

UCH-FC
Biotecnología
A346
C.1

**ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL GEN DE LA FITOENO
SINTASA EN EL GENOMA DE *Xanthophyllomyces dendrorhous*
(EX: *Phaffia rhodozyma*)**

Tesis

Entregada a la Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos para optar

al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Facultad de Ciencias

Por

Jennifer Cecilia Alcaíno Gorman

2002



Director de Tesis: Dr. Víctor Cifuentes Guzmán.

AGRADECIMIENTOS

En estas pocas palabras quiero decir lo feliz que estoy de haber cumplido y finalizado esta etapa de mi vida. Lo orgullosa que me siento por haber estudiado en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, en donde he conocido a gente maravillosa, compañeros, amigos y profesores.

Quiero agradecer especialmente a Víctor Cifuentes, mi profesor guía, quien ha sido un gran apoyo desde mi inicio en esta facultad, por darme tantas oportunidades y entregarme su cariño y amistad.

Quiero agradecer a todos mis compañeros de laboratorio, Claudio, Carla, Patricia, Claudia, Dony, Eugenio, Patricio, Raquel, Rubén, Rafael y especialmente Salvador, quien siempre me ha ayudado y ha sido un gran amigo.

A mis compañeros y amigos, principalmente Marcela y Pancho, con quienes he compartido momentos inolvidables.

A todos mis profesores, por su paciencia y generosidad, principalmente a Victoria Guixé por su amistad.

A los profesores Claudio Vásquez, Margarita Carú y Claudio Martínez, por ser tan comprensivos y generosos conmigo.

A mi familia, a mis padres quienes adoro Héctor y Texia, a mis hermanos Valeria y Ricardo, a mis sobrinos, a mis suegros Memo y Rosita. Ellos siempre me alegraron, me apoyaron, me entendieron y me hicieron sentir su cariño.

A mi marido Guillermo, por apoyarme en las buenas y en las malas. Guille, gracias por tu amor.

ÍNDICE GENERAL

	página
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCION	1
1. Carotenoides: características principales y biosíntesis.....	1
2. <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	5
3. Aproximación molecular al estudio de la carotenogénesis en <i>X. dendrorhous</i>	7
HIPÓTESIS	10
OBJETIVOS	11
1. Objetivo general.....	11
2. Objetivos específicos.....	11
MATERIALES Y METODOS	12
I. Materiales.....	12
1.- Material biológico.....	12
1.1.- Microorganismos.....	12
1.2.- Plásmidos.....	12
1.3.- Enzimas.....	12
1.4.- Ácidos nucleicos.....	12
2.- Medios de cultivo y reactivos químicos.....	13
3.- Sistemas de purificación y marcación radioactiva.....	13
3.1.- Purificación de DNA plasmidial.....	13
3.2.- Purificación DNA a partir de geles de agarosa.....	13
3.3.- Marcación radioactiva de ácidos nucleicos.....	13

II. Métodos	13
1.- Cultivo y mantención de microorganismos	13
1.1.- Bacterias	13
1.2.- Levaduras	14
2.- Purificación de ácidos nucleicos	14
2.1.- DNA plasmidial	14
2.2.- DNA genómico <i>X. dendrorhous</i>	14
2.3.- Extracción de DNA desde geles de agarosa	15
2.4.- Extracción de RNA de <i>X. dendrorhous</i>	16
3.- Cariotipo electroforético	16
3.1.- Preparación de DNA cromosómico intacto de <i>X. dendrorhous</i>	16
3.2.- Electroforesis de campo pulsado	17
4.- Análisis de DNA	17
4.1.- Digestión con endonucleasas de restricción	17
4.2.- Reacción de la polimerasa en cadena (PCR)	18
4.3.- Transcripción Reversa acoplada a la reacción de la polimerasa en cadena (RT-PCR)	18
5.- Transformación genética por electroporación	19
5.1.- <i>Escherichia coli</i>	19
5.2.- <i>X. dendrorhous</i>	20
6.- Hibridación DNA-DNA	20
6.1.- Marcación de sondas	21
6.2.- Preparación de las membranas	21
6.3.- Prehibridación	21
6.4.- Hibridación	22

6.5.- Lavados	22
RESULTADOS	23
1. Amplificación y clonamiento del gen que codifica la enzima fitoeno sintasa y licopeno ciclasa de la cepa silvestre UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i>	23
2. Secuenciación de los insertos de los plásmidos pJ1, pJ15 y pLC2.	31
3. Clonado del gen <i>crtYB</i> genómico de la enzima fitoeno sintasa-licopeno ciclasa de la cepa silvestre UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i>	37
4. Secuenciación del inserto del plásmido p33.13.	42
5. Clonamiento y secuenciación del cDNA del gen <i>crtYB</i> de <i>X. dendrorhous</i>	50
6. Análisis genético molecular del gen <i>crtYB</i> de <i>X. dendrorhous</i>	56
6.1. Ubicación del gen <i>crtYB</i> en el genoma de <i>X. dendrorhous</i>	56
6.2. Análisis de restricción de DNA genómico de <i>X. dendrorhous</i>	59
7. Transformación de la cepa silvestre UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i> con una delección del gen <i>crtYB</i>	69
7.1. Construcción de las delecciones:.....	69
7.2. Transformación de <i>X. dendrorhous</i> con una delección del gen <i>crtYB</i>	73
DISCUSION	75
1. Clonamiento y secuenciación del gen <i>crtYB</i> que codifica la enzima fitoeno sintasa y licopeno ciclasa de la cepa silvestre UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i>	75
2. Clonamiento del cDNA del mensajero del gen <i>crtYB</i>	78
3. Análisis genético molecular del gen <i>crtYB</i> , que codifica la enzima fitoeno sintasa-licopeno ciclasa.	91
4. Transformación de la cepa silvestre UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i> con una delección del gen <i>crtYB</i>	93
CONCLUSIONES	95
BIBLIOGRAFIA	96
APÉNDICE	102

LISTA DE TABLAS

	página
Tabla I: Partidores diseñados a partir de regiones heterólogas y homólogas de genes de fitoeno sintasas y licopeno ciclsasas, para amplificar los genes <i>crtB</i> y <i>crtY</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	24
Tabla II: Resumen de digestiones simples y dobles realizadas a los plásmidos pJ1 y pJ15 y tamaños de fragmentos obtenidos .	28
Tabla III: Partidores ubicados en la región de clonamiento múltiple del vector pBluescript SK.	31
Tabla IV: Partidores diseñados a partir de la secuencia del fragmento <i>EcoRV</i> de 5917 pb del plásmido p33.13 para amplificar el cDNA del gen <i>crtYB</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	50
Tabla V: Tamaño de las bandas obtenidas a partir de la hibridación mostrada en la figura 19.	61
Tabla VI: Tamaño de las bandas obtenidas a partir de la hibridación mostrada en la figura 20.	63
Tabla VII: Tamaño de las bandas obtenidas a partir de la hibridación mostrada en la figura 21.	65

LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1: Resumen de la biosíntesis de isoprenoides y sus relaciones biosintéticas.	2
Figura 2: Biosíntesis de astaxantina.	4
Figura 3: Ruta de biosíntesis de astaxantina.	8
Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) de los plásmidos pJ1 y pJ15.	26
Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) del DNA plasmidial de los plásmidos pJ1 y pJ15 digerido con distintas enzimas para construir un mapa de restricción.	27
Figura 6: Mapa de restricción de los plásmidos pJ1 y pJ15.	29
Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) del plásmido pLC2.	30
Figura 8: Secuencias de los insertos de 2,2 kb de los plásmidos pJ1, pJ15 y alineamiento múltiple con la secuencia del gen que codifica la enzima fitoeno sintasa de la cepa UCD 67-210 de <i>X. dendrorhous</i> .	32
Figura 9: Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) de los productos de PCR de la genoteca de <i>X. dendrorhous</i> construida en el sitio <i>Bam</i> HI del plásmido YIp5.	39
Figura 10: Hibridación de DNA de la cepa UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i> con el fragmento de 2,2 kb de pJ1 utilizado como sonda.	40
Figura 11: Hibridación de DNA de la cepa UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i> digerido con distintas enzimas de restricción.	41
Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) de la reacción de PCR, identificando al clon portador del gen <i>crtYB</i> en la genoteca parcial construida en el sitio <i>Eco</i> RV del plásmido pBluescript.	43
Figura 13: Secuencia del fragmento <i>Eco</i> RV de p33.13.	45

Figura 14:	Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) de los productos de RT-PCR a partir de RNA total de la cepa UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i> .	51
Figura 15:	Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) del cDNA del gen <i>crtYB</i> clonado en <i>E.coli</i> .	53
Figura 16:	Alineamiento de las secuencias nucleotídicas parciales de los fragmentos MPP, DOWN y UP, correspondientes al cDNA del gen <i>crtYB</i> y secuencia nucleotídica parcial del gen <i>crtYB</i> de la cepa UCD 67-210.	54
Figura 17:	Electroforesis de campo pulsado (CHEF) del DNA cromosómico intacto de <i>X. dendrorhous</i> .	57
Figura 18:	Electroforesis de campo pulsado (CHEF) del DNA cromosómico intacto de <i>X. dendrorhous</i> .	58
Figura 19:	Hibridación de DNA genómico de la cepa UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i> digerido con distintas enzimas de restricción, utilizando el fragmento de 2,2 kb del plásmido pJ1 como sonda.	60
Figura 20:	Hibridación de DNA genómico de la cepa UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i> digerido con distintas enzimas de restricción, utilizando el fragmento de 2,2 kb del plásmido pJ1 como sonda. .	62
Figura 21:	Hibridación de DNA genómico de la cepa UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i> digerido con distintas enzimas de restricción, utilizando el fragmento de 2,2 kb del plásmido pJ1 como sonda. .	64
Figura 22:	Mapa de restricción de la región cromosómica donde se ubica el gen <i>crtYB</i> .	66
Figura 23:	Esquema que representa la organización del gen <i>crtYB</i> en el genoma <i>X. dendrorhous</i> .	68
Figura 24:	Esquema de la construcción de plásmidos pB5 y p11.1, portadores de una delección del gen <i>crtYB</i> .	70

Figura 25:	Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) de la digestión de p33.13 con <i>SaII</i> y <i>XbaI</i> y purificación de los fragmentos para construir plásmidos portadores de una delección del gen <i>crtYB</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	72
Figura 26:	Transformación de <i>X. dendrorhous</i> con el gen <i>crtYB</i> deletante.	74
Figura 27:	Organización estructural del gen <i>crtYB</i> en los plásmidos pJ1, pJ15 y pLC2.	76
Figura 28:	Secuencia parcial del cDNA del mensajero del gen <i>crtYB</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	79
Figura 29:	Alineamiento de las secuencias aminoacídicas del gen <i>crtYB</i> de las cepas silvestres UCD 67-385 y UCD 67-210.	82
Figura 30:	Alineamiento esquemático de las secuencias aminoacídicas de proteínas de la familia de escualeno y fitoeno sintasas de algunos organismos.	85
Figura 31:	Motivos conservados en la secuencia proteica deducida del gen <i>crtYB</i> de la cepa silvestre UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i> y la familia de proteínas escualeno y fitoeno sintasas.	88
Figura 32:	Cladograma del alineamiento de las secuencias de fitoeno sintasas de distintos organismos.	89
Figura 33:	Cladograma del alineamiento de las secuencias de licopeno ciclasas de distintos organismos.	90

ABREVIATURAS

CHEF	Campo eléctrico de contorno homogéneo
DMAPP	dimetilalil pirofosfato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
FPP	farnesil pirofosfato
GPP	geranil pirofosfato
GGPP	geranilgeranil pirofosfato
IPP	isopentenil pirofosfato
kb	kilobases
LB	medio de cultivo Luria Bertani
MM _v	medio mínimo Vogel
NMD	Nonsense Mediated Decay
pb	pares de bases
PCR	Reacción de polimerasa en cadena
RT-PCR	Reacción de la transcriptasa reversa acoplada a PCR
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
YM	medio de cultivo rico para <i>X. dendrorhous</i>

RESUMEN

Xanthophyllomyces dendrorhous es una levadura basidomicete que posee la capacidad de sintetizar carotenoides, principalmente la xantófila astaxantina (3,3'-dihidroxi- β - β -caroten-4,4'-diona) reconocida por sus propiedades antioxidantes. Además, este pigmento tiene un alto interés comercial, especialmente en la industria alimentaria, donde se utiliza como suplemento alimenticio para peces salmónidos.

Para su aplicación industrial, se han obtenido cepas de *X. dendrorhous* sobreproductoras de astaxantina mediante experimentos de mutagénesis, sin alcanzar los niveles necesarios para su comercialización. El estudio molecular de los genes involucrados en la carotenogénesis en *X. dendrorhous*, permitirá conocer los procesos biológicos que gobiernan la biosíntesis de astaxantina y así facilitar la construcción de cepas sobreproductoras que sean comercialmente más atractivas.

El análisis químico de los intermediarios de la ruta de biosíntesis de astaxantina ha sugerido la siguiente vía de síntesis: Isopentenil-difosfato \rightarrow Geranilgeranil-difosfato \rightarrow Fitoeno \rightarrow Licopeno \rightarrow β -caroteno \rightarrow Equinenona \rightarrow 3-hidroxi equinenona \rightarrow Fenicoxantina \rightarrow Astaxantina. Esta tesis se centró básicamente en los pasos de formación de fitoeno (paso catalizado por la enzima fitoeno sintasa) y la formación de β -caroteno a partir de licopeno (catalizado por la enzima licopeno ciclasa).

A partir de un análisis bioinformático de genes de distintos organismos involucrados en las dos etapas de interés, se diseñaron partidores específicos para cada uno de ellos. Se logró la amplificación y clonado de un fragmento de 2,2 kb (con los partidores diseñados para el gen de la fitoeno sintasa) y un fragmento de 1,5 kb (con los partidores diseñados para el gen de la licopeno ciclasa). El análisis de sus secuencias demostró que el fragmento de 1,5 kb está completamente contenido en el fragmento de 2,2 kb, apoyando las evidencias de que ambas actividades enzimáticas estarían codificadas por un mismo gen, el gen *crtYB*, como ha sido comunicado en otros casos. Estos fragmentos fueron útiles para aislar al gen completo a partir de una genoteca de la

cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*. Dicho gen se encuentra en un fragmento *EcoRV* de aproximadamente 5,9 kb el cual fue clonado en el vector pBluescript y luego secuenciado completamente. Este plásmido recombinante fue denominado p33.13. El análisis de su secuencia indicó que el gen está compuesto por cinco exones y cuatro intrones.

En base a la secuencia del gen *crtYB* en el plásmido p33.13, se diseñaron partidores para clonar el cDNA a partir del RNA total mediante RT-PCR. Fue posible aislar y secuenciar completamente tres cDNAs de distintos tamaños de 2,6, 2,3 y 2,2 kb. El análisis de las secuencias indicó que el cDNA de mayor tamaño contiene los cuatro intrones. El de 2,2 kb corresponde al cDNA de un mRNA maduro y sólo contiene los exones. El cDNA de 2,3 kb se diferencia del cDNA de 2,2 kb ya que contiene parte del primer intrón y ha perdido parte del segundo exón, lo que genera un codón de término de la traducción prematuro. Esta situación se genera por el reconocimiento de señales de "splicing" alternativas. A partir de la secuencia del cDNA de 2,2 kb, se infirió la secuencia aminoacídica de la proteína, la cual estaría compuesta por 673 aminoácidos.

Mediante experimentos de hibridación con una sonda específica para el gen *crtYB*, se determinó que el gen se localiza en dos bandas cromosómicas del cariotipo electroforético de la levadura. Los resultados del análisis de restricción del DNA total de *X. dendrorhous* mediante hibridación indicó que el gen se localiza en una región de aproximadamente 31 kb la que no presenta variaciones aparentes en las dos bandas cromosómicas donde se localiza el gen.

Se obtuvieron colonias pálidas a partir de la transformación de la cepa silvestre con un plásmido que contiene una deleción del gen que, probablemente corresponde a mutantes para este gen que producen una menor cantidad de pigmentos por un efecto de dosis génica. Se observa sectorización en las colonias pálidas, donde hay sectores de la colonia con el fenotipo silvestre, sugiriendo recombinación mitótica apoyando las evidencias de la condición diploide natural de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*.

INTRODUCCION

1. **Carotenoides: características principales y biosíntesis.**

Los carotenoides son pigmentos naturales de color amarillo, naranja o rojo de los cuales se han descrito más de 600 estructuras químicas diferentes (Takaichi *et al.*, 1996). Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza ya que son sintetizados por bacterias, algas, plantas y hongos. En animales, son adquiridos a través de su dieta y son acumulados en algunos de sus tejidos (Armstrong, 1994). La función principal que se les asigna es la protección contra el daño fotooxidativo (Cunningham y Gantt, 1998).

Los carotenoides son compuestos terpénicos que típicamente consisten en un esqueleto hidrocarbonado de cuarenta carbonos (C₄₀). Pueden presentar algunas modificaciones químicas tales como anillos de cinco o seis átomos de carbono o grupos funcionales oxigenados. Se han clasificado en dos grupos según su estructura química: los **carotenos** que no presentan átomos de oxígeno en su estructura y las **xantófilas** que sí los poseen. Su largo esqueleto hidrocarbonado puede presentar numerosos dobles enlaces conjugados responsables de las distintas propiedades espectrales de estos pigmentos, los que absorben la luz dentro de la región visible del espectro entre 400 y 500 nm (Pine, 1993).

Existen numerosas aplicaciones y usos de los carotenoides. Hay evidencias que cumplen un rol importante en la prevención de enfermedades cardiovasculares como también el cáncer. También son utilizados con propósitos farmacéuticos (Schmidt-Dannert, 2000), como colorantes y como suplemento alimenticio en animales, especialmente salmónidos y crustáceos (Johnson, 1977, Johnson, 1979).

Los carotenoides forman parte del grupo de compuestos llamados isoprenoides (Armstrong 1994, Lagarde *et al.*, 2000). Los isoprenoides son sintetizados vía un precursor común, el isopentenil difosfato (IPP). El IPP consiste en una molécula de cinco carbonos (C₅), el cual es isomerizado en dimetilalil difosfato (DMAPP) por la enzima IPP – isomerasa. Luego se condensa una molécula de IPP con una de DMAPP formando un

compuesto de diez carbonos, geranil difosfato (GPP, C₁₀), el cual es el precursor de los monoterpenos. Posteriormente, éste se condensa con una nueva molécula de IPP formándose farnesil difosfato (FPP, C₁₅), precursor de los sesquiterpenos y del escualeno. Una tercera molécula de IPP es adicionada resultando la formación de geranilgeranil difosfato (GGPP, C₂₀), que es el precursor de los diterpenos y del fitol, que a su vez es el precursor de la clorofila. El primer paso específico de la biosíntesis de carotenoides es la formación de fitoeno (C₄₀) por la enzima fitoeno sintasa que condensa dos moléculas de GGPP formando prefitoeno (PPPP) que sería transformado en fitoeno por la misma enzima. El fitoeno es el primer carotenoide de la vía y es incoloro (figura 1). Este sufre cuatro reacciones de desaturación catalizadas por la enzima fitoeno deshidrogenasa que aumentan el sistema de dobles enlaces conjugados, produciéndose neurosporeno o licopeno. A este nivel de la vía de biosíntesis de carotenoides en los distintos organismos se ramifica, lo que genera la enorme diversidad de este tipo de pigmentos encontrada en la naturaleza (Britton, 1998).

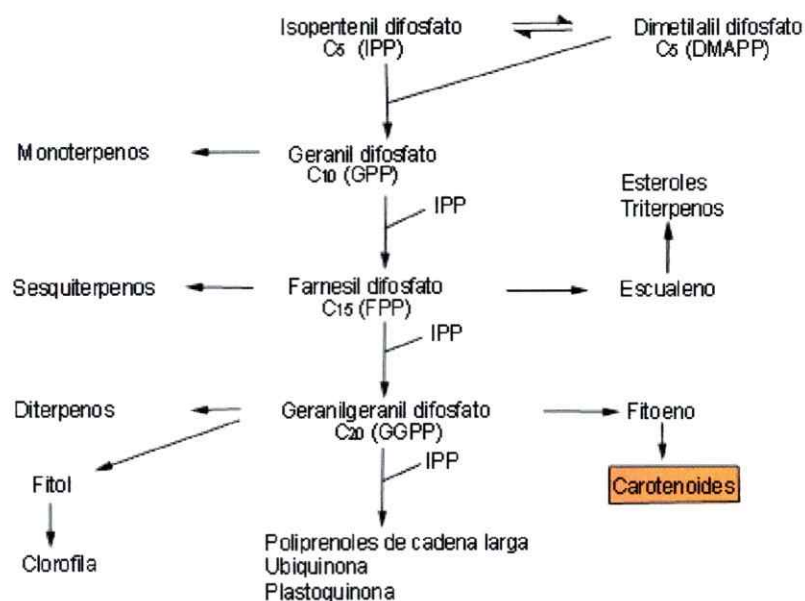


Figura 1.- Resumen de la biosíntesis de isoprenoides y sus relaciones biosintéticas.
Adaptado de Britton, "Carotenoids" Capítulo 2, 1998.

Una de las grandes preguntas que ha surgido sobre la ruta de biosíntesis de carotenoides es como estaría organizada la combinación de enzimas involucradas, para asegurar la eficiencia requerida en la síntesis del producto final. Se han presentado numerosos modelos de organización enzimática. Inicialmente se postuló que cada reacción estaría catalizada por una enzima, codificada por un gen (Britton, 1998). Sin embargo, se ha visto que esto no es así. Por ejemplo, en la formación de licopeno a partir de fitoeno deberían estar involucradas cuatro enzimas dado que existen cuatro reacciones de desaturación (figura 2). En plantas este paso está catalizado por sólo dos enzimas, cada una codificada por un gen, la fitoeno desaturasa que transforma al fitoeno en ξ -caroteno (pasando por fitoflueno) y la ξ -caroteno desaturasa que convierte al ξ -caroteno en licopeno (pasando por neurosporeno). En bacterias y hongos las cuatro desaturaciones son catalizadas por una misma enzima fitoeno desaturasa, codificada por un solo gen (Cunningham y Gantt, 1998). Para el hongo *Phycomyces blakesleeanus* se propuso un modelo de un complejo multienzimático a partir de relaciones matemáticas entre la proporción de núcleos en heterocariones y la composición cuantitativa de carotenoides, que estaría formado por cuatro copias de una única fitoeno desaturasa y dos copias de una única licopeno ciclasa.

Se ha informado que generalmente las enzimas que participan en las etapas tempranas de la biosíntesis podrían ser solubles o asociadas periféricamente a membranas y las enzimas que participan en etapas tardías, estarían unidas a membranas. Esto se debe a que los sustratos requeridos, luego de la formación de fitoeno, son muy hidrofóbicos y por lo tanto insolubles en un medio acuoso.

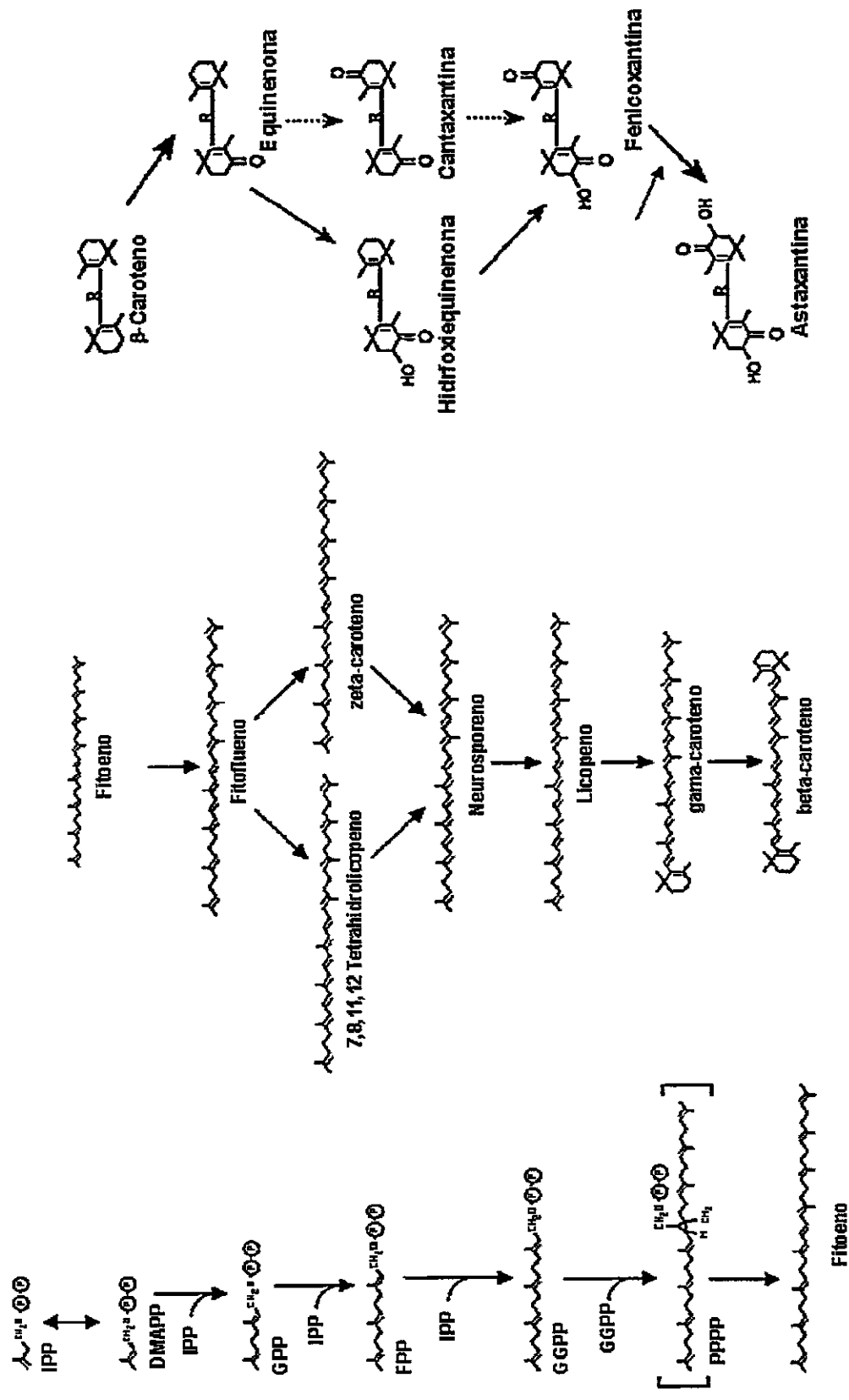


Figura 2.- Biosíntesis de astaxantina.

