

UCH-FC  
DOC-B  
LS 7/9  
C.1

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN**

**DE LA FITOENO DESHIDROGENASA DE**

*Xanthophyllomyces dendrorhous*

(*ex Phaffia rhodozyma*)

Tesis

Entregada a la Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos para optar

al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

**Rubén Alberto León Berríos.**

**2000**

Director de Tesis: Dr. Victor Cifuentes Guzmán.

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

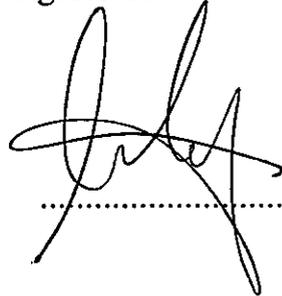
INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE DOCTORADO

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

RUBÉN ALBERTO LEÓN BERRÍOS

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el Examen Defensa de Tesis rendido el día 9 de Agosto del 2000.

Director de Tesis  
Dr. Victor Cifuentes G.



.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Margarita Carú



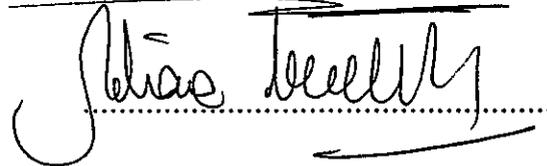
.....

Dra. Liliana Cardemil



.....

Dra. Eliana Canelo



.....

Dr. Carlos Jerez

.....

**“.....solo con el corazón se puede ver bien;  
lo esencial es invisible a los ojos.....”**

A mis padres  
Gabriela Berríos G. y Oscar León V.  
por su sacrificio, y amor.

A Cecilia que ha tenido la  
paciencia y amor para soportarme y  
entenderme.

Nunca pensé que al llegar a esta etapa me costaría tanto redactar estas líneas, no porque no sepa que escribir si no más bien porque son tantas las cosas que quisiera expresar, para agradecer, a todos los que de una u otra forma me apoyaron, motivaron y posibilitaron el cumplir con esta meta.

En especial quiero dar gracias a Víctor, mi tutor, por todo el apoyo entregado, por brindarme su confianza, por darme la oportunidad y por sobre todo por entregarme su amistad (gracias por tu paciencia).

A Germán y Claudio por brindarme su amistad e interés por compartir conmigo tantas alegrías y penas en nuestras largas jornadas en el laboratorio.

A todos mis amigos del laboratorio, Dony (cerebro), Jennifer, Patricia, Raquel, Eugenio, Patricio, Rafael y Salvador, gracias por su amistad y colaboración desinteresada en la elaboración de esta tesis.

A mis amigos, Blanca Urzúa, Jessica Martínez, Gloria Mosquera, Lorena Bravo, Madeleine Manzúr, Irene Morales, Jorge Arroyo y Basilio Carrasco por su preocupación e incentivo.

A la Dra. Margarita Carú, Prof. Eliana Canelo y Dr. Julio Alcayaga por su ayuda, consejos e incentivo para lograr esta meta.

Al Dr. Guido Pincheira por su constante empeño en entregar su experiencia y una visión diferente de la ciencia.

A mis amigos “peloteros” de esta Facultad, Turko, Fer, Manuel, Pancho, Claudio, gracias por acompañarme siempre.

A toda mi familia, en especial a mis padres Gabriela y Oscar, a mi Pepa, mis hermanos Maritza, Juan Pablo y Agustín por su constante apoyo y preocupación, sacrificando parte de su vida para que yo alcance este título.

A mis animales por darme una muestra práctica de fidelidad y “cariño”, gracias por enseñarme a valorar las cosas simples de la vida, por acercarme a Dios; ...gracias por domesticarme.

A mi mujer, Cecilia, por apoyarme en las buenas y en las malas, por esforzarse en tratar de entenderme, por motivarme siempre a seguir adelante y por sobre todo por amarme. (Gracias Marmosita,... te amo).

Gracias Señor

“.....solo se conocen bien las cosas si las domesticamos, los hombres no tienen tiempo de conocer nada. Lo compran todo hecho en las tiendas y como no hay tiendas donde vendan amigos, los hombres ya no tienen amigos.....”

## ÍNDICE GENERAL

	página
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE DE MATERIAS	iii
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xvi
INTRODUCCIÓN	1
APROXIMACIÓN METODOLOGICA AL PROBLEMA	17
MATERIAL Y MÉTODOS	21
I. Materiales	21
1. Material biológico	21
1.1 Bacterias	21
1.2 Levaduras	21
1.3 Plásmidos	22
1.4 Enzimas	22
1.5 Acidos desoxirribonucléicos	22
2. Reactivos químicos y medios de cultivo.	23
3. Sistemas de purificación y marcado radiactivo de ácidos nucleicos	23
II. Métodos	24
1. Cultivos y mantención de microorganismos	24
1.1 Bacterias	24
1.2 Levaduras	24
2. Formación de protoplastos	25
3. Pigmentos	26
3.1 Cromatografía líquida de alta resolución	26

4. Purificación de DNA	27
4.1 DNA plasmidial	27
4.2 Extracción de DNA desde geles de agarosa	27
4.3 DNA genómico de <i>X. dendrorhous</i>	28
4.4 Extracción de DNA genómico de <i>Erwinia uredovora</i>	29
5. Transformación genética	30
5.1 <i>Escherichia coli</i>	30
5.1.1 Transformación.	31
5.1.3 Selección de clones con inserto	31
5.2 <i>X. dendrorhous</i>	32
5.2.1 Transformación de <i>X. dendrorhous</i> mediante protoplastos	32
5.2.2 Transformación mediante Electroporación de <i>X. dendrorhous</i>	33
6. Análisis de DNA	33
6.1 Digestión con endonucleasas de restricción	33
6.2 Reacción de la polimerasa en cadena (PCR).	34
6.2.1 Partidores para el aislamiento de los genes de carotenogénesis de <i>E. uredovora</i>	34
6.2.2 Amplificación de DNA	35
6.3 Hibridación DNA-DNA	35
6.3.1 Marcado de las sondas	36
6.3.2 Hibridación	37
6.4 Hibridación en librería genómica hibridación de DNA en colonia	38 39
6.5 Secuenciación	40
6.5.1 Gel de secuenciación: Sistema "Base Ace de Stratagene <sup>™</sup> "	41

7. Preparación de DNA cromosómico para campo pulsado	42
7.1 <i>X. dendrorhous</i> y <i>S. cerevisiae</i>	42
7.2 Electroforesis de campo pulsado	43
RESULTADOS	44
1. Análisis de los clones rescatados a partir de los transformantes de <i>X. dendrorhous</i> .	44
1.1 Transformación con los clones rescatados desde la genoteca de <i>X. dendrorhous</i>	51
2. Clonamiento de los genes crt de <i>E. uredovora</i>	55
2.1 Diseño de los partidores de PCR para la síntesis de los genes <i>crtB</i> , <i>crtE</i> , <i>crtI</i> y <i>crtY</i> de <i>E. uredovora</i> .	55
2.11 Partidores utilizados para la amplificación de los genes crt. de <i>E. uredovora</i>	56
2.2 Amplificación y clonamiento en el plásmido Bluescript SK <sup>-</sup> de los genes crt de <i>E. uredovora</i> .	57
2.3 Formación de las construcciones EGB e IGY en el plásmido Bluescript SK <sup>-</sup> y clonamiento de ellas, en el vector YCp50.	61
2.4 Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y expresión de los genes crt de <i>E. uredovora</i>	64
3. Aislamiento, clonamiento y secuenciación del gen <i>atx3</i> ( <i>crtI</i> ), que codifica para la enzima fitoeno deshidrogenasa de <i>X. dendrorhous</i>	68
3.1 Secuenciación de los clones L2_2 y L2_5.	70
4. Análisis genético molecular del gen ATX3, que codifica para la fitoeno deshidrogenasa, en <i>X. dendrorhous</i> .	82

4.1 Análisis de restricción de DNA genómico de <i>X. dendrorhous</i> , utilizando como sonda el fragmento interno <i>EcoRV</i> del genATX3.	85
5. Transformación de <i>X. dendrorhous</i> , con el DNA de los clones L2_2 y L2_5.	91
5.1 Electrortransformación de la cepa albina (atx3) de <i>X. dendrorhous</i>	91
5.2 Electrotransformación de la cepa silvestre de <i>X. dendrorhous</i> (UCD 67-385), con una deleción en el gen de la fitoeno deshidrogenasa.	93
5.3 Transformación de una de las transformantes pálidas, con la deleción del gen de la fitoeno deshidrogenasa utilizada en 5.2.	95
DISCUSION	101
CONCLUSIONES	121
Apéndice N° 1	123
Apéndice N° 2	125
Apéndice N° 3	130
BIBLIOGRAFIA	131

## LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1 : Ejemplo de algunos genes involucrados en la síntesis de carotenoídes aislados desde organismos eucariontes.	9
Tabla 2 : Experimentos de transformación, mediante protoplastos, de las cepas mutantes de <i>X. dendrorhous</i> Atx3 y Atx5, con el plásmido pPR142H2.	51
Tabla 3 : Experimentos de transformación, mediante protoplastos, de las cepas mutantes de <i>X. dendrorhous</i> Atx3 y Atx5, con los plásmidos rescatados desde la genoteca.	53
Tabla 4 : Experimentos de transformación, mediante protoplastos, de las cepas mutantes de <i>X. dendrorhous</i> Atx3 y Atx5, con parejas de plásmidos rescatados desde la genoteca.	54
Tabla 5 : Secuencia nucleotídica de los partidores diseñados para amplificar los genes crtB, crtE, crtI y crtY de <i>E. uredovora</i> .	56
Tabla 6 : Tamaño de las bandas, en kilobases, obtenidas a partir de la hibridación de la figura 30.	89
Tabla 7 : Resumen de los experimentos de transformación de la cepa albina (Atx3) con los plásmidos L2_2 y L2_5.	92
Tabla 8 : Electrotransformación de la cepa silvestre de <i>X. dendrorhous</i> con el gen ATX3 portando una deleción.	96

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig. 1: Relaciones biosintéticas entre los isoprenoides.	3
Fig. 2. Esquema simplificado de la conversión de carotenos cíclicos a xantófilas	5
Fig. 3: Vía de síntesis de astaxantina a partir de geranyl-geranylpirofosfato propuesta para <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> .	13
Fig. 4: Vía de síntesis de licopeno a partir de fitoeno.	15
Fig. 5: Representación esquemática de las reacciones de desaturación en la biosíntesis de carotenoídes de bacterias, hongos, cianobacterias y plantas superiores.	15
Fig. 6: Representación esquemática de la orientación y ubicación de los genes <i>crt</i> de <i>E. uredovora</i> , bajo el control del promotor Gal 1/10 de <i>S. cerevisiae</i> . Las flechas indican el sentido de la transcripción de cada uno de los genes.	19
Fig. 7: Electroforesis en gel de agarosa del DNA de los clones pRL1.3 y pRL0.5 derivados del clon pPR142H2	45
Fig. 8: Secuencias obtenidas a partir de los extremos del plásmido pPR142H2	46
Fig. 9: Secuencia nucleotídica de los subclones pRL0.5 y pRL1.3.	47
Fig. 10: Electroforesis en gel de agarosa de los clones rescatados desde la genoteca de <i>X. dendrorhous</i> .	49
Fig. 11: Electroforesis en gel de agarosa del DNA de los clones pRL3 y pRL5a digeridos con endonucleasas de restricción	50

Fig. 12:	Resumen de la vía de síntesis de carotenos de <i>E. uredovora</i>	55
Fig. 13:	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de los genes crt desde el genoma de <i>E. uredovora</i> .	58
Fig. 14:	Electroforesis en gel de agarosa que muestra DNA de los plásmidos que llevan los genes crt de <i>E. uredovor</i> .	59
Fig. 15:	Esquema de clonamiento de los genes crt de <i>E. uredovora</i> y fabricación de las construcciones (EGB y IGY), para la expresión de estos genes en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	60
Fig. 16:	Electroforesis en gel de agarosa donde se muestra el análisis de restricción del plásmido pIGY.	62
Fig. 17:	Electroforesis en gel de agarosa se muestra el análisis de restricción de los plásmidos pEGB e YCpEGB.	63
Fig. 18:	Electroforesis en gel de agarosa, se muestra análisis mediante PCR de los transformantes de <i>S. cerevisiae</i> que llevan el plásmido YCpEGB.	65
Fig. 19:	Electroforesis en gel de agarosa. análisis mediante PCR de los diploides de <i>S. cerevisiae</i> , que llevan los plásmidos YCpEGB e YCpIGY.	66
Fig. 20:	Análisis mediante HPLC de las cepas transformantes y diploides, de <i>S. cerevisiae</i> , que llevan los genes de carotenogénesis de <i>E. uredovora</i> .	67
Fig. 21:	Electroforesis en gel de agarosa. Se presentan los productos de amplificación obtenidos desde el genoma de la cepa UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i> , utilizando los partidores diseñados para la fitoeno deshidrogenasa	69
Fig. 22:	Electroforesis en gel de agarosa en gel de agarosa. Se presentan seis clones que llevan como inserto el fragmento de 3,6 kb, amplifcado a partir de la cepa UCD 67-385.	71
Fig. 23:	Representación esquemática de los clones L2_2 y L2_5	72
Fig. 24:	Secuencia nucleotídica total del inserto del clon L2_2.	73
Fig. 25:	Secuencia nucleotídica total del inserto en el clon L2_5	76

