la mantención de las cepas, se mezcló 1 ml de cultivo, con 298 μ l de glicerol al 87% y se almacenaron a -80 °C.

2.2. Métodos de Purificación

2.2.1.- DNA plasmidial

El DNA plasmidial se purificó a partir de 5 ml de cultivos bacterianos utilizando el método de lisis alcalina (Birnboim and Doly, 1979). Las células se colectaron por centrifugación durante 1 min. Luego, se resuspendieron en 100 μ l de solución I (50 mM glucosa, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8,0 con lisozima 4 mg/ml) y se incubaron 5 min. a temperatura ambiente. Se

agregó 200 µl de solución II (NaOH 0.2 N y SDS 1%), se mezcló suavemente y se dejó incubando en hielo durante 5 min. Luego, se agregó solución III (Acetato de Potasio 5 M) y se incubó por 5 min. en hielo. La mezcla se centrifugó por 10 min. y se realizó dos lavados con 1 volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y una vez con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Finalmente, el DNA fue precipitado con 2 volúmenes de etanol y mantenido a -20 °C. El DNA fue resuspendido en solución TE-RNAsa (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 10 mM más RNAsa 40 µg/ml) e incubado durante 30 min. a 37 °C. Las muestras fueron analizadas por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1X pH 8.0 (Tris 1M, EDTA 500 mM y ácido acético glacial) en presencia de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y visualizado en un transiluminador. Para la cuantificación del DNA se utilizó el programa ID1 de Kodak.

2.2.2.- DNA genómico

El DNA genómico de *X. dendrorhous* se obtuvo a partir de protoplastos (Hermosilla y cols., 1995; Retamales y cols., 1998). Las células de *X. dendrorhous* fueron colectadas por centrifugación 10.000 rpm durante 5 min. y lavadas 2 veces con KCl 0.8 M y se resuspendieron en 4 ml de KCl 0.8 M. Posteriormente, se agregó novozyma a una concentración final de 4 mg/ml, completando un volumen de 5 ml, y se incubaron a 22 °C durante toda la noche. Una vez formados los protoplastos, se lavaron dos veces con KCl 0.8 M y se centrifugaron a 4.000 rpm por 10 min. cada vez. Posteriormente, se resuspendieron en 5.4 ml de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 20 mM pH 8.0), se agregó 0.6 ml de SDS al 10 % y se incubó la mezcla a 37 °C por 10 min. Transcurrido este tiempo, se agregó 50 µl de proteínasa K (20 mg/ml) y se incubó a 55 °C por una hora. Se agregó 10 µl de RNAsa (10 mg/ml) y se incubó a 37 °C por 30 min. Luego, la mezcla con el DNA fue desproteínizada agregando un volumen de fenol saturado en solución Tris-HCl pH 7.4, agitando suavemente durante 30 min. y centrifugando durante 10 min. La fase

acuosa fue depositada en un tubo corex limpio de 30 ml y a la fase fenólica se le agregó 2 ml adicionales de solución TE, se homogenizó suavemente recuperando nuevamente la fase acuosa. Ambas fases se juntaron y se repitió el proceso de desproteinización con un volumen de fenol saturado. Posteriormente, se realizó dos extracciones con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y una vez con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), siempre mezclando muy suavemente, para luego centrifugar por 10 min. para separar las fases. Por último, el DNA fue precipitado con dos volúmenes de etanol absoluto frío, se mezcló suavemente y el ovillo formado se extrajo con una pipeta y se depositó en un tubo Eppendorf. Posteriormente, se lavó con etanol al 70%. Finalmente, el DNA fue resuspendido en 500 µl de amortiguador TE-RNAsa. El DNA fue analizado por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % en presencia de bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml y visualizado bajo transiluminador. La calidad y concentración fue chequeada con el programa ID1 de Kodak.

2.2.3.- Extracción de DNA desde geles de agarosa

Para purificar las bandas de DNA de interés desde geles de agarosa se cortó con bisturí bajo luz UV en un transiluminador. Luego, el trozo de gel se depositó en un tubo Eppendorf y se agregó una solución de NaI 6M. Posteriormente, se incubó a 55 °C hasta que la agarosa se disolvió completamente, se agregó al tubo 10 µl de Glassmilk (silica) y se incubó por 10 min. a temperatura ambiente homogenizando cada 2 min. Posteriormente, se centrifugó durante 1 min. se eliminó el sobrenadante, se lavó el precipitado tres veces con 500 µl de solución NewWash (Tris pH 7.5 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 25 mM pH 7.5 y etanol 50%) y se centrifugó por 1 min. cada vez. Luego, se agregó 15 µl de agua estéril, se incubó por 15 min. a 55 °C y se centrifugó, separando la resina del DNA, el cual fue depositado en un tubo Eppendorf. La calidad

del DNA obtenido fue chequeada por electroforesis en geles de agarosa 0.8 % y la concentración se determinó con el programa ID1 de Kodak.

2.2.4.- Extracción de RNA de *X. dendrorhous*

La extracción de RNA total se basó en el método de Chomczynski y Sacchi (1987), modificado por Lodato y cols., (2003) para *X. dendrorhous*. Se centrifugó 40 ml de cultivo a 10.000 x g durante 10 min. a 4 °C. Luego, se agregó a las células 5 ml de solución de Chomczynski 10:1:10 (Solución D; 151 de β -mercapto etanol; Acetato de Na 2M pH 4.0) con fenol ácido junto con 3 ml de perlas de vidrio. La ruptura de las células se realizó en vortex durante 5 min. a velocidad máxima y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. A esta mezcla se agregó 0.2 ml de cloroformo por cada ml de solución Chomczynski con fenol ácido, luego se agitó manualmente y se incubó a temperatura ambiente por 5 min., se centrifugó a 10.000 x g por 20 min. y la fase acuosa se transfirió a un tubo Eppendorf. Se lavó con 2.5 ml de fenol: cloroformo (1:1), se centrifugó a 10.000 x g por 15 min. y el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf, se agregó 1 volumen de isopropanol y se incubó a 20 °C por 1 h. Posteriormente, se centrifugó a 10.000 x g durante 10 min. a 4 °C y el precipitado de RNA fue lavado con etanol al 75% y resuspendido en agua tratada con DEPC. Finalmente, la concentración y la calidad de RNA fue determinada por espectrofotometría a 260 nm y por electroforesis en gel de agarosa denaturante, respectivamente.

2.3.- Construcción de una genoteca parcial de *X. dendrorhous*

2.3.1.- Construcción de un mapa de restricción genómico

Se realizaron digestiones totales del DNA genómico de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* con algunas enzimas de restricción estas fueron: *Sall*, *XhoI*, *NcoI*, *EcoRV*,

EcoRI, *BamHI*, *DraI* y *PstI*. El DNA digerido fue separado en gel de agarosa al 0.8% y luego, transferido a una membrana de Nylon mediante la técnica Southern Blot con algunas modificaciones realizadas en nuestro laboratorio.

2.3.2.- Hibridación con la sonda ast2.5

Para los experimentos de hibridación se utilizó la sonda ast2.5, que correspondió a un producto de PCR de 2.5 kb, amplificado con los partidores CP450-F y CP450-R, diseñados a partir de la secuencia publicada en base de datos para el gen de la astaxantina sintasa.

2.3.3.- Digestión con la enzima de restricción *PstI*

I

Se digirió completamente DNA genómico con la enzima de restricción *PstI*. Luego, se purificó DNA de un rango de tamaño aproximado entre 3.5 y 4.5 kb, mediante geneclean. Posteriormente, el DNA fue ligado al vector pBluescript SK- linearizado con *PstI* y con la mezcla de ligado se transformó la cepa DH5 α de *E. coli*. Los transformantes obtenidos fueron seleccionados en placas LB con el antibiótico ampicilina (100 μ g/ml) y X-gal (0,024 mg/ml) y las colonias blancas portadoras del inserto de interés fueron seleccionadas y replicadas por duplicado en placas LB ampicilina con 50 colonias cada una. Luego, se colectó las células de 24 placas con transformantes y de la mezcla homogénea, se purificó DNA plasmidial. Posteriormente, el DNA plasmidial fue amplificado mediante PCR de colonia con los partidores CP450-F y CP450-R.

2.4.- Cariotipo Electroforético

2.4.1.- Preparación de DNA cromosómico intacto de *X. dendrorhous*

El análisis de electroforesis de campo pulsado del DNA cromosómico de *X. dendrorhous* se basó en la técnica descrita por Cifuentes y cols., (1997). La obtención del DNA cromosómico intacto se realizó a partir de un cultivo de 100 ml con MMv en fase estacionaria crecido durante 3 a 5 días e incubado con agitación constante a 22 °C. Las células fueron lavadas dos veces con 50 mM EDTA pH 6.0 y resuspendidas en una solución de EDTA 50mM pH 6.0 con 5 mg/ml de novozima. Luego, se le agregó 3 ml de agarosa de bajo punto de fusión 1% preparada con EDTA 100 mM pH 6.0 y precalentada a 42 °C. La mezcla fue distribuida en moldes de 100 µl e incubada a 4 °C por 15 min. para su gelificación. Posteriormente, los bloques fueron sumergidos en 5 ml de buffer LET (EDTA 500 mM, β-mercaptoetanol 7,5 %, Tris-HCl 10 mM pH 7,5) y 0.4 mg/ml de novozima e incubados a 37 °C por 16 hrs. Se realizaron dos lavados con una solución de EDTA 50 mM pH 8.0, luego fueron sumergidos en 3 ml de solución NDS (EDTA 500 mM, N-lauroylsarcosina 1% y Tris-HCl 10 mM pH 7,5) y 1 mg/ml de proteinasa K e incubados a 55 °C por 24 hrs. Finalmente, los bloques fueron lavados dos veces con EDTA 50 mM y guardados a 4 °C hasta su utilización.

2.4.2.- Electroforesis de Campo Pulsado

La electroforesis de campo pulsado se realizó con el sistema CHEF II de BioRad (Chu y cols., 1986) en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 0.5X (Tris pH 8.0, ácido bórico y EDTA pH 8.0) a una temperatura constante de 14 °C. Las condiciones de corrida se determinaron de acuerdo a la separación óptima de las bandas de DNA cromosómico de *X. dendrorhous* (Cifuentes y cols., 1997). En este estudio los pulsos entregados fueron 90-90 seg. por 24 hrs. a 180 V. Luego, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (1 µg/ml) por 6 hrs. y se lavaron con agua destilada, para finalmente ser visualizados en un transiluminador con radiación UV.

2.5.- Análisis de DNA

2.5.1.- Digestión con endonucleasas de restricción

El análisis de restricción se realizó de acuerdo a lo descrito por Sambrook y cols., (1989). Se digirió 0.5 a 1 µg de DNA plasmidial con 1 a 2 unidades enzimáticas más el buffer de la enzima, en un volumen de 20 µl. Se incubó durante 2 hrs. a la temperatura indicada por el proveedor. Al realizar las digestiones con más de una enzima de restricción, se utilizó el buffer multicore 10X de Promega. Finalmente, se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% los tamaños y la concentración de las bandas obtenidas, las cuales fueron calculadas utilizando el programa ID1 de Kodak.

2.5.2.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

2.5.2.1.- Diseño de partidores

Para amplificar el gen de la astaxantina sintasa, se diseñaron los partidores directo CP450-F (5'cagtctttacctcgctccg 3') y reverso CP450-R (5'ggttccgcgtctatcagaaac 3') que amplificaron un fragmento de 2.5 kb. Para clonar el cDNA de gen de la astaxantina sintasa se diseñaron los partidores F1mast (5' ggatccccacctactttctccatagt 3') y R1mast (5' ggatccgacgacgtagaagtcatagc 3'), ambos partidores con sitios de restricción *Bam*HI, que permitieron posteriormente liberar el inserto clonado de 1.9 kb. Ambas parejas de partidores fueron diseñados a partir de la secuencia publicada en base de datos (Genbank N° acceso AX034665) para el gen de la astaxantina sintasa (Hoshino y cols., 2000).

2.5.2.2.- Amplificación de DNA

Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador Perkin Elmer 2400. Como templado se utilizó DNA genómico de *X. dendrorhous* a una concentración de 20 ng/μl en un volumen final de 25 μl que contenía buffer de PCR 1X pH 8,4 (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM), MgCl₂ 2 mM, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a 0,2 mM cada uno, 1 μM de cada partidor y 0.2 unidades de DNA *Taq* polimerasa. El protocolo de amplificación utilizado consistió en una denaturación inicial de 95 °C por 3 min., seguido de 35 ciclos de: Denaturación a 94 °C por 30 seg., alineación de partidores a 55 °C por 30 seg. y elongación a 72 °C por 3 min. y por último, una elongación final a 72 °C por 10 min.

2.5.3.- Transcripción Reversa acoplada a la reacción de la polimerasa en cadena (RT-PCR)

2.5.3.1.- Síntesis de cDNA

La reacción RT se realizó en un volumen total de 20 μl con 3 μg de RNA total, partidor oligo-dT₁₅ (25 μM) y se incubó durante 5 min a 70 °C. Luego, se agregó buffer M-MLV 5X, dNTP's a una concentración de 10 mM, agua y se incubó durante 5 min. a 37 °C. Finalmente, se adicionó 200 U (1μl) de transcriptasa reversa MLV y la mezcla de reacción se incubó durante 1 hr. a 42 °C y luego a 70 °C durante 10 min.

2.5.3.2.- PCR

La reacción de PCR se realizó mezclando 2,5 μl de buffer *Taq* 10X, 0,5 μl de dNTPs 10 mM, 1 μl de MgCl₂ 50 mM, 1 μl de cada partidor a 25 μM, 2 μl de reacción RT, 1 U de *Taq* (Promega) y agua. El protocolo de amplificación que se utilizó consistió en una denaturación inicial a 95 °C por 3 min., y luego 28 ciclos de: 94 °C por 30 seg., 55 °C por 30 seg., 72 °C por 3 min. y una extensión final de 72 °C por 10 min.