Se muestran las tres etapas principales de la biosíntesis de astaxantina. Estas son: la formación de fitoeno desde IPP, la formación de β-caroteno desde fitoeno y la formación de astaxantina a partir de β-caroteno.

En muchos sistemas carotenogénicos los intermediarios de la vía están presentes en pequeñas cantidades. Este hecho sugiere la participación de complejos multienzimáticos que no liberarían al medio los intermediarios de la vía, los que serían rápidamente transformados en el siguiente intermediario dentro del complejo. A partir de plantas superiores como *Lycopersicon esculentum* y *Capsicum annuum* se ha purificado un complejo multienzimático fitoeno sintasa que, además de realizar la actividad de fitoeno sintasa, también realiza las actividades IPP isomerasa y GGPP sintasa. Estos complejos han sido relativamente simples de solubilizar por lo que se propone que tendrían localización periférica y estarían unidos débilmente a membranas (Britton, 1998).

Uno de los carotenoides que actualmente concita gran interés para su estudio, principalmente debido a sus propiedades antioxidantes, es la astaxantina. En la síntesis de astaxantina el fitoeno pasaría a formar licopeno, que luego de la ciclación de ambos extremos del mismo por la enzima licopeno ciclasa daría lugar a β -caroteno. La posterior adición de grupos hidroxilo y ceto al β -caroteno originan la astaxantina (Girard, 1994) (figura 2).

La biosíntesis de astaxantina se limita exclusivamente a microorganismos y algunos ejemplos son la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*, el alga *Haematococcus pluvialis* y las bacterias marinas *Agrobacterium aurantiacum* y *Alcaligenes* sp. cepa PC-1 (Fraser, 1997).

2. *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

A fines del siglo XIX Ludwig describió una levadura responsable del color rojo de exudados desde heridas de árboles (especialmente *Betula spp*) y la llamó *Rhodomyces dendrorhous*. Entre 1967 y 1968 Phaff aisló levaduras de color rojo desde los exudados de árboles heridos en regiones montañosas de Japón y Alaska. Se la llamó *Rhodozyma montanae nov. gen, et sp.*, pero no se le dio un adecuado nombre en latín. Luego, en 1976

Miller, propuso el nombre de *Phaffia rhodozyma*, el cual fue publicado validamente. Posteriormente fueron aisladas muchas cepas desde la parte Europea de Rusia. Se observó que *P. rhodozyma* era la levadura dominante en los exudados rojos de los árboles heridos y se propuso que correspondía a *Rhodomyces dendrorhous*, descrita inicialmente por Ludwig (Phaff *et al* , 1972, Miller *et al*, 1976, Golubev *et al*, 1995).

Debido a que se desconocía su fase perfecta, *P. rhodozyma* fue clasificada como una levadura tipo basidiomicete por sus características de formación de yemas enteroblásticas, su pared celular estructurada en multicapas, presencia de actividad ureásica, capacidad de sintetizar pigmentos carotenoides (principalmente astaxantina), producir compuestos amiloides y fermentar azúcares (Miller *et al*, 1976). Todo esto ha sido apoyado por estudios de estructura primaria y secundaria de rRNA 5S. Posteriormente, análisis de rRNA de 18S y 26S, mantuvieron a *P. rhodozyma* como género independiente (Yamada *et al.*, 1990).

La mayoría de las levaduras basidomicetas son heterotálicas y por lo tanto requieren de cepas de tipo de apareamiento compatible para obtener su fase sexual. Sin embargo, como no se conocía la fase sexual del ciclo reproductivo de *P. rhodozyma* fue clasificada como una levadura imperfecta y ubicada dentro del grupo de los deuteromicetes. En 1995 Golubev describió su fase perfecta en la cual el núcleo de la célula madre se conjuga con el núcleo de la célula hija, fenómeno conocido como pedogamia. Luego de la conjugación se desarrolla un holobasido de 70 a 80 μm de longitud y de 2 a 3.5 μm de diámetro presentando entre 4 a 6 basidiosporas apicales, ovals o elipsoidales de 4 x 8 μm . Este tipo de ciclo de vida es desconocido en las levaduras basidiomicetes y por lo tanto se propuso un nuevo género y especie, *X. dendrorhous* para el estado perfecto de *P. rhodozyma* (Golubev, 1995).

3. Aproximación molecular al estudio de la carotenogénesis en *X. dendrorhous*.

Por experimentos de mutagénesis se han obtenido cepas de *X. dendrorhous* con un mayor contenido de astaxantina, pero sin alcanzar los niveles apropiados para su comercialización (An *et al.* 1989). No obstante, la obtención de mutantes ha sido de gran utilidad para el estudio de la ruta de biosíntesis de astaxantina en la levadura. Existen tres clases de mutantes las que son reconocidas por alteraciones en su pigmentación. Aquellas que poseen mutaciones en genes regulatorios de los cuales hay dos tipos: subproductores de pigmentos y sobreproductores (Girard *et al.*, 1994). También están los mutantes que tienen una mutación en algún gen estructural de la ruta de biosíntesis por lo cual acumulan algún intermediario de la vía. Entre este último grupo se encuentran aquellos mutantes albinos no productores de carotenoides y albinos que acumulan fitoeno (Girard *et al.*, 1994) y mutantes que acumulan β -caroteno (An *et al.*, 1989, Martínez 1995, Martínez *et al.*, 1998). Hasta el momento no se han encontrado mutantes que acumulen licopeno o mutantes que acumulen algún intermediario entre β -caroteno y astaxantina. Se ha sugerido la participación de un complejo multienzimático que actuaría en esta última etapa de la biosíntesis, es decir, el paso de β -caroteno a astaxantina (An *et al.*, 1989) o la participación de un sólo gen que codificaría para una enzima que presente las dos actividades de oxidación necesarias para transformar el β -caroteno en astaxantina. Finalmente, es posible mencionar que existe un tercer tipo de mutantes en que estaría afectado algún gen que pudiera tener un efecto indirecto sobre el fenotipo de pigmentación, como es el caso de genes que controlan el flujo de precursores (León, 2000). En la figura 3 se ilustra la biosíntesis de astaxantina, comparando la ruta de plantas, algas y cianobacterias con la de *X. dendrorhous*.

El clonamiento de los genes involucrados en la carotenogénesis en *X. dendrorhous*, permitirá conocer los procesos biológicos que gobiernen la síntesis de astaxantina y posteriormente facilitará la producción de cepas de *X. dendrorhous* con un contenido mayor de astaxantina lo que sería comercialmente más atractivo.

Figura 3.-Ruta de biosíntesis de astaxantina.

En la figura se resumen los principales pasos de la ruta de biosíntesis de astaxantina en *X. dendrorhous* (lado derecho de la figura) y se compara la biosíntesis de carotenoides en plantas, algas y cianobacterias (lado izquierdo de la figura). Se señalan también los genes estructurales de la vía que han sido clonados y secuenciados. A la izquierda de la figura, se indica el color de las colonias que acumulan carotenoides intermedios en la ruta de biosíntesis.

HIPÓTESIS

En la ruta de biosíntesis de astaxantina de *X. dendrorhous* la formación de fitoeno a partir de geranilgeranil-difosfato, estaría controlada por un gen estructural que codifica la enzima fitoeno sintasa que además presenta actividad licopeno ciclasa, cuya organización estructural y funcional es compleja.

OBJETIVOS

1. Objetivo general

1. Estudiar la organización del gen que codifica la enzima fitoeno sintasa (*crtB*) en el genoma de la cepa silvestre UCD 67-385 de la levadura *X. dendrorhous*.

2. Objetivos específicos

1. Clonado de un fragmento del gen *crtB* de *X. dendrorhous* mediante PCR utilizando partidores diseñados de regiones conservadas homólogas y/o heterólogas.
2. Aislar un fragmento de DNA genómico de *X. dendrorhous*, portador del gen *crtB* a partir de una genoteca de la levadura.
3. Clonado del cDNA del mensajero del gen *crtB* de *X. dendrorhous*.
4. Caracterización del gen *crtB* mediante secuenciación, mapeo de restricción, hibridación y análisis computacional del gen.
5. Ubicación del gen *crtB* en el cariotipo electroforético de la levadura.
6. Construcción de mutantes de delección del gen *crtB* en la cepa silvestre de *X. dendrorhous*.

MATERIALES Y METODOS

I. Materiales

1.- Material biológico

1.1.- Microorganismos

1.1.1.- Bacterias

Para los experimentos de clonamiento se utilizó la cepa DH5 α de *Escherichia coli* (Sambrook *et al*, 1989).

1.1.2.- Levaduras

La cepa silvestre de *X. dendrorhous* (Ex. *P. rhodozyma*) UCD 67-385 (Miller *et al*, 1976) ha sido obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC).

1.2.- Plásmidos

Se utilizaron los plásmidos YIp5 y pBluescript SK⁻ (pBluescript) (Sambrook *et al*, 1989).

1.3.- Enzimas

Las endonucleasas de restricción, DNA ligasa del bacteriófago T4, DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*, transcriptasa reversa de M-MLV, DNasa, RNasa A, se adquirieron de compañías como Promega, BioLabs y Gibco-BRL, USA.

Las enzimas novozima, proteinasa K y lisozima, se adquirieron en Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, U.S.A. y Gibco-BRL, U.S.A.

1.4.- Ácidos nucleicos

El DNA de esperma de salmón se adquirió de Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, U.S.A. El DNA del bacteriófago lambda digerido con la enzima de restricción *Hind* III, se adquirió de BioLabs Inc. U.S.A.

2.- Medios de cultivo y reactivos químicos

Todos los productos químicos utilizados, son de uso general y frecuente en un laboratorio de microbiología y fueron adquiridos de compañías como Merck Química Chilena Soc. Ltda., Sigma Chemical Co. ST. Louis, Missouri, U.S.A., Difco Laboratories, Detroit, Michigan U.S.A.

α -[³²P]-dCTP fue adquirido de Fermelo Biotec.

3.- Sistemas de purificación y marcación radioactiva

3.1.- Purificación de DNA plasmidial

Se adquirieron los siguientes sistemas de purificación de DNA plasmidial:

- "Plasmid miniprep kit", BioRAD.
- "E.Z.N.A Plasmid Miniprep kit I", Omega.

3.2.- Purificación DNA a partir de geles de agarosa

Kit GeneClean II, compañía Bio 101, California, U.S.A.

3.3.- Marcación radioactiva de ácidos nucleicos

Se utilizó el sistema de marcación radioactiva "Kit Random Primers DNA Labeling System", de Gibco-BRL.

II. Métodos

1.- Cultivo y mantención de microorganismos

1.1.- Bacterias

E. coli fue crecida en medio de cultivo Luria Bertani (triptona 1%, extracto de levadura 0,5% y cloruro de sodio 0,5%) a 37°C con agitación constante. Las cepas portadoras de plásmidos se crecieron en medio LB suplementado con ampicilina 100 µg/ml. Para la mantención de las cepas se mezcló 1 ml de cultivo saturado de cada una de ellas con 298 µl de glicerol al 87% y se mantuvieron a -70°C.

1.2.- Levaduras

Las cepas de *X. dendrorhous* fueron crecidas en medio YM (glucosa 1%, extracto de levadura 0,3%, extracto de malta 0,3% y peptona 0,5%) a 22°C con agitación constante. Para los experimentos que requerían formación de protoplastos la levadura fue crecida en medio mínimo MM_v (Retamales *et al*, 2002).

2.- Purificación de ácidos nucleicos

2.1.- DNA plasmidial

El DNA plasmidial de cultivos bacterianos se purificó por el método de la lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979). Para ello se crecieron las cepas bacterianas en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Se centrifugaron las células a 14.000 rpm por 1 minuto. El "pellet" celular se resuspendió en 100 µl de solución I (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0) con lisozima 4 mg/ml y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó 200 µl de solución II (NaOH 0,2 N y SDS 1%) mezclando suavemente y se dejó la mezcla en hielo por 5 min, para luego agregar solución III (acetato de potasio 5 M) e incubar por otros 5 min en hielo. Se centrifugó la mezcla a 14.000 rpm por 10 min. Se extrajo el sobrenadante dos veces con 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y una vez con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El DNA se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto frío, manteniéndolo por 30 min a -20 °C. Finalmente el DNA se resuspendió en 50 µl de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 10 mM) con RNasa A a una concentración de 30 µg/ml. La mezcla fue incubada durante 30 min a 37 °C. La concentración y calidad del DNA fue analizada por electroforesis en geles de agarosa (Sambrook *et al*, 1989) en tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8.0) en presencia de bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml, utilizando el programa ID1 de Kodak.

2.2.- DNA genómico *X. dendrorhous*

El DNA de *X. dendrorhous* fue obtenido a partir de protoplastos de la levadura. La obtención de protoplastos se realizó por el método desarrollado en nuestro laboratorio (Hermosilla *et al*, 1995, Retamales *et al*, 1998). Para ello, se hizo crecer la levadura en

500 ml de MM_v a 22°C hasta saturación y se lavaron las células 2 veces con KCl 0,8 M. Las células fueron resuspendidas en 4 ml de KCl 0,8 M y se agregó novozyma a una concentración final de 4 mg/ml, completando un volumen de 5 ml. La mezcla fue incubada con agitación suave por 2 horas a 37°C o 12 horas a 22°C. Los protoplastos fueron lavados tres veces con KCl 0,8 M centrifugando a 1900 x g por 10 min cada vez y resuspendidos en 5,4 ml de Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 20 mM. Luego se agregó 0,6 ml de SDS 10X y se incubó a 37°C por 10 min. Posteriormente se agregó 50 µl de proteinasa K a una concentración de 20 mg/ml, dejando la mezcla a 55°C por una hora. Se centrifugó a 1900 x g por 5 min y el sobrenadante fue extraído tres veces con un volumen de fenol saturado en tampón Tris-HCl pH 7,4, dos veces con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y una vez con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), siempre mezclando muy suavemente y centrifugando a 1900 x g por 10 min para separar las fases. El DNA se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto frío, lavado con etanol al 70% y finalmente resuspendido en 500 µl de tampón TE. El DNA fue analizado por electroforesis en geles de agarosa (0,7%) en presencia de bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml.

2.3.- Extracción de DNA desde geles de agarosa

Para la extracción de DNA a partir de geles de agarosa, se utilizó el kit GeneClean II (Bio 101, Carlsbad, CA, USA). Los fragmentos de DNA se separaron por electroforesis en gel de agarosa (0,7%) en tampón TAE. Se cortó con un bisturí la zona del gel o banda de interés visualizando el DNA bajo luz UV en un transiluminador. El trozo de gel se depositó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se agregó 3 volúmenes de NaI 6 M (de acuerdo del peso del trozo de gel en gramos). Se incubó por 10 min a 55 °C hasta que la agarosa se disolvió completamente. Luego, se agregó 7 µl de resina Glassmilk (silica) y se incubó por 10 min a temperatura ambiente, para luego centrifugar en una microcentrífuga Eppendorf por 5 seg a 12.000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se lavó tres veces el "pellet" con 500 µl de solución NewWash (Tris-HCl pH 7.5 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2,5 mM, Etanol 50 % v/v) centrifugando 10 seg a 12.000 rpm cada vez. Finalmente, el DNA se eluyó de la resina agregando 15 µl de agua estéril e incubando por 10 min a 55 °C. Se centrifugó a 12.000 rpm por 30 seg y se recuperó el

sobrenadante (que contiene el DNA), depositándolo en un tubo Eppendorf limpio y estéril. La cantidad de DNA obtenida se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa utilizando el programa ID1 de Kodak.

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

Para evitar contaminación con RNasas, se utilizó el inhibidor dietilpirocarbonato (DEPC), agregado al agua con la cual se prepararon las soluciones.

La extracción de RNA total, se basó en el trabajo de Chomezynski y Sacchi, 1987. Para ello se centrifugó 5 ml de cultivo de *X. dendrorhous* en fase estacionaria ($\sim 10^8$ células/ml) y luego se sumergió el "pellet" de células en N₂ líquido. Se resuspendieron las células en 1,5 ml de reactivo de TRIzol (Gibco BRL) y se agregó un volumen de perlas de vidrio (425-600 μ m). Se agitó en vórtex a máxima velocidad durante 4 min, alternando 30 seg de agitación y 30 seg de incubación en hielo. El homogenizado se incubó 10 min a temperatura ambiente y luego se agregó 0,4 ml de cloroformo agitando en forma manual por 5 min a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 12100 x g por 15 min a 2-8 °C. Se tomó la fase acuosa (superior) muy cuidadosamente y se agregó un volumen de isopropanol y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 12100 x g por 10 min a 2-8 °C para eliminar el sobrenadante y lavar el "pellet" con 1 ml de etanol 75 %. Finalmente se dejó secar el "pellet" de RNA y se resuspendió en agua tratada con DEPC incubando a 55 °C. El RNA se almacenó a -20 °C hasta su posterior utilización.

3.- Cariotipo electroforético

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

Para los análisis de electroforesis de campo pulsado se preparó DNA cromosómico intacto de la levadura mediante la técnica descrita por Cifuentes *et al* (1997) basada en Schwartz (1984). Para ello, se colectaron las células en fase estacionaria de un cultivo de *X. dendrorhous* de 100 ml en MM_v. Se lavaron las células dos veces con EDTA 50 mM pH 8.0 para luego ser resuspendidas en una solución de EDTA 50mM pH 8.0 con 10 mg/ml de novozima. Se agregó 3 ml de agarosa de bajo punto de fusión 1%, EDTA 125 mM pH 8.0, precalentada a 42°C y la mezcla se distribuyó en moldes de 100 μ l,

permitiendo la gelificación a 4°C por 15 min. Los bloques se sumergieron en 5 ml de tampón LET (500 mM EDTA, 7,5 % β -mercaptoetanol, 10mM Tris-HCl, pH 7.5) que contenía 0,4 mg/ml de novozima y se incubó a 37°C por 16 horas. Transcurrida la incubación, los bloques se lavaron dos veces con EDTA 50 mM y luego se sumergieron en 5 ml de solución NDS (500mM EDTA, 1% N-lauroylsarcosina y 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) que contenía 1 mg/ml de proteinasa K, se incubó a 55 °C por 24 horas. Finalmente, los bloques se lavaron dos veces con EDTA 50 mM y se dejaron en la misma solución a 4°C hasta su posterior utilización.

3.2.- Electroforesis de campo pulsado

La electroforesis de campo pulsado se realizó utilizando el sistema CHEF II y CHEF III de BioRad (Chu *et al*, 1986) en geles de agarosa 0.85-1% en tampón TBE 0.5X (45 mM Tris-borato, 1mM EDTA pH 8.0) a 14 °C. Las condiciones de separación óptima de las bandas de DNA cromosómico de *X. dendrorhous* son las descritas por Cifuentes *et al* (1997). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio 1 μ g/ml por 6 horas y luego fueron lavados en agua destilada por 3 a 4 horas para finalmente ser visualizados en un transiluminador con radiación UV.

4.- Análisis de DNA

4.1.- Digestión con endonucleasas de restricción

Se realizaron análisis de restricción según Sambrook *et al* (1989). Para DNA plasmidial se digirió en un volumen final de 20 μ l entre 0,5 y 1,0 μ g de DNA con una unidad enzimática de la endonucleasa de restricción utilizada, con el tampón adecuado e incubando por 2 horas a la temperatura indicada por el proveedor. Para el DNA genómico de *X. dendrorhous* se digirió alrededor de 5 μ g con 5 unidades enzimáticas. Al realizar digestiones con más de una enzima de restricción se utilizó el tampón multicore de Promega. Los productos de digestión se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 0,7-1%. Los tamaños y concentraciones de los fragmentos generados se calcularon con el programa ID1 de Kodak.

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

4.2.1.- Diseño de partidores

Se diseñaron partidores específicos a partir de regiones homólogas y heterólogas para los genes de las enzimas fitoeno sintasa y licopeno ciclasa. Tanto los partidores "forward" como "reverse" portaban un sitio de restricción para la enzima *Bam*HI en su extremo 5'.

4.2.2.- Amplificación de DNA

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 µl que contenía tampón de PCR 1X pH 8,4 (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM), 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 µM de cada partidor, entre 10 y 100 ng de DNA templado y entre 0,2 y 0,5 unidades de *Taq* polimerasa. Se utilizó un termociclador Perkin Elmer 2400 utilizando el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineación de los partidores a 55°C por 30 segundos y elongación a 72 °C por 3 minutos. Finalmente se dejó por 10 minutos a 72°C para una elongación final y luego mantenida a 4°C.

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

4.3.1.- Síntesis de cDNA (reacción RT)

Las muestras de RNA fueron tratadas previamente con 10 U (1 µl) de DNasa (Roche). La reacción RT se realizó con transcriptasa reversa M-MLV (Promega). En un volumen total de 14 µl se mezcló 3 µg de RNA total, partidor oligo-dT₁₅ (25 µM) y agua-DEPC. Se incubó a 70°C durante 5 min y luego se dejó rápidamente en hielo por 3 min. A la mezcla se agregó 5 µl de buffer M-MLV 5X, 5 µl de dNTP's 2,5 mM y 1 µl de M-MLV RT. Se incubó por 1 hora a 42 °C y luego se calentó a 65 °C por 10 min.

4.3.2.- PCR

La reacción de PCR se efectuó en un volumen final de 25 µl en una mezcla de reacción que contuvo 2,5 µl de buffer *Taq* polimerasa 10X, 0,5 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl

de MgCl₂ 50 mM, 1 µl de cada partidor 25 µM, 2 µl de reacción RT, 1 U de *Taq*pol (Promega) y agua. El programa que se utilizó fue el siguiente: 95 °C por 3 min, 28 ciclos de 94 °C por 30 seg, 55°C por 30 seg y 72 °C por 3 min, extensión final a 72 °C por 10 min y luego mantenida a 4°C.

5.- Transformación genética por electroporación

5.1.- *Escherichia coli*

5.1.1.- Preparación de células electrocompetentes

Se inoculó un litro de medio LB con 1/100 volumen de un cultivo saturado de *E. coli* DH5 α y se incubó a 37°C con agitación constante hasta que se alcanzó una DO_{600nm} entre 0.5 y 0.8. Posteriormente, se enfrió el matraz en hielo durante 15- 30 min y luego se centrifugó a 4000 x g por 15 min a 4°C. Las células se lavaron una vez con 1 litro de agua destilada estéril fría, una vez con 500 ml de agua destilada estéril fría y una vez con 20 ml de glicerol al 10 % estéril y frío, centrifugando a 4000 x g por 15 min a 4°C cada vez. Las células se resuspendieron en 3 ml de glicerol al 10 % estéril frío y se pusieron alícuotas de 50 µl por tubo Eppendorf, almacenándolas a -70°C hasta su utilización.

5.1.2.- Transformación

Para cada transformación de *E. coli*, se tomó un tubo Eppendorf con los 50 µl de células electrocompetentes. Las células fueron descongeladas en hielo y luego se les agregó DNA transformante en un volumen no mayor de 10 µl. La mezcla se depositó en una cubeta de electroporación de 0.2 cm (Bio Rad). Se utilizó un equipo Gene Pulser Bio Rad para generar el siguiente pulso: 25 µF, 200 Ω y 2.5 kV. Luego del pulso se dejaron las células en hielo para luego agregarles 1 ml de medio LB e incubar a 37°C por una hora. Finalmente se sembraron 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.

5.1.3.- Selección de clones portadores de inserto

Al utilizar al plásmido pBluescript como vehículo de clonamiento, las bacterias transformadas se sembraron en placas con medio LB-agar 2% suplementadas con 100

$\mu\text{g/ml}$ ampicilina y $32 \mu\text{g/ml}$ de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D galactopiranosido). El plásmido pBluescript confiere resistencia a ampicilina a las células que lo contienen y por lo tanto, la presencia de ampicilina en el medio selectivo permite que sólo crezcan aquellas bacterias que hayan incorporado al plásmido. La selección de clones portadores de plásmidos que contienen inserto se realiza por el color de la colonia. El sitio de clonamiento múltiple del plásmido pBluescript se localiza en el gen *lacZ* que codifica la enzima β -galactosidasa. La enzima β -galactosidasa actúa sobre el sustrato cromogénico X-gal, proporcionando el color azul a la colonia. Por lo tanto, las colonias azules son portadoras del plásmido pero no contienen inserto y no así las colonias blancas cuyo color se debe a la disrupción del gen *lacZ* (Sambrook *et al*, 1989).

5.2.- *X. dendrorhous*

La transformación de *X. dendrorhous* se basó en Adrio *et al* (1995) y Kim *et al* (1998). Para ello se inoculó 200 ml de medio YM con 1-2 ml de un cultivo de *X. dendrorhous* de 48 horas. Se incubó con agitación constante a $22 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta alcanzar una $\text{DO}_{550\text{nm}}$ de 1,2. Las células fueron centrifugadas a $5000 \times g$ durante 5 min, resuspendidas en 25 ml de tampón BD (50 mM tampón fosfato de potasio, pH 7.0, 25 mM ditionitrito [DTT]) e incubadas a $22 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos. Las células fueron lavadas dos veces con 25 ml de tampón STM (270 mM sacarosa, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM MgCl_2) frío y finalmente resuspendidas en 1 ml de tampón STM. Se mezcló 60 μl de células electrocompetentes con 10-20 μg de DNA transformante en un volumen de 5 μl y se depositó la mezcla en una cubeta de electroporación. Se le proporcionó el siguiente pulso: 125 mF, 600 Ω , 0,45 kV. Posteriormente las células fueron resuspendidas en 1 ml de medio YM líquido e incubadas a $22 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 horas, luego fueron sembradas en placas con medio YM-agar al 2%.