Fig 26: Alineamiento y comparación de las secuencias nucleotídicas de los clones L2_2 y L2_5	79
Fig 27: Comparación de las secuencias de proteínas, estimadas a partir de las secuencias nucleotídicas de los clones L2_2 y L2_5.	83
Fig 28: Hibridación de la sonda del fragmento interno <i>EcoRV</i> del gen ATX3 (fitoeno deshidrogenasa) con la banda cromosómica I de la cepa silvestre UCD 67-385.	84
Fig 29: Análisis de restricción de DNA genómico total de <i>X. dendrorhous</i> (cepa UCD 67-385), utilizando como sonda el fragmento interno <i>EcoRV</i> que se encuentra dentro del gen ATX3.	87
Fig. 30: Análisis de restricción de DNA genómico total de <i>X. dendrorhous</i>	88
Fig. 31: Representación esquemática de la ubicación del gen ATX3, en una sección del genoma de <i>X. dendrorhous</i>	90
Fig. 32: Geles de agarosa (0.8 %) que muestran la construcción de los plásmidos que llevan el fragmento de 2,4 kb correspondiente al gen de la fitoeno deshidrogenasa con una delección de 1,2 kb	94
Fig. 33: Análisis mediante HPLC de una de las cepas transformante pálidas.	97
Fig 34: Se muestran las colonias obtenidas a partir de la electrotransformación de una de las colonias "pálidas", transformada con el DNA que porta una delección en el gen ATX3.	98
Fig 35: Gel de agarosa (0.8 %) que muestra DNA amplificado, utilizando los partidores que amplifican el fragmento de 3,6 kb. Se utilizó DNA de la cepa silvestre UCD 67-385, de las dos transformantes pálidas y el DNA de dos colonias transformantes blancas.	100
Fig. 36: Comparación de las secuencias proteicas, estimadas a partir de las secuencias nucleotídicas de los clones L2_2 (ProtL2_2), L2_5 (ProtL2_5) y de la cepa tipo, UCD 67-210 (ProCTipo).	109
Fig 37: Perfil de hidrofobicidad determinado para la secuencia proteica deducida, a partir del clon L2_5, para la enzima fitoeno deshidrogenasa	

de la cepa UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i> .	112
Fig 39: Dendrograma del alineamiento de las secuencias de fitoeno deshidrogenasas de diferentes organismos	114

## ABREVIATURAS

BSA	albúmina sérica de bovino
BD	Buffer fosfato ditionitrol
CHEF	campo eléctrico de contorno homogéneo
DMAPP	dimetil alilpirofosfato
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
FPP	farnesil pirofosfato
GPP	geranil pirofosfato
GGPP	geranilgeranil pirofosfato
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
IPP	isopentenil pirofosfato
IPTG	isopropil $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
kb	kilobases
LB	medio Luria Bertani
MM <sub>v</sub>	medio mínimo Vogel
PCR	Reacción de polimerasa en cadena
PBS	tampón fosfato salino
PEG	polietilenglicol

RNAsa A	ribonucleasa A
SDS	dodecil sulfato de sodio
STM	Buffer Tris, Sacarosa, Cloruro de Magnesio
TAE	tampón tris-acetato-EDTA
TBE	tampón tris-borato-EDTA
TE	tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N',-tetra-metiletilendiamina
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
UV	ultravioleta
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ D-galactopiranosido
YEP	medio rico para <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
YM	medio rico para <i>X. dendrorhous</i> .

## RESUMEN

Los carotenoides son el grupo más diverso de pigmentos que se encuentran en la naturaleza. Actualmente se han descrito más de 600 de estos compuestos, distribuidos en el reino vegetal, hongos, bacterias y animales.

La naturaleza hidrofóbica y la necesidad de encontrarse unidas o asociadas a membranas de muchas de las enzimas que participan en la síntesis de carotenoides, ha sido una de las dificultades que ha encontrado el estudio bioquímico de la carotenogénesis. De este modo, el análisis de la síntesis de estos pigmentos se ha enfocado principalmente desde el punto de vista genético-molecular.

En algunos procariontes se han descrito todos los genes que participan en la síntesis de carotenoides no obstante, aún quedan muchos aspectos relacionados a la regulación que se encuentran en estudio. Por otra parte, en eucariontes la información es más fragmentada y solo se han aislado algunos genes relacionados a la síntesis de estos pigmentos.

En esta tesis se utilizó la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* como modelo de estudio de la carotenogénesis. Esta levadura sintetiza la xantófila astaxantina (3,3'-dihidroxi- $\beta$ - $\beta$ -caroten-4,4'-diona), un pigmento de alto interés comercial, especialmente para la industria alimentaria. La vía biosintética y su regulación no son claras, no obstante, el análisis químico de los intermediarios, sugiere que este pigmento se sintetiza a través de la ruta:  $\beta$ -caroteno  $\rightarrow$  equinenona  $\rightarrow$  3-hidroxi equinenona  $\rightarrow$  fenicoxantina  $\rightarrow$  astaxantina.

Este trabajo se centró particularmente en el paso entre fitoeno y licopeno, una etapa que se ha descrito como limitante en la carotenogénesis de otros organismos. Además se ha visto que en plantas, algas y cianobacterias esta reacción es catalizada por dos productos génicos a diferencia de los hongos donde solo se requiere uno.

A través del análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los genes y enzimas de fitoeno deshidrogenasas aisladas de diferentes organismos, se diseñaron partidores para amplificar, mediante PCR, el gen de esta enzima desde el DNA genómico de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*.

El análisis de la secuencia nucleotídica del fragmento de DNA amplificado indica que este gen posee once intrones y codifica para una proteína de 582 aminoácidos que corresponde a la enzima fitoeno deshidrogenasa. Por otra parte, el análisis de la secuencia aminoacídica, permitió determinar algunas características de esta proteína, tal como su potencialidad de unir a membranas, un posible sitio de unión a nucleótido y la ubicación un sitio que uniría al fitoeno. La secuencia aminoacídica deducida muestra una gran similitud con las secuencias de las enzimas fitoeno deshidrogenasa provenientes de hongos y bacterias.

Ensayos de hibridación entre el gen aislado, denominado *ATX3* y cromosomas obtenidos por campo pulsado indica que éste gen se encontraría en una de las bandas cromosómicas mayores del cariotipo electroforético. El mapa de restricción indica que el gen para la fitoeno deshidrogenasa de *X. dendrorhous* se encuentra en un fragmento *PstI* de 30 kb.

La transformación de la cepa silvestre con una delección del gen *ATX3*, permitió obtener mutantes de delección pálidos, que sintetizan una menor cantidad de astaxantina,

la re-transformación de mutantes pálidos con el gen *ATX3* con la delección, produjo transformantes albinos. Un análisis mediante PCR de estos mutantes, corroboró que los transformantes pálidos eran heterocigotos para el gen *ATX3*, con un alelo silvestre y otro mutante que porta la delección esperada y los transformantes albinos eran homocigotos para la delección, llevando ambos alelos mutados. Esto último sugiere que esta integración en el genoma se realizó mediante recombinación homóloga y además aporta evidencias que sostienen que *X. dendrorhous* presentaría una condición diploide natural.

## ABSTRACT

The carotenoids are the most diverse group of pigments found in nature. Actually more than 600 of these compounds have been described distributed in the plant, fungi, bacteria and animal kingdoms.

The hydrophobic nature and the need of association to membranes of many of the enzymes that participate in the carotenoid synthesis has been one of the difficulties that the biochemical study of the carotenogenesis has found. This way, an alternative approach has been from a genetic-molecular point of view.

In some prokaryotes, all the genes that participate in the carotenoids synthesis have been described, nevertheless there are still many unknown aspects related to regulation. On the other hand, in eukaryotes the available information is scanty and only a few genes related to the synthesis of these pigments have been isolated.

In this thesis, the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* was used as a model to study the carotenogenesis. This yeast synthesizes the xanthophyll astaxanthin (3,3'-dihydroxi- $\beta$ - $\beta$ -caroten-4,4'-dione), a pigment of high commercial interest especially for the food industry. The biosynthetic pathway and its regulation is not clear, however, the chemical analysis of the intermediate metabolites suggests that this pigment is synthesized through the:  $\beta$ -carotene  $\rightarrow$  equinenone  $\rightarrow$  3-hydroxyequinenone  $\rightarrow$  phenicoxantine  $\rightarrow$  astaxanthin pathway.

The research described in this thesis was focused mainly on the conversion of phytoene to lycopene, a stage that has been described as limiting in the carotenoid

biosynthesis of other organisms. In plants, algae and cyanobacteria this reaction is catalyzed by two gene products whereas in fungi only one is required.

The gene of phytoene dehydrogenase was amplified from the genomic DNA of the wild type UCD 67-385 of *X. dendrorhous*. The primers used were designed from the analysis of the nucleotide and amino acid sequences of the enzymes phytoene dehydrogenase from different organisms.

The analysis of the nucleotide sequence of the amplified DNA fragment indicates that the gene contains eleven introns and codes for a protein of 582 amino acids corresponding to phytoene dehydrogenase. The analysis of the amino acid sequence allowed the identification of some characteristics of this protein, such as its ability to bind to membranes and putative binding sites to nucleotide and phytoene. The amino acid sequence deduced showed a great similarity to the sequences of phytoene dehydrogenase from fungi and bacteria.

Hybridization assays between the isolated gene named *ATX3* and chromosomes obtained by pulse field indicate that this gene may be located in one of major chromosomal bands of the electrophoretic karyotype. The restriction analysis showed that the phytoene dehydrogenase gene of *X. dendrorhous* is in a 30 kb *PstI* fragment.

“Pale” mutants synthesizing small amounts of astaxanthin were obtained from transformation of the wild strain with a deletion of the gene *ATX3*. The re-transformation of “pale” mutants with the deleted *ATX3* gene produced albino transformants. A PCR analysis of these mutants corroborated that the “pale” transformants were heterozygous and the albino transformants were homozygous for the deleted *ATX3* gene. This suggests that the integration in the genome was by homologous

recombination and contributes evidence to sustain that *X. dendrorhous* may present a natural diploid condition.

## INTRODUCCION

Los carotenoides constituyen el grupo más amplio de pigmentos que se encuentran en la naturaleza. Se han descrito más de 600 carotenoides, los cuales se encuentran extensamente distribuidos en el reino vegetal, bacterias fotosintéticas y no fotosintéticas y en una diversidad de hongos (Karnaukhov, 1990, Armstrong & Hearst, 1996). Estos compuestos y sus derivados, como la vitamina A, también se encuentran en animales, quienes los adquieren de la dieta, acumulándolos en algunos tejidos.

Los carotenoides son compuestos terpénicos, formados por la condensación de varias moléculas de isopreno, el cual se constituye en su unidad estructural básica. De esta manera, se pueden encontrar carotenoides que poseen entre 30 y 40 átomos de carbono (Figura 1). Además, es posible encontrar pigmentos parcialmente degradados llamados apocarotenoides los cuales son constituyentes de estas vías metabólicas y dan como resultado moléculas de 45 y 50 átomos de carbono. Algunos carotenoides pueden presentar anillos de cinco o seis átomos de carbono, y/o grupos funcionales oxigenados, tales como grupos hidroxilo, metoxi, oxo, epóxidos, carboxilos y grupos aldehidos. En virtud a lo recientemente descrito, los carotenoides pueden ser clasificados sobre la base de su composición química en:

a) carotenos, que corresponde a aquellos que no presentan átomos de oxígeno en su estructura y b) xantófilas, que poseen átomos de oxígeno.

Muchos carotenoides poseen un largo esqueleto hidrocarbonado, el cual puede presentar entre tres y quince doble enlaces conjugados. Esta larga cadena poliénica juega un rol importante en las propiedades de dichos compuestos. El número de doble enlaces

es responsable de las propiedades espectrales de estos compuestos, absorbiendo la luz entre 400 y 500 nm, y le confieren propiedades hidrofóbicas pudiéndolos encontrar habitualmente asociados a estructuras membranosas. Sucesivas deshidrogenaciones introducen una serie de dobles enlaces alargando el cromóforo y produciendo carotenoides coloreados, siendo el primero  $\zeta$ -caroteno. Además, reacciones de ciclamiento convierten a estas moléculas lineales en carotenos cíclicos, como por ejemplo  $\beta$ -caroteno. Las xantófilas son formadas, posteriormente, por la adición de oxígeno a estas estructuras, lo que potencia la capacidad de estas moléculas para transferir energía, como en los complejos captadores de luz en las plantas, o incrementando sus facultades como agentes protectores contra el daño fotooxidativo y su capacidad para actuar sobre moléculas que promueven el daño oxidativo.

Inicialmente, los estudios sobre los carotenoides se centraron basicamente en su aislamiento y purificación. En el año 1831, Wackenroder informó el aislamiento y cristalización de unos pigmentos rojo brillante desde raíces de zanahoria, a los cuales, denominó "caroteno". Berzelius, en 1837 creó el término "xantofila" para un pigmento amarillo extraído de hojas senescentes. En 1903, utilizando cromatografía de absorción, Tswett caracterizó químicamente a estos compuestos y reconoció una relación estructural entre xantófilas y carotenos, a los que denominó carotenoides. Posteriormente, técnicas más resolutivas permitieron determinar la estructura elemental de los carotenos ( $C_{40}H_{56}$ ) y las xantófilas ( $C_{40}H_{56}O_2$ ) (Isler, 1979).