2. 6.- Transformación genética por electroporación

2.6.1.- Preparación de células electrocompetentes de *Escherichia coli*

A partir de un cultivo de *E. coli* DH5 α crecida en medio LB y suplementado con ácido nalidíxico (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) se realizó una dilución 1/100, en un volumen de 1 l. de medio LB, también suplementado con dicho antibiótico y se incubó a 37 °C con agitación constante hasta que se alcanzó una $\text{D.O}_{560\text{nm}}$ entre 0.5 y 0.8 (fase exponencial temprana-media). Luego, el matraz con las células fue enfriado, y se centrifugó a 10.000 x g por 10 min. a 4 °C. Las células fueron lavadas dos veces con agua destilada estéril ultrapura y fría, el primer lavado fue con 1 L y el segundo con 500 ml. Luego, se resuspendieron en 20 ml de glicerol al 10 % estéril y frío, y se centrifugó a 10.000 x g. por 10 min. a 4 °C. Finalmente, se resuspendieron en 3 ml de glicerol al 10 %, se alicuotaron 50 μl de células en tubos Eppendorf estériles y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

2.6.2.- Transformación de *Escherichia coli*

La transformación se realizó utilizando 50 μl de células electrocompetentes de la cepa *E. coli* DH5 α , las que fueron transformadas con un volumen de DNA no mayor a 10 μl . La mezcla fue depositada en una cubeta de electroporación de 2 mm (Bio Rad), para dar el pulso se utilizó un electroporador (Gene Pulser Bio Rad) que generó las siguientes condiciones de electroporación: 25 μF , 200 Ω y 2.5 kV. Rápidamente, las células fueron colocadas en hielo, se agregó 1 ml de medio LB y se incubó a 37 °C por una hora. Transcurrido este tiempo se sembró alícuotas de 100 μl de células en placas con medio LB-agar 2%, suplementadas con el antibiótico adecuado e incubadas a 37 °C por toda la noche. La selección de clones con inserto se realizó en placas LB con agar 2%, suplementadas con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicilina y 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de X-gal.

2.6.3.- Transformación de *X. dendrorhous*

El método utilizado para la transformación se basó en el protocolo de Adrio y cols., (1995) y Rubinstein y cols., (1996). Para esto, se inoculó un matraz que contenía 200 ml de medio YM, con un cultivo de 20 ml de *X. dendrorhous* crecido durante 48 hrs. Luego, el matraz se incubó a 22 °C con agitación constante, hasta alcanzar una D.O_{560nm} de 4,5 - 5 (fase exponencial temprana-media). Posteriormente, las células fueron centrifugadas a 6.500 rpm durante 10 min., y luego resuspendidas en 25 ml de buffer de potasio pH 7.0 más 25 mM DTT e incubadas a 22 °C por 15 min. Transcurridos este tiempo, las células se centrifugaron a 6500 rpm durante 10 min., se lavó dos veces con 25 ml del amortiguador STM (270 mM sacarosa, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM MgCl₂) frío y se resuspendió en 0.5 a 1 ml del amortiguador STM. De esta suspensión, con una concentración celular de 1×10^9 cels./ml, se tomaron 60 µl de células electrocompetentes de *X. dendrorhous* y se agregó entre 10-20 µg de DNA en un volumen de 5 µl, la mezcla se homogenizó y se transfirió a una cubeta de electroporación de 2 mm. Las condiciones de electroporación fueron: 25 mF, 600 Ω, 0,45 kV/cm, luego del pulso, se agregó 1 ml de medio YM a la cubeta de electroporación, se homogenizó con pipeta y se incubó a 22 °C por 5 hrs. Después de este tiempo, se plaquearon 100µl. de este cultivo en placas YM-agar 2%. Finalmente, a los 4 a 5 días se observó la presencia de colonias transformantes en las placas.

2.7.- Hibridación DNA-DNA

Los experimentos de hibridación se basaron en la técnica desarrollada por Southern (1975) y descritas por Sambrook y cols., (1989).

2.7.1.- Preparación de las membranas

Se realizó electroforesis en geles de agarosa al 0,8% en presencia de bromuro de etidio y TAE 1X, utilizando 3-5 µg de DNA genómico de *X. dendrorhous* digerido con distintas enzimas de restricción. Al finalizar la electroforesis se fotografió el gel junto a una regla, como registro de la migración del DNA.

2.7.2.- Transferencia

El gel fue sumergido en una solución de depurinación (HCl 0.2 N) durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se enjuagó el gel con agua desionizada. Luego, fue sumergido en 500 ml solución de denaturación (NaCl 1.5 M y NaOH 0.5 N) por 45 min. a temperatura ambiente y lavado con agua desionizada. La neutralización se realizó sumergiendo el gel durante 30 min. en 500 ml de solución que contiene Tris-HCl 1 M pH 7.4, NaCl 1,5 M a temperatura ambiente Siempre con agitación suave y constante. Finalmente, se repitió este paso con solución de neutralización nueva durante 15 min. y se enjuagó nuevamente con agua desionizada.

2.7.3.- Montaje de la transferencia

Para la transferencia, se colocó el gel sobre el soporte de una cámara de electroforesis con los pocillos hacia abajo y rodeado por bandas de parafilm sobre el papel filtro de 3 mm para evitar la absorción del buffer fuera del gel. Sobre el gel se colocó una membrana de Nylon Biodyne B (Pall) y sobre ésta, otro filtro de 3 mm. Luego, se colocó abundante papel absorbente y encima un matraz con agua, con un peso igual a 500 grs. sujeto a un soporte universal. La transferencia se realizó durante 12 a 14 hrs. en buffer de transferencia SSC 10X (SSC 20X = NaCl 3 M, $C_6H_5NaO_7 \cdot 2 H_2O$ 0,3 M pH 7,0).

2.7.4.- Fijación del DNA a la membrana

El DNA fue fijado a la membrana de Nylon en un horno a 80 °C durante 30 min. y luego con radiación U.V (254 nm) durante 5 min.

2.7.5.- Marcaje de la sonda

Se denaturó 30 ng de sonda por simple ebullición durante 5 min luego, se depositó rápidamente en hielo y se le agregó una mezcla equimolar de desoxiribonucleótidos (2 μ l de dATP, 2 μ l de dGTP, 2 μ l de dTTP), 15 μ l de mezcla de partidores, 5 de dCTP³² (50 μ Ci) y 3 μ l de agua destilada. Posteriormente, se adicionó 1 μ l de DNA polimerasa I (fragmento Klenow) y la reacción fue incubada a 25 °C durante 1 a 3 hrs.

2.7.6.- Prehibridación

La membrana fue lavada con SSC 2X y se depositó en una botella de hibridación con 10 ml de solución de hibridación (Na₂HPO₄ 0.5 M pH 7.2, SDS 7%). Luego, se incubó la membrana en la botella de hibridación por 5 min. a 65 °C en un horno de hibridación.

2.7.7.- Hibridación

Se agregó la sonda denaturada por ebullición a la botella de hibridación con la membrana totalmente empapada con la solución de hibridación y se dejó por 16 horas a 65 °C con agitación suave en el horno de hibridación.

2.7.8.- Lavados

La membrana fue lavada en la botella de hibridación, mediante el uso de dos soluciones. Primero fue lavada dos veces con 10 ml de una solución que contenía Na₂HPO₄ 40 mM pH 7.2, SDS 5% y luego dos veces con 10 ml de una solución compuesta por Na₂HPO₄ 40 mM pH 7.2, SDS 1%. La membrana fue mantenida entre 30 y 60 min. a 65 °C con agitación suave, con la solución de lavado correspondiente. Después de los lavados, la membrana fue retirada de la botella de hibridación se colocó sobre una placa autoradiográfica, se cubrió con plástico y sobre esto se colocó una hoja de papel. Luego, fue depositada en una placa de desarrollo y llevada a

oscuridad, sobre ella se colocaron varias placas autoradiográficas las que se mantuvieron a -80 °C por tiempos variables, antes de ser reveladas.

2.8.- Secuenciación

La secuencia completa de los clones portadores del gen *ast* y cDNA de *X. dendrorhous* se obtuvieron utilizando el secuenciador DNA Sequencing Kit Big Dye™ Terminator v3.0 de Applied Biosystems, en el Centro de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Las secuencias nucleotídicas fueron analizadas con los programas Chromas versión 1.43, ContigExpress 2003 y las herramientas del paquete de programas Vector NTI Suite 9.0. Para la búsqueda de secuencias homólogas en bases de datos se utilizó el conjunto de aplicaciones BLAST, disponible en el sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>.

2.9.- Construcción de mutantes de delección de *X. dendrorhous*

La construcción de mutantes de delección de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* fue realizado mediante el reemplazo de un fragmento del gen *ast* por un casete de resistencia a higromicina compuesto por el gen *hph* de *E. coli* que codifica para la enzima higromicina B-fosfotransferasa, bajo el control del promotor del gen del factor de la traducción 1 α (PEF-1 α) de *X. dendrorhous* y la región terminadora del gen de la enzima gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (Tgpd) de *X. dendrorhous*. Luego, con este fragmento se transformó la levadura y los transformantes obtenidos fueron seleccionados por su resistencia a estos antibióticos en placas YM sólido. Luego, fueron analizados por visualización del color de la colonia, PCR con los partidores CP450-F y C19-R y HPLC de los pigmentos totales.

2.10.- Extracción de carotenoides

Los transformantes fueron crecidos a partir de un cultivo con 70 ml de medio YM. De este volumen se utilizaron 50 ml para extracción de pigmentos y 15 ml para la determinación de peso seco. La extracción de carotenoides se basó en el método de An y cols., (1989) con algunas modificaciones realizadas en nuestro laboratorio. Al pellet de células provenientes de 50 ml de cultivo se le agregó 1 ml de acetona más un volumen de perlas de vidrio, las que fueron agitadas a máxima velocidad en vórtex por 1 min. Luego, por centrifugación se recuperó la fase orgánica a $12.100 \times g$ a $4^\circ C$, la que fue depositada en un tubo corex, este procedimiento fue repetido hasta que los restos celulares quedaron blancos. Finalmente, los extractos de acetona fueron juntados y los pigmentos extraídos con un quinto de volumen de éter de petróleo. Finalmente, la absorbancia del extracto fue medida a 474 nm.

2.11.- Análisis cualitativo y cuantitativo de los pigmentos por HPLC

Los pigmentos disueltos en éter de petróleo se secaron con nitrógeno gaseoso y se resuspendieron en acetona. Los pigmentos fueron separados por HPLC con una columna de fase reversa RP-18 Lichrocart 125-4 (Merck), utilizando una mezcla de acetonitrilo: metanol: isopropanol (85:10:5 v/v) como fase móvil con un flujo de 1ml/min a temperatura ambiente, en condiciones isocráticas. Los espectros de cada máximo de elusión fueron recuperados utilizando un detector con arreglo de diodos. Los carotenoides producidos fueron identificados de acuerdo a sus espectros de absorción, tiempos de retención y comparación con estándares específicos. La cuantificación se realizó utilizando curvas de calibración generadas con los estándares correspondientes.

RESULTADOS

1.- Búsqueda en genotecas parciales del gen *ast* mediante PCR.

Una primera aproximación para clonar el gen *ast* en su versión genómica a partir de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* fue la búsqueda mediante PCR en dos genotecas parciales de DNA de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* disponibles en nuestro laboratorio. Para esto se diseñaron partidores específicos de 20 bases utilizando como referencia la secuencia del gen de la astaxantina sintasa publicada en la base de datos Genbank (N° AX034665) de otra cepa silvestre de *X. dendrorhous* (cepa ATCC96815). Los partidores diseñados corresponden a CP450-F y CP450-R (Tabla 1).

La primera genoteca analizada fue construida en el sitio de clonamiento *Bam*HI del plásmido *Ylp5*, la cual consiste en 65 mezclas, denominadas PR1 a PR65, de aproximadamente 100 clones recombinantes cada una y la segunda genoteca, fue construida en el sitio de clonamiento *Eco*RV del plásmido pBluescript SK-, con un tamaño promedio de inserto de 5,8 kb, y que contiene 42 mezclas con 52 clones cada una. Como resultado de la búsqueda en ambas genotecas, no se logró aislar un clon positivo para el gen *ast*, motivo por el cual se procedió a realizar un análisis de restricción con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RV, utilizadas en la construcción de dichas genotecas.

2.- Análisis de restricción de DNA genómico de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*

La segunda estrategia para ubicar el gen *ast* fue la construcción de un mapa de restricción genómico de *X. dendrorhous*. Para esto, se realizaron experimentos de hibridación utilizando DNA genómico de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* digerido con una batería de enzimas de restricción (Figura 7A) y como sonda un producto de PCR denominado ast2.5. Los resultados de la autoradiografía (Figura 7B) indican que la sonda ast2.5, hibrida con 2 o más

bandas en la mayoría de las digestiones con la diferentes enzimas. Sin embargo, cuando la digestión es realizada con *EcoRI* y *PstI* se observa una única banda de hibridación de aproximadamente 23 kb y 4.0 kb, respectivamente. Esto significa que estas enzimas no cortarían el gen, por lo tanto ambas pueden ser seleccionadas para la construcción de la genoteca, pero se obtuvo por *PstI* por el tamaño de banda amplificada, considerada más apropiada para el clonamiento en pBluescript SK-.

Tabla 1.- Secuencia de partidores utilizados para amplificar el gen *ast* de *X. dendrorhous*, diseñados a partir de la secuencia para el gen de la astaxantina sintasa publicada y disponible en base de datos (N° AX034665).