6.- Hibridación DNA-DNA

Los experimentos de hibridación se basaron en las técnicas desarrolladas por Southern (1975) y descritas por Sambrook *et al* (1989).

6.1.- Marcación de sondas

Las sondas de DNA se marcaron por random primers utilizando α -[³²P]-dCTP.

Se desnaturalizó 30 ng de DNA en un tubo Eppendorf por simple ebullición por 5 min y depositando el tubo rápidamente en hielo. La mezcla de reacción contenía 30ng de muestra de DNA desnaturalado, 2 μ l de dATP 10 mM, 2 μ l de dGTP 10 mM, 2 μ l de dTTP 10 mM, 15 μ l de mezcla de partidores, 5 μ l de dCTP³² (50 μ Ci), 1 μ l de la enzima DNA pol fragmento Klenow y agua hasta completar un volumen de 50 μ l. Se incubó a 25 °C por 1-3 horas y se agregó 5 μ l de buffer de detención. La sonda fue lavada en una columna de Sephadex G-50 estéril en una jeringa de tuberculina.

6.2.- Preparación de las membranas

Se realizó electroforesis en geles de agarosa (0,7%) en presencia de bromuro de etidio 0,5 μ g/ml, TAE 1X, utilizando 3-5 μ g 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. El gel fue sumergido en HCl 0,2 N por 15 minutos con agitación suave para depurar y se enjuagó con agua desionizada. Luego, para desnaturalar el DNA, el gel fue sumergido en una solución de NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 N, por 45 min a temperatura ambiente y agitación suave. Se enjuagó el gel con agua desionizada. Posteriormente, se neutralizó el gel sumergiéndolo dos veces en una solución de Tris-HCl 1 M (pH 7.4), NaCl 1,5 M, primero por 30 min y luego por 15 min a temperatura ambiente y agitación suave. El DNA fue transferido a una membrana de nylon PALL BIODYNE B según Sambrook, *et al* (1989), utilizando una solución SSC 10X (SSC 20X= NaCl 3 M, citrato de sodio 0,3 M pH 7,0) como tampón de transferencia. La transferencia se realizó durante 16 horas y el DNA se fijó a la membrana de nylon mediante radiación UV de 260 nm durante 5 min o calentándola por 15 min a 80°C.

6.3.- Prehibridación

La membrana fue lavada con SSC 2X y luego se depositó en una botella de hibridación con 10 ml de solución de hibridación (Na₂HPO₄ 0.5 M pH 7.2, SDS 7%). Se incubó la membrana en la botella por 5 min a 65 °C en un horno de hibridación Hybrilinker HL-2000 de UVP Laboratory Products.

6.4.- Hibridación

Se agregó la sonda (desnaturada por ebullición y depositada en hielo) 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.

6.5.- Lavados

La membrana fue lavada en la botella de hibridación. Se realizaron cuatro lavados los que consistieron en dos lavados con 10 ml de una solución que contenía Na_2HPO_4 40 mM pH 7.2, SDS 5% y dos lavados con 10 ml de una solución compuesta por Na_2HPO_4 40 mM pH 7.2, SDS 1%. Para cada lavado, la membrana se mantenía entre 30 y 60 min a 65 °C con agitación suave con la solución de lavado correspondiente. Posteriormente, la membrana se retiró de la botella de hibridación y se depositó sobre un soporte cubierto por plástico. La membrana sobre el soporte también fue recubierta por plástico y depositada en un "cassette" que luego en oscuridad se puso sobre ella una placa autoradiográfica. El "cassette" con la membrana y la placa autoradiográfica se mantuvo a -70°C por tiempos variables antes de revelar la placa autoradiográfica en un equipo Curix 60 de AGFA.

RESULTADOS

1. Amplificación y clonamiento del gen que codifica la enzima fitoeno sintasa y licopeno ciclasa de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*.

Para elaborar la estrategia que permitiese la amplificación mediante PCR y el clonamiento del gen *crtB* y el gen *crtY* de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*, se compararon secuencias aminoacídicas de proteínas y nucleotídicas de los genes de las enzimas fitoeno sintasa y licopeno ciclasa de distintos organismos, disponibles en la base de datos del GenBank. Se identificó zonas conservadas para ambas enzimas y a partir de ellas se diseñaron oligonucleótidos que permitieran amplificar parte de ambos genes. Sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos con estos partidores. Posteriormente, fue publicada en GenBank la secuencia de un gen que codifica una enzima bifuncional que comparte las actividades fitoeno sintasa y licopeno ciclasa de *X. dendrorhous* de otra cepa silvestre UCD 67-210. Por esta razón el gen fue llamado *crtYB* (Nº de acceso: AJ133646) y a partir de su secuencia se diseñaron nuevos partidores para amplificar los genes a partir de DNA de nuestra cepa silvestre de *X. dendrorhous* (UCD 67-385). Tanto los partidores “forward” como “reverse” portaban un sitio de restricción para la enzima *Bam*HI en su extremo 5' para su posterior análisis en los experimentos de clonamiento (Tabla I).

Al utilizar en la reacción de PCR DNA genómico de la cepa silvestre UCD 67-385 como molde y los partidores FS-11 y FS-21, amplificó un fragmento de DNA de 2,2 kb y con los partidores LC-1 y LC-2 se obtuvo otro de 1,5 kb. Ambos fragmentos fueron purificados a partir de geles de agarosa (0,7%) por la técnica de GeneClean como se indicó en Materiales y Métodos. Los fragmentos fueron ligados independientemente al plásmido pBluescript SK linearizado con la enzima *Eco*RV y con la mezcla de ligación se transformó *E. coli*. Se seleccionaron las colonias transformantes blancas portadoras de DNA plasmidial el cual fue posteriormente analizado mediante digestión con enzimas de restricción.

Tabla I

Partidores diseñados a partir de regiones heterólogas y homólogas de genes de fitoeno sintasas y licopeno ciclasas, para amplificar los genes *crtB* y *crtY* de *X. dendrorhous*. En las secuencias nucleotídicas de los partidores se ha subrayado el sitio de restricción para la enzima *Bam*HI.

Partidor	Orientación	Secuencia nucleotídica	Gen	Enzima
FS-1	Forward	5'- <u>agtatg</u> caaagacgtttta-3'	<i>crtB</i>	Fitoeno sintasa
FS-2	Reverse	5'-ttgtagtcattggcttcaat-3'	<i>crtB</i>	Fitoeno sintasa
FS-11	Forward	5'- <u>ggatc</u> caaatctttcaatgacta-3'	<i>crtB</i>	Fitoeno sintasa
FS-21	Reverse	5'- <u>ggatc</u> caaacgactttgatct -3'	<i>crtB</i>	Fitoeno sintasa
LC-1	Forward	5'- <u>ggatc</u> cctcgtatttattgcgt -3'	<i>crtY</i>	Licopeno ciclasa
LC-2	Reverse	5'- <u>ggatc</u> cctctaaggagttcgt -3'	<i>crtY</i>	Licopeno ciclasa

El análisis del DNA plasmidial de los transformantes indicó que dos clones (J1 y J15) contienen un plásmido de aproximadamente 5,1 kb y fueron denominados pJ1 y pJ15 respectivamente. La digestión con la endonucleasa de restricción *Bam*HI indicó que ambos plásmidos presentan dos bandas, una de 2,9 kb correspondiente al vector pBluescript linearizado y una segunda banda de 2,2 kb correspondiente al inserto de interés (Figura 4). Posteriormente se realizó la caracterización de ambos plásmidos mediante la elaboración de los respectivos mapas de restricción. Como resultado se determinó que ambos plásmidos presentaban la misma orientación del inserto y comparten los mismos cortes de restricción de las enzimas utilizadas. La figura 5 representa un ejemplo de las digestiones realizadas. En la tabla II se indica los tamaños de los fragmentos de DNA generados al digerir a los plásmidos pJ1 y pJ15 con las distintas enzimas de restricción para confeccionar un mapa de restricción.

En la figura 6, se muestra el mapa de restricción de los clones pJ1 y pJ15, que resume los resultados recién mencionados.

Para el fragmento amplificado de 1,5 kb, correspondiente a parte del gen de la enzima licopeno ciclasa de *X. dendrorhous*, se procedió de igual manera. Se purificó desde un gel de agarosa (0,7%) el fragmento amplificado por PCR en que se utilizaron los partidores LC-1 y LC-2 y DNA genómico de *X. dendrorhous* como DNA molde. El fragmento fue ligado al plásmido pBluescript SK linearizado con la enzima *Eco*RV y con la mezcla de ligación se transformó *E. coli*. Se seleccionaron las colonias transformantes blancas portadoras de DNA plasmidial el cual fue analizado mediante digestión con enzimas de restricción. Se determinó que tres clones llamados LC1, LC2 y LC3 eran portadores de plásmidos que presentaban insertos de 1,5 kb al ser digeridos con la enzima *Bam*HI y se denominaron pLC1, pLC2 y pLC3 (Figura 7).



Figura 4.- Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) de los plásmidos pJ1 y pJ15. La figura resume la estrategia de clonado del producto de PCR utilizando partidores internos específicos para el gen que codifica la enzima fitoeno sintasa.

Carriles 1 y 11: DNA del bacteriófago λ digerido con la enzima *Hind*III (λ /*Hind*III), utilizado como estándar de tamaño molecular. Carril 2: Reacción de PCR utilizando DNA de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* como molde y los partidores FS-11 y FS-21. Carril 3: Producto de PCR purificado por GeneClean. Carril 4: plásmido pJ1 sin digerir. Carril 5: plásmido pJ1 digerido con *Bam*HI. Carril 6: plásmido pJ15 sin digerir. Carril 7: plásmido pJ15 digerido con *Bam*HI. Carril 8: plásmido pBluescript digerido con *Bam*HI (la banda de aproximadamente 1,5 kb presente corresponde a DNA plasmidial superenrollado que no se digiere). Carril 9: Reacción de PCR utilizando a pJ1 como DNA molde y los partidores FS-11 y FS-21. Carril 10: Reacción de PCR utilizando a pJ15 como DNA molde y los partidores FS-11 y FS-21.



Figura 5.- Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) del DNA plasmidial de los plásmidos pJ1 y pJ15 digerido con distintas enzimas para construir un mapa de restricción.

Carriles 1 y 20: DNA de λ HindIII utilizado como estándar de tamaño molecular. Los plásmidos pJ1, pJ15 y pBluescript fueron digeridos respectivamente con las siguientes enzimas: Carriles 2, 3 y 4: *EcoRV*. Carriles 5, 6 y 7: *PstI*. Carriles 8, 9 y 10: *EcoRI*. Carriles 11, 12 y 13: *HindIII*. Carriles 14, 15 y 16: *AvaI*. Carriles 17, 18 y 19: *BglII* (las bandas de aproximadamente 2,0 kb en las digestiones de pJ1 y pJ15, corresponden a DNA superenrollado no digerible).

Tabla II

Resumen de digestiones simples y dobles realizadas a los plásmidos pJ1 y pJ15 y tamaños de fragmentos obtenidos.

A: Digestiones simples

B: Digestiones dobles

Enzima	Tamaños de fragmentos pJ1 (pb)	Tamaños de fragmentos pJ15 (pb)	Enzimas	Tamaños de fragmentos pJ1 (pb)	Tamaños de fragmentos pJ15 (pb)
<i>AvaI</i>	3000	3000	<i>BamHI</i>	1300	1300
	2200	2200		+	900
<i>BamHI</i>	3000	3000	<i>EcoRI</i>		
	2200	2200			
<i>BglII</i>	3800	3800	<i>EcoRI</i>	3900	3900
	1200	1200	+	1000	1000
<i>EcoRI</i>	4200	4200	<i>HindI</i>	300	300
	930	930			
<i>EcoRV</i>	No lo corta	No lo corta	<i>EcoRI</i>	2500	2500
<i>HindIII</i>	4900	4900	+	1400	1400
	300	300	<i>PvuII</i>	800	800
<i>PstI</i>	No lo corta	No lo corta		400	400
<i>PvuII</i>	2500	2500	<i>EcoRI</i>	2900	2900
	1970	1970	+	1300	1300
	650	650	<i>SaII</i>	650	650
<i>SaII</i>	3200	3200		250	250
	2000	2000	<i>EcoRI</i>	4250	4250
<i>XbaI</i>	3200	3200	+	650	650
	2000	2000	<i>XbaI</i>	250	250
<i>XhoI</i>	5200	5200			
			<i>SaII</i>	3000	3000
		+	1950	1950	
		<i>XbaI</i>	250	250	

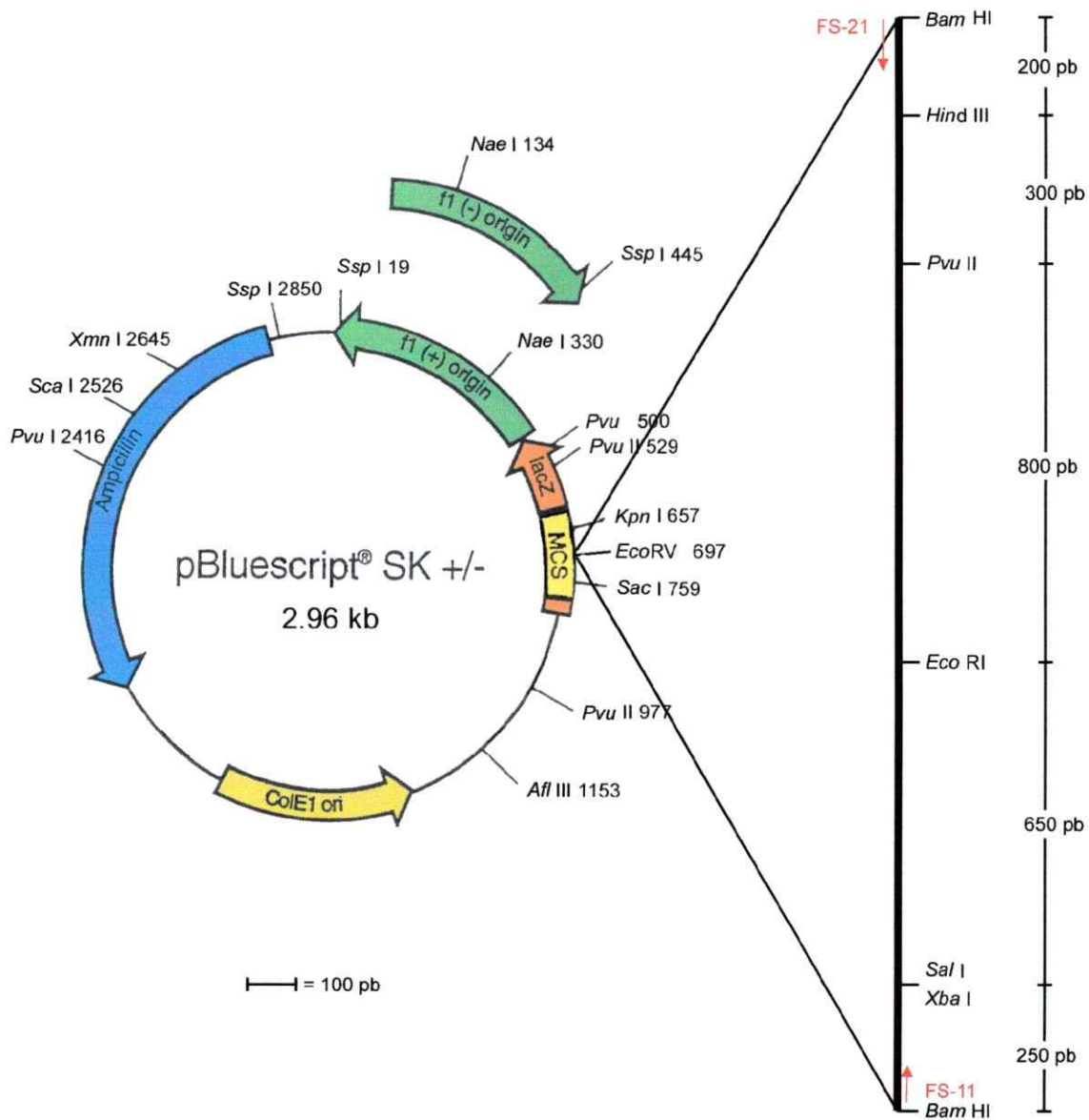


Figura 6.- Mapa de restricción de los plásmidos pJ1 y pJ15.

En la figura se indica los sitios y posición de corte de las enzimas de restricción. Ambos plásmidos poseen los mismos sitios de restricción y sus insertos están igualmente orientados en el vector. También se muestra, en rojo, la posición de los partidores que amplifican al fragmento de 2,2 kb.

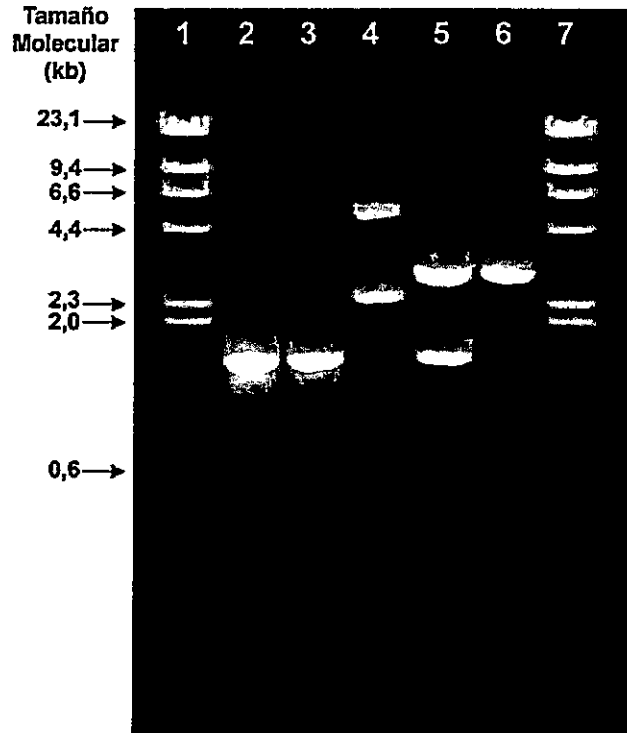


Figura 7.- Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) del plásmido pLC2. La figura resume la estrategia de clonamiento del producto de PCR utilizando partidores internos específicos para el gen que codifica la enzima licopeno ciclasa.

Carriles 1 y 7: DNA de λ Hind III utilizado como estándar de tamaño molecular. Carril 2: reacción de PCR utilizando DNA de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* como DNA molde y los partidores LC-1 y LC-2. Carril 3: Producto de PCR purificado por GeneClean. Carril 4: plásmido pLC2 sin digerir. Carril 5: plásmido pLC2 digerido con *Bam*HI. Carril 6: plásmido pBluescript digerido con *Bam*HI.

2. Secuenciación de los insertos de los plásmidos pJ1, pJ15 y pLC2.

Los insertos de 2,2 kb de los plásmidos pJ1 y pJ15 fueron secuenciados completamente en ambas direcciones a partir de sus extremos. La secuenciación se inició utilizando los partidores T3 y T7 ubicados en la región de clonamiento múltiple del vector pBluescript (tabla III). Posteriormente, la secuenciación fue continuada diseñando partidores que permitían extender las secuencias parciales obtenidas. El tamaño de ambas secuencias completas obtenidas fue de 2198 pb, lo que es muy similar al tamaño obtenido de los insertos al ser analizados por electroforesis luego de ser liberados del vector por digestión con *Bam*HI. El análisis de ambas secuencias indica que son idénticos y presentan un alto porcentaje de identidad con la secuencia de la otra cepa silvestre UCD 67-210 publicada en la base de datos (figura 8) observándose algunas diferencias.

El inserto de 1,5 kb del plásmido pLC2, fue secuenciado completamente desde ambos extremos, de igual forma que los insertos de los plásmidos pJ1 y pJ15. El análisis de su secuencia muestra que es idéntica a un fragmento interno de 1,5 kb de la secuencia del inserto de los clones pJ, indicando que ambas actividades enzimáticas, fitoeno sintasa y licopeno ciclasa, estarían codificadas por el mismo gen.

Tabla III

Partidores ubicados en la región de clonamiento múltiple del vector pBluescript SK.

Partidor	Secuencia nucleotídica
T3	5' - attaacctcactaaag -3'
T7	5' - aatacgactcactatag -3'

2501

2600

PJ15
PJ1
210

TCCTGAAGTATCTTCCAACCCGCATGCCACAANTGACATGGTCTCCGATTTTCTTACCCTACTATTTGGGCCCCCGCTACACCCTTCGCAACCTGACAAG
TCCTGAAGTATCTTCCAACCCGCATGCCACAANTGACATGGTCTCCGATTTTCTTACCCTACTATTTGGGCCCCCGCTACACCCTTCGCAACCTGACAAG
tcctgaagtatcttccaaaccgcatgccacaattgacatggtctccgattttcttacccctactatttgggccccccgctacacccttcgcaaacctgacaag

2601

2700

PJ15
PJ1
210

ATCCTTTCTTCGCCCTTTACTTCTCCTTCGCACCCCTTCCCGACCCACGGGAATGTATCCCTCCGGCTCCCTCCCTTCGGCTTCGGCTTCGGAGCTCGTTTC
ATCCTTTCTTCGCCCTTTACTTCTCCTTCGCACCCCTTCCCGACCCACGGGAATGTATCCCTCCGGCTCCCTCCCTTCGGCTTCGGCTTCGGAGCTCGTTTC
atccttctctcgcccttacttctctctcgacccttcccgaaccccaagggaatgataccccctccccctctctctctcgctctcgccctgcccagctcgttcc

2701

2800

PJ15
PJ1
210

AATTCCTTACCGAAAAGGGTTCCCGTTCAATACCAATTTCCGCTTCAAGTTGCTCGCTAAGTTGCAAGGGCTGATCCCTCGATACCCACTCGACGAACTCCT
AATTCCTTACCGAAAAGGGTTCCCGTTCAATACCAATTTCCGCTTCAAGTTGCTCGCTAAGTTGCAAGGGCTGATCCCTCGATACCCACTCGACGAACTCCT
aatctcttaccgaaagggttccccgttcaataaccatttgccttcaagttgctcgtcaagttgcaagggctgatccctcgataccccactcgaacgaaactcct

2801

2900

PJ15
PJ1
210

TAGAGGATACACCCTGATCTTATCTTTCTTTATCGACAGAGGCGAGTCCAGGCTCGGAAGACGCCCTATCGAGACCCACAGCTGACTTGTGGACTATGGT
TAGAGGATACACCCTGATCTTATCTTTCTTTATCGACAGAGGCGAGTCCAGGCTCGGAAGACGCCCTATCGAGACCCACAGCTGACTTGTGGACTATGGT
tagaggatacacccactgatcttatcttctcccttatcgacagaggcagtcaggctcggaagagcctatcgagacacagctgactgctgagactatggt

2901

3000

PJ15
PJ1
210

CTATGTGTAGCAGGCTCAGTCGCCGAGCTATTGGTCTATGTCTCTTGGGCAAGTGCACCAAGTCAGGTCCTGCCACCATAGAAGAAAGAGAAAGCTGTGT
CTATGTGTAGCAGGCTCAGTCGCCGAGCTATTGGTCTATGTCTCTTGGGCAAGTGCACCAAGTCAGGTCCTGCCACCATAGAAGAAAGAGAAAGCTGTGT
ctatgtagcaggctcagtcgccgagctatbgtctatgctcttgggcaagtgcaccaagtcaggctccctgcccaccatagaaagaaagagaaagctggtg

3001

3100

PJ15
PJ1
210

TAGTGGCAAGCCGAGAGATGGGAACTGCCCTTCAGTTGGTGAACAATGCTAGGGACAATTAAGGGGACGCAACAGAGGGGAGATTTTACCCTACCCTCTC
TAGTGGCAAGCCGAGAGATGGGAACTGCCCTTCAGTTGGTGAACAATGCTAGGGACAATTAAGGGGACGCAACAGAGGGGAGATTTTACCCTACCCTCTC
tagtggcaagccgagagatgggaaactgcccttcagttggtgaaacatbgtatgggacatttaaaggggacgcaacagaaagggagattttaccctaccactctc

3101

3200

PJ15
PJ1
210

ATTCCTTTGGTCTTCGGGATGAATCAAAGCTTTCGGATCCCGACTGATTTGGACGGAACTCGGCCCTCAAGATTTTCGACAAAACCTCCTCAGTCTATCTCCTTCG
ATTCCTTTGGTCTTCGGGATGAATCAAAGCTTTCGGATCCCGACTGATTTGGACGGAACTCGGCCCTCAAGATTTTCGACAAAACCTCCTCAGTCTATCTCCTTCG
atcttbggtcttcgggatgaatcaaagcttgcgatcccgactgattggacggaaacctcggcctcaagatttccgacaaaactcctcagctctatctcctctc

3201

3300

PJ15
PJ1
210

TCCACATTACCATCTTCAAACGCCCTCAGAAAGCTTCGGFTTCGAATGSAAGACGTACTCGCTTCCATTAGTCGCCCTACGCAGAGGATCTTGCCAAACATT
TCCACATTACCATCTTCAAACGCCCTCAGAAAGCTTCGGFTTCGAATGSAAGACGTACTCGCTTCCATTAGTCGCCCTACGCAGAGGATCTTGCCAAACATT
tccacattaccatcttcaaacgcctcagaaagcttccggttcgaaatggaagacgtactcgcttccattagtcgcctacgcagaggtatcttgcccaaacatt

3301

3400

PJ15
PJ1
210

CTTATAAGGGAATTGACCGACTTCCTACCGAGGTTCAAAGCGGGAATGCCAGCGGCTTCCGGAGCTACCTACTGATCGGCCGAGAGATCAAAGTCGTT~
CTTATAAGGGAATTGACCGACTTCCTACCGAGGTTCAAAGCGGGAATGCCAGCGGCTTCCGGAGCTACCTACTGATCGGCCGAGAGATCAAAGTCGTT~
cttataagggaaattgaccgacttcttaccgaggttcaagcgggaaatgacgaggttggcgaggtacctaactgactggccgagagatcaaaagtcgtttg

3401

3500

PJ15
PJ1
210

~
~
gaaaggagcgtcggagagaaagacagttcgcggatggaggagatacggaaagtcttgagtgtggtcatgagcggatgggaagggcagtaagacagc

Figura 8.- Secuencia de los insertos de 2,2 kb de los plásmidos pJ1, pJ15 y alineamiento múltiple con la secuencia del gen que codifica la enzima fitoeno sintasa de la cepa UCD 67-210 de *X. dendrorhous*.