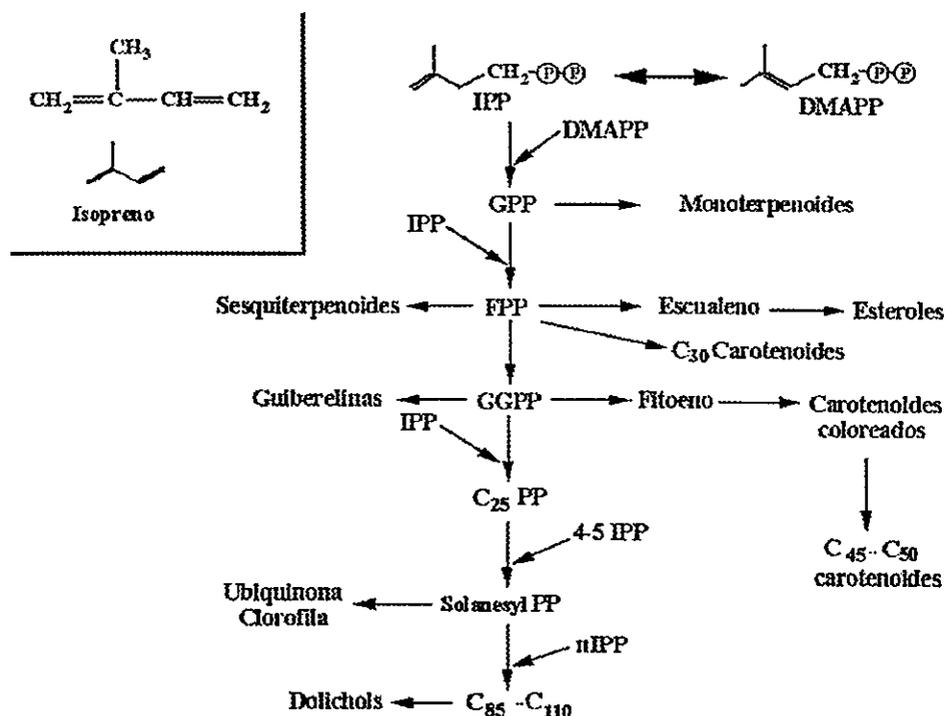


Figura 1.- Relaciones biosintéticas entre los isoprenoides. IPP, isopentenil pirofosfato; DMAPP, dimetil alilpirofosfato; GPP, geranyl pirofosfato; GGPP, geranylgeranyl pirofosfato; FPP, farnesil pirofosfato. (Modificado de Bramley & Mackenzie, 1988).

Una etapa posterior en el estudio de los carotenoides se orientó a conocer su biosíntesis, determinándose que estas moléculas se encuentran en la ruta general de los isoprenoides, compartiendo los sustratos básicos con compuestos tales como esteroides, giberelinas, ácido retinoico y quinonas (Figura 1) (Bramley & Mackenzie, 1988, Sandman, 1991). Sin embargo, estudios comparativos de las rutas biosintéticas de dichos compuestos, en diferentes organismos que los producen, permitieron determinar la existencia de grandes diferencias en relación con la formación de sus intermediarios. Esto sugiere la existencia de diferencias relacionadas con las enzimas que catalizan las reacciones y por lo tanto, con los genes estructurales que controlan genéticamente cada una de las etapas de tales vías (Bramley & Mackenzie, 1988).

En la mayoría de los organismos, hasta ahora estudiados, se ha observado un alto grado de conservación en las primeras etapas de la biosíntesis de carotenoides, es decir, la síntesis de geranilgeranilpirofosfato, prefitoeno y fitoeno, e incluso licopeno, se mantienen como una constante entre los intermediarios de la vía. De este modo, la gran diversidad de carotenoides corresponde a pasos posteriores a la síntesis de fitoeno o licopeno, abarcando especialmente, la síntesis de xantófilas. Un ejemplo lo podemos ver en la Figura 2 (Sandmann, 1991, Chamovitz, *et al*, 1992, Armstrong & Hearst, 1996).

La diversidad de carotenoides encontrados en la naturaleza, en cuanto a su estructura e isómeros, ha planteado un gran desafío a químicos, bioquímicos y genetistas con respecto a la postulación de sus rutas de biosíntesis. Los estudios bioquímicos iniciales se basaron en la utilización de precursores marcados de carotenoides, inhibidores de la carotenogénesis y la determinación de los compuestos intermediarios que se acumulaban en diferentes mutantes afectados en la carotenogénesis ya sea en plantas, bacterias y hongos. Sin embargo, la determinación de reacciones bioquímicas específicas ha resultado una labor difícil debido a la naturaleza hidrofóbica de las enzimas involucradas en la biosíntesis de estos pigmentos y a su tendencia a unirse a membranas (Isler, 1979; Bramley & Mackenzie, 1988; Sandmann, 1991). Algunas de las enzimas estudiadas han sido la geranilgeranilpirofosfato sintetasa y la fitoeno sintetasa, las cuales, se encuentran en las fracciones solubles de los extractos celulares. No obstante lo anterior, recientemente, gracias a las técnicas de DNA recombinante, ha sido posible estudiar otra enzima de la ruta, la licopeno ciclasa de *Erwinia uredovora* (Schnurr, *et al*, 1996).

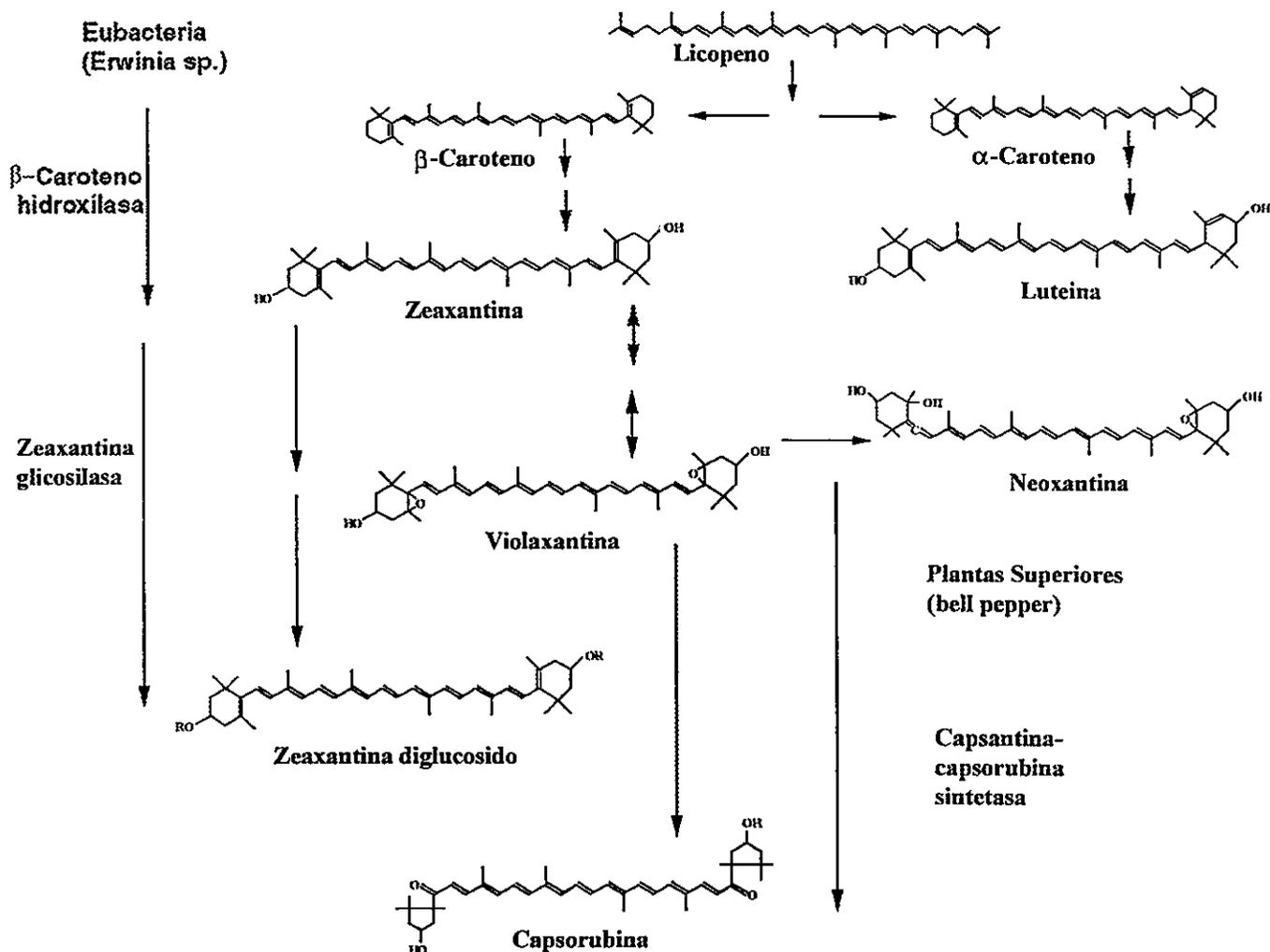


Figura 2.- Esquema simplificado de la conversión de carotenos cíclicos a xantófilas cíclicas. En algunas bacterias es posible encontrar xantófilas glicosiladas. Zeaxantina diglucosido (R= glucosido) es un producto final característico en especies de *Erwinia*. En cianobacterias se acumula principalmente zeaxantina. Luteina, violaxantina y neoxantina son los productos finales más característicos encontrados en plantas superiores. Las enzimas y los genes involucrados en varias de estas conversiones biosintéticas no han sido aun caracterizadas. (Extraído de Armstrong & Hearst, 1996).

En la actualidad, los estudios de la biosíntesis de carotenoides, sus intermediarios y las enzimas que en ella participan, se han enfocado desde el punto de vista genético-molecular. La facilidad para seleccionar mutantes afectados en la síntesis de carotenoides ha permitido disponer de un valioso material para estos estudios. A través de éstos, se han podido conocer las rutas completas de su biosíntesis y también aislar algunos de los genes participantes. Sin embargo, el clonamiento y secuenciación de los genes, así como el entendimiento de todos los pasos en las diferentes rutas biosintéticas solo ha sido posible en algunos organismos procariontes.

Desde el punto de vista molecular, *Rhodobacter capsulatus* fue el primer microorganismo en el cual se logró aislar los genes que participan en la síntesis de estos pigmentos (Biel & Marrs, 1985). Posteriormente, se estableció la organización y secuencia nucleotídica de los genes, así como las propiedades deducidas de los productos proteicos, que participaban en la biosíntesis de carotenoides en este organismo (Armstrong, *et al*, 1989). En esta bacteria fotosintética, existe un supercluster génico de aproximadamente 50 kb que codifica para muchas de las funciones requeridas en la fotosíntesis, incluyendo la bacterioclorofila, y además las enzimas involucradas en la biosíntesis de carotenoides. Se logró establecer que siete genes eran los responsables de las enzimas que participaban en la síntesis de los dos carotenoides finales, las xantófilas esferoideno y esferoidenona. Los genes fueron llamados, *crtA*, *crtB*, *crtC*, *crtD*, *crtE*, *crtF* y *crtI* codifican para las enzimas esferoideno monooxigenasa, fitoeno sintetasa, hidroxineurosporeno sintetasa, metoxineurosporeno deshidrogenasa, GGPP sintetasa, hidroxineurosporeno o-metiltransferasa y fitoeno deshidrogenasa, respectivamente.

Posteriormente, se logró establecer la secuencia de los genes que participan en la síntesis de zeaxantina-diglucoosido en la bacteria fitopatogénica y no fotosintética *Erwinia uredovora* (Misawa, *et al*, 1990). En este organismo los genes también se disponen en un cluster de aproximadamente 7 kb, el cual posee seis genes que codifican las enzimas que participan en la vía de síntesis de esta xantófila. Los genes fueron llamados *crtE*, *crtB*, *crtI*, *crtY*, *crtZ* y *crtX* y codifican las enzimas GGPP sintetasa, fitoeno sintetasa, fitoeno desaturasa, licopeno ciclasa,  $\beta$ -caroteno hidroxilasa y zeaxantina glucosilasa, respectivamente. Los estudios realizados en estos dos microorganismos significaron un gran avance en el entendimiento de la carotenogénesis tanto en lo que se refiere a las características de los productos proteicos que en ella participan como en la regulación de sus genes. Se han comparado las secuencias aminoacídicas de estas enzimas y observándose que poseen una serie de regiones bastante bien conservadas, las cuales corresponden a uniones a cofactor así como zonas que participarían en su sitio activo. Por otra parte, en *Myxococcus xanthus* se ha demostrado que la acumulación de carotenoides es estrictamente dependiente de la luz y ocurre cuando las células entran en fase estacionaria (Armstrong, 1997). Este organismo acumula como productos finales un éster de mixobactona y un éster de mixobactina, ambos son carotenoides monocíclicos derivados del  $\gamma$ -caroteno. Los estudios genéticos clásicos, han determinado que existe una serie de genes reguladores, llamados *car*, a diferencia de los genes estructurales de las enzimas de la ruta de biosíntesis de estos pigmentos, los cuales se designan *crt*.