Partidor	Orientación	Secuencia nucleotídica
CP450-F	Directo	5' CAGTCTTTACCTCGCTCCGA 3'
CP450-R	Reverso	5' GGTCCGCGTCTATCAGAAAC 3'

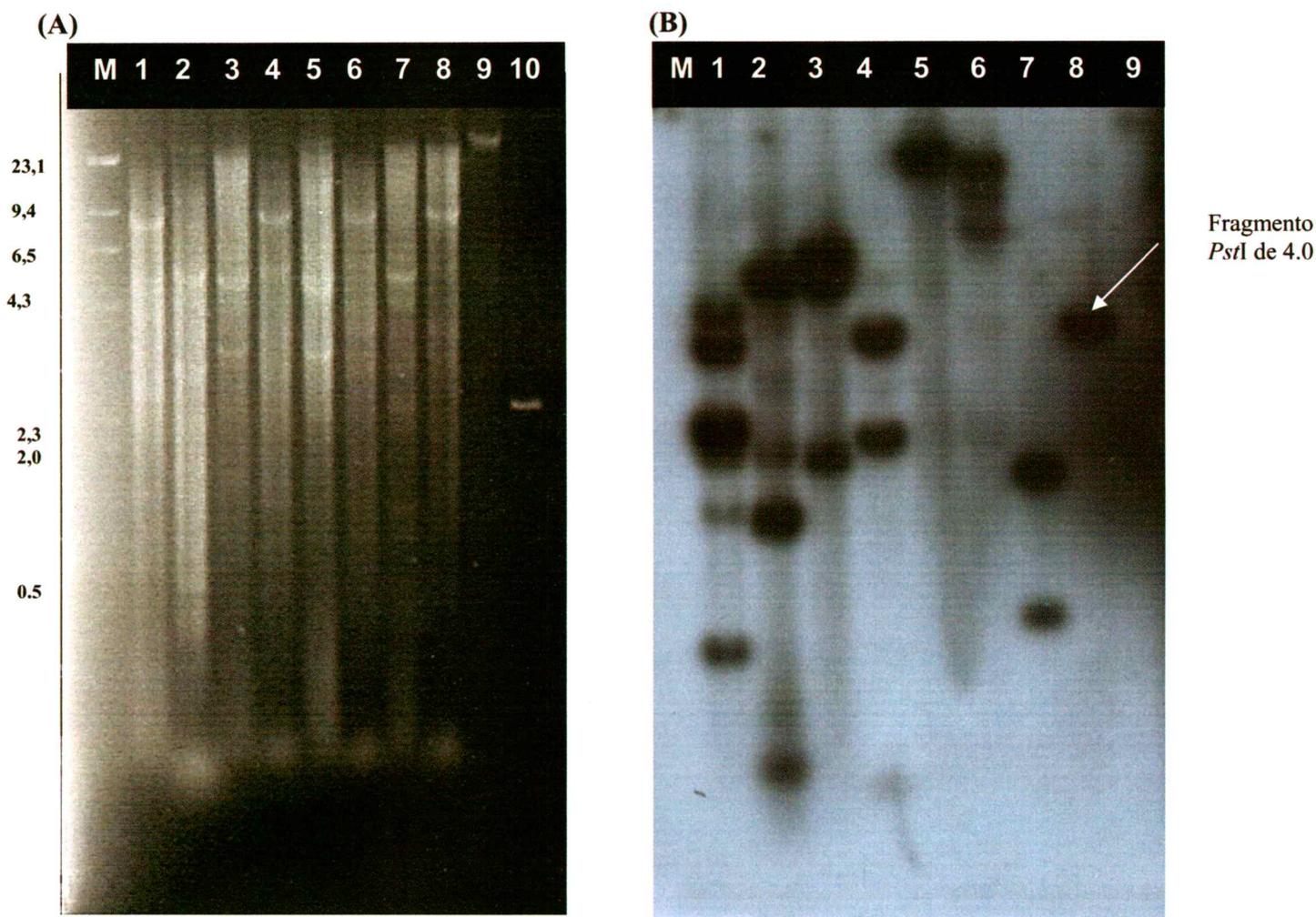


Figura 7. (A) Análisis de restricción en gel de agarosa del DNA genómico de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* digerido con distintas enzimas de restricción y (B) autoradiografía

M: Marcador de tamaño molecular (λ Hind III) en kb. Carril 1: *SalI*, Carril 2: *XhoI*, Carril 3: *NcoI*, Carril 4: *EcoRV*, Carril 5: *EcoRI*, Carril 6: *BamHI*, Carril 7: *DraI*, Carril 8: *PstI*. Carriles 9 y 10: DNA de la cepa silvestre UCD-67 385 sin digerir y sonda ast2.5, respectivamente, que no se muestran en la Figura B.

3.- Construcción de una genoteca parcial de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*.

Como se mencionó anteriormente, la estrategia utilizada para la búsqueda del gen *ast* consistió en la construcción de una genoteca parcial con la enzima *Pst*I de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos.

Posteriormente, el DNA fue ligado al vector pBluescript SK- linearizado con *Pst*I. Con la mezcla de ligado se transformó la cepa DH5 α de *E. coli*, los transformantes obtenidos fueron seleccionados y replicados en 24 placas LB ampicilina con 50 colonias cada una. Luego, se colectó las células de cada una de las placas y con la mezcla de clones se purificó el DNA plasmidial, el cual se analizó mediante PCR de colonia utilizando los partidores CP450-F y CP450-R. Se obtuvieron resultados positivos en dos de mezclas, una proveniente de la placa N° 19 y la otra de la placa N° 23 obteniéndose una banda de amplificado del tamaño esperado (2.5 kb). Los siguientes análisis fueron realizados con los transformantes de la placa N° 19 y el DNA plasmidial de la mezcla de la placa N° 23, fue congelada a -80 °C para su posterior análisis (Figura 9).

Luego, se realizó PCR de colonia de 23 de las 50 colonias pertenecientes a la placa N° 19 y se obtuvo un amplificado del tamaño esperado en los transformantes N° 1, 2, 3, 10, 18, 19 y 20 (denominados C-1, C-2, C-3, C-10, C-18, C-19 y C-20), descartándose aquellas colonias que mostraron bandas poco claras (Figura 10). Posteriormente, se extrajo DNA plasmidial de las colonias seleccionadas, las que fueron caracterizadas mediante PCR y análisis de restricción. Los resultados de PCR esta vez sólo mostraron amplificado para la colonia N° 19 y el análisis de restricción con *Pst*I mostrado en la figura 11, indicó que el transformante N° 19 contiene un inserto de 4 kb, del tamaño esperado, confirmando los resultados de PCR.

Posteriormente, se caracterizó mediante restricción el transformante N° 19 proveniente de la placa N° 19 con la enzima *Pst*I (que libera el inserto de 4.0 kb), como se observa en la figura 12. El carril N° 1 corresponde al inserto purificado de aproximadamente 4.0 kb, el carril N° 2 se observan dos bandas de amplificado, la primera y de mayor tamaño correspondió al inserto de 4.0 kb y la segunda al vector pBluescript SK- de 2.9 kb, y en el carril N° 3 se observa el vector pBluescript SK- linearizado. Por lo tanto, el plásmido que contiene el inserto de 4 kb fue denominado pC19.19, e indica que proviene de la placa N° 19 y específicamente de la colonia N° 19.

Posteriormente, este clon fue caracterizado por restricción como se muestra en la Figura 13. Lo que nos permitió obtener un mapa de restricción del gen con las enzimas mencionadas en materiales y métodos. Especialmente, se destacan las digestiones realizadas con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RV, con las cuales se construyeron las genotecas parciales analizadas en la búsqueda inicial del gen *ast*. Los resultados mostraron que *Bam*HI no corta el gen, ya que se obtuvo una única banda de 4.0 kb, y sin embargo, con la enzima *Eco*RV se observaron dos bandas que migran muy juntas en el gel de aproximadamente 2.0 kb, lo que indicó que estaría siendo cortado aproximadamente en la mitad.

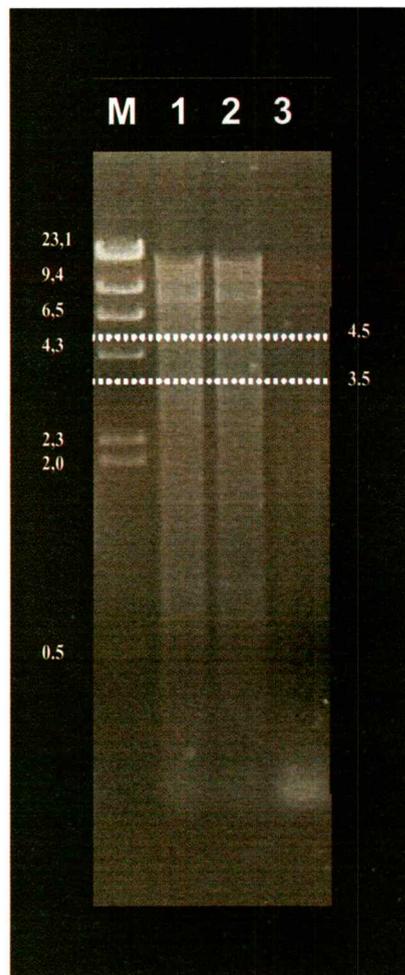


Figura 8. Digestión total de DNA genómico de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* con la enzima de restricción *Pst*I.

M: Marcador de tamaño molecular (λ *Hind*III) en kb. Carriles 1, 2 y 3: DNA genómico digerido con *Pst*I. Las líneas discontinuas indican el rango de tamaño del fragmento purificado (3.5 a 4.5 kb aprox.).

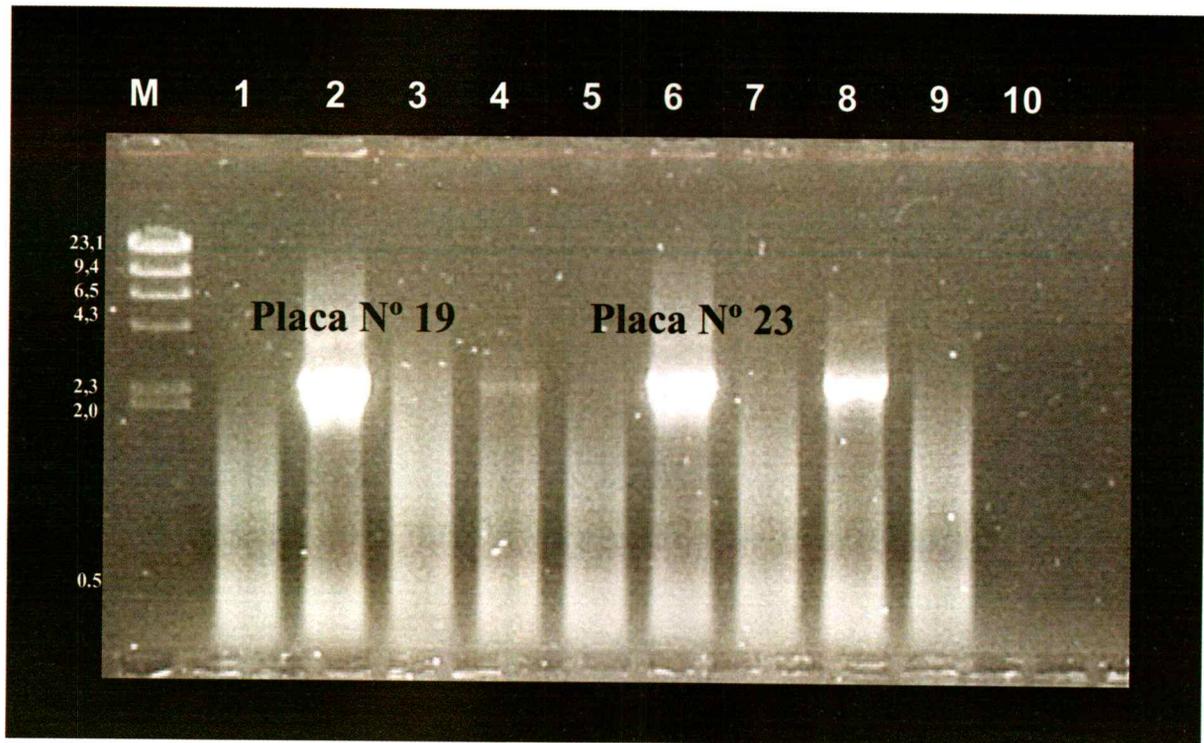


Figura 9. Análisis mediante PCR de colonia del DNA plasmidial de los transformantes pertenecientes a la placa N° 19, usando los partidores CP450-F y CP450-R, que amplifican un fragmento de 2.5 kb.

M: Marcador de tamaño molecular (*λHindIII*) en kb. Carril 1: placa N° 18, Carril 2: placa N° 19, Carril 3: placa N° 20, Carril 4: placa N° 21, Carril 5: placa N° 22, Carril 6: placa N° 23, Carril 7: placa N° 24, Carril 8: control positivo. Carril 9: control negativo.

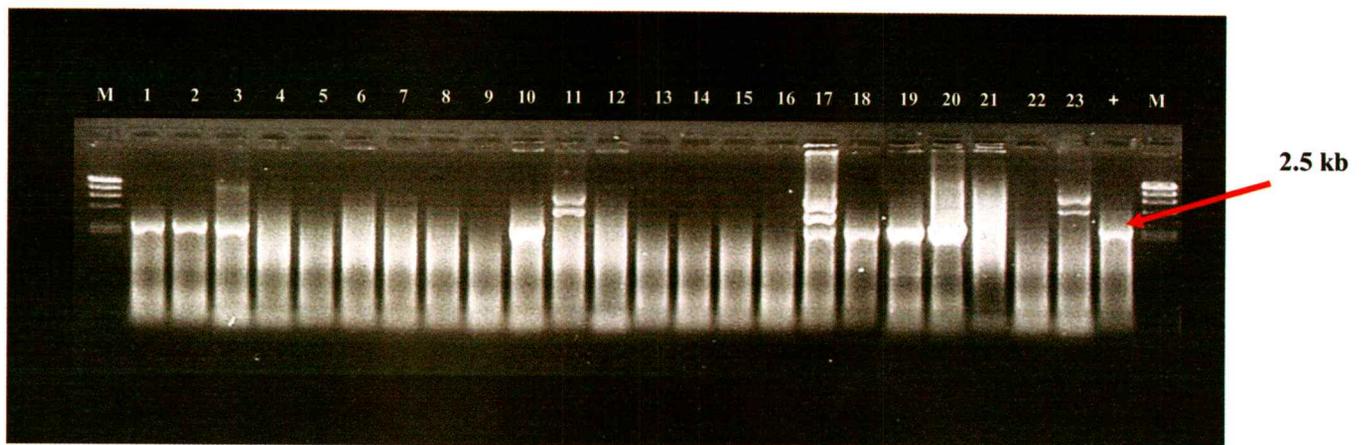


Figura 10. Análisis mediante PCR de colonia de los transformantes pertenecientes a la placa N° 19, utilizando los partidores CP450 F y CP450 R que amplificaron un producto de 2.5 kb. La flecha roja indica el amplificado esperado de 2.5 kb.

M: Marcador de tamaño molecular (λ HindIII) en kb. Carriles 1-23: Colonias N° 1-23, Carril 24: control positivo.

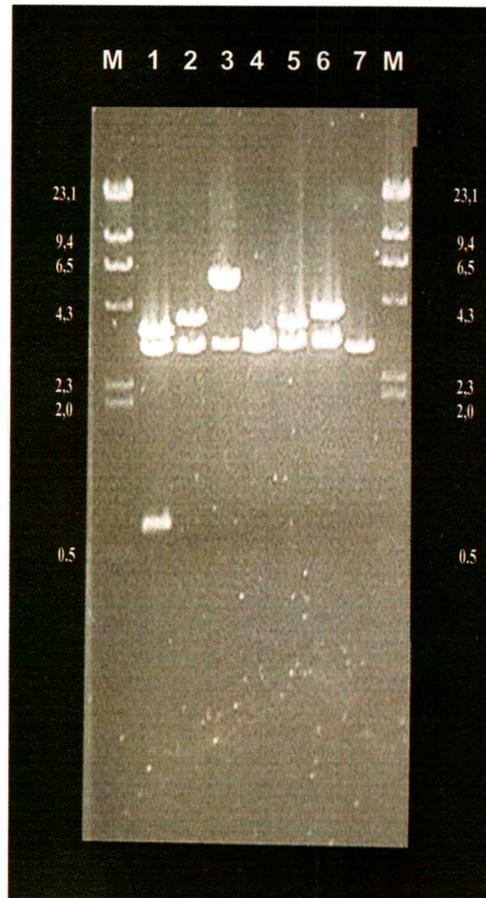


Figura 11. Digestión con *Pst*I del DNA plasmidial aislado de varias colonias transformantes pertenecientes a la placa N° 19.