En color celeste, se indican las diferencias entre las secuencias de los insertos de los plásmidos pJ1 y pJ15 y la secuencia de la cepa silvestre UCD 67-210. Son cuatro diferencias ubicadas en zonas no codificantes (intrones) y tres diferencias ubicadas en zonas codificantes (exones). Los cinco exones del gen *crtYB* se han encerrado en cajas. La numeración corresponde a la secuencia publicada de la cepa UCD 67-210.

3. Clonado del gen *crtYB* genómico de la enzima fitoeno sintasa-licopeno ciclasa de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*.

Para el clonado del gen *crtYB* genómico que codifica la enzima fitoeno sintasa-licopeno ciclasa de *X. dendrorhous*, se realizaron dos estrategias. La primera de ellas fue una búsqueda en una genoteca parcial construida en el sitio de clonamiento *Bam*HI del plásmido YIp5. La genoteca consistía en 65 mezclas, denominadas PR1 a PR65, de aproximadamente 100 clones recombinantes cada una. Inicialmente fue necesario saber si el gen *crtYB* no posee sitios de corte para la enzima de restricción *Bam*HI, de tal modo de poder encontrarlo completo en la genoteca mencionada. Para esto se analizó la secuencia obtenida de los clones pJ1 y pJ15, observándose que no presentan sitios de corte para esta enzima. Dado que estos clones no contienen la secuencia completa del gen *crtYB* y por la gran similitud observada entre su secuencia y la secuencia de 3770 pb publicada en el GenBank de la otra cepa silvestre de UCD 67-210, ésta última también fue analizada y se observó que no existían sitios de corte para la enzima *Bam*HI. Con estos resultados se concluyó que probablemente el gen *crtYB* de la cepa silvestre UCD 67-385 no es digerido por la enzima *Bam*HI y por lo tanto, posiblemente se podría encontrar en la genoteca anteriormente descrita.

Para la búsqueda del gen en la genoteca se utilizó la pareja de partidores FS-11 y FS-21, específicos para el gen *crtYB*. Se realizó experimentos de amplificación por PCR utilizando como molde el DNA plasmidial de cada una de las mezclas. Como resultado se obtuvo la amplificación del fragmento de 2,2 kb en la mezcla PR61. Posteriormente se repicaron clones de esta mezcla en diez placas por duplicado, conteniendo 25 clones diferentes cada una, denominadas PR61.I a PR61.X. El DNA plasmidial de un set de cada placa fue analizado por PCR utilizando a los partidores FS-11 y FS-21 (figura 9). En el panel B de la figura 9, se muestra que se obtuvo resultados positivos en las placas PR61.I y PR61.VI. Posteriormente se analizó cada clon individual a partir de las 25 colonias del duplicado de cada placa mediante PCR. Se esperaba que al menos un clon de cada placa PR61.I y PR61.VI fuese portadora de un plásmido que llevara un inserto que contuviese al gen *crtYB*. Sin embargo, en esta etapa no se logró resultados positivos, ya que ninguna de las colonias proporcionaba un amplificado en la reacción de PCR. Es necesario

mencionar que los resultados de amplificación a nivel de la mezcla PR.61 y de submezclas PR61.I y PR61.VI no siempre eran reproducibles, a pesar de que se lograba amplificado utilizando distintas parejas de partidores.

Para intentar explicar esta observación se determinó el tamaño del fragmento *Bam*HI cromosómico que contenía el gen *crtYB* mediante hibridación. Para ello se realizó una digestión total con la endonucleasa *Bam*HI del DNA genómico de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*. Luego el DNA digerido fue separado por electroforesis en gel de agarosa, transferido a una membrana de nylon para finalmente realizar una hibridación utilizando como sonda el fragmento de DNA de 2,2 kb portador de una porción del gen *crtYB* proveniente del clon pJ1. Como se muestra en la figura 10, el gen *crtYB* se encuentra en una banda *Bam*HI única de aproximadamente 23 kb. El gran tamaño del fragmento *Bam*HI que contiene al gen *crtYB*, podría explicar la inestabilidad del plásmido que contiene este inserto en el vector YIp5, aspecto que será discutido más adelante.

Dado que no se logró aislar al gen *crtYB* desde la genoteca construida en el sitio *Bam*HI del vector YIp5, se procedió a diseñar una segunda estrategia. La nueva estrategia consistió en intentar clonar el gen completo en un fragmento de DNA genómico de menor tamaño, utilizando otra enzima de restricción para la construcción de una nueva genoteca de *X. dendrorhous*. Debido a la similitud encontrada entre la secuencia publicada del gen *crtYB* de la cepa UCD 67-210 y la secuencia de los insertos de los plásmidos pJ1 y pJ15, se realizó un mapa de restricción "in silico" de la secuencia nucleotídica publicada en la base de datos del GenBank y así determinar las posibles enzimas que no cortan al gen. También se realizaron experimentos de hibridación utilizando DNA genómico de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* digerido con distintas enzimas de restricción y al fragmento de 2,2 kb del plásmido pJ1 como sonda. De esta manera se determinó las enzimas que no cortan al gen y el tamaño del fragmento flanqueado por los sitios de restricción en que el gen se encuentra (figura 11). Se determinó que la enzima *EcoRV* es la más apropiada para el clonamiento, dado que el gen se encuentra en un fragmento *EcoRV* único de un tamaño menor de 5,8 kb.

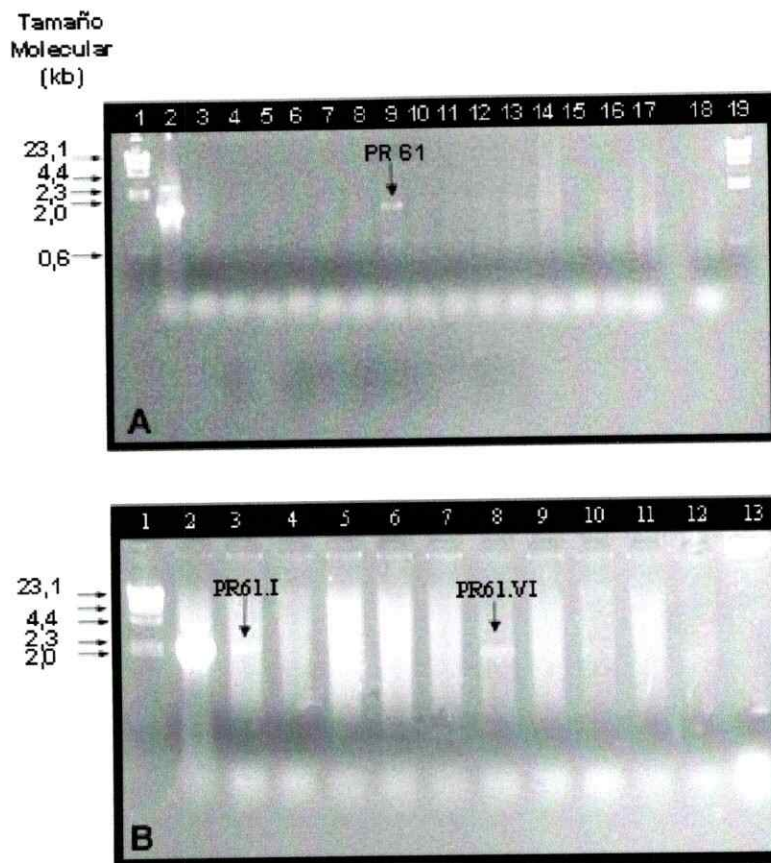


Figura 9.-Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) de los productos de PCR de la genoteca de *X. dendrorhous* construida en el sitio *Bam*HI del plásmido YIp5.

En ambos paneles, A y B, el carril 1: DNA de λ HindIII utilizado como estándar de tamaño molecular y el carril 2: control positivo de la reacción de PCR en que se utilizó DNA de pJ1 como molde. En el panel A, las reacciones de PCR se realizaron con los partidores LC-1 y LC-2 y en el panel B, las reacciones de PCR se realizaron con los partidores FS-11 y FS-21.

A: Cada carril es una reacción de PCR en que se utilizó el DNA plasmidial total de una mezcla de 100 clones diferentes como molde. La banda positiva corresponde a la mezcla N°61 (PR 61).

B: Cada carril es una reacción de PCR en que se utilizó como DNA molde el DNA plasmidial total de submezclas de 25 clones de PR 61, pueden observarse resultados positivos en las submezclas N°I y N°VI (PR 61.I y PR 61.VI).

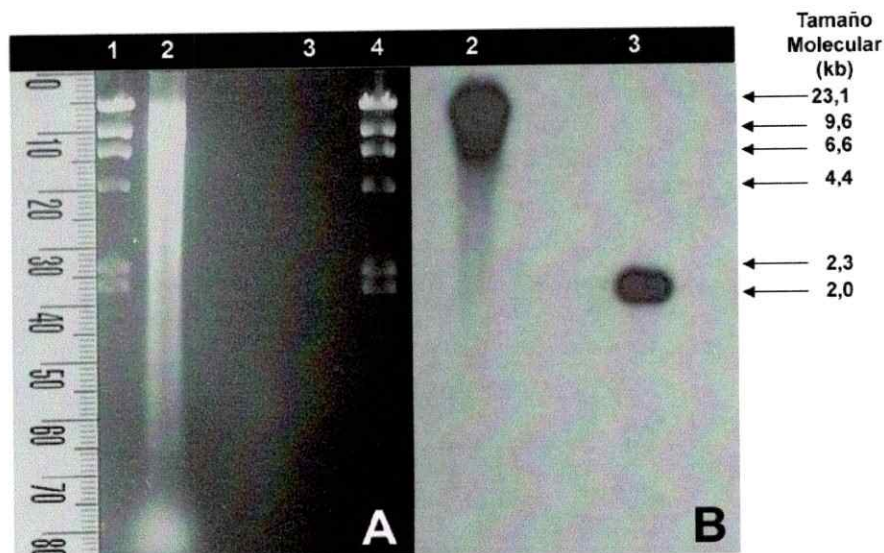


Figura 10.- Hibridación de DNA de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* con el fragmento de 2,2 kb de pJ1 utilizado como sonda.

A: Electroforesis en gel de agarosa (0,7%). Carriles 1 y 4: DNA de λ Hind III utilizado como estándar de tamaño molecular. Carril 2: DNA de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* digerido con BamHI. Carril 3: 1 ng del inserto de 2,2 kb del plásmido pJ1 como control positivo de la hibridación.

B: Autorradiografía de la hibridación. Carril 2: DNA de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* digerido con BamHI, observándose una banda única de aproximadamente 23 kb. Carril 3: Banda de 2,2 kb, control positivo de la hibridación.

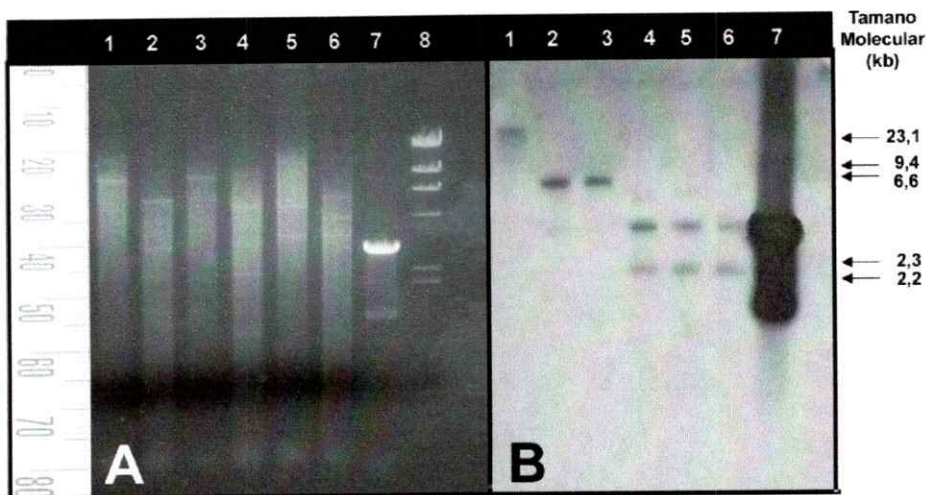


Figura 11.- Hibridación de DNA de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* digerido con distintas enzimas de restricción.

A: Electroforesis en gel de agarosa (0,7%).

B: Autorradiografía de la hibridación.

El DNA genómico de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* digerido con:

Carril 1: *Bam*HI. Carriles 2 y 3: *Eco*RV. Carriles 4, 5 y 6: *Eco*RI. Carril 7: 1 ng de pJ1 sin digerir como control positivo de la hibridación. Carril 8: DNA de λ HindIII utilizado como estándar de tamaño molecular.

Con el objeto de construir una genoteca parcial de *X. dendrorhous*, se digirió completamente DNA cromosómico de la cepa UCD 67-385 con la enzima *EcoRV*, para luego purificar los fragmentos de DNA de un tamaño promedio de 5,8 kb separados por electroforesis. Los fragmentos se ligaron al plásmido pBluescript, digerido con la misma enzima y con la mezcla de ligación se transformó *E. coli*. Se seleccionaron las colonias transformantes blancas portadoras de DNA plasmidial en placas de LB/Ampicilina/Xgal. Se preparó un total de 42 placas (N°1 a N°42), en duplicado, cada una conteniendo 52 colonias transformantes. A partir de un set de cada duplicado de placas se purificó DNA plasmidial el que fue analizado mediante la técnica de PCR utilizando los partidores FS-11 y FS-21, específicos para el gen *crtYB*, obteniéndose resultados positivos en dos de ellas (placas N°19 y N°33). Se purificó el DNA plasmidial de cada una de las 52 colonias transformantes de la placa N°33 que fue utilizado como DNA molde para las reacciones de PCR, logrando identificar a la colonia N°13 como la portadora del plásmido que contiene un fragmento de DNA de 5,8 kb de *X. dendrorhous* que contiene el gen de interés (figura 12). Se le llamó clon 33.13 y p33.13 al plásmido que contenía.

4. Secuenciación del inserto del plásmido p33.13.

El fragmento *EcoRV* de 5,8 kb del plásmido p33.13 del clon 33.13 fue secuenciado completamente. La secuenciación del inserto de 5,8 kb del plásmido p33.13 se inició utilizando los partidores T3 y T7 ubicados en la región de clonamiento múltiple del vector pBluescript (Tabla III). Luego de obtener las primeras secuencias se diseñó nuevos partidores a partir de éstas con los cuales fuese posible extender las secuencias parciales obtenidas hasta lograr la secuencia completa. El tamaño de la secuencia obtenida fue de 5917 pb, ligeramente superior al tamaño obtenido por electroforesis, probablemente debido a la menor resolución en la determinación de tamaños desde un gel de agarosa para fragmentos de mayor tamaño.

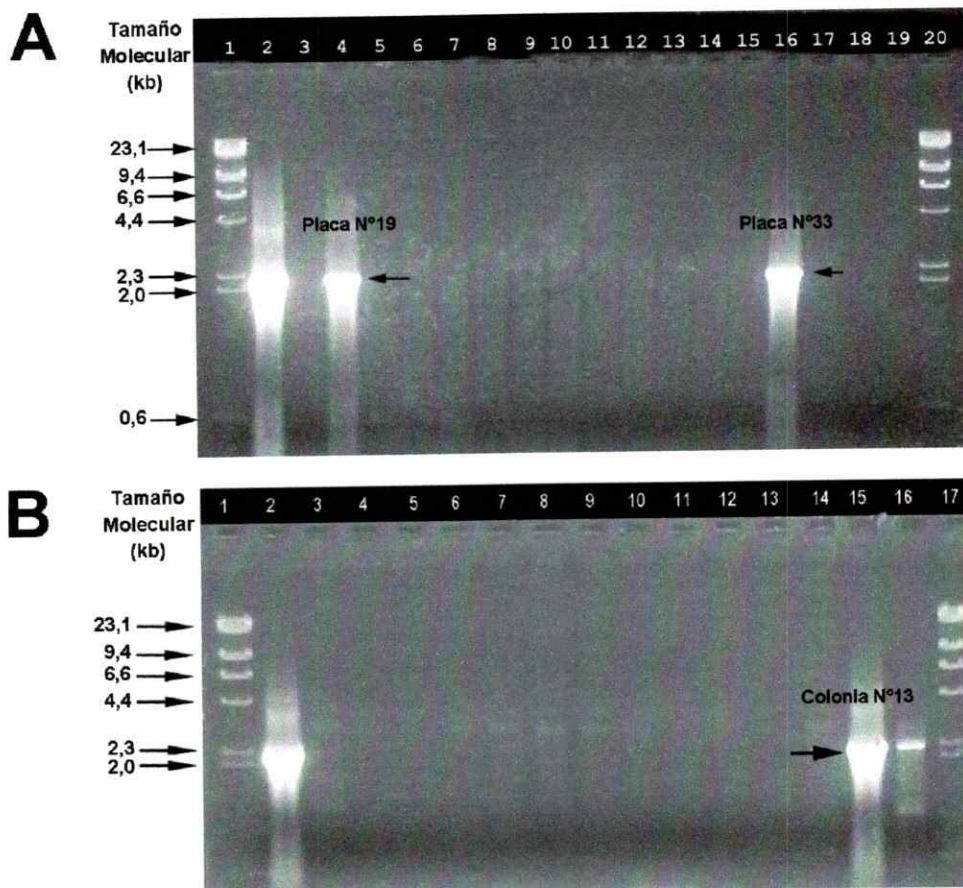


Figura 12.- Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) de la reacción de PCR, identificando al clon portador del gen *crtYB* en la genoteca parcial construida en el sitio *EcoRV* del plásmido pBluescript.

En los paneles A y B, el carril 1 corresponde a DNA de λ HindIII utilizado como estándar de tamaño molecular y el carril 2 corresponde al control positivo de la reacción de PCR en que se utilizó a pJ1 como DNA molde. En las reacciones de PCR se utilizaron los partidores FS-11 y FS-21.

A: Cada carril es una reacción de PCR utilizando DNA plasmidial total como molde obtenido desde placas con 52 colonias transformantes cada una.

B: Cada carril es una reacción de PCR utilizando como molde el DNA plasmidial de colonias individuales de la placa N°33.

La secuencia completa se ilustra en la figura 13. Se determinó que el gen tiene 4 intrones luego de comparar las regiones de las vecindades intrón-exón del gen de la proteína ribosomal L41, el gen de actina y el gen de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de *X. dendrorhous*. Además de comparar con la secuencia publicada en la base de datos.

El gen se ubica aproximadamente en la mitad del fragmento *EcoRV* y considerando desde el inicio de la traducción hasta el fin de ésta abarca un total de 2385 pb. La zona codificante tiene un total de 2022 pb lo que corresponde un 85% aproximadamente del total del gen. Los intrones son pequeños con un tamaño promedio de 91 pb, siendo de 80 pb el más pequeño (intrón II) y de 111 pb el de mayor tamaño (intrón I). Los exones presentan tamaños variables: el primero sólo tiene 26 pb y el quinto 1033 pb.

1 gatactgtcatgtctagttggtcataatgttctaaaccacgaagaataatccttcatctggccatatacgtaaaccttaacagctggattagattagatcca
101 actggcttcaactgcgagaaaagttacacagatccgaccttctaagacacatgtcaaccagctcttttaacctccggttaaacgagctctccggaaacaggttc
201 aaacgatacctccggtccgtcccgcggaggtattctcgtcagtgctcgtgtttggtttgacccgatttgagcactaaacgctctttgtcgtctctagta
301 gttctcctttgactgacgtacttgtcagaacatgatgaaatcctcttccctctcactccttttcttgcaaaagccaggagcggtaacggatcaattgat
401 ccaatcgactgtctatcgggtcatcaagttcgatttcaagtgtagcctgcctacggttcattcagagatccaaaacctttgaaacttataagcatgctcttga
501 cgctggaagagcgtatagtaccgtcatcccggccggtcaaacacggataatgcaaatgttaaggctatacgaggagcgttcctatgacagaagatgg
601 gtccaccgatagtggttgaaaggagatgggtggaatagagacaaatggggaattccagtttgcctttgacgagaaaggacactgggttggaaaagaaa
701 gatggtacgttcttccaccttgaaatgtgttctactagacatgtttgacacgtaaatcttcttccactttgacttttgaaactatggtggttgg
801 gcgatccccaaaatcattagcttctaactcagctcattacctcgtatcctcacttactaccaggtgttgcatctcacctacggcctcttcttcttctct
901 cgactggccatggaaaaggatattacgataaaatacactcagtcagtcgactgtgcaggcaagaatcgaccccggtccgaaagctgagtaacgcgtc
1001 ttctcttttctcgatacccaacggacgctattttggacagaaggatgagactatccaaacagctcaaaacaaactaaacgctcttga ttaatcaaccgctca
1101 acttattgctcaactcagttggactggcgtgaaagaacagttctttagacaaaagacatggtccctataggagaaatgggatctggatctggatgaagtgtt
1201 ggttggagatcacgtgaggacattatccgaggacaattaactacttaagataatacatgatttatgtcgatcggcatccagccgggattgatcggctg
1301 atggccggaaaatgtgatgaggtcgaaactcgatctctctttttttgttcatcttctcactccctcttctctcttctactaaacatccatctcccaactgtc
1401 tagatcagttcggaaaacaagaagtggacacagagagatctttgtgaaagattgtaattccagaaaagggaaaaacaaaggaagcgcggaagcacaatca
1501 ccaacttcagcaagccggtccagcccgatctcggatagacatcatcttacccaactcgtatcatcccccaacagatagagtttttgtcgcaATGACGGCTC

EXON I

INTRON I

1601 TCGCATATTACCAGATGTTGTCTCCATACCCTCTTCTCGTTTTGCACACCACCTCATGTGTGCATATGTGTGCGGTCCTTCCAATCTTTCAATGACTA

EXON II

1701 ACATCTTTACCGTGCTCTTCTTT**AG**CCATCTGATCTATACTCTCCCAATCTTGGTCTTCTCGGTCTGCTCACTTCCCCGATTTTGACAAAAATTTGAC
 1801 ATCTACAAAATATCGATCCTCGTATTTATTCGGTTTAGTGCAACACACCATGGACTCATGGATCATCAGAAAATGGCGCATGGACATATCCATCAGCGG

INTRON II

1901 AGAGTGGCCAAGGCGTGTGGAAACGTTTCTAGAG**GT**TAGTCGACCGTTAAATCTCTAAAGCCGGCGTCGTTTCCGCGATTACATTTAAACATCTGAAATTTA

EXON III

2001 TCCCTGATCAAC**AG**TGTTCCATATGAAAGTAGCGCTTCTTTGTCAATCAAAACCGTAAATCACCCGGCTTGGTCTTACGTCTTGGCAACTAGGCACCTTCTCC
 2101 CATCTCTGGCGCTTCCCAAAGACTAGATCGTCCGGCCCTTCTCTCGGGCTCAAGGGCTCATCCCTCTGCCCAATATCTACCTATTTACCGCTCACCCCCAG
 2201 CCCATCGCCCGCCCGCTCGTGACAGATCACTACTTCTACATGGGGCACTCTCCTTACTCATCACCCACCTACCATGCTCTTGGCAGCAATATCAGGC
 2301 GAATATGCTTTTCGATTTGGAAAAGTGGCCGAGCAAAGTCAACTATTCGAGCAATCATGATCCCAGCGGTGATCTGATTTGGGTAGATTTATGTTGCTGTCCG
 2401 GTCAAGACTCTTGGTCCGATCAACGATGAGAAATGTGAGGGTGGAGGCTTGGAGGTGTACTACCCATTTGAGGAAGCTATGTTCTTTACTGACGAATCT

INTRON III

2501 AATGATTTGTTCTGGGTCGTCTGCCCT**GGT**AAGTTGATCTCATCCCTCTCTCCCTTGGTGAAAAAAGCTGTTGGCTGATTTGCTGCCAATTCACCCATCGG

EXON IV

2601 AATCTG**AG**CGATCATACTCAGGCCCTATACCTGCTACACGGTCGAACATATTTATGGCAACAAAAGATGCCATCTTCAATTTCCCTCATTTACACCCGCCT
 2701 GTGCTCTCCCTGTTTTTAGCAGCCGACCATACTCTTCTCAGCCAAAACGCTGACTTGGAACTGGCAGTCAAGTTGTTGGAGGAAAAGAGCCGGAGCTTTT

INTRON IV

2801 TTGTTGCCTCGGCTGGATTTCCTAGCGAAGTTTAGGGAGGGCTGGTTGGACT**GT**GAGCACCGCATTCTTTAGGTTTGTTCGGTCTTTCACCTTCATGTGCA

EXON V

2901 TTCGGTGATCAGTTTTCTTTGGTGTATCCGGGACCTGCATAAC**AG**ATACGCATTTCTCCGGGTGACTGATGATCTTATCGACTCTCCTGAAGTATCTTCCAA
 3001 CCCGCATGCCACAATTGACATGGTCTCCGATTTTCTTACCCTACTATTTGGGCCCCCGCTACACCCTTCGAACTGACAAGATCCTTTCTTCGCCTTTA