Actualmente, se han aislado los genes que participan en la síntesis de carotenoides en una serie de bacterias y cianobacterias, tal como, el cluster completo de los genes crt de *Erwinia herbicola*, el cluster completo de *Flavobacterium* R1534 y el cluster de todos los genes crt de la bacteria marina *Agrobacterium aurantiacum* (Armstrong, 1994, Misawa *et al*, 1995). Adicionalmente, han sido clonados algunos genes de bacterias tales como *Thermus thermophilus* (Hoshino *et al*, 1993), *Staphylococcus aureus* (Wieland *et al*, 1994), *Streptomyces griseus* (Schumann *et al*, 1996) y otros.

Aún no se ha descrito el aislamiento de todos los genes que participan en la síntesis de carotenoides en especies de cianobacteria. Sin embargo, se han podido aislar algunos de los genes en organismos tales como: *Synechocystis* sp. (cepa PCC6803) (Martínez-Férez *et al*, 1992), *Synechococcus* sp. (cepa PCC7942) (Chamovitz *et al*, 1992), *Anabaena* sp. (cepa PCC7120) y otros.

En organismos eucariontes se han aislado algunos de los genes que participan en la síntesis de carotenoides. No obstante, en ninguna especie han clonado todos los genes estructurales que controlan las enzimas de una misma vía. Los primeros estudios genéticos, para identificar los genes que participan en la síntesis de estos pigmentos, en organismos superiores están descritos en dos especies de hongos, *Neurospora crassa* y *Phycomyces blakesleeanus* (Eslava *et al*, 1974). Sin embargo, el primer gen que codifica para una enzima que participa en la síntesis de carotenoides en un organismo eucarionte fue aislado a partir del análisis de una secuencia de cDNA sintetizado de un mensajero que se expresa durante la maduración del fruto en *Lycopersicon esculentum*, el cual fue llamado inicialmente pTOM5 (Ray *et al*, 1987). Actualmente se ha

determinado que codifica la enzima fitoeno sintetasa y es ahora conocido como *PSY1* (Bird *et al*, 1991). Así, mediante diferentes aproximaciones experimentales ha sido posible aislar una serie de genes de carotenogénesis en eucariontes, ver Tabla 1.

**Tabla 1.-** Ejemplo de algunos genes involucrados en la síntesis de carotenoides aislados desde organismos eucariontes.

Gen	Enzima	Organismo	Referencia
<i>al-1</i>	Fitoeno deshidrogenasa	<i>N. crassa</i>	Schmidhauser <i>et al</i> , 1990
<i>al-3</i>	GGPP sintetasa <sup>a</sup>	<i>N. crassa</i>	Nelson <i>et al</i> , 1989
<i>al-2</i>	Fitoeno sintetasa	<i>N. crassa</i>	Schmidhauser <i>et al</i> , 1994
PDH	Fitoeno deshidrogenasa	<i>C. nicotianae</i>	Ehrenshaft <i>et al</i> , 1994
CCS	Capsantina-capsorubina sintetasa	<i>C. annuum</i>	Armstrong & Hearst, 1996
PDS	Fitoeno deshidrogenasa	<i>C. annuum</i>	Hugueney <i>et al</i> , 1992
PDS-1	Fitoeno deshidrogenasa	<i>G. soja</i>	Bartley <i>et al</i> , 1991
<i>carB</i>	Fitoeno deshidrogenasa	<i>P. blakesleeanus</i>	Ruiz-Hidalgo <i>et al</i> , 1997.
PSY	Fitoeno sintetasa	<i>L. esculentum</i>	Bird <i>et al</i> , 1991
<i>CrtL</i>	Licopeno ciclasa	<i>L. esculentum</i>	Pecker <i>et al</i> , 1996
<i>CrtL</i>	Licopeno ciclasa	<i>N. tabacum</i>	Pecker. <i>et al</i> , 1996
PDS	Fitoeno deshidrogenasa	<i>Zea mays</i>	Li <i>et al</i> , 1996
BKT	$\beta$ -caroteno cetolasa	<i>H. pluvialis</i>	Lotan & Hirschberg, 1995

<sup>a</sup>GGPP: Geranilgeranilpírofosfato

Un microorganismo eucarionte carotenogénico es la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (anteriormente *Phaffia rhodozyma*). Este hongo acumula la xantófila astaxantina (3, 3'-dihidroxi- $\beta,\beta$ -caroteno-4,4'-diona) como producto final y es una especie interesante como modelo de estudio genético molecular de la síntesis de estos pigmentos, además de presentar proyecciones en cuanto a su utilización como organismo de producción industrial de esta xantófila (Johnson *et al*, 1977, Sanderson & Jolly, 1994).

*X. dendrorhous* es una levadura, aislada desde exudados de árboles en las regiones montañosas de Alaska y Japón (Miller *et al*, 1976). Se caracteriza por presentar una pared celular estructurada en multicapas, formar yemas enteroblásticas y clamidosporas que germinan por yemación. Además, no forma micelio, sintetiza carotenoides (principalmente astaxantina), produce compuestos amiloides y es capaz de fermentar azúcares. Sus células son elipsoidales de 3.8 a 7.5  $\mu\text{m}$  por 5.5 a 10.5  $\mu\text{m}$ , uninucleadas y frecuentemente yeman en el mismo sitio. Su contenido G + C es de 48.3 % (Miller *et al*, 1976).

En un principio *X. dendrorhous* fue clasificada como una levadura imperfecta, por desconocerse la fase sexual de su ciclo reproductivo, de origen basidiomicete (Miller *et al*, 1976; Yamada & Kawasaki, 1989; Yamada, *et al*, 1990). No obstante, recientemente se ha descrito su fase perfecta, en la cual el núcleo de la célula madre se conjuga con el núcleo de la célula hija (proceso llamado pedogámia), luego de esto se desarrolla un largo holobasidio de 70 a 80  $\mu\text{m}$  de longitud y 2 a 3.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, el cual presenta entre 4 y 6 basidiosporas terminales, ovales o elipsoidales de 4 x 8  $\mu\text{m}$ .

Debido a que este ciclo de vida es desconocido en levaduras basidiomicetes fue propuesto el nuevo género y especie *Xanthophyllomyces dendrorhous* para el estado perfecto de *Phaffia rhodozyma* (Golubev, 1995). No obstante, debido a un comportamiento diferente en la esporulación de la cepa tipo en esta levadura (CBS 5905, UCD 67-210), otros investigadores discuten este análisis proponiendo que *X. dendrorhous* sería una especie diferente a *Phaffia rhodozyma* (Kucsera *et al*, 1998).

En base al análisis químico de los intermediarios de la carotenogénesis de *X. dendrorhous*, se ha propuesto una vía de síntesis de astaxantina. En la figura 3 podemos ver una modificación de la vía a partir de geranylgeranylpirofosfato (GGPP) (Andrewes *et al*, 1976). Las características de las enzimas responsables de la síntesis de estos compuestos y el orden en que actúan aún, son materia de especulación. Actualmente, no se ha descrito el aislamiento de genes que estén involucrados en la síntesis de astaxantina en *X. dendrorhous*. Sin embargo, el análisis de mutantes afectados en la carotenogénesis y el análisis químico de los intermediarios de la vía, han llevado a plantear una serie de preguntas en torno a la síntesis de astaxantina en esta levadura. Debido a que la carotenogénesis en *X. dendrorhous* formaría parte de su metabolismo secundario, es posible proponer la existencia de tres tipos de genes involucrados en este proceso: a) genes estructurales que codifican por las enzimas involucradas directamente en las reacciones de síntesis de carotenoides, b) genes regulatorios que controlan la expresión de parte o la totalidad de los genes estructurales y c) genes que poseen un efecto indirecto sobre el fenotipo de pigmentación, como aquellos genes que controlan el flujo de precursores y cosustratos o facilitan la acumulación de estos compuestos (Lukner, 1990).

Considerando este último punto de vista, probablemente los mutantes que pueden entregar mayor información son aquellos que presentan mutaciones en genes regulatorios y estructurales. Ambos fenotipos son fácilmente reconocibles ya que presentan alteración en los niveles de pigmentos individuales o bien acumulan alguno de los pigmentos intermediarios, respectivamente.

En *X. dendrorhous* los mutantes del tipo regulatorio presentan patrones de pigmentación variable, pudiéndose encontrar mutantes subproductores de pigmentos, los que muestran niveles proporcionalmente bajo de todos los carotenoides presentes. O bien mutantes sobreproductores que presentan un patrón de pigmentación diferente en cuanto a la acumulación de carotenos y xantófilas, específicamente entre  $\beta$ -caroteno y astaxantina. (Girard *et al*, 1994., Calo *et al*, 1995).

Por otra parte, los mutantes que presentan alteración en los genes estructurales de la síntesis de astaxantina son principalmente de tres tipos. Dos de ellos son albinos y se diferencian en el nivel de acumulación de fitoeno (Girard *et al*, 1994) y el tercer grupo se caracteriza por acumular  $\beta$ -caroteno (An *et al*, 1989, Martínez, 1995).

A la luz de los antecedentes anteriores, una de las hipótesis que surge es que, dada la imposibilidad de obtener cepas mutantes que acumulen algún intermediario entre  $\beta$ -caroteno y astaxantina, las etapas de la síntesis de astaxantina a partir de  $\beta$ -caroteno estarían controladas por un solo gen, el cual codificaría por una enzima con las dos actividades de oxidación necesarias para la formación de astaxantina. Alternativamente, estas actividades enzimáticas podrían ser realizadas por polipéptidos individuales que formarían un complejo multienzimático, dependiente de varios genes estructurales.

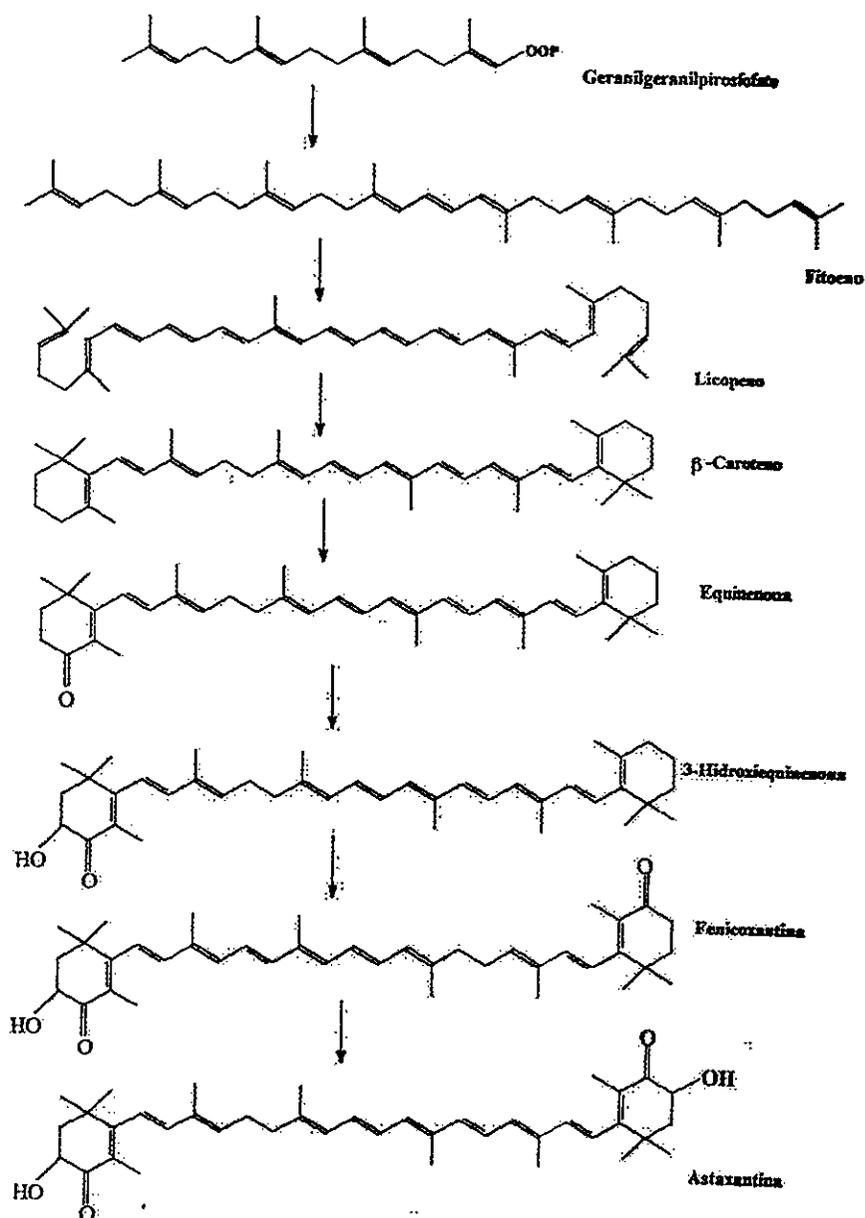


Figura 3.- Via de síntesis de astaxantina a partir de geranyl-geranylpirofosfato propuesta para *Xanthophyllomyces dendrorhous* (adaptado de Andrewes *et al*, 1976).