M: Marcador de tamaño molecular (λ HindIII) en kb. Carril 1: Colonia N° 1, Carril 2: Colonia N° 2, Carril 3: Colonia N° 3, Carril 4: Colonia N° 10, Carril 5: Colonia N° 18, Carril 6: Colonia N° 19, Carril 7: pBluescript SK- linearizado.



Figura 12. Análisis de restricción con *Pst*I del plásmido pC19.19.

M: Marcador de tamaño molecular (*λ*HindIII) en kb. Carril 1: Fragmento *Pst*I de 4.0 kb liberado desde el plásmido pC19.19. Carril 2: plásmido pC19.19 digerido con *Pst*I. Carril 3: pBluescript SK- linearizado.



Figura 13.- Análisis por restricción del plásmido pC19.19 e inserto de 4,0 kb portador del gen *ast* con distintas enzimas de restricción en gel de agarosa.

M: Marcador de tamaño molecular (*NHindIII*) en kb. Carriles 1 y 2: pC19.19/*BamHI* e inserto/*BamHI*, Carriles 3 y 4: pC19.19/*DraI* e inserto/*DraI*, Carriles 5 y 6: pC19.19/*XhoI* e inserto/*XhoI*, Carriles 7 y 8: pC19.19/*SalI* e inserto/*SalI*, Carriles 9 y 10: pC19.19/*EcoRV* e inserto/*EcoRV*, Carriles 11 y 12: pC19.19/*HindIII* e inserto/*HindIII*, Carriles 13 y 14: pC19.19/*PstI* e inserto/*PstI*.

4.- Secuenciación del inserto de 4 kb del plásmido pC19.19 portador del gen *ast* que codifica la enzima astaxantina sintasa.

El inserto de 4.0 kb del plásmido pC19.19 fue secuenciado en ambas direcciones a partir de sus extremos comenzando con los partidores T3 y T7, ubicados en el sitio de clonamiento múltiple del vector pBluescript SK-. Luego, se continuó con partidores diseñados a partir de las secuencias previamente obtenidas, hasta completar el segmento en ambas direcciones (Tabla 2). El tamaño del fragmento de DNA fue de 3.994 pb el cual coincide con el tamaño del plásmido pC19.19 determinado por el análisis de restricción con *Pst*I. El análisis de la secuencia indicó que el gen *ast* estaría constituido por 18 exones y 17 intrones de longitudes variables (Tabla 3). Se identificaron regiones que participan en el inicio de la transcripción, río arriba del codón de inicio de la traducción ATG. Entre ellas dos secuencias ricas en pirimidinas en las posiciones -45 a -72 y -104 a -119, una caja TATA (TTTAAAA) en la posición -347, una potencial caja CAAT en la posición -484 y un potencial sitio de unión a reguladores transcripcionales, creA [(G/C)(C/T)GG(A/G)G] a -469 relacionado con la represión catabólica por glucosa.

Posteriormente, se realizó la caracterización del plásmido pC19.19 mediante mapeo de restricción, el cual permitió determinar la orientación del gen *ast* en relación a la posición de los partidores T3 y T7 del vector pBluescript SK⁻ (Figura 15).

Tabla 2. Lista de partidores y secuencias nucleotídicas utilizados para secuenciar el gen *ast* en su versión genómica y cDNA. Las flechas indican la orientación (→) directa y (←) reversa.

Nombre de Partidor	Secuencia 5' → 3'	Posición en el gen
T3	ATTAACCCTCACTAAAG	←
C19R2	CTGCAGTCGACAAACATGAA	3976 - 3995 ←
ATXR1	AAGATTGGACGACTGAGCCA	824 - 843 ←
ATXR2	AGACTTAGGATATCCCGACC	2183 - 2202 ←
ATXR3	ACACAGAAGCATGAAGAGGC	3940 - 3959 ←
C19R-D	CGTAGAAGTCATAGCGCCTG	3820 - 3839 ←
C19F-FR	TGTAAAGTAGTTGGTATGAT	631 - 649 ←
C191R-C2	GAGTCCAAGGTAGGAGCAAA	1826 - 1845 ←
CP45ORp	CCAGAGCGACGATAGACGACGT	3837 - 3858 ←
ASTcDNAR	TCATTCGACCGGCTTGACC	3708 - 3726 ←
T7	AATACGACTCACTATAG	→
Ch1	ATCCCCTCTCTGTCCGCTCA	1360 - 1379 →
Ch2	AGCAGTTTCCCGACGAGTTG	2000 - 2019 →
Ch3	CTTAATGCGTTGCCTTATCT	2652 - 2671 →
Ch4	GCACATCACCTTGATCATT	3636 - 3655 →
Ch5	TTCATGCTTCTGTGTCTCCA	3945 - 3964 →
Ch1R	AGAGCCATGACGTCCAGAGT	1635 - 1654 →
Ch2R	ATCAACAGCCTGATCGGAAG	2148 - 2167 →
Ch3R	GAAGCATGACCATCGTTCCT	3057 - 3076 →
Ch3F	TTCCGGCTTCTCTTCTGT	2917 - 2935 →
ATXD2	TATCTTACCAGGGTCGAGCT	1615 - 1634 →
ATXD3	GGATGTTTCACCGACTCTCA	2481 - 2500 →
ATXD4	GGTCGGTCATCAACGAGGTC	3026 - 3045 →
C19BF	CTGCAGGCACCGGCGCAAGT	1 - 20 →
C19REV	GATCTTCATGTTTGTGCGACTG	3972 - 3992 →
C19F-2	CGGCGCAAGTGGCTCCGGAC	11 - 30 →
C19F-D	GCCAGCAGTTGATCAAGCGA	40 - 59 →
C19F-C1	CCAGTTTGTCCATCCGAACC	1038 - 1057 →
C191R-C1	CAGACTCGAGACCGAAGGAG	1503 - 1522 →
C192R-C3	CGATGAGGAGGTACTCGCTC	2330-2349 →
C19R-C4	GACCGGAGAGGTGGCTTGAG	3273 - 3292 →
CP450Fp	GCCACCTACTTTCTCCATATGT	542 - 563 →
CP450MF	CTTCAGTCTTTACCTCGCTC	628 - 647 →
ASTcDNAF	ATGTTTCATCTTGGTCTTGCTC	560 - 580 →
Clon19F-1	GCACCGGCGCAAGTGGCTCC	7 - 26 →
Clon19F-2	CGGCGCAAGTGGCTCCGGAC	11 - 30 →

Exón 7

1711 atgctcttccatataatcgatacgcgactcatatgtccaggggtttgactataagagcgcgactcgcctccagaaacaagaccaatgagctctatgt
1801 cgcttttgcggacttaccgatgggtttgctcctaccttggactcattcaaggcttatcatgtgggattttgtaccttacttccgaactat
1891 ggtatgtctgccattctttgatatccaaaagattatggataggttacttcttaaaaattccacctatcgtgaacagaaacggagacatgaga
1981 tacctttgactcaaggattagcagtttcccgcagcagtggtgggatcgtaaagtccagatcaagcctctctgaataattcttgggtcatcatctt
2071 aaacctcctaggctcattccatccatggtgctgcaatagagcttatggagcaaaaagcagggcctgcttggctcagcttcccgatcaggct
2161 gttgataaaaaaggatgttcaaggctcgggatatccctaaagtctcctaggttagtaacgttttttaaacgtatatacagagcggcgacattctt
2251 tccttgacaactgtcaacatgctcgttactagtgagagcaaacatcgcccaacctgcctgaatctcaaaagcttccgatgaggaggt
2341 actcgtcagatcagtaacctgttatttggctggatatgagtgtgtatcctttccccctctctatccttagctgtataaaaaagcactaataga
2431 ggtctttatgtttcctgttgatcagaacttcttcgacagctcttgacatggatgtttcccgactctcagaagacaagctgttcaggat
2521 aaacttcgagaagaaatltgtcagatcgacacggatatgcctacgctgtgaggatgttttttgatgctaaatcttcttcttgcaaatga
2611 ctaaaacggccttccattcttgatccatttttagacgaacttaatcgcttgccttatctcgaagcgttgggttctcgattcttgggtctt
2701 gtcttccaaaatacaatcaggattatgtctcatctgatttgcgtctacggcgttgaaatctaactagtttggtaaggagctctctcgtct
2791 agacctcctagtccttatgctaaccgtgaatgcttgaaggatgaagacgtatgttggcttcatcgcgataatcttccatttcataattcc
2881 tttgtacatacgcatacaggctgaccgagctcaaatccggcttctctctgtgcttttttggccttcttattcttcttcttca
2971 accaaaaattgtcacagttcatcccacttgcgagcctgtcatlgtgctgagatgggtcgtcatcaacgaggtccggatcacgaaaaggaa
3061 cgatggtcatgcttctgtaagttttcccttttattcatctcctgataaaatagtttctgatagacgcggaccaatcagcgttgttcaaca
3151 tcaatcgttcaaaagtcttattggagaagatgcagaagaatcaggtacaattcgtttttttaaagccaatcgggttctgtagcgt
3241 attgaccggcctcttttaattctcgaaaagaccggagaggtggcttgaggacgttaacagactcgtcaacagatattgaagcaccctat
3331 ggacaccagcagcgtgtatgtttttttgtgtaatttctttgtgaatttgcaaaaacgttgaactcgcgcttcccttgttgttgaaatcc
3421 cagttatctctggaccagagcttgcctgtaaagtttcttctcatctggcgccttagcagtatccgatcatccatctagttcttctgtacga
3511 ttgtttctgactctcgcacttctgcagttgggtggcgatttgcgtcggcagatgaaggccttcttgttctcactctccgtcgggtcc

Exón 8

Exón 9

Exón 10

Exón 11

Exón 12

Exón 13

Exón 14

Exón 15

Exón 16

Exón 17

Exón 18

3601 agttcgagcccatcatctctcatccagagtagcagacacatcaccttgatcatcttcccgtcctcgaatcgttggtagagagaaggaggggt
3691 accagatgcgtttgcaggtcaagccgggtcgaa**TGA**gttgattcttcataatgtaagagaagttctataatctgagaatgtgtgactaggac
3781 aatgccttctttgtatcgatttgtttctcataccggcaggcgctatgacttctacgtcgtctatcgctcgtctctggactctcttctttac
3871 cctatatattccatccgctctgtatattgtctatcacgacgctctgtgtcgtcactcaatattcagcctcttcatgcttctctgtgtct
3961 ccatagatgtgatcttcatgtttgtcga**ctgcag**

Figura 14. Secuencia genómica del gen *ast* de *X. dendrorhous* y análisis de la región promotora. Se indican en color el codón de inicio de la traducción **ATG**, el codón de término de la traducción **TGA**, una caja **CAAT**, un sitio **creA**, una caja **TATA** y una región rica en pirimidinas **CTCT**. También, se indica el sitio de clonamiento *Pst*I (**CTGCAG**).

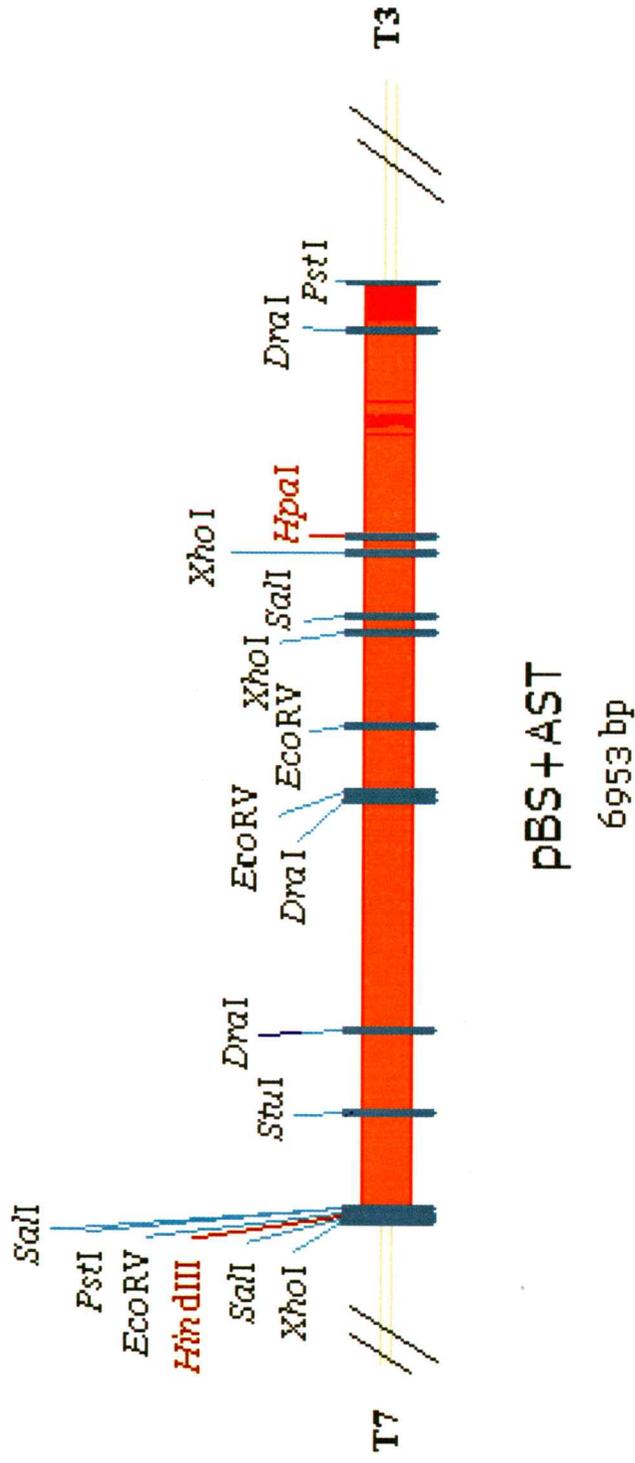


Figura 15. Mapa de restricción de la secuencia genómica del plásmido pC19.19 del gen *ast* de *X. dendrorhous*

5.- Clonado del cDNA del gen *ast* de *X. dendrorhous*.