3101 CTTCTCCTTCGCACCCCTTCCCGACCCACGGGAATGTATCCCCTCCCGCCTCCTCCTTCGCTCTCGCCTGCCGAGCTGGTTCATTCCTTACCGAAAAGG
 3201 TTCCCGTTCAATACCATTTGCCTTCAGGTTGCTCGCTAAGTTGCAAGGGCTGATCCCTCGATACCCCACTCGACGAACTCCTTAGAGGATACACCACCTGA
 3301 TCTTATCTTTCCTTTTATCGACAGAGGCAGTCCAGGCTCGAAGACGCCCTATCGAGACCACAGCTGACTTGCTGGACTATGGTCTATGTGTAGCAGGCTCA
 3401 GTCCCGGAGCTAATGGTCTATGTCTCTTTGGCAAGTGCACCAAGTCAGGTCCTGCCACCATAGAAGAAAGAGAAGCTGTGTAGTGGCAAGCCCGAGAGA
 3501 TGGGAACTGCCCTTCAGTTGGTGAACATTTCTAGGGACATTAAGGGGACGCAAGAGGGAGATTTACCTACCACTCTCATTTCTTTGGTCTTTCGGGA
 3601 TGAATCAAAAGCTTGGATCCCGACTGATTTGGACGGAACTCGGCCTCAAGATTTGCACAAACTCCTCAGTCTATCTCCTTCGTCCACATTACCATCTTCA
 3701 AACGCCCTCAGAAAAGCTTCGGTTCGAATGGAAGACGTACTCGCTTCCATTTAGTCGCTTACGATTTAGTCGCCCTACGCAGAGGATCTTGCCAAAACATTTCTTATAAGGGAATTGACC
 3801 GACTTCCTTACCGAGTTCAAAGCGGGAATCGAGCGGCTTGGCGGAGCTACCTACTGATCGGCCGAGAGATCAAAGTCGTTTGAAAGGAGACGTCGGGAGA
 3901 GAGAAGGACAGTTGCCGGATGGAGGAGATCGGAAAAGTCTTGAGTGTGGTCATGAGCGGATGGAAAGGCGAGTAAAGAcagcggaagaataccgacagac
 4001 aatgatgagtgaataaaatcctcaatcctcttcttagtgctctttttttgttttctattatgaccaactctaaaggaactgcagata
 4101 tttctctcccccatcttccctccatcgtttgcatttttccatttttgcgttactatgtcaattcttttcttcttcttcttcaatctag
 4201 acaattctatagatgtttagaatgtatacattgacaggttatagaccataaagactataggctttggctactagagagcaaccgcaaccgatggtggtc
 4301 gatacgggcccccttttggacttggtgcccctcagaccacagaccacgaatccccgtgggtcacgggcttagcttgtgccagccccagcagtcagtaca
 4401 gtccccagccccagccccactagcaacagcgtcaagccccggctccttgccaaactggttctcctctgatgcagggctaggtgcagcatgtttgc
 4501 gcgatacgtcgacatacctgttcccccaagtctgagagaacacagtaagaaacatagagagtagtgagcaaccgacacatcatctttgagccatacaaca
 4601 catgtcacttactcgacagacgcttcgcacacttctagatcgccacgcttttgcctcttccagagaactcgccatgacacttttcgagcacactctcgcgct
 4701 ccgatactccccgctttgcgagcctggatcagtaggtagatcctcagcttgcaaacacagcacccttgacaggaccagggcctgccccacgagaagggcgcg
 4801 tcgcccgaaggccaggaaggctgacgtcctgctgacagcgggccccacttgcggtactgctctcgcggctgtagtgcgccccccagtgagacgtct
 4901 ccaccgccgagcggaagaatgcccgagcccaagagaaggactgatagcgcgagacgagagcagcatgagaccatcgagactggcagatctaaaggaagg

5001 tctaaagaaagccgaaacgataccgagctggcaagccagtttgcgaggtgaaaggctttgcacagttagattgagcgtaagtgcgagcgtaa
5101 gcgacactcgcacggagagtggttgacacttccgcatcgttcttcatccacagccgctgttccctcttaagcatcattggtagacaaaatatggacataca
5201 taatcgagtaagcatgtcagaatttacatctgaatattacagaatacaaaagtcttgtgtacaaggagttcacctattgtatatctaccgaaaagctgccc
5301 acggaacaagggttaaatatcaagcttgtccatgtattactatgtatctagtgttggcgtattatacgaatggatatgggatggaaagtcttttgag
5401 aaatgagaagggaagcagatggaaggaagaaaccgaaaggagaggggagaataagacatcaagagccccaaggatctctactctatac
5501 gacctgggctcctctcagttttccatccttctccggttcccttctctggaattcatcctgggagcctttgaggtggttccgaaaggtccttctgggaca
5601 attcgctcaaatgtctcatcgcgtcgttgcggttgcggtgaggttgtagtaaccggcgatataatgcatgctgtataggtgcagccgaaagattcagctac
5701 actcgcaggcgaattgtcagggggtcgtcagatttggggatgtaagcctctttaaagggagtaaccgctggatgaaagaagctcatcagtagacatgctccc
5801 aagaaaggacagtagatcttgaaacagcatctgttaaatbgaaagataataagcagagcaagaagagataaaaaaaaaaagtgaacatcgggaatagaaaacgt
5901 ggagagccaaaagatatc

Figura 13.- Secuencia del fragmento *EcoRV* de p33.13.

En la figura se muestra la secuencia nucleotídica completa del inserto *EcoRV* del plásmido p33.13. En letras rojas se presenta el sitio de restricción de la endonucleasa *EcoRV*, sitio en que fue clonado el fragmento en el vector pBluescript. En mayúscula se describe al gen *crtYB* de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*. El gen presenta cinco exones (destacados en amarillo) y cuatro intrones (en azul). Los sitios de “splicing” son mostrados en negrita y subrayados.

5. Clonamiento y secuenciación del cDNA del gen *crtYB* de *X. dendrorhous*.

A partir de la secuencia clonada del fragmento *EcoRV* de 5917 pb de la cepa silvestre UCD 67-385 y la secuencia publicada de la cepa UCD 67-210, se diseñaron oligonucleótidos que permitieran clonar el cDNA del gen *crtYB* (Tabla IV).

Tabla IV

Partidores diseñados a partir de la secuencia del fragmento *EcoRV* de 5917 pb del plásmido p33.13 para amplificar el cDNA del gen *crtYB* de *X. dendrorhous*.

Partidor	Orientación	Secuencia nucleotídica	Tamaño esperado de amplificado en kb.
PBS-A1	Forward	5'-ccgatctcggatagacatca -3'	2,23
PBS-B2	Reverse	5'-aggaagatggggggaagag -3'	
GPRN-1	Forward	5'-tacccaactcgtatcatccc -3'	2,34
GPRN-2	Reverse	5'- agtctttatggtctataacct -3'	

La clonación del cDNA del gen *crtYB* se realizó utilizando la técnica de la reacción de la transcriptasa reversa acoplada a PCR (RT-PCR). La reacción de la transcriptasa reversa (RT) fue realizada utilizando como templado RNA total extraído desde un cultivo de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* en fase estacionaria como se indicó en Materiales y Métodos. El producto de la reacción de RT fue utilizado como molde para la reacción de PCR. Como resultado se obtuvo dos amplificados al utilizar los partidores PBS-A1 y PBS-B2, uno de 2,6 kb (llamado UP) y el otro de 2,2 kb (denominado DOWN), respectivamente (figura 14 panel A). Al utilizar la pareja de partidores GPRN-1 y GPRN-2, se obtuvo una banda de DNA de aproximadamente 2,3 kb (llamada MPP) (figura 14 panel B).

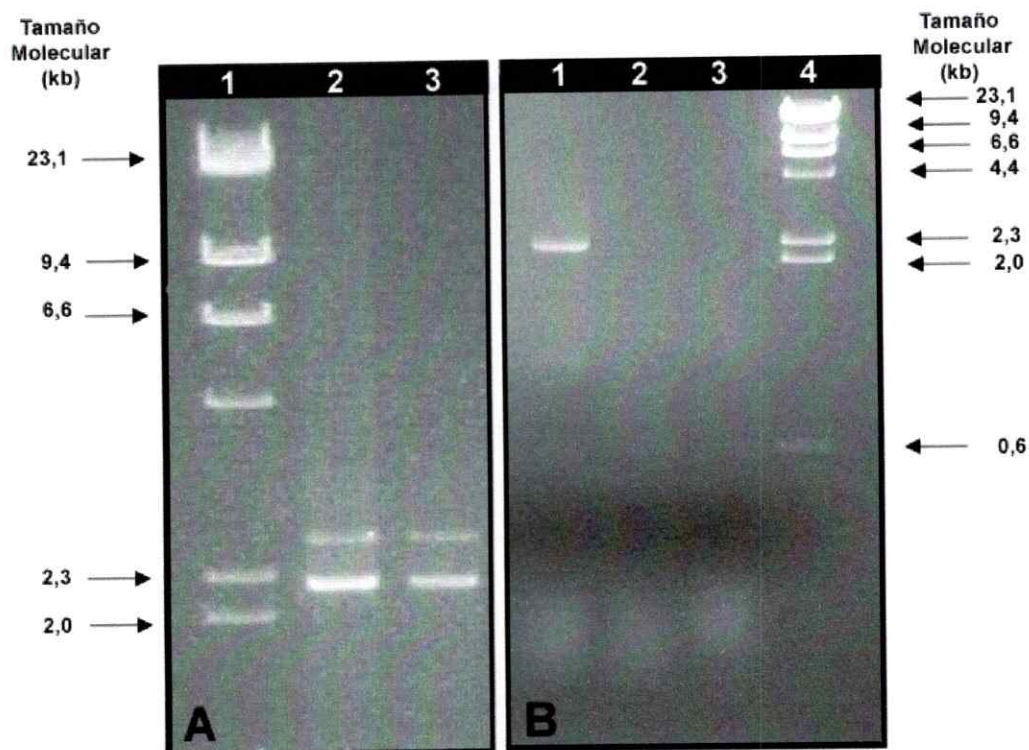


Figura 14.- Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) de los productos de RT-PCR a partir de RNA total de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*.

A: Carril 1: DNA de λ HindIII utilizado como estándar de tamaño molecular. Carriles 2 y 3: RT-PCR utilizando los partidores PBS-A1 y PBS-B2.

B: Carril 1: RT-PCR utilizando los partidores GPRN-1 y GPRN-2. Carril 2: RT-PCR utilizando sólo al partidor GPRN-1. Carril 3: RT-PCR utilizando sólo al partidor GPRN-2. Carril 4: DNA de λ HindIII utilizado como estándar de tamaño molecular.

Los tres fragmentos fueron purificados desde geles de agarosa 0,7% por la técnica de GeneClean y ligados independientemente al vector pBluescript linearizado con la enzima *EcoRV*. Posteriormente, con la mezcla de ligación se transformó *E. coli* y se seleccionó colonias transformantes blancas. El DNA plasmidial de los transformantes fue analizado por una doble digestión utilizando las enzimas de restricción *BamHI* y *XhoI* que no cortan al gen *crtYB* y liberan el inserto del vector pBluescript. En la figura 15 se resume la estrategia de clonamiento del cDNA del gen *crtYB* y se indica que efectivamente los tres fragmentos anteriormente mencionados correspondientes al cDNA del gen *crtYB*, fueron clonados en el vector pBluescript. Cada clon se denominó UP, DOWN y MPP y los plásmidos pUP, pDOWN y pMPP, respectivamente.

Los plásmidos pUP, pDOWN y pMPP portadores de los insertos que corresponden al cDNA del gen *crtYB* se utilizaron para secuenciación. Los tres fragmentos fueron secuenciados completamente, iniciando la secuenciación con los partidores T3 y T7, de la región de clonamiento múltiple del vector pBluescript (Tabla III). La secuenciación se completó diseñando partidores a partir de las secuencias parciales obtenidas que permitiesen su extensión. Se comparó las secuencias completas obtenidas de los tres cDNA y se observó que el fragmento de mayor tamaño de 2,6 kb (UP) corresponde a un mensajero no procesado que presenta los 4 intrones del gen. El cDNA de 2,2 kb (DOWN), corresponde al cDNA de un mensajero maduro al cual sus intrones han sido removidos y sólo presenta los cinco exones. Sin embargo, la secuencia del tercer fragmento de 2,3 kb (MPP) muestra un cDNA que conserva parte del primer intrón y ha perdido parte del segundo exón. Esta situación genera un codón de término de la traducción prematuro reconociéndose señales de "splicing" alternativas (figura 16).



Figura 15.-Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) del cDNA del gen *crtYB* clonado en *E. coli*.

Carriles 1 y 12: DNA de λ HindIII utilizado como estándar de tamaño molecular. Carril 2: cDNA UP purificado por GeneClean. Carril 3: pUP digerido con *Bam*HI y *Xho*I. Carril 4: cDNA DOWN purificado por GeneClean. Carril 5: pDOWN digerido con *Bam*HI y *Xho*I. Carril 6: cDNA MPP purificado por GeneClean. Carril 7: pMPP digerido con *Bam*HI y *Xho*I. Carril 8: pBluescript digerido con *Bam*HI. Carril 9: Reacción de PCR utilizando a pUP como DNA molde y los partidores PBS-A1 y PBS-B2. Carril 10: Reacción de PCR utilizando a pDOWN como DNA molde y los partidores PBS-A1 y PBS-B2. Carril 11: Reacción de PCR utilizando a pMPP como DNA molde y los partidores GPRN-1 y GPRN-2.

1001 ~~~~~TACCCAACTCGTATCATCCCAACACAGATAG 1100
 MPP ~~~~~
 DOWN ~~~~~TACCCAACTCGTATCATCCCAACACAGATAG
 UP ~~~~~CCGATCTGGATAGACATCATCTTACCCAACTCGTATCATCCCAACACAGATAG
 210 ~~~~~CCGATCTGGATAGACATCATCTTACCCAACTCGTATCATCCCAACACAGATAG
 GAAAGAGGGCCGAAAGCACATCACCAACTTCAGCAAGCCGGTCCAGCCCGATCTCGGATAGACATCATCTTACCCAACTCGTATCATCCCAACACAGATAG

1101 **EXON I** 1200
 MPP AGTTTTTGTGGCAATGACGGCTCTCGCATATTACCAGAA**GT**TTGTCTCCATAACCTCTTCTCGTTTTCACACACCACACTCATGTGTGCATATGTGT
 DOWN AGTTTTTGTGGCAATGACGGCTCTCGCATATTACCAGAAI
 UP AGTTTTTGTGGCAATGACGGCTCTCGCATATTACCAGAA**GT**TTGTCTCCATAACCTCTTCTCGTTTTCACACACCACACTCATGTGTGCATATGTGT GCGT
 210 AGTTTTTGTGGCAATGACGGCTCTCGCATATTACCAGAA**GT**TTGTCTCCATAACCTCTTCTCGTTTTCACACACCACACTCATGTGTGCATATGTGT GCGT

1201 **EXON II** 1300
 MPP
 DOWN
 UP CCTTCCAAATCTTTCAATGACTAACATCTTTACCGTGCTCTTCTTCTTTAGCCATCTGATCTATACTCTCCAAATCTTGGTCTTCTCGGTCTGCTCACIT
 210 CCTTCCAAATCTTTCAATGACTAACATCTTTACCGTGCTCTTCTTCTTTAGCCATCTGATCTATACTCTCCAAATCTTGGTCTTCTCGGTCTGCTCACIT

1301 1400
 MPPTGCAACCACACCCATGGGACTCATGGATCATCAGAAATGG
 DOWNTGCAACCACACCCATGGGACTCATGGATCATCAGAAATGG
 UP CCCCATTGACAAAATTTGACATCTACAAAATATCGATCCTCGTATTTATTTGCGTTT TGCACCCACACCCATGGGACTCATGGATCATCAGAAATGG
 210 CCCCATTGACAAAATTTGACATCTACAAAATATCGATCCTCGTATTTATTTGCGTTT TGCACCCACACCCATGGGACTCATGGATCATCAGAAATGG

Figura 16.- Alineamiento de las secuencias nucleotídicas parciales de los fragmentos MPP, DOWN y UP correspondientes al cDNA del gen *crtYB* y secuencia nucleotídica parcial del gen *crtYB* de la cepa UCD 67-210.

Se muestran los dos primeros exones (en cajas) y el primer intrón (en azul). Se indican los sitios 5' y 3' de "splicing" (en negrita y subrayados). También se señala el posible sitio de "splicing" alternativo (en amarillo y destacados con rojo) el cual genera un mensajero que contiene parte del primer intrón y pierde parte del segundo exón, produciendo un codón de término de la traducción prematuro. Destacado en celeste se muestra la diferencia en el exón II, entre la secuencia de la cepa UCD 67-385 y UCD 67-210. La numeración corresponde a la secuencia de la cepa UCD 67-210.

6. Análisis genético molecular del gen *crtYB* de *X. dendrorhous*.

6.1. Ubicación del gen *crtYB* en el genoma de *X. dendrorhous*.

Para estudiar la estructura y la organización del gen *crtYB* en el genoma de la levadura se determinó su localización en el cariotipo electroforético. Se realizaron diversas electroforesis de campo pulsado utilizando distintas condiciones de corrida para separar las bandas de DNA cromosómico. Los geles fueron transferidos a membranas de nylon para luego realizar experimentos de hibridación. Se utilizó el fragmento de 2,2 kb del plásmido pJ1 como sonda para identificar la ubicación del gen. Se realizó una electroforesis de campo pulsado utilizando pulsos de 90 segundos a 6V/cm dentro de 24 horas en un equipo CHEF II de BioRad, que permitió separar los cromosomas de la levadura. Bajo estas condiciones, se ubicó al gen en la banda cromosómica II (figura 17), que estaría compuesta por tres cromosomas. Para separar la banda II en sus tres bandas cromosómicas componentes (A, B y C) se realizó una nueva electroforesis de campo pulsado utilizando un tiempo de corrida de 60 horas con pulsos 500 segundos por 48 horas y pulsos de 250 segundos por 12 horas a 6V/cm, en un equipo CHEF III de BioRad. Como resultado se observa que la sonda del gen *crtYB* reconoce dos bandas (II A y II B) cromosómicas en el cariotipo electroforético (figura 18).

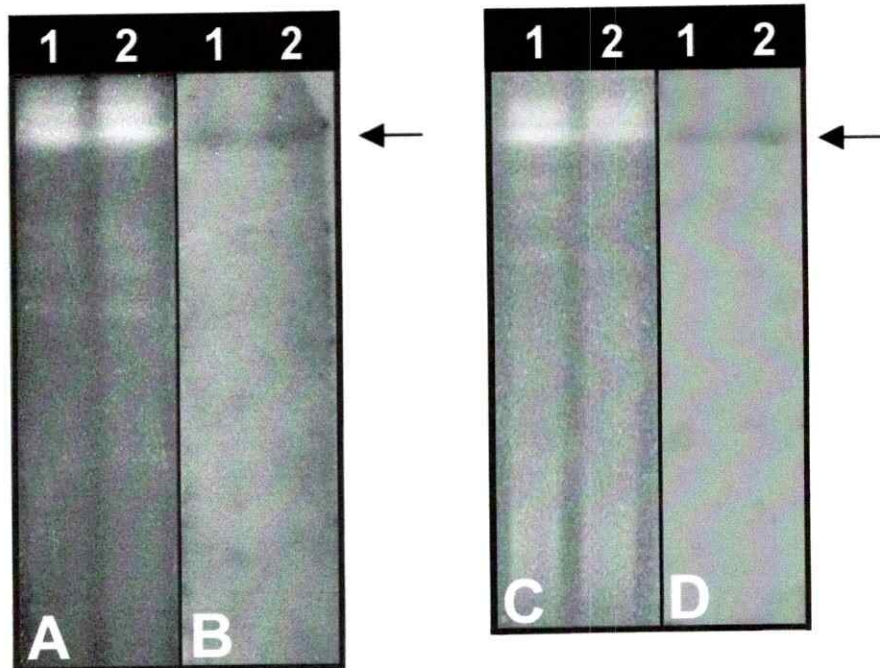


Figura 17.- Electroforesis de campo pulsado (CHEF) del DNA cromosómico intacto de *X. dendrorhous*.

Las condiciones del CHEF fueron: pulsos de 90 segundos a 6 V/cm durante 24 horas.

A: Cariotipo electroforético de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* teñido con bromuro de etidio.

B: Hibridación de la figura A, utilizando como sonda el inserto de 2,2 kb del plásmido pJ1. Se observa una banda de hibridación que corresponde a la banda II del cariotipo electroforético de *X. dendrorhous*.

C: Cariotipo electroforético de *X. dendrorhous* teñido con bromuro de etidio.

D: Hibridación de la figura C, utilizando como sonda el inserto de 2,2 kb del plásmido pJ1. Se observa una banda de hibridación que corresponde a la banda II del cariotipo electroforético de *X. dendrorhous*.

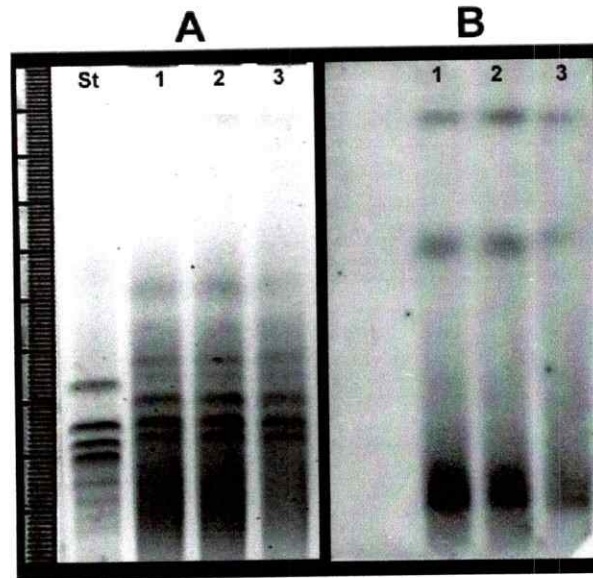


Figura 18.- Electroforesis de campo pulsado (CHEF) del DNA cromosómico intacto de *X. dendrorhous*.

Se corrió el CHEF por 60 horas con pulsos de 500 segundos por 48 horas y pulsos de 250 segundos por 12 horas a 6 V/cm.

A: Carriles 1 a 3; cariotipo electroforético de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* teñido con bromuro de etidio.

B: Carriles 1 a 3; hibridación de la figura A, utilizando como sonda el inserto de 2,2 kb del plásmido pJ1. Se observan dos bandas de hibridación que corresponden a la banda II A y banda II B del cariotipo electroforético.

6.2. Análisis de restricción de DNA genómico de *X. dendrorhous*.

Con la finalidad de caracterizar la ubicación del gen *crtYB* en el genoma de la levadura se realizó análisis de restricción de DNA genómico utilizando distintas endonucleasas de restricción. Luego de realizar las digestiones y correr la electroforesis en gel de agarosa (0,7%) los productos se transfirieron a una membrana de nylon para realizar experimentos de hibridación utilizando el fragmento de 2,2 kb del plásmido pJ1 como sonda. Este resultado puede dar información para estimar si el gen se encuentra en una copia o más en el genoma de la levadura además de obtener mayor información sobre la ubicación del gen en el genoma. Los resultados de este análisis se muestran en las figuras 19, 20 y 21 y se resumen en las Tablas V, VI y VII.

Además se realizaron digestiones dobles y triples, permitiendo construir un mapa de restricción genómico de las regiones adyacentes del gen *crtYB* (figura 22).

Se logró confirmar que el gen se encuentra en un fragmento *Bam*HI único de aproximadamente 23 kb y dentro de éste en un fragmento *Eco*RV de alrededor de 5,8 kb.

En la figura 23 se representa la organización del gen *crtYB* en el genoma de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*, elaborado con los resultados mencionados en esta sección.

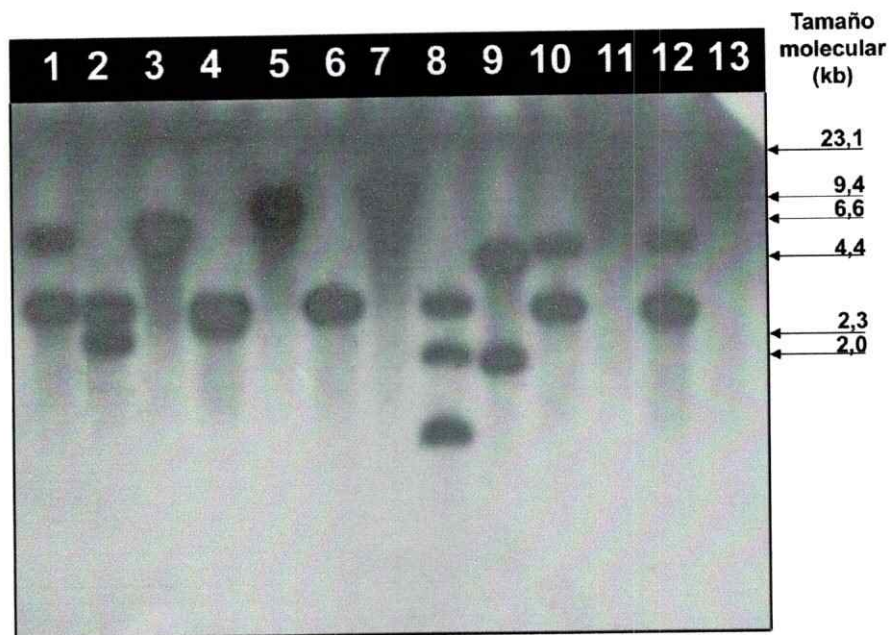


Figura 19.- Hibridación de DNA genómico de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* digerido con distintas enzimas de restricción, utilizando el fragmento de 2,2 kb del plásmido pJ1 como sonda.