Otra interrogante que subyace a los antecedentes anteriores, es la posibilidad que otros pasos en la vía de síntesis de astaxantina sean controlados por un solo gen que codificaría por una enzima capaz de reconocer dos sustratos diferentes. Uno de éstos puede estar representado en la síntesis de lycopeno a partir de fitoeno. La literatura

describe para este paso la necesidad de introducir cuatro dobles enlaces (cuatro desaturaciones) para pasar desde fitoeno a licopeno, pudiéndose producir como intermediarios fitoflueno,  $\zeta$ -caroteno y neurosporeno, como ocurre en cianobacterias y plantas superiores (ver figuras 4 y 5) (Bramley & Mackenzie, 1988., Dogbo *et al*, 1988, Armstrong & Hearst, 1996, Hugueney *et al*, 1992.). Se ha descrito para estos organismos que existen dos genes que estarían involucrados en este paso (Hugueney *et al*, 1992., Linden *et al*, 1994., Armstrong & Hearst, 1996.), los genes CrtP y CrtQ, que codificarían para una fitoeno desaturasa, tipo CrtP, la cual produce  $\zeta$ -caroteno y una enzima llamada  $\zeta$ -caroteno desaturasa que llevaría al  $\zeta$ -caroteno hasta licopeno. Sin embargo, organismos tales como bacterias no-fotosintéticas y fotosintéticas anoxygenicas poseen la capacidad de sintetizar licopeno o neurosporeno a partir de fitoeno, mediante una sola enzima que es codificada por un gen llamado CrtI (fitoeno deshidrogenasa tipo CrtI) (figura 5) (Bartley *et al*, 1990, Fraser *et al*, 1992). Adicionalmente, en algunos hongos se ha aislado el gen que codifica para esta enzima describiéndose como una enzima del tipo CrtI (Schmidhauser *et al*, 1990., Ehrenshaft & Daub, 1994., Armstrong & Hearst, 1996).



**Hipótesis de Trabajo:**

“En la ruta de biosíntesis de astaxantina, en *Xanthophyllomyces dendrorhous*, el paso entre fitoeno y licopeno estaría controlado por un solo gen estructural, el cual codifica para una fitoeno deshidrogenasa del tipo CrtI, semejante a la descrita en algunas bacterias y hongos”.

**Una hipótesis alternativa sería:**

“Existiría más de un gen estructural que estaría involucrado en el paso de fitoeno a licopeno en *X. dendrorhous*, los cuales regularían el paso de fitoeno a  $\zeta$ -caroteno y luego de  $\zeta$ -caroteno a licopeno”.

Para poner a prueba esta hipótesis, en esta tesis se consideraron los siguientes objetivos específicos:

- Aislamiento del o los genes a partir de una genoteca de la cepa UCD 67-385 de *Xanthophyllomyces dendrorhous*.
- Realización de un mapa de restricción de los plásmidos aislados desde la genoteca de *Xanthophyllomyces dendrorhous*.
- Secuenciación y análisis de la secuencia nucleotídica de los genes aislados.
- Localización en el cariotipo electroforético de alguno de estos genes aislados.
- Transformación de mutantes de carotenogénesis de *X. dendrorhous* con alguno de estos genes.
- Transformación de la cepa silvestre de *X. dendrorhous* (UCD67-385) con productos de delección de los genes aislados.

## Aproximación metodológica al problema.

Para abordar el problema del aislamiento de alguno de los genes que participan en la biosíntesis de carotenoides en la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* se han utilizado diferentes estrategias.

### Estrategias metodológicas utilizadas en el desarrollo de esta tesis:

1° Análisis de la capacidad de complementar las mutaciones de las cepas atx3 y atx5 por el plásmido pPR142H2.

2° Construcción de un sistema heterólogo de síntesis de carotenoides.

3° Diseño de partidores a partir de zonas conservadas en la secuencias de aminoácidos de fitoeno deshidrogenasas de bacterias y hongos.

1° El plásmido pPR142H2 es un plásmido rescatado desde transformantes de *X. dendrorhous*. Estos transformantes fueron obtenidos luego de experimentos de transformación de cepas mutantes albinas (que acumulan fitoeno) y mutantes amarillas (que acumulan  $\beta$ -caroteno) con una genoteca de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* (Martínez *et al*, 1998).

Fragmentos *HincII* del inserto de 2,6 kb de este plásmido fueron subclonados en pBluescript SK-. Estos fragmentos fueron secuenciados y además utilizados como sonda para rescatar desde la genoteca de la cepa silvestre, clones que probablemente llevarían el gen, o parte del gen, que complementó las mutaciones. La hibridación en colonias, permitió aislar entonces 6 clones, dos de 5 kb, dos de 6 kb, uno de 8 kb y otro de 1 kb.

Un análisis de restricción permitió determinar que eran diferentes. Se probó la capacidad de cada uno de ellos para complementar la mutación presente en la cepa *atx5*, así como la mutación de la cepa *atx3*. Ninguno de estos plásmidos, por si solos, o en parejas fueron capaces de complementar las mutaciones presentes en estas cepas. Considerando estos resultados se decidió utilizar una segunda estrategia.

2° Esta estrategia se basa en la expresión de los genes de carotenogénesis de la bacteria *Erwinia uredovora* (Misawa, *et al*, 1990) en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Con este sistema se podrá obtener una cepa de esta levadura que sintetice  $\beta$ -caroteno, esta cepa posteriormente sería transformada con una genoteca de DNA total o cDNA de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*. Se espera que los plásmidos que lleven alguno de estos genes provocara que esta cepa cambie de color ya que le conferirá la capacidad de sintetizar un carotenoide diferente (por ejemplo equinenona, 3-OH-equinenona, etc). De esta forma, se podría aislar el o los genes que participan en la síntesis de astaxantina a partir de  $\beta$ -caroteno en *X. dendrorhous*.

Se utilizarán cuatro genes de *E. uredovora*, *crtB*, *crtE*, *crtI* y *crtY* que codifican para las enzimas, geranylgeranylpirofosfato sintetasa, fitoeno sintetasa, fitoeno deshidrogenasa y licopeno ciclasa. Ellos serán amplificados mediante PCR desde el genoma de *E. uredovora* y ubicados bajo el control del promotor divergente Gal1/10 en el vector centromérico YCp50, para lograr su expresión en *S. cerevisiae* (figura 6).

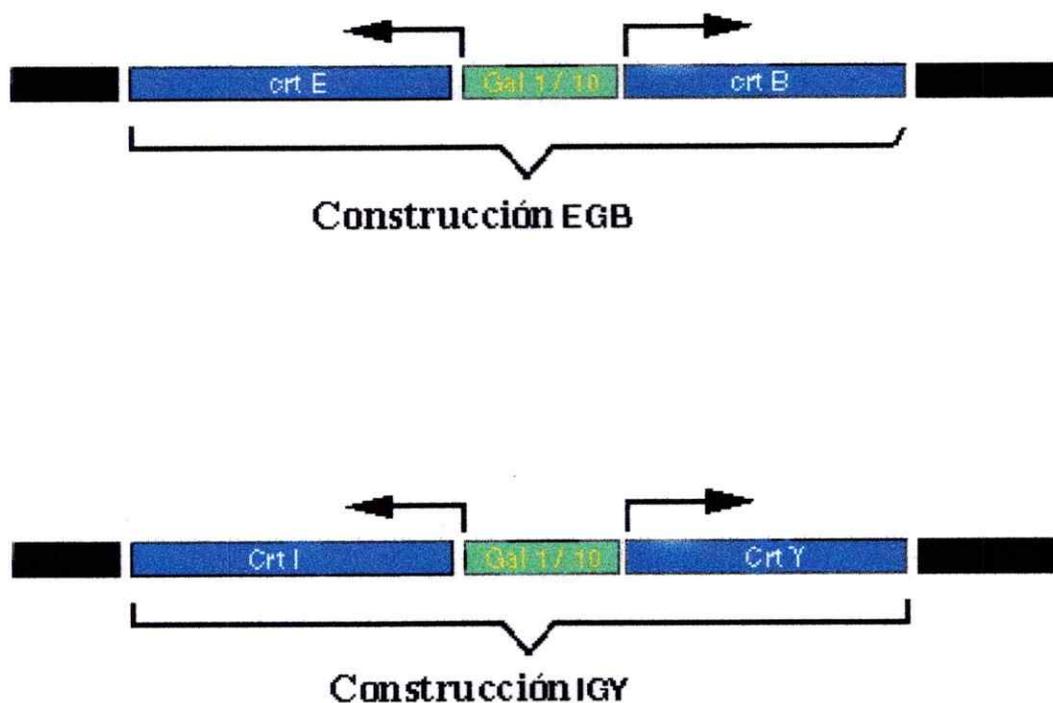


Figura 6.- Representación esquemática de la orientación y ubicación de los genes *crt* de *E. uredoovora*, bajo el control del promotor Gal 1/10 de *S. cerevisiae*. Las flechas indican el sentido de la transcripción de cada uno de los genes.

3º Un tercer acercamiento consistió en un estudio de las secuencias nucleotídicas y proteicas de algunos genes y enzimas que participan en la síntesis de carotenoides en organismos procariontes y eucariontes. Esto se realizó con la finalidad de encontrar regiones conservadas tanto en la secuencia nucleotídica como aminoacídica, de esta forma se podrían construir partidores que permitieran amplificar el gen o parte de él a partir del genoma o una genoteca de ésta levadura. Uno de los genes analizados fue el gen de la fitoeno deshidrogenasa, este posee una gran importancia en la síntesis de carotenoides, ya que se ha

probado que en otros organismos existe, a este nivel, regulación de la vía de síntesis de estos pigmentos (Ruíz-Hidalgo *et al*, 1997; Sandmann & Kowalczyk, 1989). Por otra parte, este paso también presenta otros aspectos de interés como son la presencia de uno o dos genes que participan en las cuatro reacciones de deshidrogenación del fitoeno para dar licopeno (ver figura 3). Al comparar las secuencias de genes y proteínas de fitoeno deshidrogenasas, presentes en las bases de datos, de organismos tales como *E. uredovora*, *Rhodobacter capsulatus*, *Agrobacterium aurantiacum*, *Lycopersicon esculentum*, *Capsicum annum*, *Glycine max*, *N. crassa* y *Cercospora nicotianae*, se logró determinar zonas que son bastante conservadas en la secuencia aminoacídica. De este modo, se resolvió elaborar partidores degenerados que permitieran lograr la amplificación de una parte del gen de la fitoeno deshidrogenasa de *X. dendrorhous*. Sin embargo, al realizar un examen más exhaustivo de la base de datos se encontró ingresada una secuencia para una posible fitoeno deshidrogenasa de otra cepa silvestre de *X. dendrorhous*. Al analizar esta secuencia, se pudo apreciar que los partidores diseñados anteriormente presentaban una gran similitud con zonas de esta secuencia por esto, se decidió diseñar partidores adicionales basados en la secuencia de la base de datos e intentar su amplificación en nuestra cepa silvestre UCD 67-385.

Un fragmento de 3,6 kb fue amplificado, clonado y secuenciado totalmente y en ambos sentidos. Al analizar esta secuencia se observó que existía una zona de gran similitud con la secuencia del gen de la enzima fitoeno deshidrogenasa de diferentes organismos. Para probar que efectivamente correspondía a dicha secuencia se transformó una cepa mutante de *X. dendrorhous* que acumula fitoeno, además se transformó la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* con una delección en esta secuencia con la finalidad de lograr reemplazar, por recombinación, el gen silvestre del genoma de esta levadura y obtener una cepa albina.

## MATERIALES Y METODOS

### I. Materiales

#### 1. - Material biológico.

##### 1.1. - Bacterias:

La cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Sambrook *et al*, 1989) fue utilizada como vehículo de clonado y obtención de plásmidos.

La bacteria carotenogénica *Erwinia uredovora* 20D3 ATCC 19321.

##### 1.2. - Levaduras:

La cepa silvestre de *Xanthophyllomyces dendrorhous* UCD 67-385 fue adquirida al American Type Culture Collection, (ATC 24202), Rockville, MD, U.S.A. Las cepas mutantes *Atx3* (albina), *Atx5* (amarilla), *Atx8* (albina), corresponden a mutantes de pigmentación obtenidas en nuestro laboratorio y derivan de la cepa silvestre UCD 67-385. Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* AB1380, FYB12-5D $\alpha$ , FYB11-8Ba, son parte del cepario de hongos del Laboratorio de Genética, de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Los genotipos de estas cepas son, AB1380a: *ade2\_1*, *can1-100*, *lys2-1*, *trp1*, *ura3 his5 [psi+]*, FYB12-5D  $\alpha$ : *ura3*, *trp1*, *leu2* y FYB11-8Ba: *ura3*, *leu2*, *his3*, *lys1*. Todas las cepas fueron mantenidas congeladas a -70 °C en medio YM más 17 a 25% de glicerol y son parte del cepario de hongos del Laboratorio de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

### 1.3 Plásmidos:

Los plásmidos pBlueScript SK<sup>-</sup> (Sambrook *et al.*, 1989), utilizado en el clonamiento de genes e YCp50 (Pouwels *et al.*, 1988) utilizado en clonamiento del promotor Gal1/10 de *Saccharomyces cerevisiae* y los genes de crtB, crtE, crtI y crtY de *E. uredovora*, para la expresión de ellos, en esta levadura.

### 1.4 Enzimas:

Las endonucleasas de restricción, DNA ligasa del bacteriofago T4, DNA polimerasa de *E. coli* (fragmento Klenow) y de *Thermus aquaticus* fueron adquiridas en Biolabs, Inc. U.S.A. y Gibco-BRL, U.S.A.