Para clonar el cDNA a partir del mRNA del gen *ast* se extrajo RNA total de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* y luego se sintetizó la doble cadena de su cDNA mediante RT-PCR, utilizando los partidores F1 mast y R1 mast (Tabla 4) originando un amplificado de 1.9 kb (Figura 16). Este fragmento fue purificado y ligado al vector pBluescript SK- linearizado con *EcoRV*. Luego, con la mezcla de ligado se transformó la cepa DH5 α de *E. coli* y las colonias portadoras del inserto fueron seleccionadas en placas LB ampicilina X-gal. Se extrajo DNA plasmidial de 4 colonias transformantes denominadas: C-2, C-32, C-40 y C-46 (Figura 17), que fueron chequeadas mediante PCR obteniéndose un amplificado de 1.9 kb. Luego, se realizó un análisis de restricción con la enzima *Bam*HI (que libera el inserto) y se observó que todas eran portadoras del fragmento esperado de 1.9 kb (Figura 18).

Posteriormente, tres de estos clones fueron secuenciados completamente: C-2, C-32 y C-40 con el objetivo de determinar posible procesamiento alternativo del mRNA del gen de la astaxantina sintasa. Los resultados de la secuenciación no arrojaron diferencias entre las secuencias analizadas.

Tabla 3. Partidores para amplificar el cDNA del gen *ast* de *X. dendrorhous*, diseñados a partir de la secuencia publicada en base de datos (N° AX034665) para el gen de la astaxantina sintasa.

Partidor	Orientación	Secuencia nucleotídica 5' → 3'
F1 mast	Directo	<u>GGATCCCC</u> ACCTACTTTCTCCATATGT
R1 mast	Reverso	<u>GGATCCG</u> ACGACGTAGAAGTCATAGC

Se indica el sitio *Bam*HI (GGATCC) incorporado en el extremo 5' de cada partidor.

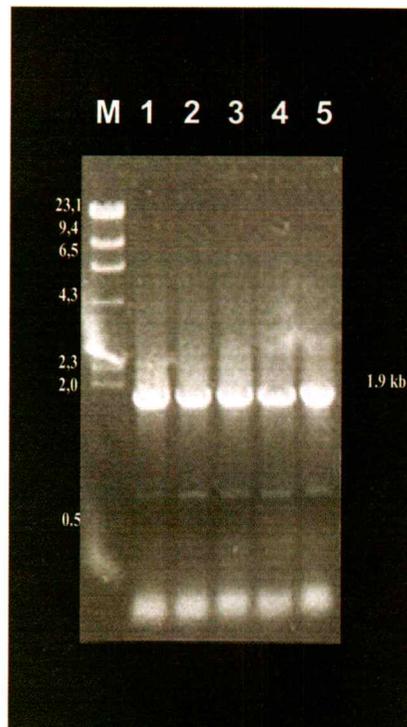


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación del cDNA del gen *ast* mediante RT-PCR.

M: Marcador de tamaño molecular (*NHindIII*) en kb. Carriles 1-5: Cinco reacciones de RT-PCR diferentes.



Figura 17. Análisis por PCR de las colonias transformantes de *E. coli* portadores del gen *ast*.

M: Marcador de tamaño molecular (*NHindIII*) en kb. Carril 1: Control positivo. Carril 2: Control negativo. Carriles 4 al 6: Productos de PCR de los clones: C-2, C-32, C-40 y C-46, respectivamente.

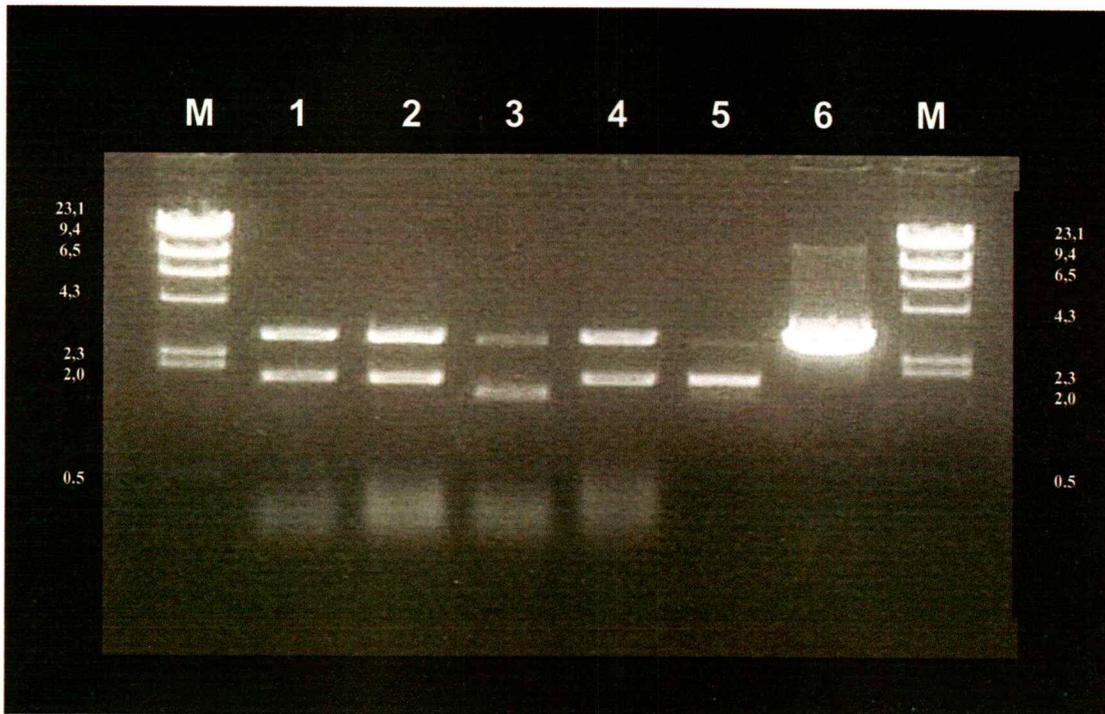


Figura 18. Análisis de restricción con *Bam*HI de las colonias transformantes que mostraban el tamaño de amplificado esperado.

M: Marcador de tamaño molecular (λ *Hind*III) en kb. Carriles 1-4: DNA de los clones C-2, C-32, C-40 y C-46 digeridos con *Bam*HI. Carril 5: inserto de 4.0 kb purificado. Carril 6: pBluescript SK- linearizado.

6.- Secuenciación del cDNA del gen *ast*

El cDNA fue secuenciado en ambas direcciones a partir de ambos extremos utilizando los partidores T3 y T7 respectivamente. Posteriormente se continuó con partidores internos diseñados para el gen *ast*, hasta lograr la secuencia completa. Los resultados indicaron que la secuencia completa tiene un tamaño de 1809 pb (Figura 19) y contiene un marco de lectura abierto (ORF) que codifica para una proteína de 557 aminoácidos, determinado mediante análisis bioinformática.

Los resultados del Blast-P realizados con la secuencia traducida arrojaron homología con proteínas citocromo P450 presentes en hongos basidiomicetes tales como *Cryptococcus neoformans* y *Ustilago maydis* (proteína hipotética), en hongos ascomicetes como en *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus clavatus*, también existiría homología con enzimas de plantas como en *Gibberella zeae* (proteína hipotética) y con varias citocromos P450 de mamíferos pertenecientes a la familia 3A (Figura 20).

7.- Ubicación del gen *ast* en el cariotipo electroforético de *X. dendrorhous*

Con el objetivo de ubicar el gen *ast* en el cariotipo de la levadura, se realizó una hibridación utilizando como sonda un fragmento de PCR de 2.5 kb denominado *ast2.5* de acuerdo a lo descrito en materiales y método. Los resultados de la autoradiografía indican que el gen *ast* estaría presente en las dos primeras bandas de hibridación (Figura 21C), que coinciden con los dos triplete de cromosomas de mayor tamaño del cariotipo electroforético de *X. dendrorhous* (Figura 21A y B).

1 ccacctactttctccat**atg**ttcatcttggcttctcacaggtgcttaggcctggttctcatgggcatccatagcgttcttca
91 gtctttacctcgctccgaggcgatctcaactgtataaaccttcagggccccaatacacaactactttacaggcaatttttagacatccc
181 tctcagctcgtacaggtgaagagcatgcgaagtacagagaaaaaacggaagcacacctccggtttgctgggatacgcctggagcaccccgctct
271 tgaactcgcacgatccgaaaagtcttcaaccatgtgatgaaagaagcctacgactatccgaaacctggatggccgctcgagtgctcagaa
361 ttgctaccggagatggtgtgttaacggcggaaaggtgaagctcataaagcgacatcgaaggatcatgatccccctctctgtccgctcagggccg
451 ttaagtcgatgggtcccaattttcttagaaaaaggatggaactgtcgacaagatgtaggagtcggctgagaaggatatggccgtgg
541 gagatcggccggtgaaaagaagcaaccagactcgagaccgaaggagtcgataaaggattgggtcggctcgagctactctggagcgtca
631 tggctcttgcaggggttgactataagagcgactcgcctccagaacaagaccatgagctctatgtcgttttgcggacttaccgatggggt
721 ttgctcctacctggactcattcaaggctatcatgtgggattttgtaccttacttccgaactatgaaacggagacatgagatacctttga
811 ctcaaggattagcagtttcccgcaggttgggatacagcttatggagcaaaaagcaggccgtgcttggctcagcttccgatcagggtg
901 ttgataaaaaggatgttcaaggtcgggatatcctaagctcctagtgagagcaaacatcgccccaacctgctgaaatcctcaaaaagctgt
991 ccgatgaggagggtactcgtctcagatcagtaaacctgttatttgggatagaaacttctcgacagcttggacatggatggtttcacccgac
1081 tctcagaagacaagctgttcaggataaaacttcgagaagaaatttgcagatcgacacggatagcctacgctagacgaacttaatgcgt
1171 tgccttatctcgaagcgttggtaaggagctctctctagaccctcctagtccttatgtaaacctgaaatgcttgaaggatgaagact
1261 tcatcccacttggcagcctgtcattggtcgagatgggtcggatcaacagggtcggatcacgaaaggaacgatggatcgttccgt
1351 tgttcaacatcaatcgttcaaaagttcatttatggagaagatgcagaagaatccagaccggaggtggttggagcgtaacagactcgc
1441 tcaacagtatgaagcaccctatggacaccagcggcgttctctctggaccagagcttgccttgggtggcgttggctgcggccgaga
1531 tgaaggccttctgttgtcactctccgtcgggtccagttcagccccatcctctcatccagagtaacgagcacatcaccttgatcattt
1621 cccgtcctcgaatcgttggtagagagaaggaggggtaccagatgcgttgcaggtcaagccggtcgaatga**aga**gttgattcttcataatgta
1711 agagaagttctatatctgagaatgtgtgactaggaacaatgccttcttggatcggatttggttctcataccccggcaggcgtatgacttc
1801 tacgtcgtc.

Figura 19. Secuencia del cDNA del gen *ast* de *X. dendrorhous*

	Score (Bits)	E Value
Cytochrome P450 [Cryptococcus neoformans var. neoformans JEC21].	<u>346</u>	1e-93
hypothetical protein UM04189.1 [Ustilago maydis 521]	<u>233</u>	1e-59
cytochrome P450 monooxygenase, putative [Aspergillus fumigatus Af293].	<u>168</u>	5e-40
hypothetical protein FG02118.1 [Gibberella zeae PH-1].	<u>171</u>	5e-41
cytochrome P450 [Aspergillus clavatus NRRL 1]	<u>165</u>	4e-39
cytochrome P450 monooxygenase (Fum15), putative [Neosartorya fischeri NRRL 181]	<u>150</u>	1e-34
cytochrome P-450 3A12 [Canis lupus familiaris].	<u>140</u>	2e-31
cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5 [Macaca mulatta]	<u>140</u>	9e-32
cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 13 [Rattus norvegicus]	<u>134</u>	8e-30

Figura 20. Resultados del BLAST-P para la secuencia traducida del gen *ast* de *X. dendrorhous*. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

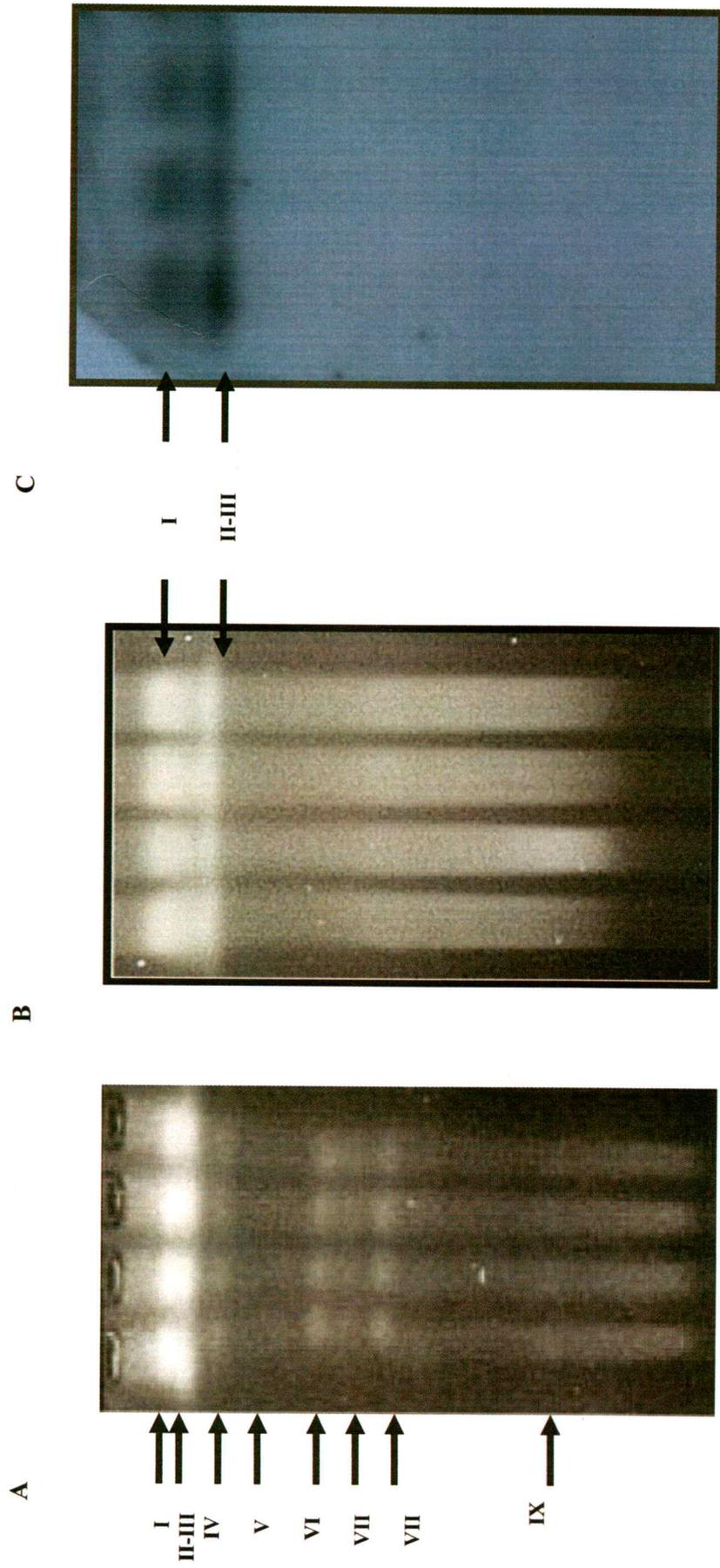


Figura 21. Electroforesis de campo pulsado (CHEF) de los cromosomas de *X. dendrorrhous*.