En cada carril hay 5 µg de DNA aproximadamente, digerido con las siguientes enzimas de restricción:

Carril 1: *SalI*. Carril 2: *SalI* y *EcoRV*. Carril 3: *EcoRV*. Carril 4: *SalI* y *AvaI*. Carril 5: *AvaI*. Carril 6: *SalI* y *XhoI*. Carril 7: *XhoI*. Carril 8: *SalI* y *HindIII*. Carril 9: *HindIII*. Carril 10: *SalI* y *PstI*. Carril 11: *PstI*. Carril 12: *SalI* y *BamHI*. Carril 13: *BamHI*. Los tamaños de las bandas de hibridación obtenidas se resumen en la Tabla V.

Tabla V.

Tamaño de las bandas obtenidas a partir de la hibridación mostrada en la figura 19.

Carril	Enzimas de restricción	Tamaño de bandas (kb)
1	<i>SaII</i>	5,6 2,7
2	<i>SaII + EcoRV</i>	2,7 2,0
3	<i>EcoRV</i>	5,8
4	<i>SaII + AvaI</i>	2,7 2,6
5	<i>AvaI</i>	8,1
6	<i>SaII + XhoI</i>	2,7
7	<i>XhoI</i>	12,1
8	<i>SaII + HindIII</i>	2,9 1,8 0,9
9	<i>HindIII</i>	4,7 1,7
10	<i>SaII + PstI</i>	4,8 2,7
11	<i>PstI</i>	22,2
12	<i>SaII + BamHI</i>	5,4 2,7
13	<i>BamHI</i>	23,0

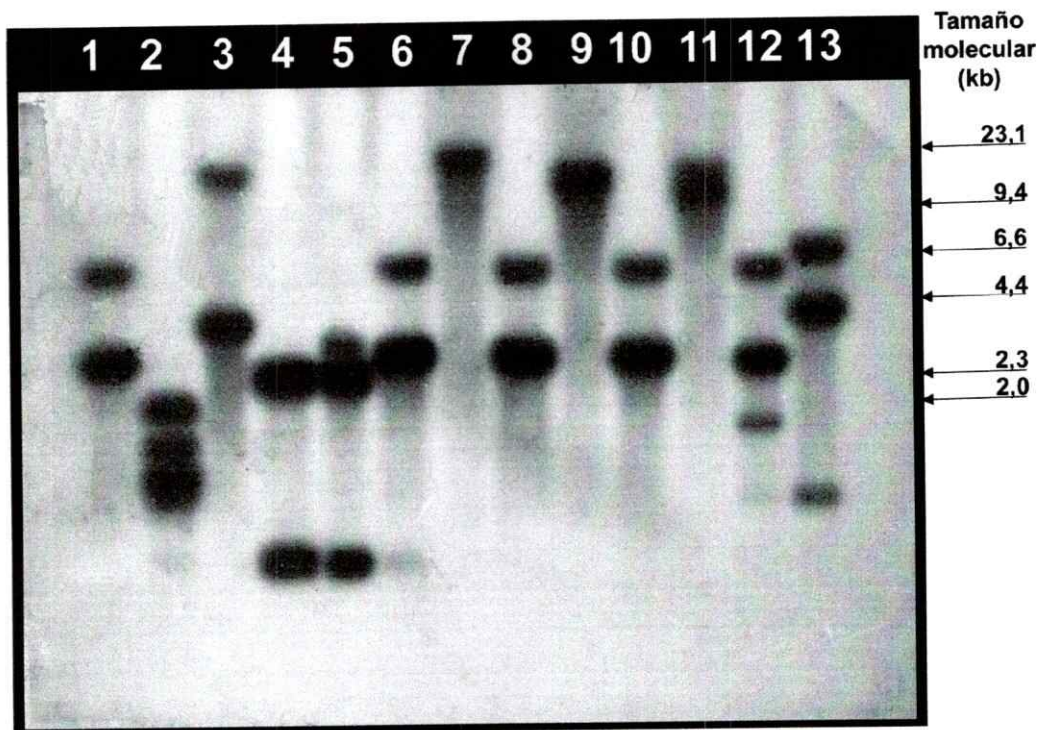


Figura 20.- Hibridación de DNA genómico de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* digerido con distintas enzimas de restricción, utilizando el fragmento de 2,2 kb del plásmido pJ1 como sonda.

En cada carril hay 5 µg de DNA aproximadamente, digerido con las siguientes enzimas de restricción:

Carril 1: *SalI*. Carril 2: *SalI* y *PvuII*. Carril 3: *PvuII*. Carril 4: *SalI* y *XbaI*. Carril 5: *XbaI*. Carril 6: *SalI* y *BglII*. Carril 7: *BglII*. Carril 8: *SalI* y *BglII*. Carril 9: *BglII*. Carril 10: *SalI* y *ScaI*. Carril 11: *ScaI*. Carril 12: *SalI* y *BclII*. Carril 13: *BclII*. Los tamaños de las bandas de hibridación obtenidas se resumen en la Tabla VI.

Tabla VI

Tamaño de las bandas obtenidas a partir de la hibridación mostrada en la figura 20.

Carril	Enzimas de restricción	Tamaño de bandas (kb)
1	<i>SaII</i>	5,6 2,7
2	<i>SaII + PvuII</i>	1,9 1,5 1,2
3	<i>PvuII</i>	23,0 3,3
4	<i>SaII + XbaI</i>	2,3 0,5
5	<i>XbaI</i>	2,3 0,5
6	<i>SaII + BglII</i>	5,6 2,7
7	<i>BglII</i>	No cortó
8	<i>SaII + BglI</i>	5,6 2,7
9	<i>BglI</i>	20,0
10	<i>SaII + ScaI</i>	5,6 2,7
11	<i>ScaI</i>	18,0
12	<i>SaII + BclI</i>	5,6 2,7 1,6 1,0
13	<i>BclI</i>	7,2 4,3 1,0

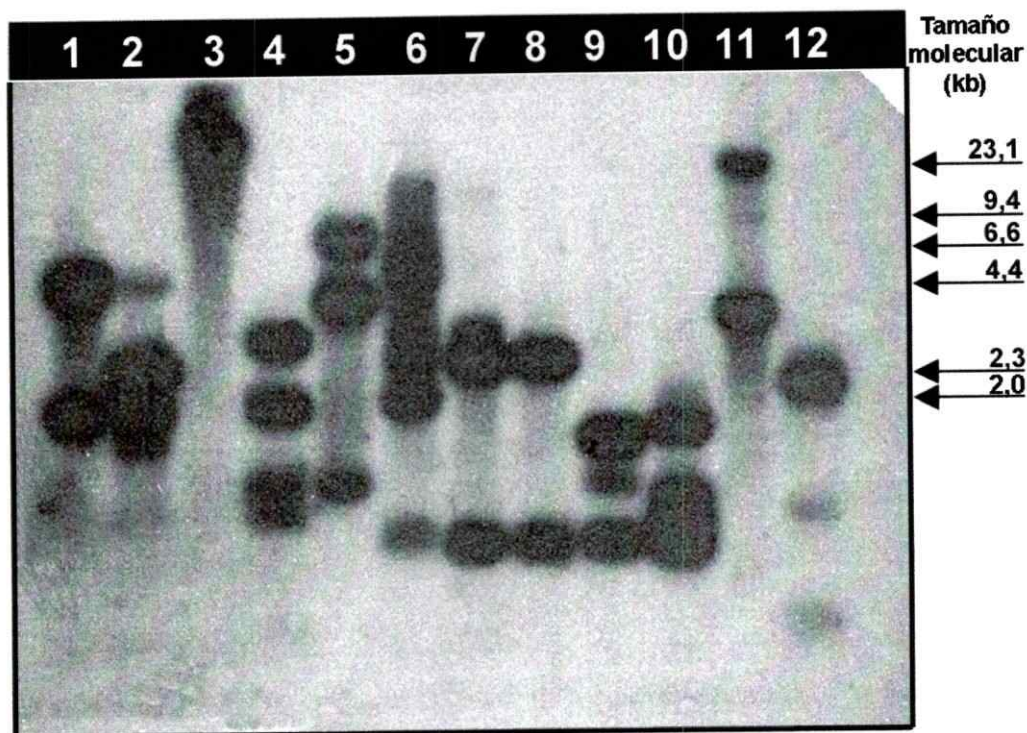


Figura 21.- Hibridación de DNA genómico de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* digerido con distintas enzimas de restricción, utilizando el fragmento de 2,2 kb del plásmido pJ1 como sonda.

En cada carril hay 5 μ g de DNA aproximadamente, digerido con las siguientes enzimas de restricción:

Carril 1: *Hind*III. Carril 2: *Hind*III y *Bgl*II. Carril 3: *Bgl*II. Carril 4: *Hind*III y *Bcl*I. Carril 5: *Bcl*I. Carril 6: *Hind*III y *Xba*I. Carril 7: *Xba*I. Carril 8: *Xba*I y *Bgl*II. Carril 9: *Bgl*II. Carril 10: *Xba*I y *Pvu*II. Carril 11: *Pvu*II. Carril 12: *Hind*III y *Pvu*II. Los tamaños de las bandas de hibridación obtenidas se resumen en la Tabla VII.

Tabla VII

Tamaño de las bandas obtenidas a partir de la hibridación mostrada en la figura 21.

Carril	Enzimas de restricción	Tamaño de bandas (kb)
1	<i>Hind</i> III	4,7
		1,7
2	<i>Hind</i> III + <i>Bgl</i> II	No cortó
3	<i>Bgl</i> II	No cortó
4	<i>Hind</i> III + <i>Bcl</i> II	3,0
		1,7
		1,0
		0,7
5	<i>Bcl</i> II	7,2
		4,3
		1,0
6	<i>Hind</i> III + <i>Xba</i> I	No cortó bien
7	<i>Xba</i> I	2,3
		0,5
8	<i>Xba</i> I + <i>Bgl</i> II	No cortó
9	<i>Xba</i> I + <i>Bcl</i> II	1,2
		1,0
		0,5
10	<i>Xba</i> I + <i>Pvu</i> II	1,5
		0,7
11	<i>Pvu</i> II	23,0
		3,4
12	<i>Hind</i> III + <i>Pvu</i> II	3,4
		1,7
		0,3

Figura 22.- Mapa de restricción de la región cromosómica donde se ubica el gen *crtYB*.

En esta figura se esquematiza la ubicación del gen *crtYB* en una sección del genoma de *X. dendrorhous*.

A: Aproximadamente 31 kb del genoma de *X. dendrorhous*.

B: Zona de aproximadamente 9,8 kb amplificada tres veces.

En color rojo se representa el fragmento 2,2 kb del clon pJ1, el cual se ha usado como sonda en los experimentos de hibridación. En color verde se representa al fragmento *EcoRV* de 5,8 kb que contiene al gen *crtYB* que fue clonado en pBluescript. Es importante destacar que todos los sitios de corte dentro del fragmento *EcoRV* han sido confirmados por su secuencia. Los sitios de restricción fuera del fragmento *EcoRV* (zona amarilla), han sido reproducibles en distintos experimentos de hibridación. Sin embargo, puede haber diferencias en su posición dado que el experimento no permite una mayor resolución. La escala con que se construyó la figura se indica en ella.

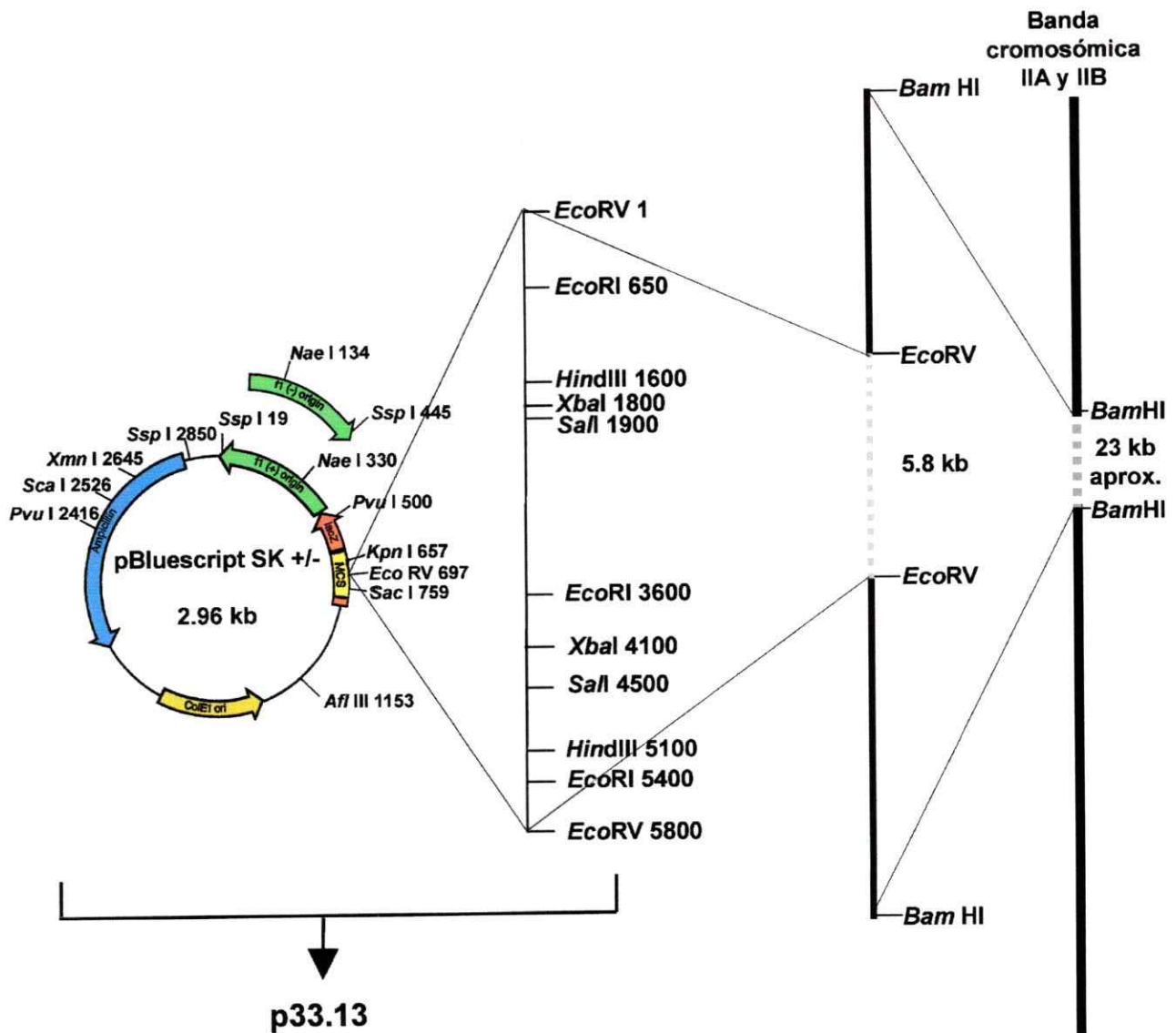


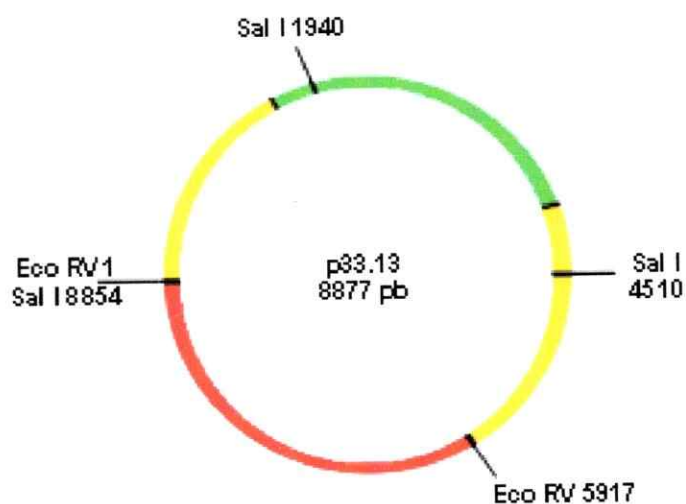
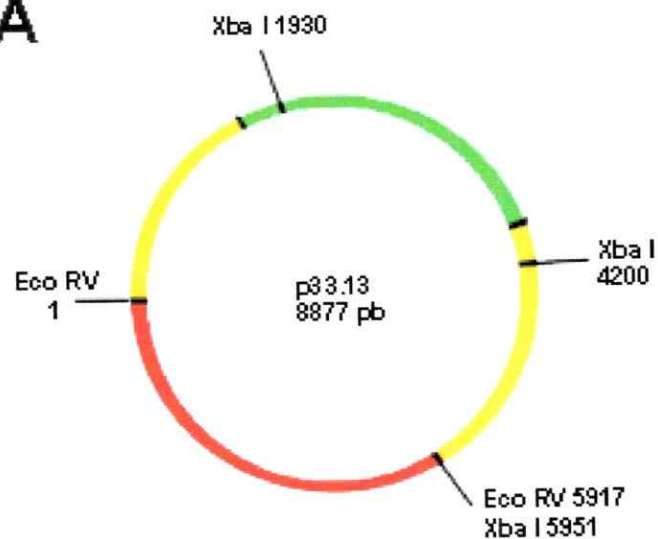
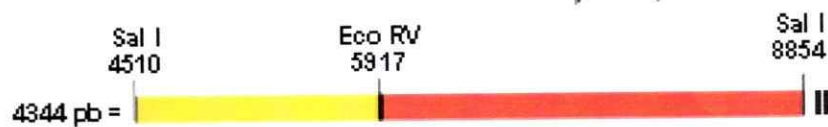
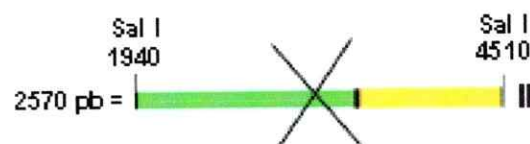
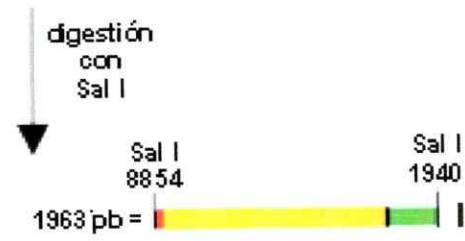
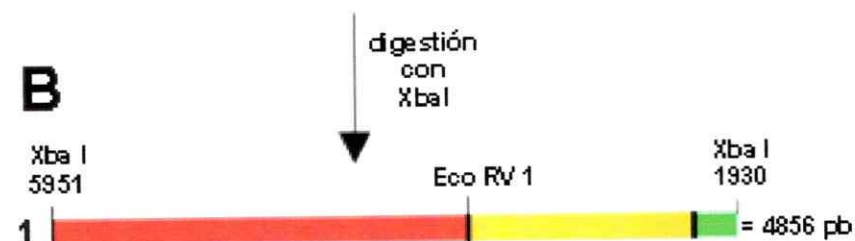
Figura 23.- Esquema que representa la organización del gen *crtYB* en el genoma *X. dendrorhous*.

La figura muestra que el gen *crtYB* se ubica en un fragmento *EcoRV* de 5,8 kb que ha sido clonado en el vector pBluescript y en un fragmento *BamHI* 23 kb, que se ubica en alguna parte del cromosoma. También se muestra el mapa de restricción del clon 33.13.

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

7.1. Construcción de las delecciones:

Para demostrar experimentalmente que el clon 33.13 era portador de un fragmento de DNA de *X. dendrorhous* que contenía al gen *crtYB*, se intentó inducir una mutación en la levadura. La mutación consistía en una delección de gran parte del gen *crtYB*. En el mapa de restricción del clon 33.13 (figura 23) se muestra que existen dos sitios de corte para la endonucleasa *SalI* y dos sitios para *XbaI*. Para cada enzima, uno de los sitios se ubica dentro del gen y otro adyacente a él. Por lo tanto, la estrategia utilizada (figura 24) fue digerir al plásmido 33.13 con estas enzimas independientemente, de modo de obtener dos delecciones: una producida por *SalI* y otra por *XbaI*. Primero se preparó DNA plasmidial del clon 33.13, el cual se digirió completamente con *SalI* o *XbaI*. Como el plásmido Bluescript, también posee un sitio de corte para cada enzima, al digerir el plásmido 33.13 con *SalI* se producen tres fragmentos de 4,3, 2,6 y 2 kb, donde el fragmento de 2,6 kb corresponde al segmento de DNA que se desea eliminar. Al cortar con *XbaI* también se producen tres fragmentos de 4,9, 2,3 y 1,7 kb, aproximadamente, donde el fragmento de 2,3 kb es el que se desea eliminar, de modo de producir una delección en el genoma de la levadura posteriormente. En ambos casos, el fragmento de mayor tamaño corresponde al plásmido pBluescript y un segmento de DNA genómico de la levadura (figura 23). Después de digerir al plásmido 33.13, se realizó una electroforesis observándose para ambos casos las tres bandas anteriormente mencionadas (figura 25).

A**B**

Ligado de fragmentos 1 y 3

Ligado de fragmentos I y III

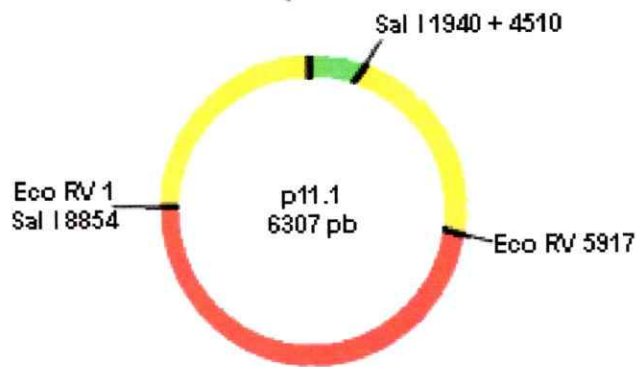
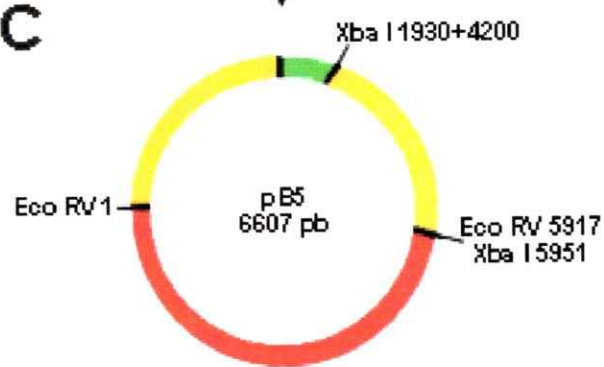
C

Figura 24.- Esquema de la construcción de plásmidos pB5 y p11.1 portadores de una delección del gen *crtYB*.

En la figura se esquematiza la estrategia utilizada para la construcción de plásmidos portadores de una delección del gen *crtYB*. En rojo se presenta la secuencia correspondiente al vector de clonamiento pBluescript, en verde se representa al gen *crtYB* y en amarillo se muestra el DNA genómico de *X. dendrorhous* adyacente al gen *crtYB*. La numeración de los plásmidos en la figura corresponde a la numeración del plásmido p33.13. Esta numeración se mantuvo para facilitar la comprensión de la delección creada.

A. Se muestra los sitios de corte de las enzimas *XbaI*, *SaII* y *EcoRV* de p33.13.

B. Se muestran los fragmentos generados al cortar p33.13 con las enzimas *XbaI* (lado izquierdo de la figura) y *SaII* (lado derecho de la figura). Los fragmentos indicados con una cruz, son los fragmentos eliminados que contienen al gen *crtYB*.

C. Se indican los plásmidos generados, luego de ligar los fragmentos de interés. En la figura se muestra la correcta orientación de los plásmidos, necesaria para poder generar una delección en la levadura.

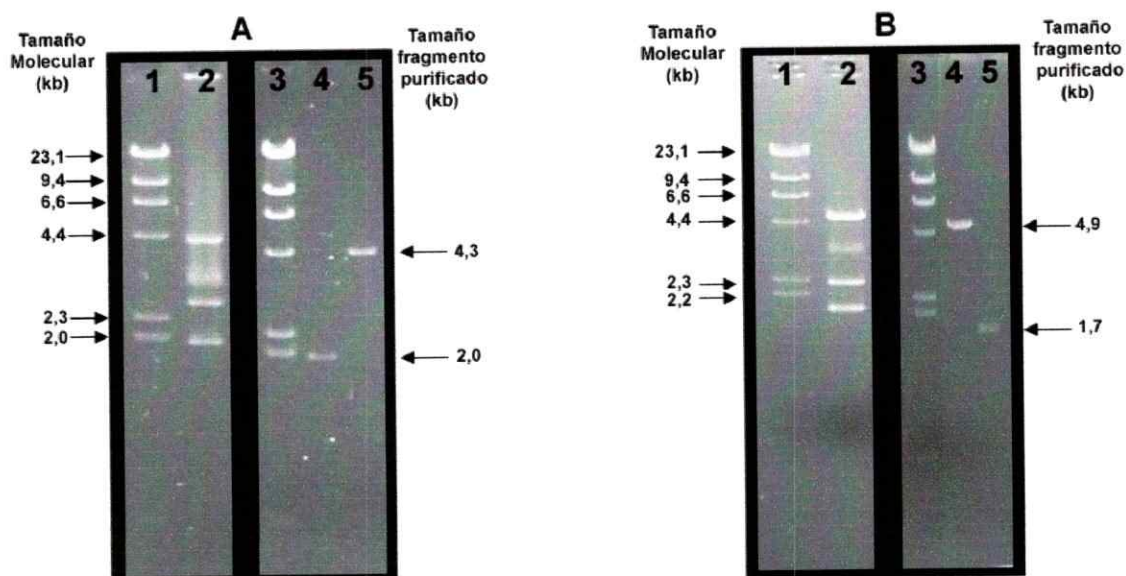


Figura 25.-Electroforesis en gel de agarosa (0,7%) de la digestión de p33.13 con *SalI* y *XbaI* y purificación de los fragmentos para construir plásmidos portadores de una deleción del gen *crtYB* de *X. dendrorhous*.