Las enzimas lisozima, novozima, proteínasa K y ribonucleasa A, fueron adquiridas en Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, U.S.A. y Gibco-BRL, U.S.A.

### 1.5 Acidos desoxirribonucleicos:

El DNA del bacteriófago lambda digerido con la endonucleasa de restricción *Hind* III, fue adquirido desde BioLabs Inc. U.S.A. y Bethesda Research Laboratories Inc. U.S.A. El DNA de esperma de salmón se adquirió a Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, U.S.A.

## 2.- Reactivos químicos y medios de cultivo.

Los reactivos de uso general y frecuente son p.a. Otros reactivos fueron adquiridos a las compañías que se indican:

A Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, U.S.A.: 2,4-dihidroxipirimidina (Uracilo), 8-hidroxiquinolina, adenina, ampicilina, ATP, bromuro de etidio, BSA (fracción V), cloruro de litio, ioduro de sodio, IPTG, L-arginina, L-histidina, L-leucina, L-metionina, L-treonina, L-triptófano, sacarosa, SDS, tetraciclina, tiamina (Vitamina B<sub>1</sub>), X-gal, cloruro de rubidio.

A Merck Química Chilena Soc. Ltda.: Ácido bórico, alcohol isoamílico, cloroformo, DTT, DL-valina, EDTA, etanol absoluto, fenol, formamida, glicerol, glucosa, L(+)-alanina, L-asparagina, L-fenilalanina, L-tirosina, L-serina, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, polietilenglicol 4000, Tris-HCl.

A Difco Laboratories, Detroit, Michigan U.S.A.: triptona, peptona, extracto de levadura, extracto de malta, agar-agar.

A Nutricional Biochemical Corporation U.S.A.: DL-isoleucina, L-cisteina.

A Du Pont, Company, U.S.A.:  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP, <sup>35</sup>S-dATP.

## 3. - Sistemas de purificación y marcado radiactivo de ácidos nucleicos.

Los siguientes sistemas fueron adquiridos a las compañías que se indican:

A Bio 101, California, U.S.A.: Kit.GeneClean II, a Gibco-BRL: Kit Random Primers

DNA labeling System, a United Stated Biochemical: Sequenase V(2.0), DNA sequencing Kit y a Promega el sistema de secuenciación de DNA fmol.

## II. Métodos

### 1. - Cultivos y mantención de Microorganismos.

#### 1.1. - Bacterias:

*Escherichia coli* fue crecida en medio de cultivo Luria Bertani (LB) (Apéndice 1) a 37 °C, con agitación constante. Para su mantención se creció hasta saturación, se adicionó ampicilina 100 µg/ml en el caso de cepas portadoras de plásmidos. Se tomaron 1400 µl del cultivo y se mezclaron con 400 µl de glicerol al 87% y se mantuvieron indefinidamente a -70 °C. *E. uredovora* fue crecida en medio de cultivo Luria Bertani (LB) a 30 °C con agitación constante. la mantención se realizó de igual forma que *E. coli*.

#### 1.2. - Levaduras:

Las cepas de *X. dendrorhous* fueron crecidas en medio YM (Apéndice 1) a 22 °C con agitación constante. Para los experimentos de fusión de protoplastos, la levadura fue crecida en medio mínimo Vogel, MM<sub>v</sub> (Apéndice 1). La mantención de las cepas de *X. dendrorhous* se realizó creciendo la levadura en YM durante 7 días hasta alcanzar una DO<sub>550nm</sub>=1.2 para luego congelarlas a -70 °C en presencia de glicerol a una concentración final de 20 a 30%. *S. cerevisiae* fue crecida en YEP (Apéndice 1) a 30 °C, con agitación constante. Las

cepas de *S. cerevisiae* se crecieron en YEP a 30 °C hasta alcanzar una  $DO_{550nm}$  de 1.0 y congeladas en glicerol a una concentración final de 20 a 30 %, a -70 °C.

## 2. - Formación de protoplastos.

La formación de protoplastos fue realizada de acuerdo al método desarrollado en nuestro laboratorio (Hermosilla *et al*, 1995). Para ello las células de *X. dendrorhous* fueron crecidas en 100 ml de medio mínimo  $MM_v$  hasta alcanzar una  $DO_{550nm}=1.2$ . Luego, las células se lavaron dos veces con KCl 0.8 M, se resuspendieron en 4.5 ml de KCl 0.8 M y se agregó novozima a una concentración final de 1 mg/ml, completando un volumen total de 5 ml. La mezcla fue incubada a 22 °C con agitación suave por aproximadamente 12 h, tiempo en el cual se obtiene un 100% de protoplastos. Los protoplastos fueron lavados tres veces con KCl 0.8 M, centrifugando a 1500 x g por 5 min en centrifuga refrigerada Sorvall (modelo RC-5B con un rotor de ángulo fijo SS-34) y resuspendidos en 2 ml del mismo estabilizador osmótico ( $1 \times 10^8$  células/ml). La concentración de protoplastos fue determinada mediante recuento directo con una cámara de Neubauer y por plaqueo en medio de regeneración YM-KCl-agar 0.7% (Apéndice 1).

### 3. - Pigmentos:

La extracción y cuantificación de los pigmentos en microgramos por gramo de levadura seca (ppm), se realizó utilizando una modificación al método descrito por An *et al.* (1989), a partir de 10 a 15 mg de peso seco de células. Las células fueron depositadas en un tubo de vidrio de 20 x 150 mm conteniendo 2.5 cm de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro. El tubo fue agitado durante 2 min en un vórtex a máxima velocidad y se agregó 6 ml de acetona. Se agitó nuevamente en vórtex por 1 min y se agregó 2 ml de una solución de NaCl (4 %) y 6 ml de éter de petróleo. El tubo fue agitado nuevamente en vórtex por 1 min y se centrifugó durante 6 min a 1935 x g en una centrífuga Sorvall a 4 °C. La fase éter fue traspasada a un tubo de vidrio y se midió el volumen recuperado. Se midió la absorbancia de la fase éter a 450 nm y se estimó la concentración de pigmentos, (An *et al.*, 1989).

#### 3.1. - Cromatografía líquida de alta resolución:

La separación de los pigmentos mediante HPLC de fase reversa se realizó basándose en lo descrito por Craft, 1992. Los pigmentos obtenidos según el punto 4 fueron resuspendidos en 200  $\mu$ l de éter de petróleo y alícuotas de 50  $\mu$ l fueron sometidas al análisis cromatográfico. Se utilizó como fase móvil una mezcla de acetonitrilo: metanol (9: 1), en una columna LiChrospher RP18, 5  $\mu$ m (Merck). Se aplicó un flujo de 1 ml/min durante toda la corrida cromatográfica (35 min) y

los pigmentos fueron registrados a una longitud de onda de 450 nm de. Para el análisis de fitoeno, los pigmentos fueron medidos a 287 nm.

#### 4. - Purificación de DNA.

##### 4.1. - DNA plasmidial:

Para aislar DNA plasmidial de cultivos bacterianos, se utilizó el método de la lisis alcalina (Birnboim & Doly, 1979). Las cepas bacterianas fueron crecidas en 10 ml de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente. el DNA fue resuspendido en 50  $\mu$ l de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA mM) con RNAsa A a una concentración de 30  $\mu$ g/ml. La solución fue incubada durante 15 min a 37 °C, finalmente la calidad y concentración del DNA fue visualizada por electroforesis en gel de agarosa (Sambrook *et al*, 1989) y utilizando el program ID1 de Kodak.

##### 4.2. - Extracción de DNA desde geles de agarosa:

En algunos casos fue necesario limpiar el DNA mediante "GeneClean". GeneClean II es un kit comercializado por Bio 101, Carlsbad, CA, USA (<http://www.bio101.com>). Para ello, 1  $\mu$ g de ácidos nucleicos aislados fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0,7% a 7 V/cm por 3 h. Posteriormente, se aisló un fragmento de gel que contenía el DNA de interés y fue purificado de acuerdo a lo descrito en el manual de este kit.

#### 4.3. - DNA genómico de *X. dendrorhous*:

Para obtener DNA de peso molecular sobre 23 kb, se utilizó un protocolo basado en la obtención de protoplastos (ver punto 2). Los protoplastos de *X. dendrorhous* fueron centrifugados a 1935 x g en una centrífuga Sorvall (rotor SS-34) durante 4 min y resuspendidos suavemente en 4.5 ml de Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 20 mM. Luego, se agregó 0.5 ml de SDS al 10% y se incubó la mezcla a temperatura ambiente por 5 min, después se agregó 50 µl de proteinasa K a 20 mg/ml y se incubó a 55 °C por 1 hr. Posteriormente, se agregó 10 µl de RNAsa a 10 mg/ml y se incubó a 30 °C por 30 min. La solución con el DNA fue desproteinizada agregando 5 ml de fenol saturado en tampón Tris-HCl pH 7.4 y se agitó suavemente durante 30 min. Las fases fueron separadas por centrifugación a 4000 rpm por 4 min, la fase acuosa fue transferida a un tubo Corex de 30 ml con una pipeta de vidrio de 10 ml. A la fase fenólica, se agregó 2 ml de solución Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 20 mM y se agitó suavemente por 30 min, separando las fases nuevamente por centrifugación a 4000 rpm por 4 min. Ambas fases acuosas se unieron y se agregaron 4 ml de fenol saturado. Después de agitar la mezcla por 30 min, se recuperó la fase acuosa mediante centrifugación a 1935 x g por 4 min. Este último paso fue repetido una vez más y posteriormente se agregaron 5 ml de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) a la fase acuosa. Se mezcló suavemente y ambas fases fueron separadas por centrifugación a 1935 x g por 4 min, recuperando la fase acuosa.

Para retirar restos de fenol desde la fase acuosa, se agregó 5 ml de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), agitando suavemente por 30 min y separando las fases por centrifugación. Por último, el DNA fue precipitado mediante la adición de 2.5 volúmenes de etanol absoluto e incubado en hielo por 10 min. Los ácidos nucleicos fueron retirados de la suspensión con ayuda de una pipeta de 10 ml en posición invertida y depositados en un tubo de microcentrífuga estéril. Luego de secar el DNA, este fue lavado con etanol al 70% y posteriormente resuspendido en 500 a 1000  $\mu$ l de tampón TE. Finalmente, el DNA fue analizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.5-0.6%.

#### 4.4. - Extracción de DNA genómico de *E. uredovora*.

La extracción de DNA genómico de *E. uredovora* fue realizada mediante una adaptación al método descrito por Misawa *et al*, 1990. Las células fueron crecidas en medio LB (apéndice 1) a 30 °C con agitación constante hasta llegar a fase estacionaria. Se agregó al medio de cultivo 0,2 ml de ampicilina 100 mg/ml y se incubó por una hora. Las células fueron centrifugadas a 4340 x g en una centrifuga Sorvall (rotor SS-34) durante 5 minutos y se resuspendieron en buffer TES (apéndice 2) y fueron incubadas a 68 °C durante 15 minutos. Luego las células fueron centrifugadas a 4340 x g por 5 minutos, resuspendidas en 7 ml de solución I con lisozima a 5 mg/ml y agregó 10  $\mu$ l de RNAsa a 100 mg/ml La mezcla fue incubada por 30 minutos a 37 °C, posteriormente se agregó 50  $\mu$ l de

proteínasa K a 20 mg/ml y se continuó incubando por 15 minutos. Luego, se agregó 0,7 ml de SDS al 10 % y se incubó la mezcla a 37 °C durante varias horas, hasta ver lisis total de las células. La solución con el DNA fue desproteinizada mediante dos extracciones con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y dos con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). En ambos casos las fases fueron mezcladas suavemente y separadas por centrifugación a 1935 x g por 4 minutos. Finalmente, el DNA se precipitó agregando 3 volúmenes de etanol absoluto frío y mezclando muy suavemente. Los ácidos nucleicos fueron retirados de la solución utilizando una pipeta de 10 ml en posición invertida y depositados en un tubo de microcentrífuga.

## 5. - Transformación genética.

### 5.1. - *E. coli*:

La transformación genética de la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*, fue realizada según el método de RbCl (Ulthermohlen, 1994). La cepa DH5 $\alpha$ , de *E. coli*, fue sembrada en medio LB sólido. Las placas se incubaron durante dos días a 37°C. Se tomaron tres colonias aisladas y con ellas se inoculó un matraz de 50 ml que contenía 7 ml de medio  $\phi$  ( Apéndice 1). El cultivo fue incubado con agitación constante hasta alcanzar una  $DO_{550nm} = 0.3$ . 5 ml del cultivo se utilizaron para inocular 100 ml de medio  $\phi$  precalentado a 37°C, el cual se incubó con agitación hasta alcanzar una  $DO_{550nm} = 0.48$ . Este cultivo fue distribuido en tubos Corex de

15 ml preenfriados, las células fueron precipitadas mediante centrifugación a 5000 rpm en una centrífuga Sorvall a 4°C y luego resuspendidas suavemente en 30 ml de solución TfβI (Apéndice 2). Posteriormente las células fueron precipitadas por centrifugación bajo las mismas condiciones, resuspendidas en 4 ml de solución TfβII (Apéndice 2), distribuidas en alícuotas de 50 ó 100 µl en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml y guardadas inmediatamente a -70°C.