Figura A. CHEF en gel de agarosa 0.9% de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorrhous* (Cifuentes y cols., 1997).

Figura B. CHEF en gel de agarosa al 0.8% indicando los cromosomas de *X. dendrorrhous*.

Figura C. Autoradiografía que indica la ubicación del gen *ast* en 2 bandas del cariotipo electroforético de *X. dendrorrhous* (Banda I y Banda II-III).

8.- Construcción de una deleción del plásmido pC19.19 portador del gen *ast* de *X. dendrorhous*

Con el objetivo de demostrar experimentalmente que el fragmento de DNA presente en el plásmido pC19.19, es portador del gen *ast*, se procedió a construir una mutación por deleción de gran parte de éste. Para ello se buscó en el mapa de restricción, enzimas que se ubicaran cercanas a los extremos del gen. Las enzimas seleccionadas fueron *StuI* y *HpaI* con las cuales se eliminó un fragmento de 2.485 pb de la región codificante del gen *ast* (Figura 22A). Luego, al producto de digestión se ligó el casete de resistencia a higromicina B (Figura 22B) y se transformó *E.coli*, obteniéndose transformantes resistentes a dicho antibiótico denominado pC19.19 Δ *ast*::Hyg^R. Este clon fue utilizado para la transformación de la cepa silvestre de *X. dendrorhous*.

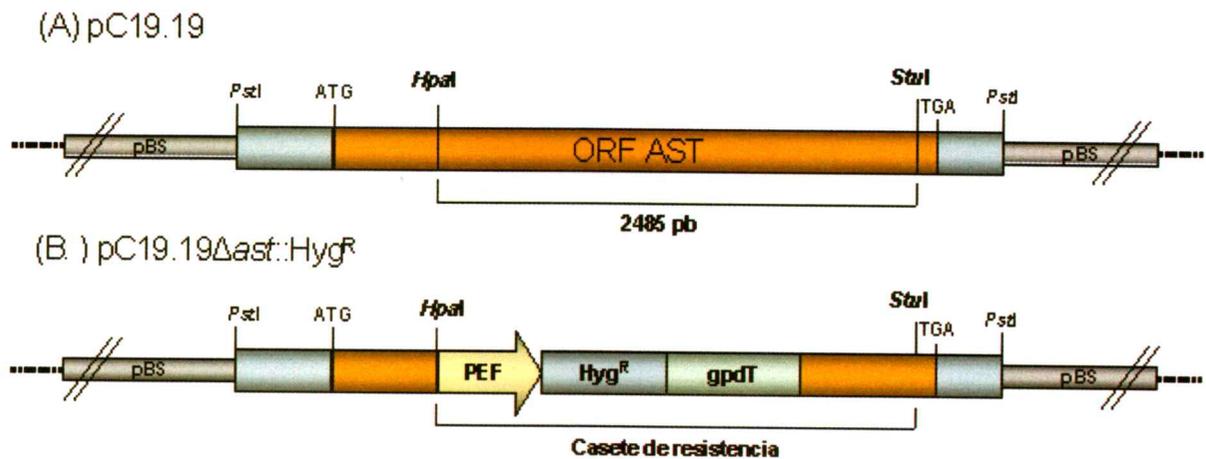


Figura 22. (A) Esquema del plásmido pC19.19 que indica la región de 2.485 pb eliminada. (B) Inserción del casete de resistencia a Higromicina en el sitio *HpaI*-*StuI* del plásmido pC19.19.

9.- Transformación de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*

La cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* fue transformada con el clon pC19.19 $\Delta ast::Hyg^R$, obteniéndose transformantes resistentes Higromicina. El análisis molecular mediante PCR con los partidores CP450 F y C19R-D, ubicados fuera de la deleción del gen *ast* indicó que el transformante denominado Tr31 era heterocigoto para el gen *ast* (Figura 24 carril 2), es decir se observó la presencia de una banda que correspondió al alelo silvestre de 3.2 kb y otra banda de 2.6 kb que correspondió al casete de resistencia a Higromicina, y su fenotipo fue similar al de la cepa silvestre. También, se obtuvieron transformantes de fenotipo amarillo que al ser analizados por PCR amplificaron una banda única de 2.6 kb, que correspondió al casete de resistencia a Higromicina. Posteriormente, estos transformantes fueron crecidos a baja presión selectiva y luego, a alta presión de antibiótico observándose una homocigotización del alelo mutado (Figura 24 carriles 3-8). Como resultado se obtuvieron varios transformantes de fenotipo amarillo (transformante Tr10) (Figura 25 B).

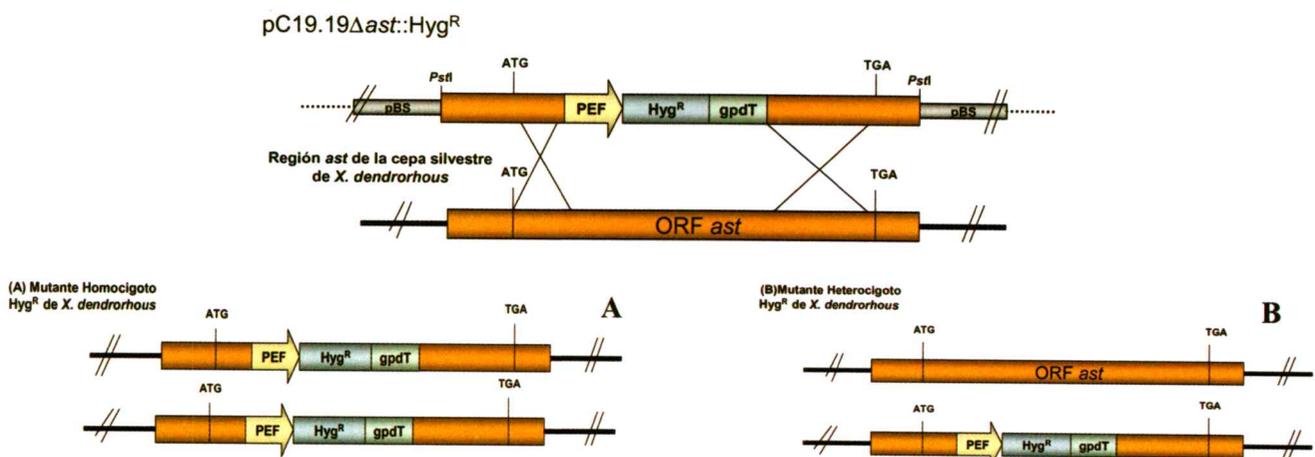


Figura 23. Esquema general del mecanismo de inserción del casete de resistencia a higromicina en el genoma de *X. dendrorhous*, por recombinación homóloga con el locus *ast*. A: Mutante homocigoto. B: Mutante heterocigoto.

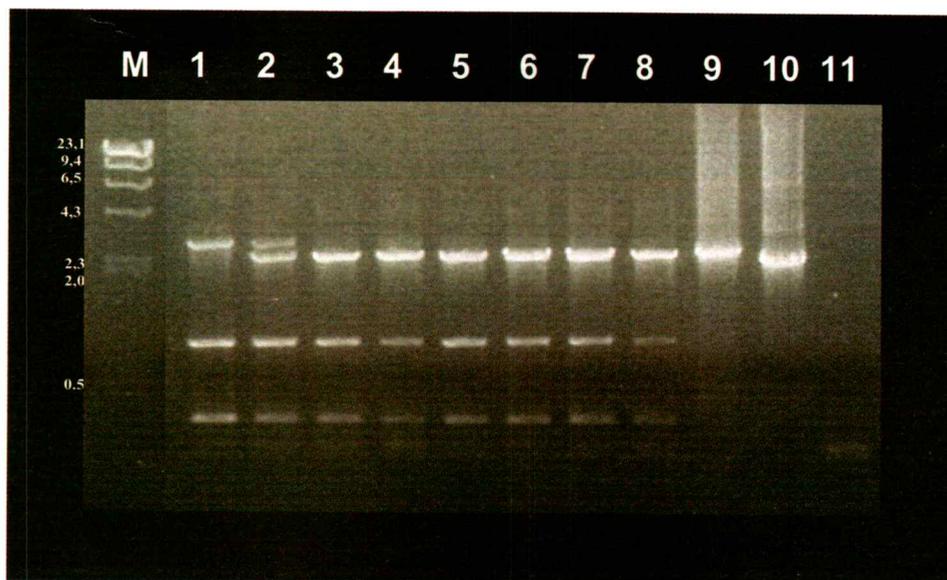


Figura 24. Análisis por PCR de las colonias transformantes obtenidas a partir de la transformación de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* con el plásmido portador de la delección.

M: Marcador de tamaño molecular (λ Hind III) en kb. Carril 1: Control positivo. Carril 2: Transformante heterocigoto Tr31. Carril 3-8: Transformantes homocigotos. Carril 9: casete hyg, Carril 11: control negativo.

10.- Análisis de pigmentos por HPLC

Se realizó una comparación visual de las cepas transformantes y sus respectivas cepas parentales, observándose a simple vista diferencias en su pigmentación. Se confirmó que las colonias amarillas correspondían a *X. dendrorhous* por observación al microscopio óptico y presencia de elementos genéticos extracromosómicos característicos de su cepa parental UCD 67-385.

Para corroborar estas observaciones, se extrajo pigmentos de las diferentes cepas los que fueron separados mediante HPLC y analizados por su espectro de absorción y tiempo de retención. El análisis de los cromatogramas de las cepas parentales indicaron la presencia del pigmento astaxantina en la cepa silvestre UCD 67-385 y en la cepa heterocigota Tr31, por sus espectros de absorción y tiempos de retención de 3 min. Sin embargo, en el transformante homocigoto Tr10, solo se observó la presencia de β -caroteno con un tiempo de retención de 27 min y por su espectro de absorción. Confirmando que existiría un bloqueo en la ruta de biosíntesis de astaxantina a partir de β -caroteno. El fenotipo de los transformantes y los pigmentos que acumulan se muestran en la Figura 25.

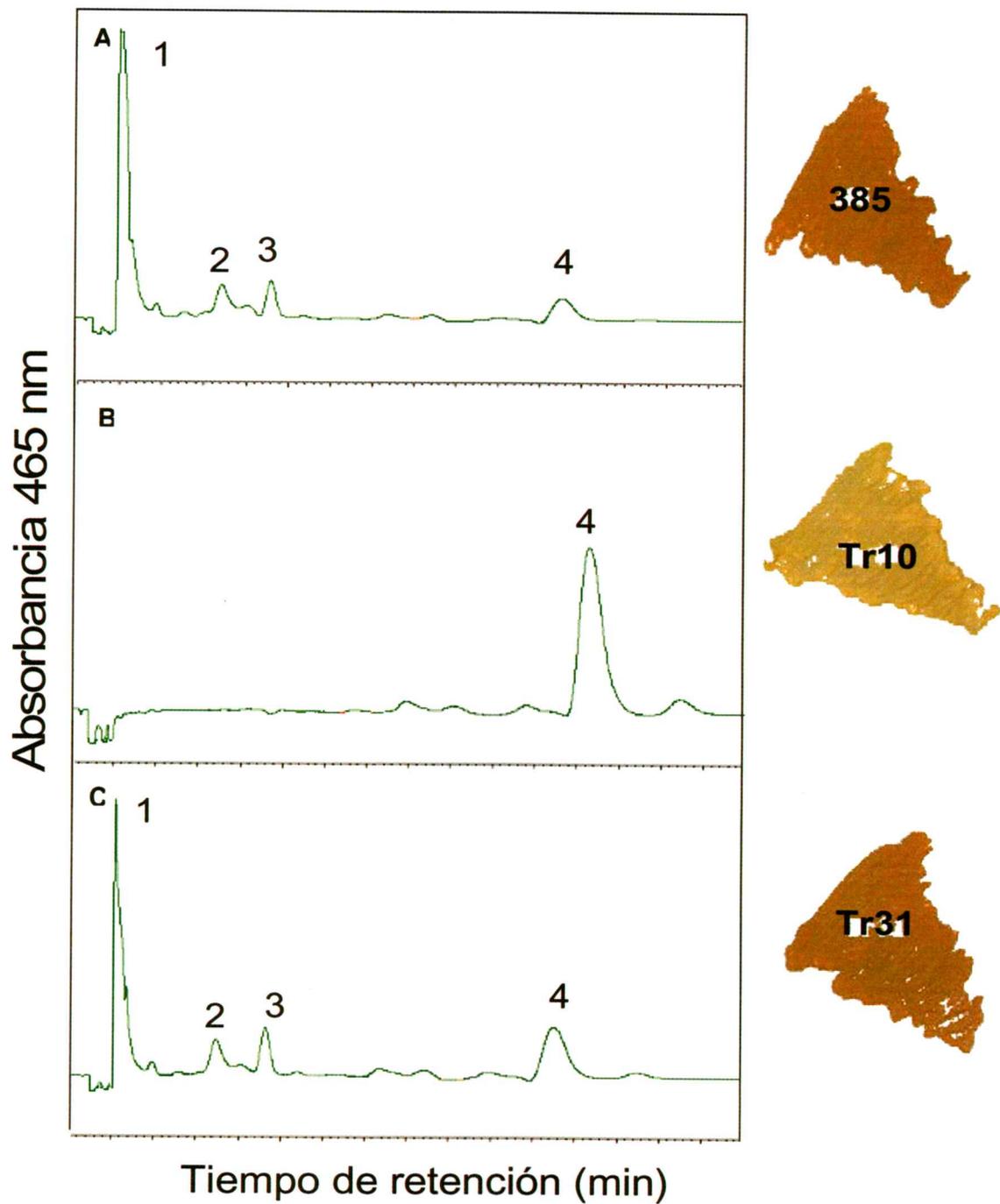


Figura 25. Cromatogramas y fenotipos de (A) Cepa silvestre, (B) Cepa homocigota Tr10, (C) Cepa heterocigota Tr31. Los números indican los diferentes pigmentos que acumulan. 1: Astaxantina, 2: hidroxiequinenona, 3: Equinenona, 4: β -caroteno.