A: Se representa la deleción realizada con la enzima *Sal I*. Carriles 1 y 3: DNA de λ *HindIII* utilizado como estándar de tamaño molecular. Carril 2: plásmido 33.13 digerido con *SalI*. Carriles 4 y 5 representan a los fragmentos purificados de 2 y 4,3 kb respectivamente.

B: Se representa la deleción realizada con la enzima *Xba I*. Carriles 1 y 3: DNA de λ *HindIII* utilizado como estándar de tamaño molecular. Carril 2: plásmido 33.13 digerido con *XbaI*. Carriles 4 y 5 representan a los fragmentos purificados de 4,9 y 1,7 kb respectivamente.

En el caso de digestión con *SalI*, se purificaron por GeneClean las bandas de 4,3 y 2,0 kb para luego ser ligadas y así eliminar la banda de 2,6 kb que contiene gran parte del gen *crtYB*. En el caso de digestión con *XbaI* las bandas de 4,9 y 1,7 kb fueron purificadas y luego ligadas. De este modo se eliminó la banda de 2,3 kb. Luego de ligar y transformar *E. coli* fue necesario comprobar la correcta orientación de las bandas ligadas. Esto es necesario dado que para producir la deleción en la levadura debe ocurrir una doble recombinación entre el DNA introducido y el DNA genómico de la levadura para lo cual debe existir homología entre ambos DNAs en ambos extremos de la deleción. La apropiada orientación fue comprobada digiriendo el DNA plasmidial de los transformantes de *E. coli*, con la enzima *EcoRV*. De esta forma se obtuvieron dos clones portadores de plásmidos que contenían un fragmento de DNA portador de una deleción del gen *crtYB*. Los clones se llamaron pB5 (portador de la deleción producida por *XbaI*) y p11.1 (portador de la deleción producida por *SalI*), que en ambos casos al ser digeridos con la enzima *EcoRV* se producen dos fragmentos, uno de 3 kb, que corresponde al plásmido pBluescript, y una de 3,5 kb, portadora del fragmento con la deleción en el caso de pB5, y una de 3,3 kb, portadora del fragmento con la deleción en el caso de p11.1

7.2. Transformación de *X. dendrorhous* con una deleción del gen *crtYB*.

Se realizó experimentos de transformación de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Para ello se utilizó entre 10 y 20 µg de DNA del respectivo plásmido portador de la deleción linearizado con la enzima *EcoRV* con el objeto de favorecer la recombinación en la levadura. Luego de cuatro experimentos de transformación se observaron colonias pálidas en relación a la silvestre, que corresponderían a posibles transformantes. La frecuencia de colonias pálidas fue de aproximadamente $4,2 \times 10^{-5}$ o 12 transformantes por µg de DNA. Se confirmó que las colonias pálidas correspondían a *X. dendrorhous* por observación al microscopio óptico y presencia de RNA de doble hebra entre sus ácidos nucleicos. Una característica particular de colonias pálidas es que se sectorizaban recobrando su fenotipo silvestre (figura 26).

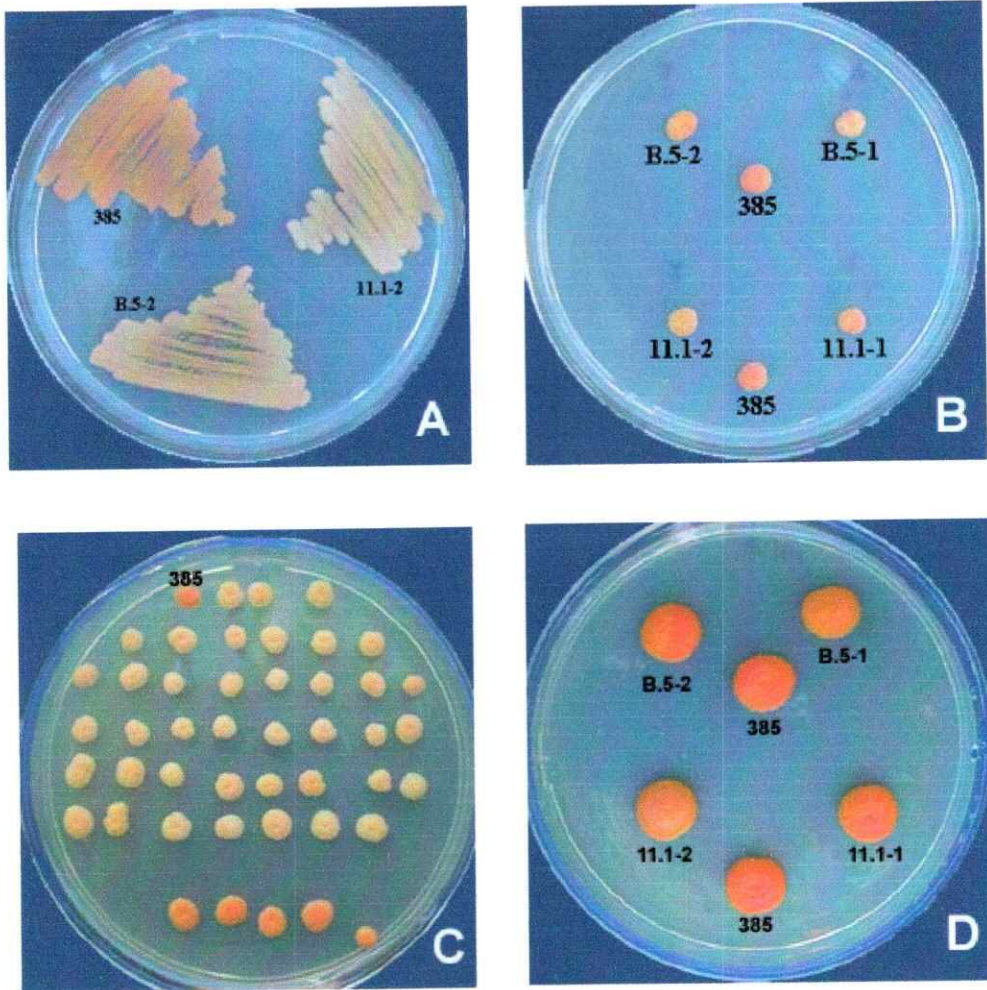


Figura 26.- Transformación de *X. dendrorhous* con el gen *crtYB* deletante.

A: Se muestra una siembra de la cepa silvestre UCD 67-385 (385) y de dos transformantes pálidos, B5-2 y 11.1-2.

B: En esta placa se han picado algunos transformantes pálidos. También se observa a la cepa silvestre (385) para comparar la intensidad del color de las colonias. Si se observa detalladamente es posible distinguir que las colonias pálidas están sectorizadas.

C: Se observan algunas colonias pálidas que han sido picadas junto a la cepa silvestre (385).

D: Esta placa corresponde a la misma placa de la figura B, pero luego de dos semanas de incubación a 4°C. Hay una mayor producción de pigmento y la sectorización de las colonias pálidas es evidente.

DISCUSION

1. Clonamiento y secuenciación del gen *crtYB* que codifica la enzima fitoeno sintasa y licopeno ciclasa de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*.

Con el objeto de aislar un fragmento de DNA genómico de la cepa silvestre UCD 67-385 de la levadura *X. dendrorhous* que contuviese el gen *crtB* que codifica la enzima fitoeno sintasa y un fragmento de DNA que contuviese el gen *crtY* que codifica la enzima licopeno ciclasa, se diseñaron partidores específicos a partir de regiones homólogas y heterólogas para estos genes. De tal forma que a través de la técnica de PCR utilizando DNA genómico de *X. dendrorhous* como DNA templado sería posible amplificar una porción de estos genes y así disponer de sondas específicas para ellos con las cuales sería posible encontrar los genes completos en una genoteca de la levadura. Los resultados fueron exitosos dado que se clonaron dos fragmentos de DNA: un fragmento de 2,2 kb amplificado con la pareja de partidores específicos diseñados para el gen *crtB* y un fragmento de 1,5 kb amplificado con la pareja de partidores diseñados para el gen *crtY*. La secuenciación de estos fragmentos y su análisis indicó que sus secuencias eran idénticas, lo que permitió confirmar que ambas actividades enzimáticas fitoeno sintasa-licopeno ciclasa estarían codificadas por un mismo gen llamado *crtYB* (Verdoes *et al*, 1999). Este hecho podría explicar la inexistencia de cepas mutantes de *X. dendrorhous* que acumulen licopeno.

El alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los insertos de los plásmidos pJ1, pJ15 y aquella del gen *crtYB* de la cepa silvestre UCD 67-210 permitió apreciar que las secuencias de los insertos de los plásmidos pJ1 y pJ15 eran idénticas. Respecto a la secuencia publicada se observan siete diferencias: cuatro de ellas ubicadas en sectores no codificantes del gen, dos en el intrón II, una en el intrón III y una en el intrón IV. Las otras tres diferencias se ubican en sectores codificantes del gen: una en el exón II, otra en el exón IV y una en el exón V. Estas diferencias serán discutidas más adelante. Con respecto al inserto de pLC2, éste está completamente incluido en los insertos de los

plásmidos pJ1 y pJ15 y en secuencia demostró ser idéntica a ellos. En la figura 27 se esquematiza la porción del gen *crtYB* que contienen los insertos de los plásmidos pJ1, pJ15 y pLC2, además de ilustrar la organización estructural de este gen.

La secuenciación de los fragmentos de 2,2 kb de los plásmidos pJ y de 1,5 kb del plásmido pLC2 demostró que los partidores diseñados realmente eran específicos para el gen *crtYB* y que estos fragmentos son apropiados para ser utilizados como sondas para estudiar la organización del gen *crtYB* en el genoma de la levadura y para la búsqueda de dicho gen en una genoteca de la levadura.

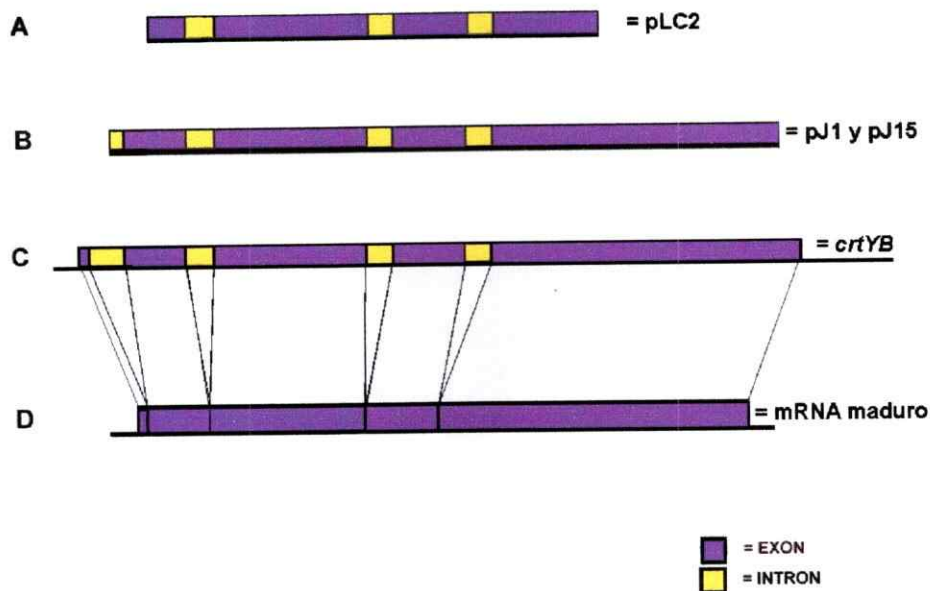


Figura 27.- Organización estructural del gen *crtYB* en los plásmidos pJ1, pJ15 y pLC2.

A: pLC2, el inserto del plásmido pLC2 contiene desde el inicio del segundo exón hasta aproximadamente la mitad del quinto exón.

B: pJ1=pJ15, el inserto de los plásmidos pJ contienen parte del primer intrón hasta el quinto exón.

C: Estructura del gen *crtYB*, contiene 5 exones (rosado) y 4 intrones (amarillo).

D: Estructura del mRNA maduro del gen *crtYB*.

El primer intento de clonado del gen *crtYB* completo, desde el DNA genómico de la levadura, fue a través de una búsqueda en una genoteca parcial construida en el sitio de clonamiento *Bam*HI del plásmido YIp5 (Alcaíno *et al.*, 2000). El DNA plasmidial purificado de cada una de las 65 mezclas de la genoteca de 100 clones diferentes cada una fue utilizado como molde en los experimentos de amplificación con los partidores FS11 y FS21, específicos para el gen *crtYB* (Barahona *et al.*, 2001). Aunque se detectó la presencia del gen *crtYB* en la mezcla PR61 y en las submezclas de 25 clones diferentes, PR61.I y PR61.VI, no se logró encontrar la colonia individual portadora del plásmido que llevaba un inserto que contenía al gen *crtYB*. A pesar de que el experimento se repitió varias veces, no siempre los resultados fueron consistentes. Existen dos posibles explicaciones a lo anteriormente mencionado. Una razón que explicaría la pérdida del clon portador del gen *crtYB* sería que el fragmento *Bam*HI, en que se ubica el gen, es muy grande (23 kb aproximadamente) en relación al vector de clonamiento (YIp5 de 5,4 kb) y éste se perdería a lo largo de las generaciones. Sin embargo, en el laboratorio se han clonado otros genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides de *X. dendrorhous* que también se han encontrado en fragmentos de DNA de gran tamaño, siendo éste el caso de los genes *idi* (isopentenil PP isomerasa), *crtE* (GGPP sintasa) y *crtI* (fitoeno desaturasa), que se encontraron en un fragmento *Bam*HI de aproximadamente 10, 9 y 18 kb, respectivamente. Este hecho sugiere una segunda explicación para la pérdida del clon portador del gen *crtYB* y que se refiere a que dada la extensión del fragmento *Bam*HI en que se encuentra el gen *crtYB* (de aproximadamente 2,4 kb), se encontraría además otra secuencia que sería “rechazada” por *E. coli*, lo que conduciría a su pérdida las sucesivas divisiones de la bacteria.

La segunda aproximación para el clonado del gen *crtYB* completo fue la construcción de una nueva genoteca utilizando otra enzima de restricción que no corte al gen y que el fragmento que lo contenga sea de menor tamaño que el generado por *Bam*HI. Luego de una serie de experimentos de hibridación de los productos de restricción del DNA genómico de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* utilizando al fragmento de 2,2 kb perteneciente al plásmido pJI como sonda, se logró determinar que el gen se encuentra en un fragmento *Eco*RV de aproximadamente 5,8 kb

que consideramos apropiado para su clonamiento. Se utilizó la misma estrategia anterior para encontrar el gen, pero esta vez la genoteca fue construida en el sitio de clonamiento *EcoRV* del plásmido pBluescript. De este modo fue posible identificar a una colonia individual portadora del plásmido que contenía un fragmento de DNA de *X. dendrorhous* que contenía al gen de interés, clon 33.13 cuyo plásmido llamamos p33.13.

El inserto *EcoRV* de 5,8 kb de p33.13 fue secuenciado completamente. Su secuencia fue comparada con la secuencia de los insertos de los plásmidos pJ1 y pJ15, demostrando ser idénticas en la región que compartían. Al ser comparada con la secuencia de la cepa UCD 67-210 no mostró tener más diferencias a las encontradas anteriormente.

2. Clonamiento del cDNA del mensajero del gen *crtYB*.

A partir de la secuencia publicada de la cepa UCD 67-210 y la secuencia clonada por nosotros de la cepa UCD 67-385 se diseñaron oligonucleótidos que permitieran clonar el cDNA del gen *crtYB*.

Fue posible clonar tres cDNA de mensajeros de este gen cuyos tamaños son: 2,6, 2,3 y de 2,2 kb aproximadamente. Los tres cDNAs fueron secuenciados completamente. El cDNA de mayor tamaño, UP, correspondió a un mensajero no procesado que cuenta con los 4 intrones del gen. El cDNA de 2,2 kb, DOWN, corresponde a la secuencia de DNA esperada correspondiente al cDNA de un mensajero ya maduro predicha a partir de la secuencia del gen completo. Sorprendentemente, la secuencia del tercer fragmento de 2,3 kb, MPP, corresponde a un cDNA que conserva 55 pb correspondientes a parte del primer intrón y carece de 109 pb correspondientes a parte del segundo exón. Esta situación, representada en la figura 28, genera un codón de término de la traducción prematuro reconociéndose señales de "splicing" alternativas, por lo tanto no originaría una enzima funcional. El fragmento MPP corresponde al cDNA de un mensajero no productivo.

EXON I **INTRON I**

AGTTTTTGTGCGCAATGACGGCTCTCGCATATTACCAGAT**GT**TTGTCTCCATACCTCTTCTTCGTTTTGCA

CACCACTCATGTGTGCATATGTGT**GT**GCGTCCTTCCAAATCTTTCAATGACTAACATCTTTACCGTGCTC

EXON II

TTCTTCTT**AG**CCATCTGATCTATACTCTCCAATTCTTGGTCTTCTCGGCCTGCTCACTTCCCCGATTTT

GACAAAATTTGACATCTACAAAATATCGATCCTCGTATTTATTGCGTTT**AG**TGCAACCACACCATGGGAC

TCATGGATCATCAGAAATGGCGCATGGACATATCCATCAGCGGAGAGTGGCCAAGGCGTGTTTGGAACGT

TTCTAGA

Figura 28.- Secuencia parcial del cDNA del mensajero del gen *crtYB* de *X. dendrorhous*.

Se muestran los dos primeros exones (destacados con amarillo) y el primer intrón (en azul). Se indican los sitios 5' y 3' de "splicing" (en negrita y subrayados). También se señala el posible sitio de "splicing" alternativo (en amarillo y destacados con rojo), el cual genera un mensajero no productivo que contiene parte del primer intrón y pierde parte del segundo exón, produciendo un codón de término de la traducción prematuro.

Por otra parte, en nuestro laboratorio también fue clonado y secuenciado el cDNA de un mensajero no productivo del gen *crtI* (Lodato, no publicado). Este cDNA conserva parte del primer intrón generando en su secuencia un codón de término de la traducción prematuro. En ambos casos los mensajeros no productivos se producirían por el reconocimiento de señales de “splicing” alternativas. Hasta el momento no se ha comunicado ningún caso de la existencia de este fenómeno en genes de carotenogénesis u otros genes de la levadura *X. dendrorhous*. Una explicación para este hecho podría ser que los cDNA de los mensajeros no productivos de los genes *crtYB* y *crtI* serían productos de errores de la maquinaria de “splicing”. Otra alternativa es que estos mensajeros podrían presentar una función reguladora de la expresión génica de la carotenogénesis de la levadura. Un caso similar es lo observado en la proteína ribosomal RPL-12 de *Caenorhabditis elegans*. Se propuso que la propia proteína regularía su concentración por mecanismos de “splicing” alternativo generando pre-mRNA de una forma productiva y no productiva (Mitrovich *et al.*, 2000). El hecho de haber encontrado dos cDNA de mensajeros no productivos de dos genes distintos de la ruta de biosíntesis de carotenoides (*crtYB* y *crtI*) sugiere la existencia de un posible mecanismo de regulación de la carotenogénesis de la levadura mediante la regulación del “splicing” productivo-no productivo de los mensajeros de por lo menos dos de los genes y de este modo controlar la concentración celular de carotenoides. A partir de los resultados anteriormente mencionados, es necesaria una mayor investigación de este fenómeno, dado que estamos frente a una situación poco conocida y reportado por primera vez en *X. dendrorhous*.

Se ha estudiado que el control de calidad de los mRNA ocurre en distintas etapas: en la transcripción, en el procesamiento del pre-mRNA, en el transporte del mRNA desde el núcleo al citoplasma y en la traducción. Se ha investigado en células eucarióticas (Le Hir *et al.*, 2001, Maquat *et al.*, 2001) un mecanismo conocido con el nombre de “Nonsense-Mediated Decay”, abreviado con la sigla NMD, que eliminaría los mRNAs que contienen codones de término de la traducción prematuros. En este mecanismo es necesario distinguir entre un codón de término de la traducción prematuro y uno normal. Se piensa que en *S. cerevisia*, la NMD ocurre en el citoplasma y estaría gatillada por una

región 3' anormal no transcrita que reflejaría una distancia anormal entre el codón de término de la traducción y el sitio de poliadenilación del mRNA. Esto probablemente sería un elemento desestabilizante que podría reclutar proteínas del núcleo río abajo del codón de término de la traducción que luego interactuarían con componentes del complejo de término de la traducción en el citoplasma lo que induciría la NMD. En contraste, en células de mamíferos la NMD puede ocurrir en el citoplasma o asociado al núcleo la cual estaría gatillada por una distancia mayor de entre 50 y 55 nucleótidos entre un codón de término de la traducción y una unión exón-exón río abajo. En humanos se ha propuesto la participación de una proteína (hUpf3) en la NMD. Esta proteína formaría parte del complejo de "splicing" en el núcleo que se localiza a unos 20 nucleótidos río arriba de las uniones exón-exón que luego junto a otras proteínas permanecería unida al mRNA en el citoplasma. Estas proteínas serían retiradas por el ribosoma en la primera ronda de traducción, pero la existencia de un codón de término de la traducción prematuro localizado a más de 50 nucleótidos río arriba de una unión exón-exón, provocaría la disociación del ribosoma del mRNA, lo que impediría la remoción del complejo localizado a unos 20 nucleótidos río arriba de la unión exón-exón. Dado que este complejo contiene a la proteína hUpf3, se reclutarían otras proteínas que aún se desconocen gatillando la degradación del mRNA que contiene el codón de término de la traducción prematuro (Hentze *et al*, 1999, Kim *et al*, 2001, Ishigaki *et al*, 2001). Muy interesante es el hecho de que la proteína hUpf3 es ortóloga a una proteína de *S. cerevisiae* involucrada en la NMD de la levadura. Dado que hemos encontrado dos cDNA de mRNAs que contienen codones de término de la traducción prematuros en *X. dendrorhous*, se sugiere una futura investigación de este posible mecanismo en esta levadura identificando las proteínas involucradas en la NMD.

A partir de la secuencia del fragmento DOWN, correspondiente al mRNA maduro, se infirió la secuencia aminoacídica de la proteína fitoeno sintasa-licopeno ciclasa de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*. A pesar de que en la secuencia nucleotídica hay tres diferencias en sectores codificantes del gen *crtYB* en las cepas silvestres UCD 67-385 y UCD 67-210, sólo existe una diferencia a nivel de secuencia aminoacídica (figura29).

Figura 29.- Alineamiento de las secuencias aminoacídicas del gen *crtYB* de las cepas silvestres UCD 67-385 y UCD 67-210.

En la figura se muestra la comparación de las secuencias aminoacídicas obtenidas a partir de las secuencias nucleotídicas del gen *crtYB* de las cepas silvestres UCD 67-385 (385) y UCD 67-210 (210). Destacado en celeste se muestra la diferencia encontrada.

Entre las diferencias encontradas a nivel de secuencia nucleotídica, dos de ellas se ubican en la tercera base del codón, generando un codón distinto pero que codifica el mismo aminoácido. Esto ocurre en el exón II: en la cepa UCD 67-385 el codón es GGT y en la cepa UCD 67-210 GGC, ambos codifican para el aminoácido glicina. La otra diferencia fue encontrada en el exón V: en la cepa UCD 67-385 está el codón CCT y en la cepa UCD 67-210 el codón CCC, ambos codifican para el aminoácido prolina. Sin embargo, la tercera diferencia que se ubica en el exón IV del gen *crtYB* conduce a un cambio en la secuencia aminoacídica, ya que en el gen *crtYB* de la cepa UCD 67-385 se encuentra el codón GAA que codifica el aminoácido ácido glutámico y en la cepa UCD 67-210 está el codón AAA que codifica para lisina. Estos aminoácidos son de características fisicoquímicas diferentes, siendo uno de ellos básico y el otro ácido. Un caso similar es lo ocurrido con el gen *crtI*. En nuestro laboratorio han sido clonados y secuenciado dos alelos distintos de este gen. La comparación de sus secuencias ha indicado que poseen un gran porcentaje de diferencias, siendo uno de ellos muy similar a la secuencia publicada del gen *crtI* de la cepa silvestre UCD 67-210 (León, 2000).

La comparación de secuencias aminoacídicas de fitoeno sintasas de distintos organismos ha indicado que esta enzima es conservada en eucariontes (plantas) y procariontes. También se ha observado que presentan motivos con una significativa similitud a motivos de las enzimas escualeno sintasa de distintos organismos. La actividad realizada por ambos tipos de enzimas es muy similar: la enzima escualeno sintasa condensa dos moléculas de C₁₅-farnesil difosfato para formar escualeno que es el precursor de esteroides (Summers *et al*, 1993, Britton *et al*, 1998), mientras que la actividad de la enzima fitoeno sintasa es la condensación de dos moléculas de GGPP para formar prefitoeno que luego es transformado en fitoeno por la misma enzima. Por esta razón estas enzimas han sido agrupadas en una misma familia de las escualeno y fitoeno sintasas. En la figura 30, se muestra el resultado al analizar la secuencia aminoacídica deducida a partir del fragmento DOWN correspondiente al cDNA de un mRNA maduro del gen *crtYB*, con el programa de la red BLOCKS y se indica una comparación esquemática de las secuencias aminoacídicas de algunas enzimas de esta familia de proteínas.