#### 5.1.1. - Transformación:

Las células competentes de *E. coli* fueron descongeladas en hielo. Posteriormente, se adicionó el DNA transformante en un volumen no superior a los 10 µl y la mezcla fue incubada en hielo por 15 min, luego de lo cual fue sometida a un pulso térmico de 2 min a 42 °C. En seguida, las células fueron incubadas en hielo por 2 min y posteriormente a temperatura ambiente por 10 min. Con la finalidad de permitir la expresión del gen de resistencia codificado en el vector transformante, se adicionó a la mezcla 1 ml de medio LB y se incubó a 37 °C durante 1 hr. Finalmente, se sembraron alícuotas de 100 µl de células en placas con medio LB que contenía los antibióticos apropiados e incubadas a 37 °C por 12-16 h.

#### 5.1.2.- Selección de clones con inserto:

Para el plásmido pBluescript, la selección fue realizada directamente debido a que las bacterias transformadas fueron sembradas en placas con medio

LB-agar, ampicilina 100 µg/ml, IPTG 32 µg/ml, X-gal 32 µg/ml. En este medio de cultivo, las colonias que poseen el plásmido con un inserto que interrumpe al gen *lacZ*, son blancas y las que no poseen inserto son azules (Sambrook *et al.*, 1989).

## 5.2 .- *Xanthophyllomyces dendrorhous*

5.2.1. - Transformación mediante protoplastos de *X. dendrorhous*. Los protoplastos fueron precipitados mediante centrifugación a 1935 x g en centrifuga Sorvall a 4°C y resuspendidos en 1 ml de KCl 0,8 M, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.0. La suspensión fue dividida en alícuotas de 100 µl y depositadas en tubos Eppendorf de 1.5 ml y mantenidos en hielo. El DNA transformante se agrega en un máximo de 10 µl y se incubó por 10 min a 22 °C. Se agregó 1 ml de PEG 4000 26,4%, KCl 0,8 M, Tris-HCl 10 mM pH 8.0. CaCl<sub>2</sub> 10 mM y se incubó por 10 min a 22 °C. Los protoplastos fueron recuperados mediante centrifugación a 1000 x g por 5 minutos y resuspendidos en 1 ml de medio YM-KCl 0,8 M, CaCl<sub>2</sub> 5mM e incubados durante 1 hr a 22 °C para permitir la regeneración de la pared celular. Finalmente, se depositaron alícuotas de 100 µl de en 3 ml de medio YM-KCl 0,8 M, agar 0,7% a 45 °C y luego se depositó homogéneamente sobre la superficie de placas Petri que contenían medio YM-agar, KCl 0,8 M. Las placas fueron incubadas a 22 °C por 7 a 10 días.

### 5.2.2. - Transformación mediante Electroporación de *X. dendrorhous*.

La electrotransformación de *X. dendrorhous* fue realizada mediante una modificación a lo descrito por Kim *et al*, 1998. Un cultivo de 48 horas de crecimiento es diluido 100 a 200 veces en 200 ml de YM, el cultivo es crecido con agitación constante hasta una  $DO_{550nm}$  de 1.2. Las células son centrifugadas en centrifuga Sorvall (rotor SS-34) a 3600 x g durante 6 minutos. Luego las células fueron resuspendidas en 25 ml de buffer BD (apéndice 2) e incubadas durante 15 minutos a 21 °C. Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces con 25 ml de buffer STM (apéndice 2), frío y finalmente, resuspendidas en 0.5 ml de buffer STM (aproximadamente  $3 \times 10^9$  células/ml). A 60  $\mu$ l de células electrocompetentes de *X. dendrorhous* se agregó el DNA en un volumen de 5  $\mu$ l. Luego se mezclaron y fueron colocadas en una cubeta de 0.2 cm, Bio Rad. El pulso eléctrico es realizado con Gene Pulser Bio Rad y correspondió a 125 mF, 600 ohms, 0.45 kV/cm. Luego las células fueron resuspendidas en 0.5 ml de medio YM e incubadas durante 5 horas a 22 °C. Posteriormente fueron sembradas en placas Petri con medio YM-agar.

## 6. - Análisis de DNA.

### 6.1. - Digestión con endonucleasas de restricción:

Los análisis de restricción fueron realizados según lo descrito en Sambrook *et al*. (1989). Se incubó 0.5 a 1  $\mu$ g de DNA plasmidial con 1 a 2

unidades de enzima de restricción durante 3 h en tampón y temperatura requeridos por la enzima (según instrucciones del fabricante). Las reacciones de digestión fueron realizadas en un volumen final de 20 µl. Cuando fue necesario digerir el DNA plasmidial con dos enzimas de restricción, las reacciones fueron realizadas en forma simultánea utilizando tampón multicore 10X de Promega y los controles individuales respectivos. Cuando los productos de digestión eran requeridos para otra reacción enzimática el DNA fue desproteinizado con un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), luego con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y posteriormente precipitado con dos volúmenes de etanol a -20 °C. Finalmente, el DNA fue resuspendido en agua y o tampón TE.

Los productos de digestión fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa entre el 0,8 y 1,0%. Los tamaños de los fragmentos generados fueron calculados utilizando el programa computacional ID.1 de Kodak

## 6.2. - Reacción de la polimerasa en cadena (PCR).

### 6.2.1. – Partidores para el aislamiento de los genes de carotenogénesis de *E. uredovora*:

Los partidores fueron diseñados a partir del análisis de la secuencia del cluster de los genes de la biosíntesis de carotenoides de *E. uredovora* cuyo número de acceso de la base de datos del GenBank es D90087 (Misawa *et al*, 1990).

### 6.2.2. – Amplificación de DNA:

Como templado se utilizó entre 10 y 100 ng de DNA genómico de *E. uredovora* ó *X. dendrorhous* en un volumen de reacción de 25 µl que contenía buffer de PCR 1X pH 8,4 (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl), MgCl<sub>2</sub> 2mM, mezcla equimolar de los cuatro desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 0,2 mM, 1 µM de cada partidor y entre 0.2 y 0.5 unidades de DNA Taq polimerasa (Gibco-BRL) o en otros casos Vent-polimerasa (Biolabs). Las reacciones se realizaron en tubos de 0.2 ml en un termociclador Perkin Elmer, modelo 9600, los parámetros del ciclo fueron: Denaturación previa del DNA a 94 °C durante 3 minutos, luego 35 ciclos que incluían, denaturación a 94 °c por 30 segundos, alineación de los partidores a 55 °C por 30 segundos y una elongación a 72 °C durante 3 minutos. Finalmente una elongación final a 72 °C por 10 minutos.

### 6.3. - Hibridación DNA-DNA:

Los análisis de hibridación de ácidos nucleicos fueron realizados basándose en la técnica desarrollada por Southern (1975) y descrita en Sambrook *et al*, (1989 )y Rose *et al*, (1990).

### 6.3.1. - Marcado de las sondas:

Las sondas de DNA fueron marcadas con  $\alpha$ -[ $^{32}$ P]-dCTP mediante la técnica de "random primers" (Sambrook *et al.*, 1989). Para ello se utilizó el sistema "Random Primers DNA Labeling System" (Gibco-BRL) según instrucciones del fabricante. Para ello, 30 ng de sonda, disueltos en 20  $\mu$ l de agua fueron denaturados, mediante calentamiento en baño de agua por 5 min e inmediatamente el tubo fue depositado en hielo. Luego, se agregó 6  $\mu$ l de una solución que contenía una mezcla equimolar de desoxiribonucleótidos (dATP, dGTP y dTTP), 15  $\mu$ l de una mezcla de partidores sintéticos, 5  $\mu$ l de  $\alpha$ -[ $^{32}$ P]-dCTP (50  $\mu$ Ci) y 3  $\mu$ l de agua destilada (Apéndice 2). La solución fue mezclada suavemente y se agregó 1  $\mu$ l de DNA polimerasa I (fragmento Klenow) (Apéndice 2). La reacción fue incubada durante 3 h a 25 °C, luego se detuvo la reacción con 5  $\mu$ l de "Stop Buffer" (Apéndice 2). La sonda marcada fue separada de los nucleótidos no incorporados mediante sucesivas precipitaciones con dos volúmenes de etanol en presencia de acetato de amonio (1/10 de volumen de una solución 7.5 M). Finalmente, la sonda fue resuspendida en 100  $\mu$ l de agua y mantenida a -20 °C hasta ser utilizada.

### 6.3.2. - Hibridación:

Los experimentos de hibridación de DNA fueron realizados basándose en la técnica desarrollada por Southern (1975). La electroforesis se realizó en geles de agarosa, 0,8 % en presencia de bromuro de etidio 0.5 µg/ml, TAE 1X, se utilizó 7 a 10 µg de DNA genómico tratado con enzimas de restricción o bien 40 a 100 ng de DNA plasmidial. El tampón de corrida fue TAE 1X. Luego de la electroforesis, el gel fue irradiado con radiación UV de 260 nm y fotografiado con una referencia de distancia, para registrar la migración del DNA. Posteriormente, el gel fue sumergido en 300 ml de solución HCl 0.25 M por 15 min para depurar y luego en 300 ml de solución NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M a temperatura ambiente por 30 min para denaturar el DNA. Posteriormente, el gel fue neutralizado incubándolo en 300 ml de Tris-HCl 0.5 M (pH 7.4), NaCl 3.0 M durante 2 h. El DNA fue transferido a una membrana de nylon (Pall) como se describe en Sambrook, *et al.* (1989), utilizando una solución de citrato de sodio 10X (SSC 10X) como tampón de transferencia (Apéndice 2). La transferencia se realizó durante 16 a 20 h y el DNA fue fijado covalentemente a la membrana mediante irradiación del filtro con radiación UV de 260 nm durante 5 min. La membrana fue incubada con solución de pre-hibridación (Apéndice 2) durante 4 h a 42 °C y luego se incubó por 24 h a 42 °C en presencia de la sonda marcada, previamente denaturada mediante calentamiento a 90 °C por 5 min. Una vez terminada la hibridación, la membrana fue lavada dos veces con una solución de SSC 5X,

SDS 0.5% durante 15 min con agitación a temperatura ambiente, luego dos veces con una solución SSC 1X, SDS 0.5% a 37 °C por 15 min y finalmente, se lavó tres veces en SSC 0.1X, SDS 1% por 15 min a 65 °C, para una alta estrictez. En caso de necesitar baja estrictez, el filtro fue lavado dos veces por 15 min en SSC 1X, SDS 0.1% a temperatura ambiente y luego dos veces por 15 min en SSC 1X, SDS 0.1% a 37° C. Posteriormente, la membrana fue secada entre papel filtro y se dispuso sobre una plataforma de cartulina, la cual estaba previamente recubierta con film plástico (“alusaplast”), y todo fue cubierto con el mismo tipo de papel plástico. El armado fue puesto en una caja de exposición autorradiográfica con pantalla intensificadora Kodak, que contenía una placa autorradiográfica tipo R. La caja fue incubada a -70 °C por 2 h, para hibridación de DNA plasmidial o 12 a 24 h para hibridación de DNA genómico. Las placas fueron reveladas y fijadas según los procedimientos fotográficos rutinarios.

#### 6.4. - Hibridación en librería genómica.

Se utilizó una librería genómica en pBlueScript de *X. dendrorhous*, cepa UCD 67-385 (Martínez, 1995). Se analizaron 16 grupos provenientes de esta librería, cada uno de ellos conteniendo entre 100 y 150 clones recombinantes. De cada grupo se aisló DNA de acuerdo a Birnboim & Doly (1979), como se detalla en la sección 4.1. El DNA aislado de cada grupo fue digerido con la enzima de restricción *Bam* HI. La hibridación fue realizada según el procedimiento descrito

en la sección 6.3.2, excepto que se utilizó aproximadamente 1 µg de DNA por carril de cada grupo.

#### 6.4.1 - Hibridación de DNA en colonia:

La hibridación de DNA en colonia fue realizada según Sambrook (1989). Para cada grupo de la librería genómica de *X. dendrorhous*, se aislaron colonias por plaqueo en placas LB conteniendo ampicilina 100 µg/ml, X-gal 32 µg/ml, IPTG 32 µg/ml e incubando por 24 h a 37 °C. Se prepararon en réplica cinco placas con medio LB y ampicilina (100 µg/ml), cada una con una densidad de 100 colonias por placa para cada grupo analizado. Luego, se incubó por 24 h a 37 °C y se procedió a transferir las colonias de una de las réplicas a filtros de nylon BRL recortados circularmente con un diámetro menor al de la placa. Este filtro fue puesto sobre la placa y se marcó en cuatro posiciones de forma asimétrica mediante la perforación con una aguja estéril. Durante 5 min se dejó el filtro en contacto con la placa. Toda la manipulación de las placas fue realizada bajo campana para minimizar los riesgos de contaminación. Posteriormente, el filtro fue retirado por medio de pinzas delgadas y sometido a los procesos de denaturación y neutralización. Para la denaturación, el filtro fue puesto en contacto con papel Whatman humedecido con una solución de NaOH 0.5 N, durante 7 min. Para la neutralización el filtro fue puesto en contacto con papel Whatman saturado con Tris-HCl 1M, pH 8.0 por 5 min. Luego, el filtro fue depositado sobre papel Whatman saturado con Tris-HCl, pH 8.0, NaCl 1.5 M por

5 min. y lavado con una solución de SSC 2X (Apéndice 2). Por último el DNA fue fijado al nylon por irradiación con luz UV durante 5 min.