DISCUSIÓN

1.- Clonamiento y secuenciación del gen *ast* que codifica la enzima astaxantina sintasa de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*.

La búsqueda del gen *ast* realizada en dos genotecas de DNA genómico de *X. dendrorhous* digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RV, respectivamente, no mostró resultados exitosos. Una explicación posible es la existencia de sitios de cortes de dichas enzimas, lo cual explicaría la dificultad de encontrar el gen completo. Para conocer la posible causa de estos resultados, se decidió realizar un análisis de hibridación, utilizando la sonda *ast*2.5 y DNA genómico de *X. dendrorhous* digerido con diferentes enzimas de restricción. Los resultados de estos experimentos fueron positivos, ya que se logró ubicar el *ast* en un fragmento *Pst*I de aprox. 4.0 kb, a diferencia de las otras enzimas donde la sonda hibridó en dos o más bandas sugiriendo sitios de cortes internos en el gen. De esta manera, se logró determinar que el gen completo estaría contenido en un fragmento *Pst*I de 4.0 kb.

Este resultado nos permitió avanzar en la búsqueda del gen *ast* y por lo tanto, el siguiente paso fue la construcción de una genoteca parcial en el sitio de clonamiento *Pst*I del vector pBluescript SK-. Posteriormente, el análisis de esta genoteca mediante PCR nos permitió localizar e identificar el clon portador del gen *ast*, el que fue denominado C19.19 y su plásmido, pC19.19. El fragmento de 4 kb fue secuenciado completamente y comparado con la secuencia del gen de la enzima astaxantina sintasa de la levadura publicada hasta ese momento en la base de datos (Hoshino y cols., 2000), indicando un alto grado de homología con dicha secuencia, lo que permitió confirmar la presencia del gen *ast*. Además, al analizar la secuencia del fragmento *Pst*I portador del gen *ast* para la búsqueda de sitios de restricción se pudo identificar cortes

para la enzima *EcoRV*, a diferencia de lo encontrado para la enzima *BamHI*, donde no se observaron sitios de cortes en la secuencia. Otra posible explicación podría tener relación con la probabilidad de recuperar una secuencia determinada y su representatividad en dicha genoteca.

2.- Ubicación del gen *ast* en el cariotipo electroforético de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*.

Con el objetivo de caracterizar el gen *ast* se realizó un análisis del cariotipo electroforético de esta levadura. Al respecto, son varios los estudios que se han dedicado a definir el cariotipo electroforético de esta cepa y los resultados han sugerido un número haploide de 15 cromosomas y un tamaño genómico haploide de 23.9 Mb como se indica en la Tabla 4 (Hermosilla, 1997; Cifuentes y cols., 1997).

Además, se observan nueve bandas cromosómicas evidentes, en donde las dos primeras (primera y segunda banda) corresponderían a las de mayor tamaño y estarían compuestas por tres cromosomas cada una. El análisis de los experimentos de hibridación indicó que el gen *ast* estaría presente en las dos primeras bandas cromosómicas, pero sin embargo, no podemos aseverar en cuál de los cromosomas se ubicaría. Para dilucidar esta interrogante se propone desarrollar una metodología que permita separar los cromosomas de cada una de las bandas en cada triplete, por ejemplo modificando los tiempos de corrida. Además, existe evidencia de la diploidía de esta cepa y los patrones electroforéticos sugieren la presencia de un extenso polimorfismo cromosómico (Cifuentes y cols., 1997), que probablemente estaría relacionado con rearrreglos cromosómicos, como lo indica la pérdida de una banda cromosómica (banda IX) en la cepa atx6 derivada de la cepa silvestre UCD-385 (Hermosilla, 1997). La

presencia del gen *ast* en dos bandas cromosómicas de diferentes tamaños puede indicar la presencia de alelos en cromosomas homólogos.

Tabla 4. Tamaño de las bandas cromosómicas de la cepa silvestre UCD 67-385 (Extraído de Hermosilla G. 1997).

Cepa UCD 67-385			
Banda	Tamaño (kb)	Nº cromosomas	Nº cromosomas x Tamaño (kb)
I	2500	3	7500
II	1850	3	5550
III	1790	1	1790
IV	1530	1	1530
V	1480	1	1480
VI	1210	2	2420
VII	1150	1	1150
VIII	1090	2	2180
IX	350	1	350
Total		15	23950

3.- Análisis estructural del gen *ast* de *X. dendrorhous* y su proteína

El análisis de la secuencia del gen *ast* de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*, en su versión genómica y de cDNA indicó que el fragmento *Pst*I posee un tamaño de 3994 pb y que el gen estaría constituido por 18 exones y 17 intrones de longitudes variables.

Recientemente, se ha clonado el gen que codifica para la enzima astaxantina sintasa, denominado *crtS*. Con un ORF que codificaría para una proteína de 62.6 kDa, la cual tendría homología con enzimas del tipo citocromo P450 hidroxilasa, que estaría participando en la conversión de β -caroteno hasta astaxantina (Álvarez y cols., 2006). Además, el análisis de la secuencia genómica del gen *ast* mostró que comparte regiones reguladoras de la transcripción, idénticas a las descritas en el gen *crtS*. Por ejemplo, se identificaron regiones río arriba del codón de inicio de la traducción ATG, una

secuencia rica en pirimidinas, una caja TATA, una caja CAAT y una secuencia tipo creA, que corresponde a una región relacionada con la represión catabólica por glucosa (Álvarez y cols., 2006). Además, se ha observado que la expresión del gen *ast* no es constante en el tiempo y es afectada por diferentes factores como son la fuente de carbono presente en el medio y la presencia de agentes inductores como el etanol, entre otros (Lodato y cols., 2002). Por lo tanto, sería interesante estudiar cuales son aquellos factores que podrían ser relevantes para la regulación de la transcripción de este gen.

Luego, se realizó un análisis comparativo con otras secuencias publicadas en base de datos, para el gen de la astaxantina sintasa. Se compararon las secuencias de las cepas ATCC 24203, que corresponde a la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* y que fue utilizada en este estudio para clonar el gen *ast*, la cepa ATCC 96815, una mutante que acumula β -caroteno derivada de la cepa silvestre UCD 67-385 la cual fue utilizada para complementar la mutación con el gen *asy*, y en la cual se identificó una mutación puntual en el sitio de splicing del intrón 8 que se traduce en una proteína inactiva, la cepa silvestre ATCC 96594 de *X. dendrorhous* utilizada para la construcción de una genoteca que permitió localizar el gen *asy*, y por último, la cepa VKPM Y2410 una sobreproductora de astaxantina utilizada para clonar el gen *crtS*, que codificaría para una citocromo P450 hidroxilasa (Tabla 5).

La secuencia del gen *ast* no presenta diferencias con respecto a la obtenida para el gen *crtS*, pero si se pueden observar cambios puntuales con respecto a las demás secuencias, específicamente en los exones 7, 9, 11 y 13 y en los intrones 1, 4, 6, 7, 8, 15 y 17, pero ninguno de ellos causa una sustitución de aminoácidos, a excepción de la inserción de una G en la posición 2269 en el exón 13 de la secuencia cepa ATCC 96815. Por otra parte, en este estudio se obtuvieron las secuencias completas en dos cepas mutantes que acumulan β -caroteno (*atx5* y *atx10*), con los partidores del gen de la

astaxantina sintasa, con el objetivo de encontrar algún cambio de base en la secuencia que nos permitiera explicar la interrupción de la síntesis de astaxantina. Los resultados son analizados en la Tabla 5, donde se puede observar que solo existiría un cambio puntual de una G por una A en la posición 376, correspondiente a la región codificante del gen *ast* (exón 3).

Al realizar la traducción de la secuencia podemos señalar que no hay cambio en la proteína. Por lo tanto, esto nos permite concluir que si la mutación no se encuentra en estas cepas podría localizarse en los otros genes de la ruta de biosíntesis de astaxantina.

Tabla 5. Comparación de secuencias genómicas para el gen de la astaxantina sintasa de *X. dendrorhous* publicadas en base de datos.

(¹) gen *ast* de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* ATCC 24230 (DQ002006) (Lodato y cols., 2006), (²) gen *crtS* que codifica para la enzima β-caroteno oxigenasa de la cepa ATCC 24203 (DQ202402) (Álvarez y cols., 2006), (³) patente del gen que codifica para la enzima astaxantina sintasa de la cepa ATCC 96594 (AX034666) (Hoshino y cols., 2000), (⁴) gen que codifica para la enzima astaxantina sintasa de la cepa ATCC 96815 (AY946023) (Álvarez y cols., 2006) (⁵) gen *crtS* que codifica para la enzima citocromo P450 hidroxilasa de la cepa VKM Y2410 (DQ201828), (⁶) Mutante atx5, (⁷) Mutante atx10.

Intron/ Exón	I-1	E-3	E-5	I-6			E-7		I-7			I-8				E-9			E-11		E-13		I-15	I-17												
Posición (pb)	158	376	695	1108	1110	1120	1134	1137	1153	1191	1245	1257	1287	1347	1354	1356	1377	1378	1470	1480	1488	1493	1523	1538	1540	1541	1601	1607	1619	1628	1952	2247	2268	2678	2932	
¹ ATCC 24230	T	G	G	T	C	T	A	T	T	G	T	A	C	C	A	C	C	T	G	A	C	C	T	T	T	C	G	T	T	G	T	G	G	T		
² ATCC 24203	T	G	G	T	C	T	A	T	T	G	T	A	C	C	A	C	C	T	G	A	C	C	T	T	T	C	G	T	T	G	T	G	-	G	T	
³ ATCC 96594	A	G	A	T	C	T	A	T	T	A	T	T	G	C	A	C	C	T	G	A	C	C	T	T	T	C	G	T	T	C	C	G	-	G	T	
⁴ ATCC 96815	T	G	G	C	T	C	G	C	C	G	C	C	G	T	C	T	C	T	G	A	G	T	C	T	T	C	A	T	T	G	C	T	G	G	T	
⁵ VKM Y2410	A	G	A	T	C	T	A	T	T	A	T	T	G	C	A	C	C	T	G	A	C	C	T	T	T	C	G	T	T	G	C	T	G	-	G	T
ATX5	T	A	G	T	C	T	A	T	T	G	T	T	A	C	A	C	C	T	G	A	C	C	T	T	T	C	G	T	T	G	C	T	G	-	G	T
ATX10	T	A	G	T	C	T	A	T	T	G	T	T	A	C	A	C	C	T	G	A	C	C	T	T	T	C	G	T	T	G	T	T	G	-	G	T

I = intrón

E = exón

Posteriormente, a partir del análisis de la secuencia traducida del gen se observó que codifica una proteína de 557 aminoácidos con similitud con enzimas del tipo citocromo P450 hidroxilasa. El análisis de la secuencia proteica nos indica una alta conservación de aminoácidos que poseen funciones específicas dentro de la molécula. Como son los aminoácidos Glicina³⁴⁰ y Treonina³⁴³, la secuencia ³³⁹AGYETS³⁴⁴ que corresponde al dominio de unión del oxígeno, ⁴⁸⁸FISGPRACFG⁴⁹⁷ sitio de unión del grupo hemo, regiones relacionadas con el mantenimiento de la estructura tridimensional de la molécula, tales como ³⁹⁴ESLR³⁹⁷, cisteína⁴⁹⁵ que actúa como ligando al grupo hemo y algunos motivos de glicosilación que tienen la secuencia NX (T/S), tales como ⁴²NHT⁴⁴, ⁸⁶NST⁸⁸, ²¹⁹NKT²²¹, ⁴⁴⁹NRS⁴⁵¹.

Luego, se realizó un modelo tridimensional para esta proteína tomando como referencia proteínas del tipo P450 cristalizadas (Figura 26). Se observó que existen regiones altamente conservadas con respecto a otras proteínas del tipo P450, con funciones muy específicas dentro de la molécula, funciones que serán analizadas con más detalle en la discusión. Finalmente, para la generación del modelo se considero proteínas con una identidad de un 16% de identidad y una similitud del 34% mediante la aplicación del programa PSI Blast, ahora para evaluar el modelo se utilizó el programa prosa II, que discrimina si el alineamiento es correcto.

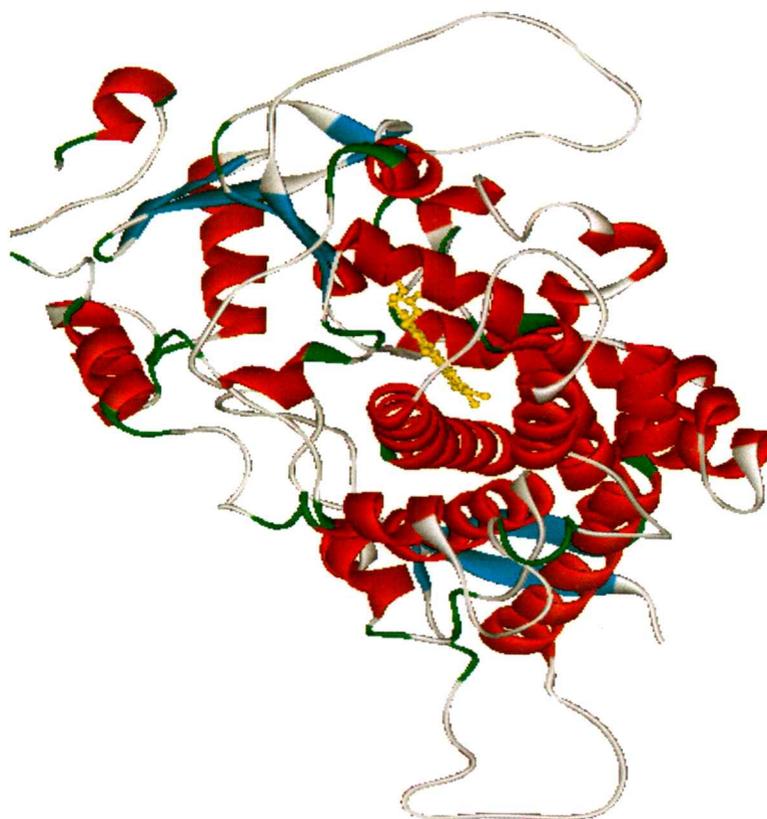


Figura 26. Estructura tridimensional de la proteína astaxantina sintasa codificada por el gen *ast* de *X. dendrorhous*.

4.- Sistema citocromo P450.