Fitoeno sintasa (PS) y Escualeno sintasas (SQS) de distintos organismos

Organismo	Enzima	N° Acceso Swissprot	Tipo De Organismo	N° aa	Esquema de la secuencia proteica
<i>M. tuberculosis</i>	PS	Q50728	bacteria	302	---AAA---B---CCC---DD---
<i>S. griseus</i>	PS	P54977	bacteria	342	---AAA---B---CCC---DD---
<i>T. aquaticus</i>	PS	P37270	bacteria	289	---AAA---B---CCC---DD---
<i>Rhizobium sp.</i>	PS	P55350	bacteria	279	---AAA---B---CCC---DD---
<i>E. uredovora</i>	PS	P21683	bacteria	296	AAA---B---CCC---DD---
<i>R. capsulatus</i>	PS	P17056	bacteria	339	---AAA---B---CCC---DD---
<i>R. gelatinosus</i>	PS	O50567	bacteria	343	---AAA---B---CCC---DD---
<i>R. sphaeroides</i>	PS	P54905	bacteria	355	---AAA---B---CCDDD---DD---
<i>S. platensis</i>	PS	O07333	cianobacteria	309	---AAA---B---CCC---DD---
<i>Synechococcus sp.</i>	PS	P37269	cianobacteria	307	---AAA---B---CCC---DD---
<i>Synechocystis sp.</i>	PS	P37294	cianobacteria	337	---AAA---B---CCC---DD---
<i>X. dendrorhous</i>	PS	NO	hongo	673	---CCC---AAA---
<i>A. thaliana</i>	PS	P37271	planta	423	---AAA---B---CCC---DD---
<i>C. annuum</i>	PS	P37272	planta	419	---AAA---B---CCC---DD---
<i>C. melo</i>	PS	P49293	planta	422	---AAA---B---CCC---DD---
<i>L. esculentum</i>	PS	P08196	planta	412	---AAA---B---CCC---DD---
<i>Z. mays</i>	PS	P49085	planta	410	---AAA---B---CCC---DD---
<i>N. pseudonarcissus</i>	PS	P53797	planta	423	---AAA---B---CCC---DD---
<i>H. sapiens</i>	SQS	P37268	mamifero	417	---AAA---B---CCC---DD---
<i>M. musculus</i>	SQS	P53798	mamifero	416	---AAA---B---CCC---DD---
<i>R. norvegicus</i>	SQS	Q02769	mamifero	416	---AAA---B---CCC---DD---
<i>C. albicans</i>	SQS	P78589	hongo	448	---AAA---B---CCC---DD---
<i>S. cerevisiae</i>	SQS	P29704	hongo	444	---AAA---B---CCC---DD---
<i>S. pombe</i>	SQS	P36596	hongo	460	---AAA---B---CCC---DD---
<i>A. thaliana</i>	SQS	P53799	planta	410	---AAA---B---CCC---DD---

(Escala: ---- 40 aminoácidos)

Figura 30.- Alineamiento esquemático de las secuencias aminoacídicas de proteínas de la familia de escualeno y fitoeno sintasas de algunos organismos.

En la figura se indica el organismo, la enzima, el número de acceso en la base de datos SwissProt, el tipo de organismo, el número de aminoácidos de la proteína y un esquema que muestra cuatro motivos conservados en esta familia de proteínas indicados con las letras A, B, C y D en azul. Sólo se muestran 24 secuencias de un total de 70 secuencias que fueron identificadas y destacado en amarillo se muestra a la proteína CRTYB de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*. Estos motivos fueron identificados con el programa **BLOCKS** ubicado en la siguiente dirección: <http://blocks.fhcrc.org/> . En la figura también se indica la escala en que se representó el esquema de la secuencia aminoacídica.

Se observa que existen cuatro motivos que son conservados y el programa BLOCKS indicó que la secuencia de la proteína CRTYB sólo comparte dos de los cuatro motivos conservados. Actualmente no se conoce la función exacta de estos motivos. En la figura 31 se muestra la porción de la secuencia de la proteína del gen *crtYB* de la cepa UCD 67-385 que contiene los motivos conservados y se compara con estos motivos de otros organismos. Es importante destacar que los motivos conservados se encuentran hacia el extremo C-terminal de la proteína, región donde se ha comunicado que se encuentra la actividad fitoeno sintasa de la proteína bifuncional CRTYB (Verdoes *et al*, 1999). Cuando se realiza un análisis comparativo de la secuencia aminoacídica de la proteína deducida a partir del cDNA maduro con secuencias aminoacídicas de fitoeno sintasas de diferentes organismos carotenogénicos mediante Clustal W permite elaborar un cladograma (figura 32). Claramente se observan tres grupos principales, uno compuesto por bacterias y hongos, otro compuesto por cianobacterias y algas y un tercer grupo compuesto por plantas superiores. Similarmente a lo que ocurre con otro gen de carotenogénesis (*crtI*) (León, 2000).

Por otra parte, el análisis de secuencias de licopeno ciclasas de distintos organismos ha indicado que existen diferentes tipos de estas enzimas. La más común es la clásica licopeno ciclasa monomérica encontrada en plantas y muchas bacterias. El primer gen clonado (*crtY*) de licopeno ciclasa fue el de *Erwinia uredovora* (Misawa *et al*, 1990). Comparando las secuencias aminoacídicas de este tipo de licopeno ciclasas de bacterias y plantas es posible encontrar cinco motivos conservados. Uno de ellos es una región hipotética de unión de nucleótido que presenta cierta similitud con este tipo de región encontrada en la enzima fitoeno desaturasa. Se desconoce la función de los otros cuatro motivos. Un segundo tipo de licopeno ciclasas corresponde a enzimas heterodiméricas, en las cuales existen dos genes que codifican para polipéptidos pequeños, que solamente en conjunto son capaces de convertir el licopeno en β -caroteno. Un ejemplo de ello ha sido descrito en la bacteria actinomicete *Brevibacterium linens*, cuya licopeno ciclasa esta compuesta por dos polipéptidos, Yc e Yd. Los genes de estos polipéptidos no presentan similitud significativa con los genes de las enzimas licopeno ciclasas clásicas (Krubasik y Sandmann, 2000).

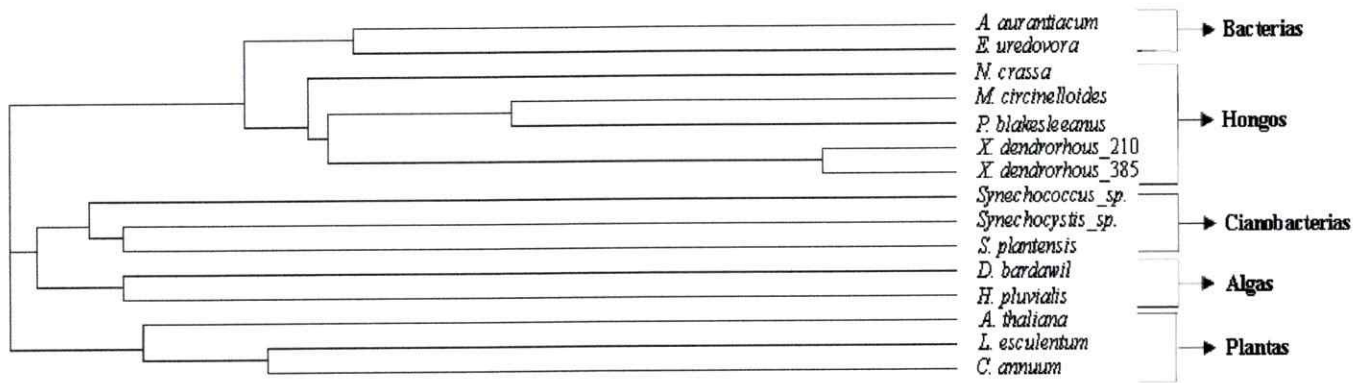


Figura 32.-Cladograma del alineamiento de las secuencias de fitoeno sintasas de distintos organismos. El análisis fue realizado con el programa ClustalW (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>)

Un tercer tipo de licopeno ciclasas son las encontradas en algunos hongos, que se caracterizan por ser enzimas bifuncionales, codificadas por un solo gen, con actividad fitoeno sintasa y licopeno ciclasa y han sido denominadas como fitoeno- β -caroteno sintasas (PBS). El extremo C-terminal de la proteína deducida del cDNA de esta enzima en *X. dendrorhous* presenta similitudes con las enzimas fitoeno sintasa de otros organismos y el extremo N-terminal, presenta similitudes con licopeno ciclasas del tipo heterodiméricas. Genes que codificarían para una enzima bifuncional con actividad fitoeno sintasa y licopeno ciclasa han sido encontrados en zygomycetes *Phycomyces blakesleeanus*, gen *carRA* (Arrach *et al.*, 2001) y *Mucor circinelloides*, gen *carRP* (Velayos *et al.*, 2000), como también en el ascomycete *Neurospora crassa*, gen *al-2* (Schmidthausen *et al.*, 1994). Probablemente, este tipo de enzima bifuncional sea característico de hongos debido a que hasta el momento sólo se han encontrado en los tres grandes grupos de estos organismos, basidomicetes, ascomicetes y zygomycetes. Como los dos primeros grupos de hongos se han desarrollado a partir de formas de zygomycetes, se propone que este tipo de licopeno ciclasas bifuncionales fue adquirido tempranamente en la evolución de los hongos. Se postula que probablemente estas enzimas se originaron de la fusión, por un proceso de recombinación, de dos genes del tipo *crt Yd* y *crt Yc* similares a los de *B. linens* y el gen de la fitoeno sintasa (Krubasik y Sandmann, 2000). Se ha propuesto que al menos existe un cuarto tipo de licopeno ciclasas dado que al

comparar las secuencias de las licopeno ciclasas conocidas con el genoma de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC6804, que ha sido secuenciado completamente, no se encuentra una similitud significativa. Lo mismo ocurre cuando se comparan estas secuencias con el genoma totalmente secuenciado de otra cianobacteria, *Anabaena* sp. PCC7120. Se ha demostrado que ambas cianobacterias producen β -caroteno, el cual es producto de la ciclación del licopeno, por lo tanto, debe existir una enzima con esta actividad en estos organismos (Krubasik y Sandmann, 2000).

La comparación de las secuencias aminoacídicas de licopeno ciclasas de distintos organismos representantes de los tres tipos de esta enzima permitió desarrollar un cladograma como se muestra en la figura 33. Se puede observar que la proteína bifuncional de *X. dendrorhous* no aparece en el mismo grupo que las otras proteínas bifuncionales.

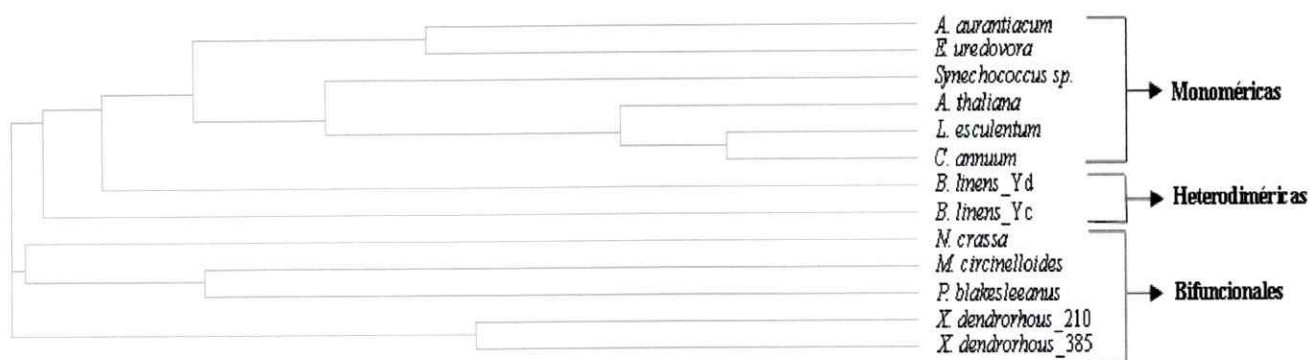


Figura 33.-Cladograma del alineamiento de las secuencias de licopeno ciclasas de distintos organismos. El análisis fue realizado con el programa ClustalW (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>)

3. Análisis genético molecular del gen *crtYB*, que codifica la enzima fitoeno sintasa-licopeno ciclasa.

Con el objetivo de caracterizar al gen *crtYB* de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* se intentó conocer su ubicación en el cariotipo electroforético de la levadura. Como ha sido descrito previamente el cariotipo electroforético de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* está constituido por 9 bandas cromosómicas (Cifuentes *et al.*, 1997). Las dos bandas de mayor tamaño están constituidas por tres cromosomas cada una. Inicialmente mediante experimentos de hibridación fue posible localizar el gen *crtYB* en la segunda banda cromosómica del cariotipo electroforético. La sonda específica del gen *crtYB* correspondiente al inserto de 2,2 kb de pJ1, sólo hibrida con la segunda banda. Sin embargo, debido a la intensidad de la segunda banda cromosómica luego de teñir el gel con bromuro de etidio y de acuerdo a lo publicado con anterioridad (Cifuentes *et al.*, 1997), se determinó que esta banda posiblemente correspondería a tres bandas cromosómicas. Por ello, se optó por cambiar las condiciones de electroforesis de campo pulsado intentando separar este triplete en sus tres componentes de tal forma de poder precisar en cual cromosoma del triplete realmente se ubica el gen *crtYB*. Los nuevos resultados indicaron que la sonda reconoce dos bandas, estableciéndose que el gen estaría ubicado en dos cromosomas.

Para obtener una mayor información de la organización del gen *crtYB* en el genoma de la levadura se realizó un análisis de hibridación del DNA genómico de la cepa UCD 67-385 digerido con distintas endonucleasas de restricción en forma simple o combinada. Como sonda se utilizó el mismo fragmento de 2,2 kb portador del gen *crtYB*. Los resultados claramente indican que el gen se encuentra en una sola copia lo que permitió la elaboración de un mapa de restricción del gen y sus vecindades en el genoma. Si existieran más copias del gen se hubiese esperado un patrón de bandas de hibridación más complejo ya que los sitios de restricción de las vecindades de las distintas copias del gen serían diferentes, lo que generaría un mayor número de bandas que variarían en el tamaño de los fragmentos de DNA que contienen al gen impidiendo en dichas condiciones construir un mapa genómico. El mapa genómico se muestra en la figura 22 y

permite describir una región de aproximadamente 31 kb. No fue posible determinar la posición de los sitios de corte reconocidos por la enzima *Bam*HI. Sin embargo, sí fue posible saber que el gen se ubica en un fragmento *Bam*HI de alrededor de 23 kb y dentro de éste, en un fragmento *Eco*RV de 5,8 kb.

A primera vista los resultados obtenidos en la ubicación del gen *crtYB* en el cariotipo electroforético y el mapeo de restricción del DNA genómico mediante hibridación, resultan contradictorios. En el primer caso, se observó que el gen se ubica en dos cromosomas y en el segundo caso, se determinó que el gen se encuentra en una sola copia. Sin embargo, es posible concluir que la región de 31 kb descrita por las digestiones se repite sin variación evidente en los dos cromosomas, lo mismo ocurre con el fragmento *Bam*HI de aproximadamente 23 kb en que se encuentra el gen.

Existen evidencias de que la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* es diploide (Cifuentes *et al*, 1997, Retamales *et al*, 1998, León, 2000) y se ha observado que esta levadura posee un elevado polimorfismo (Adrio *et al*, 1995, Cifuentes *et al.*, 1997), por lo que más de una banda cromosómica en el cariotipo electroforético podría corresponder a un mismo cromosoma. Una manera de poder discriminar si las dos bandas cromosómicas con las que hibrida la sonda del gen *crtYB* son dos cromosomas distintos, es disponer de una batería de sondas específicas para cada uno de los cromosomas de la levadura (Martínez, datos no publicados). Con estas sondas se pueden realizar experimentos de hibridación para determinar si todas las sondas específicas para una de las bandas cromosómicas con la que hibrida la sonda del gen *crtYB* también reconocen la otra banda en que se ha localizado este gen. En este momento no es posible discriminar si las dos bandas cromosómicas reconocidas por la sonda del gen *crtYB* son dos cromosomas homólogos o no. Si fuesen homólogos, alguno de ellos o ambos han sufrido algún tipo de rearrreglo cromosómico como una inserción o delección, explicando la razón de su distinto tamaño. Probablemente sean cromosomas homólogos como es sugerido por los resultados obtenidos del mapeo de restricción del DNA genómico y las evidencias del elevado polimorfismo que hay en esta levadura.

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

Se procedió a realizar experimentos de transformación de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* con la finalidad de confirmar que efectivamente el clon 33.13 era portador del gen *crtYB*. Para esto se intentó producir una delección de gran parte del gen *crtYB* nativo a través de transformación por integración que involucra una doble recombinación homóloga entre el sector del genoma de la levadura que contiene el gen *crtYB* y un DNA portador de la delección que se desea inducir. En el inserto de 5,8 kb del clon 33.13 se encuentran dos sitios de corte para la endonucleasa *SalI* y dos sitios para *XbaI*, ubicados dentro del gen y muy próximo a él. Luego de digerir el clon con estas enzimas independientemente en ambos casos se logró eliminar el fragmento que contenía gran parte del gen. El DNA obtenido, portador del gen *crtYB* con una delección, fue usado como DNA transformante. Se obtuvieron colonias pálidas en relación al fenotipo de la silvestre, como resultado de las sucesivas transformaciones realizadas. Las colonias pálidas efectivamente correspondían a *X. dendrorhous* lo que fue confirmado por observación bajo el microscopio óptico y presencia de RNA de doble hebra entre sus ácidos nucleicos (Castillo y Cifuentes, 1994, Martínez *et al*, 1994). Se observó que las colonias pálidas se sectorizaban recobrando su fenotipo silvestre. Una explicación a este fenómeno es la posible diploidía natural de esta levadura. Así, las colonias pálidas podrían ser heterocigóticas para el gen *crtYB*, donde un alelo tiene la mutación y el otro alelo sería silvestre y por lo tanto habría una menor producción de pigmentos por un efecto de dosis génica. La sectorización de las colonias podría deberse a recombinación mitótica donde las células en sectores con fenotipo silvestre habrían recobrado el alelo silvestre y por lo tanto serían homocigóticas produciendo una mayor cantidad de pigmentos. Las células en sectores de la colonia con fenotipo pálido corresponderían a células heterocigóticas. Sin embargo, aparece una pregunta ¿por qué no hay sectores albinos que corresponderían a células homocigóticas portadoras de los dos alelos mutantes? Una respuesta para esta pregunta podría ser la posible existencia de otro gen, *crtB*, vestigio de las fitoeno sintasas clásicas, levemente activo por lo que a pesar de que en la levadura existan los dos alelos mutantes del gen *crtYB*, igual existiría una leve

producción de carotenoides proporcionando el fenotipo pálido a la colonia. Sin embargo, se requiere de investigación para encontrar este gen y así poder contestar esta pregunta.

El aislamiento, la caracterización y el estudio de la organización genómica de este gen (*crtYB*), es un gran aporte para el estudio de la ruta de biosíntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*. Por otra parte, facilita los estudios de regulación de la expresión de genes involucrados en esta vía y en un futuro, elaborar estrategias para realizar experimentos de ingeniería metabólica.

CONCLUSIONES

1. Se ha clonado y secuenciado el gen *crtYB* de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*. El análisis de su secuencia determinó que el gen está constituido por cinco exones y cuatro intrones y codifica para una proteína de 673 aminoácidos con dos actividades enzimáticas, fitoeno sintasa y licopeno ciclasa.
2. Se ha clonado y secuenciado el cDNA de un mensajero no productivo del gen *crtYB*, el cual conserva parte del primer intrón y ha perdido una porción del segundo exón, generando un codón de término de la traducción prematuro. En el laboratorio también se ha clonado y secuenciado el cDNA de un mensajero del gen *crtI* que conserva parte del primer intrón generando en su secuencia un codón de término de la traducción prematuro. Ambos serían producto del reconocimiento de sitios de "splicing" alternativo.
3. El gen *crtYB* se ubica en dos bandas cromosómicas del cariotipo electroforético de *X. dendrorhous*, en un fragmento *Bam*HI de aproximadamente 23 kb y dentro de éste, en un fragmento *Eco*RV de 5,9 kb.
4. A través de experimentos de transformación se obtuvo colonias pálidas de *X. dendrorhous* que sectorizan, sugiriendo heterocigosidad y recombinación mitótica en *X. dendrorhous*.

BIBLIOGRAFIA

An G., Schuman, D. y Johnson, E. 1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 116-124.

Adrio J., Veiga M. 1995. Transformation of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *Biotech. Techniques* 9: 509-512.

Adrio J., López M., Casqueiro J., Fernández C. y Veiga M. 1995. Electrophoretic karyotype of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *Curr. Genet.* 27: 447-450.

Alcaíno J., Carvajal N., Urzúa B., Martínez C. y Cifuentes V. 2000. Aislamiento de secuencias de replicación autónoma de *Xanthophyllomyces dendrorhous* en *Saccharomyces cerevisiae*. *Bol. Micol.* 15:17-22.

Armstrong G. 1994. Eubacteria show their true colors: genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *J. Bacteriol.* 176: 4795-4802.

Arrach N., Fernández R., Cerdá E. y Avalos J. 2001. A single gene for lycopene cyclase, phytoene synthase, and regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 1687-1692.

Barahona S., Alcaíno J., Lodato P., Retamales P. y Cifuentes V. 2001. Aislamiento de genes de carotenogénesis de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Ex. *Phaffia rhodozyma*) mediante PCR. *Bol. Micol.* 16: 65-69.

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

Britton G., Liaaen-Jensen S. y Pfander H. 1998. Carotenoids. Ed by G. Britton. Birkhäuser Verlag. Basel. Boston. Berlin.

Castillo A. y Cifuentes V. 1994. Presence of double stranded RNA and virus-like particles in *Phaffia rhodozyma*. *Curr.Genet.* 26: 364-368.

Castillo A. y Cifuentes V. 1994. Caracterización genética de un sistema *killer* en *Phaffia rhodozyma*. *Anal Microbiol.* 2: 40-42.

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

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

Cifuentes V., Hermosilla G., Martínez C., León R., Pincheira G. y Jiménez A. 1997. Genetics and electrophoretic karyotyping of wild type and astaxantin mutants strains from *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek* 72:111-117.

Cunningham F. y Gantt E. 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 557-583.

Fraser P., Miura Y., Misawa N. 1997. *In vitro* characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes. *J. Biol. Chem.* 272: 6128-6135.

Girard P., Falconnier B., Bricout J. y Vladescu B. 1994. β -Carotene producing mutants of *Phaffia rhodozyma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41:183-191.

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

Hentze M. y Kulozik A. 1999. A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* 96: 307-310.

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

Ishigaki Y., Li X., Serin G. y Maquat L. 2001. Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell* 106: 607-617.

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

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

Kim V., Kataoka N. y Dreyfuss G. 2001. Role of the nonsense-mediated decay factor hUpf3 in the splicing-dependent exon-exon junction complex. *Science.* 293: 1832-1836.

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

Krubasik P. y Sandmann G. 2000. Molecular evolution of lycopene cyclases involved in the formation of carotenoids with ionone end groups. *Biochem. Soc. Trans.* 28: 806-810.

Lagarde D., Beuf L. y Vermaas W. 2000. Increased production of zeaxanthin and other pigments by application of genetic engineering techniques to *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 64-72.

Le Hir H., Gatfield D., Izaurre E. y Moore M. 2001. The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *The EMBO* 20: 4987-4997.

León R. 2002. Aislamiento y caracterización del gen de la fitoeno deshidrogenasa de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Ex: *Phaffia rhodozyma*). Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

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

Martínez C., Hermosilla G., León R., Pincheira G. y Cifuentes V. 1998. Genetic transformation of astaxanthin mutants of *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek* 73:147-153.

Martínez C., Hermosilla G., León R., Urzúa B. y Cifuentes V. 1994. Presencia de plasmios de DNA de doble hebra en *Phaffia rhodozyma*. *Bol. Micol.* 9:25-30.

Maquat L. y Carmichael G. 2001. Quality control of mRNA function. *Cell* 104: 173-176.

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

Misawa N., Nakagawa M., Kobayashi K., Yamano S., Izawa Y., Nakamura K. y Harashima K. 1990. Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172: 6704-6712.

Mitrovich Q. y Anderson P. 2000. Unproductively spliced ribosomal protein mRNAs are natural targets of mRNA surveillance in *C. elegans*. *Genes and Development.* 14: 2173-2184.

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

Pine S., Hendrickson J., Cram D. y Hammond G. 1993. Química Orgánica. Cuarta Edición McGraw-Hill, Inc., U.S.A.

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

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

Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual, 2^oEd, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Schimdthausen T., Lauter F., Schumacher M., Zhou W., Russo V. y Yanofsky C. 1994. Characterization of *al-2* the phytoene synthase gene of *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem. 269: 12060-12066.

Schimdt-Dannert C. 2000. Engineering novel carotenoids in microorganism. Curr. Opinion in Biotechnol. 11: 255-261.

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

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

Takaichi S., Sandmann G., Schnurr G., Satomi Y., Suzuki A. y Misawa N. 1996. The carotenoid 7,8-dihydro- ψ end group can be cyclized by the lycopene cyclases from the bacterium *Erwinia uredovora* and the higher plant *Capsicum annuum*. Eur. J. Biochem. 241: 291-296.

Velayos A., Eslava A. e Iturriaga E. 2000. A bifunctional enzyme with lycopene cyclase and phytoene synthase activities is encoded by the *carRP* gene of *Mucor circinelloides*. Eur. J. Biochem. 267:5509-5519.

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

Yamada Y., Nagahama T. y Kawasaki H. 1990. The phylogenetic relationship of genera *Phaffia* Miller, Yoneyama *et* Soneda and *Cryptococcus Kützing* emend. Phaff *et* Spencer (Cryptococcaceae) based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal ribonucleic acids. J. Gen. Appl. Microbiol. 36: 403-414.

APÉNDICE

Marcador de Tamaño Molecular:

DNA fago λ digerido con la enzima *Hind* III

Banda Nº	Tamaño Molecular (kb)	% del total del genoma del fago	Cantidad (ng) presente en 400 ng totales
1	23,1	48	192
2	9,41	20	80
3	6,55	14	56
4	4,37	9	36
5	2,32	3	12
6	2,02	3	12
7	0,56	1,2	4,8
8	0,12	0,25	1