Son diversos los estudios que han descrito la presencia de estas enzimas P450 o complejos monooxigenasas, debido a que juegan un rol importante en el metabolismo oxidativo de una amplia variedad de sustratos exógenos y endógenos, tanto en organismos procariontes como eucariontes. El sistema enzimático citocromo P450 lleva a cabo la catálisis del sustrato a través de la siguiente reacción general:



Este sistema depende absolutamente de NADPH y oxígeno molecular para la catálisis, debido a que los electrones necesarios para la monooxigenación pasan del NADPH al citocromo P450, a través de la acción de la enzima citocromo 450 reductasa o CPR ambas insertas en la membrana del retículo endoplásmico (Gareth y cols., 2002; Bernhardt, 2006) (Figura 27).

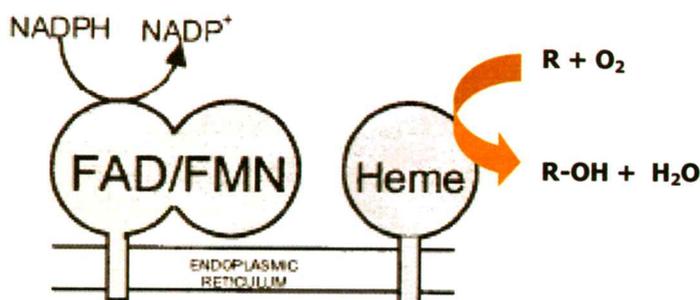


Figura 27. Representación del sistema citocromo P450 de clase II (Modificado de Gareth y cols., 2002)

En el alga *Haematococcus pluviales* se ha observado que la síntesis de astaxantina requiere de varios componentes como son el oxígeno, NADPH, y Fe²⁺, lo que ha llevado a proponer que una enzima P450 monooxigenasa estaría llevando a cabo la transformación de β-caroteno hasta astaxantina (Schoefs y cols., 2001). En Plantas, se ha descrito que la síntesis de hormonas de crecimiento (giberelinas) estarían bajo el control de genes que codifican para enzimas del tipo P450, estas enzimas también han sido estudiados en el hongo, *Gibberella fujikuroi* en donde se ha señalado que serian cuatro genes los que estarían codificando para monooxigenasas P450 (Rojas y cols., 2001).

En general, en hongos podemos encontrar una larga lista de genes que codifican para enzimas citocromos P450. En *Saccharomyces cerevisiae* se ha identificado el gen *cyp51* que codifica la enzima esterol 14-α-desmetilasa, que cataliza la 14-desmetilación

del lanosterol para formar ergosterol, un componente esencial de la membrana celular de hongos. Adicionalmente, el gen *cyp56* cuyo producto participa en la formación de ditirosina, el cual forma parte de la membrana externa de la pared de las esporas. En varias especies de *Candidas* se han descritos citocromos de la familia *cyp52*, que estarían relacionadas con procesos de bioconversión de alcanos y en *Aspergillus niger* y *Rhodotorula minuta*, se han asociado enzimas de la familia *cyp53* con reacciones de hidroxilación de compuestos aromáticos (Van der Brink y cols., 1998).

En *X. dendrorhous* el gen *ast* codificaría para una enzima del tipo citocromo P450 hidroxilasa que estaría relacionada con la síntesis de astaxantina, y con la protección contra el estrés oxidativo, impuesto sobre esta levadura por sustancias antifúngicas fotogeneradas por árboles del género *Betula*.

5.- Transformación de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* con una delección del gen *ast*.

Los experimentos de transformación nos permitieron comprobar que el clon pC19.19, es portador del gen *ast*. Por lo tanto, la estrategia fue inducir una delección de gran parte de este, utilizando las enzimas de restricción *StuI* y *HpaI* que permitieron eliminar 2485 pb del gen y luego reemplazar dicha región con un casete de resistencia a higromicina B. El gen con la mutación fue utilizado como DNA transformante de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*. En este caso, la transformación ocurriría por integración que involucraría una doble recombinación homóloga entre el sector del genoma de la levadura que contiene al gen *ast* y el DNA transformante. Los resultados mostraron la presencia de colonias amarillas, claramente diferentes a la cepa silvestre, estas fueron chequeadas primero por observación bajo el microscopio óptico y por la presencia de RNA de doble hebra entre sus ácidos nucleicos. Luego, se realizó un

análisis molecular mediante PCR con partidores específicos para el casete de resistencia y para el gen *ast* para determinar la presencia del inserto en el genoma de la levadura, chequear la orientación el genotipo de las cepas transformantes. Finalmente, el análisis de los pigmentos de los transformantes de fenotipo amarillo fue realizado por HPLC, indicando la presencia solo de β -caroteno en la cepa analizada (TR10). Estos resultados fueron concluyentes ya que permitieron confirmar que efectivamente al provocar una delección del gen *ast* se interrumpe la ruta de biosíntesis de astaxantina acumulándose β -caroteno, sugiriendo que el gen codificado en el fragmento de 3.994 pb correspondería al gen estructural de la enzima astaxantina sintasa.

CONCLUSIONES

- 1.- La construcción de una genoteca parcial en el sitio *PstI* del vector pBluescript SK-, permitió clonar y secuenciar el gen *ast*.
- 2.- El análisis de su secuencia, indicó que tiene un tamaño de 3994 pb y que estaría constituido por 18 exones y 17 intrones.
- 3.- Mediante RT-PCR se logró clonar el cDNA del gen *ast*, y secuenciarlo completamente. Se observó que posee un tamaño de 1806 pb y un ORF de 557 aminoácidos con alta similitud con enzimas tipo citocromo P450 hidroxilasa.
- 4.- Mediante electroforesis de campo pulsado y luego, por hibridación se determinó que el gen *ast* se ubicaría en las bandas cromosómicas 1 y 2 del cariotipo electroforético de *X. dendrorhous*.
- 5.- A partir de los experimentos de transformación de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* con el gen *ast* portador de una delección, se obtuvieron colonias amarillas, resultados que permitieron confirmar que el gen *ast* es funcional, y que al ser interrumpido se bloquearía la ruta de biosíntesis de astaxantina a partir de β - caroteno de esta levadura.

BIBLIOGRAFIA

Alcaíno, J. 2002. Organización estructural del gen de la fitoeno sintasa en el genoma de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex. *Phaffia rhodozyma*). Tesis de pregrado, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Álvarez, V., Marta Rodríguez-Sáiz, Juan Luis de la Fuente, Eduardo J. Gudiña, Ramiro P. Godio, Juan F. Martín and José Luis Barredo. 2006. The *crtS* gene of *Xanthophyllomyces dendrorhous* encodes a novel cytochrome-P450 hydroxylase involved in the conversion of β -carotene into astaxanthin and other xanthophylls. *Fungal Genetics and Biology*. 43: 261-272

Adrio JL, López M and Casqueiro J. 1995. Electrophoretic karyotype of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *Current Genetics*. 27: 447-450

An, G., Schuman, D. and Johnson, E. 1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Applied and Environmental Microbiology*. 55: 116-124.

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

Birnboim H. and Doly J. 1979. A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 3: 2303-2308.

Bramley, P.M. and A, Mackenzie. 1988. Regulation of carotenoid biosynthesis. *Current topics in cellular regulation*. 29: 291-343.

Candfield, L.M, J.W. Forage and J. Valenzuela. 1992. Carotenoids as cellular antioxidants. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 200: 260-265.

Cifuentes V, Hermosilla G, Martínez C, Leon R, Pincheira G, Jiménez A. 1997. Genetics and electrophoretic karyotyping of wild-type and astaxanthin mutant strains of *Phaffia rhodozyma*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 72: 111-117.

Chomczynski P and Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*. 162: 156-159.

Chu G., Vollrath D. and Davis R. 1986. Separation of large molecules by contour-clamped homogeneous electric field. *Science*. 234: 1582-1585.

Cunningham, F.X. and E. Gantt. 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49: 557-583.

Flores-Cotera, L.B, Martín, R., Sánchez S. 2001. Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55: 341-347.

Gareth A.R, Gideon Grogan, Andy Greter, Sabine L. Flitsch and Nicholas J.Turner. 2002. Identification of new class of cytochrome P450 from a *Rhodococcus sp.* Journal of Bacteriology. 184: 3898-3908.

Golubev W. 1995. Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). Yeast. 11: 101-110

Harumi Jyonouchi, Sining Sun, Koji Iijima, and Myron D. Gross. 2000. Antitumor Activity of Astaxanthin and Its Mode of Action. Nutrition and Cancer. 36: 59-65.

Hermosilla G. 1997. Caracterización molecular y genética del genoma de *Phaffia rhodozyma*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Hermosilla G., León R., Martínez C. y Cifuentes V. 1995. Formación y regeneración de protoplastos de *Phaffia rhodozyma*. Boletín Micológico. 10: 71-75.

Higuera-Ciapara, I, Felix Valenzuela and F.M. Goycoolea. 2006. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 46: 185-196.

Hoshino T, Ojima K and Setoguchi Y. 2000. Astaxanthin synthase. Hoffman-La Roche, European patent N°. 10352006-A3.

Hughes, David A. 2001. Dietary Carotenoids and Human Immune Function. Nutrition 17: 823-827.

Johnson E., Conklin D. and Lewis, M. 1977. The yeast *Phaffia rhodozyma* as a dietary pigment source for salmonids and crustaceans. Journal of the Fisheries Research Board of Canada. 34: 2417-2421.

Johnson, Eric A. 2003. *Phaffia rhodozyma*: Colorful odyssey. International Microbiology. 6: 169-174.

Lee, P. C and C. Schmidt-Dannert. 2002. Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology. 60: 1-11.

Lodato, P. 2002. Estudio de la expresión de genes de la carotenogénesis en *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex. *Phaffia rhodosyma*). Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Lodato, P. Alcaíno J, Barahona S, Retamales P and Cifuentes V. 2003. Alternative splicing of transcripts from *crtI* and *crtYB* genes of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Applied Environmental Microbiology . 69: 4676-4682.

Martínez, C. 1995. Control genético de la síntesis de carotenos en *Phaffia rhodosyma*. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Miller, M., Yoneyama, M. & Soneda, M. 1976. *Phaffia*, a new yeast genus in the Deuteromycotina (Blastomycetes). International Journal of Systematic Bacteriology. 26: 286-291

- Misawa, N. and Shimada, H. 1997. Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. *Journal of Biotechnology*. 59: 169-181.
- Nakato, T; Kandmuri, T; Sato, M and M, Takeuchi. 1999. Effect of astaxanthin rich red yeast (*Phaffia rhodozyma*) on oxidative stress in rainbow trout. *Biochemistry and Biophysical Acta*. 1426 (4): 119-125.
- Nishino, H. 1998. Cancer prevention by carotenoids. *Mutation Research*. 402: 159-163.
- Ojima K, Breitenbach J, Visser H, Setoguchi Y, Tabata K, Hoshino T, Van den Berg J, Sandmann G. 2006. Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex. *Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a beta-carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. *Molecular Genetics and Genomics*. 275: 148-58.
- Ong, A.S.H, and E.S. Tee. 1992. Natural sources of carotenoids from plants and oils. *Methods In Enzymology*. 213: 142-167.
- Palozza and Krinsky. 1992. Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: An Overview. *Methods In Enzymology*. 213: 403-420
- Parajo, J. C, Santos, V, and Vázquez, M. 1996. Producción biotecnológica de astaxantina por *Phaffia rhodozyma*. *Alimentación, Equipos y Tecnología*. 15 (N°1) 153-160.
- Prakash B. and Paul S. Bernstein. Microbial xanthophylls. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 68: 445-455.

- Renstrom B., Berger H, Liaaen-Jensen S. 1981. Esterfied, optically pure (3S 3'S) astaxanthin from flowers of *Adonis*. Annual Biochemical Systemic and Ecology. 9 : 249-250.
- Retamales P., León R., Martínez C., Hermosilla G., Pincheira G. and Cifuentes V. 1998. Complementation analisis with new genetic markers in *Phaffia rhodozyma*. Antonie Van Leweenhoek. 73: 229-236.
- Rojas, M.C. Peter, Hedden, Paul Gaskin, and Bettina Tudzynski. 2001. The P450-1 gene of *Gibberella fujikuroi* encodes a multifunctional enzyme in gibberellin biosynthesis. PNAS. 98: 5838-5843.
- Rubinstein L, Altamirano A, Ducrey Santopietro L, Baigori M and Figueroa LC. 1996. Transformation of *Phaffia rhodozyma* by electroporation. Biotechnology Techniques 10: 929-932
- Sambroock J., Fritsch E.F. and Maniatis T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2°Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanderson, G.W. and Setsuko, O.J. 1994. The value of *Phaffia* yeast as a feed ingredient for salmonid fish. Aquaculture 124: 193-200.
- Sandmann, G. 1991. Biosynthesis of cyclic carotenoids: Biochemistry and molecular genetics of the reaction sequence. Physiologia Plantarum. 83: 186-193.
- Sandmann, G. 2001. Minireview Carotenoid biosynthesis and Biotechnological Application. Archives of Biophysics 385: 4-12.

Schroeder and Eric A. Johnson. 1995. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *phaffia rhodosyma*. The journal of biological chemistry. 270: 18374-18379

Schoefs, B; Nour-Eddine Rmiki; Jaouad Rachadi and Yves Lemoine. 2001. Asthaxanthin accumulation in *Haematococcus* requires a cytochrome P450 hydroxylase and an active synthesis of fatty acids. FEBS Letters 500: 125-128.

Sieiro, C, M Poza, T de Miguel, T.G Villa. 2003. Genetic basis of microbial carotenogenesis. International Microbiology. 6: 11-16.

Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. Journal of Molecular Biology. 98: 503-517.

Van der Brink, Hans (Jr) M., Robert F.M, Van Gorcom, Cees A.M., J. J. Van den Hondel and Peter J. Punt. 1998. Cytochrome P450 enzymes systems in fungi. Fungal Genetics and Biology. 23: 1-17.

Vázquez, M and Martin, A.M. 1998. Optimization of *Phaffia rhodozyma* continuous culture through response surface methodology. Biotechnology and Bioengineering. 57: 314-320.

Verdoes J., Krubasik P., Sandmann G. and van Ooyen A. 1999. Isolation and functional characterization of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Molecular and General Genetics. 262: 453-461.

Visser H, A., J. J Van Ooyen and Jan C Verdoes. 2003. Metabolic engineering of the astaxanthin biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. FEMS Yeast Research 4: 221-231.

Yamada, Y and Kawasaki, H. 1989. The genus *Phaffia* is phylogenetically separate from the genus *Cryptococcus* (Cryptococcaceae). Agricultural and Biological Chemistry. 53: 2845–2846.

Yousry M. A. Naguig. 2000. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48: 1150-1154.

Yuan Shuai Liu and Jian Yong Wu. 2006. Hydrogen peroxide-induced astaxanthin biosynthesis and catalasa activity in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Applied Microbiology and Biotechnology. 73: 663-668.