La prehibridación fue realizada de acuerdo a la sección 8.4.2 por 4 h. a 42 °C. La hibridación, fue efectuada en condiciones de hibridación estrictas en presencia de 50% de formamida, y a 42 °C durante 24 h. Se utilizaron 30 ng de sonda marcada, denaturada por simple ebullición durante 5 min.

Los lavados posthibridación fueron realizados en condiciones de alta estrictez, esto es dos veces con una solución de SSC 5X, SDS 0.5% durante 15 min, con agitación suave a temperatura ambiente, luego dos veces con una solución SSC 1X, SDS 0.5% a 37 °C por 15 min y finalmente, tres veces en SSC 0.1X, SDS 1% por 15 min a 65 °C. Para la autorradiografía, el nylon fue expuesto a -70 °C durante 48 h.

#### 6.5. - Secuenciación:

Se realizó mediante PCR, basado en la metodología básica descrita por Sanger *et al*, 1977. El procedimiento utilizado fue el descrito en el manual de instrucción del fabricante del kit fmol distribuido por Promega.

La secuencia completa de los clones que portaban los genes crt de *Erwinia uredovora* y de los clones que llevan los genes de carotenogénesis de *X. dendrorhous* fue obtenida del servicio de secuenciación de DNA automatizado del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Madrid, España.

### 6.5.1. - Gel de secuenciación: Sistema "Base Ace de Stratagene™".

Se preparó 50 ml de solución de poliacrilamida para un gel al 6% (Apéndice 2) y se agregó 30  $\mu$ l de TEMED y 250  $\mu$ l de persulfato 10% para iniciar la polimerización, mezclando suavemente. Con ayuda de una jeringa y evitando la formación de burbujas, se depositó la solución por la parte superior de dos placas de vidrio separadas por 0.2 mm. Una vez vertida la solución fue colocada una peinetas de "dientes de tiburón" invertida se selló con papel plástico (alusaplast) el borde superior para evitar la deshidratación y se dejó polimerizando a temperatura ambiente. Posteriormente el gel se montó en un sistema de electroforesis Stratagene™, la corrida fue realizada en Buffer TBE 1X. Se realizó una precorrida a 1500 volts para estabilizar la temperatura a 50 °C, las muestras fueron cargadas luego de ser calentadas a 72 °C por 2 min. Se realizó una corrida corta, de 120 min aproximadamente, y una más larga de 240 min. Una vez finalizada la electroforesis el gel fue transferido cuidadosamente a papel Whatman 3M y secado al vacío a 80 °C. Luego, el gel deshidratado fue expuesto a una placa autorradiográfica junto con una película Kodak en oscuridad aproximadamente 24 h y posteriormente se reveló. La autorradiografía fue interpretada en la forma convencional para determinar la secuencia de cada una de las muestras.

## 7. – Preparación de DNA cromosómico para campo pulsado.

### 7.1. - *X. dendrorhous* y *S. cerevisiae*.

*S. cerevisiae* y *X. dendrorhous* fueron cultivados en 100 ml de medio YEP en y medio MM<sub>v</sub>, respectivamente, hasta alcanzar la fase estacionaria. Las células se colectaron por centrifugación a 6900 x g por 10 min. y lavadas dos veces con una solución de EDTA 50 mM pH 8.0. Posteriormente las células de *S. cerevisiae* fueron resuspendidas en 1 ml de la misma solución conteniendo 25 µl de zimoliasa 2 mg/ml en tampón fosfato 10 mM y glicerol 50%. En el caso de *X. dendrorhous* se resuspendió en una solución de EDTA 50 mM pH 8.0 que contenía 10 mg/ml de novozima. Las suspensiones fueron mezcladas con 3 ml de agarosa de bajo punto de fusión 1%, EDTA 125 mM pH 8.0 (precalentada a 42 °C) y distribuida en moldes de 100 µl, dejando enfriar a 4 °C durante 15 min. Los bloques fueron sumergidos en 5 ml de solución LET (Apéndice 2) conteniendo 0.04 mg/ml de zimoliasa en el caso de *S. cerevisiae* y 0.4 mg/ml de novozima para *X. dendrorhous*, e incubados por 16 h a 37 °C. Después, los bloques fueron lavados dos veces con EDTA 50 mM y sumergidos en 5 ml de solución NDS con proteinasa K 1 mg/ml (Apéndice 2), incubando a 50 °C por 24 h. Por último, los bloques fueron lavados dos veces con EDTA 50 mM y mantenidos en esta solución a 4 °C hasta ser utilizados. Para un tiempo largo de almacenamiento fueron sumergidos en una solución de EDTA 50 mM, glicerol 50% y puestos a -20 °C.

## 7.2. - Electroforesis de campo pulsado:

El DNA cromosómico fue separado mediante electroforesis de campo pulsado del tipo CHEF en un equipo BioRad II (Chu *et al*, 1986) de 15 cm<sup>2</sup>. Para ello, se utilizaron geles de agarosa 0.85-1% en tampón TBE 0.5X (Apéndice 2). La electroforesis fue realizada a 14 °C en TBE 0.5X como tampón de corrida. Las condiciones de corrida correspondieron a un pulso inicial y final de 60 segundos durante 24 horas a 6 Volts/cm y luego un pulso de 120 segundos durante 24 horas. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio, 1 µg/ml, durante 6 h y después destañidos por 3 a 4 h en agua destilada. Finalmente, el DNA cromosómico fue visualizado mediante irradiación UV. La hibridación se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección 6.3.2.

## RESULTADOS

### 1. - Análisis de clones rescatados a partir de transformantes de *X. dendrorhous*.

A partir de un clon obtenido de transformantes de *X. dendrorhous* y denominado pPR142H2 (Martínez, 1995), se obtuvieron dos fragmentos de DNA, de 0.5 kb y 1.3 kb, al digerir con la enzima de restricción *HincII*. Estos fragmentos fueron subclonados en el plásmido pBluescript SK<sup>-</sup> generando de esta forma los plásmidos llamados pRL0.5 y pRL1.3 que portan los fragmentos de 0.5 y 1.3 kb respectivamente (figura 7). En esta condición fueron analizados por secuenciación y utilizados como sonda para el aislamiento de clones a partir de la genoteca de la cepa silvestre, UCD 67-385.

La secuenciación parcial de ambos clones, fue realizada utilizando los partidores T7 y T3. Del mismo modo fueron secuenciados los extremos del plásmido pPR142H2 (figura 8 y figura 9). Estas secuencias fueron comparadas con la base de datos del programa GCG, mediante el programa FASTA. El resultado del análisis no presentó similitud con otras secuencias o segmentos de secuencias pertenecientes a la base de datos.

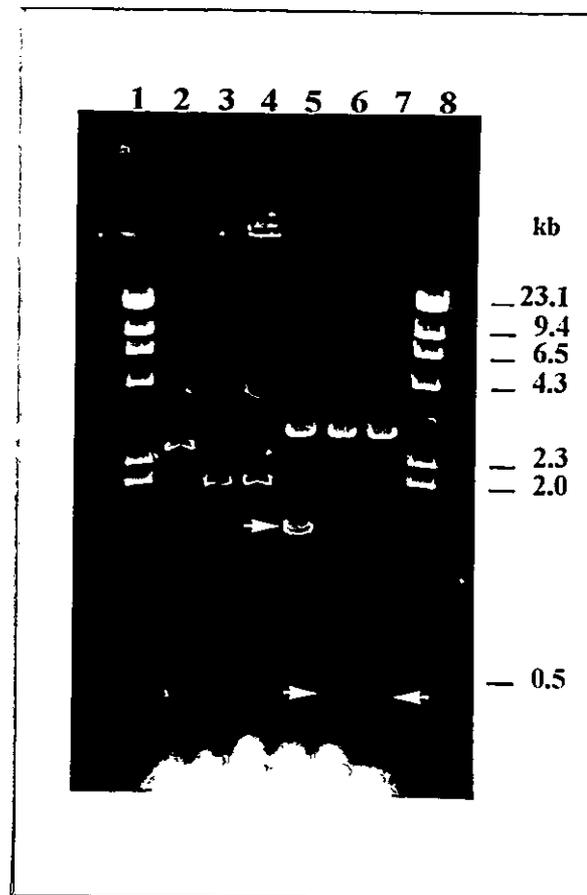


Figura 7.- Electroforesis en gel de agarosa 0,8%. Se muestra el DNA de los clones pRL1.3 y pRL0.5 derivados del clon pPR142H2.

Carriles 1 y 8: DNA del  $\lambda$ HindIII. Carril 2: pRL1.3. Carril 3 y 4: pRL0.5. Carril 5: pRL1.3 digerido con *HincII*. Carril 6 y 7: pRL0.5 digerido con *HincII*. Los tamaños del estándar de peso molecular ( $\lambda$ HindIII) son entregados en kilobases (kb). Las flechas indican los fragmentos de 1.3 kb y 0.5 kb

**A**

```

1                                     50
GATTCGTTTC CTTCTCAGAT GAGAATCTAA GATGATATCG ATACCGGCCGA

51                                     100
AACGGTCTGT TCAGGCAGGT CCATCGTTGT CTGCACACCG GTATGAAACG

101                                    150
CAAGATTGCT GTTGACCTG TTGATCTTTG TAGCCGAAAT TCACCGCAAG

151                                    200
GGATTATTGT CAAGTCCTAG ACGTCAATCT CGATGTGTTG TCTACTCGTT

201          212
CAAGCGTTGC TT

```

**B**

```

1                                     50
GGTCAACTGT CAAAGCCAAC AGCATAGAAG GTTAGAAAAG GATACATTTG

51                                     100
TCGAACGGCT AAACCTATAG GCTGAACTCA TTCTTCGCTC TAAATAAATA

101                                    150
AATGCGCGAA GGAAATAAGA AGAACAATAT AGTCATATAT ACACCATGGG

151          186
ATAATCTCAA GGTATCGTCT GTCATCTCGT TTTCGA

```

Figura 8.- La figura muestra la secuencias nucleotídica obtenidas a partir de los extremos más cercanos al sitio de multiclonamiento del plásmido pPR142H2.

A: Secuencia obtenida a partir del partidor T7, ubicado en la región de multiclonamiento, del plásmido pPR142H2.

B: Secuencia nucleotídica obtenida a partir del partidor T3, del sitio de multiclonamiento, del plásmido pPR142H2.

**A**

```

1                                     50
GCATATTTAA AAGAGCAAGG TAAAGAGAAA TAATGTTCCG GGAGAATGAG

51                                     100
AATGATGAAT GAGAAAGTGC ATCTAGTTCT AATTGTTTTT CACGTGTAGA

101                                    150
TCAATAGAGA CCCACGGACG ACCAACCTGG NGGCCGGGCA GTCTCGGCCG

151                                    200
TCAGAGTGAT GATTTCACTA CCGGGGTAAC CAAACGTGTC TTTACTGGGN

201                                    232
NNNGCGTGTG TATCATATCA GTTGATACAG GA

```

**B**

```

                                     50
TCGT CAAAGCCAAC AGCATAGAAG GTTAGAAAAG ATACATTTGT

51                                     100
CGAACGGCTA AACCTATAGG CTGAACTCCA TTCTTCGCTC TAAATAAATA

101                                    150
AATGCGCGAA GGAAATAAGA AGAACAATAT CACGATCATA TATACACCAT

151                                    200
GGGATAATCT CAAGGTATCG TCGGTCATCT CGTTTTGCAA GAGCTTCTT

201                                    228
CGTTCGATCA GCTTCACTCA ATTTCTAC

```

**C**

```

1                                     50
CACATGAATA AGACTGGATT ACTGTTACGA CAAACCCCGG CGATAGTTTT

51                                     100
TGTTTGACAT TGATGAAACG GCTTTCGTT CAGCCATACCT GTCACATAA

101                                    150
CATAGTCGT CTTTCAGACGA TTCGTTCTTG TATCTCTCTGG CCCGTCGTT

151                                    200
GAGGAAGATT GTACATTCAT CTCCATTCAT ACCAGATGCGG TGACTIONGG

201                                    250
TGGTGGTTCGC AACGATCTGG CTCCTAAGGA AATGGCAGGT TGGGATATT

251
ATAT

```

Figura 9.- Secuencia nucleotídica de los subclones pRL0.5 y pRL1.3 provenientes del plásmido pPR142H2. A: Secuencia nucleotídica del plásmido pRL0.5 utilizando el partidor. B: Secuencia nucleotídica del plásmido pRL1.3 utilizando el partidor T3. C: Secuencia nucleotídica del plásmido pRL1.3 utilizando el partidor T7

Se realizaron dos experimentos de hibridación en colonias provenientes de la genoteca de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* (Martínez, 1995). En este caso fueron utilizados como sonda los fragmentos *HincII* de 0.5 kb y 1.3 kb, provenientes del plásmido pPR142H2. De esta forma, al utilizar como sonda el fragmento de 0.5 kb se pudo aislar 3 clones y al utilizar como sonda el fragmento de 1.3 kb se aislaron 4 clones.

En la figura 10 se muestra el patrón electroforético de los siete clones, aislados desde la genoteca y digeridos con la enzima *BamHI*. Esta genoteca fue construida en el sitio *BamHI* del plásmido Bluescript, de esta forma, al digerir con dicha enzima se libera el inserto. Se puede observar que los clones aislados presentan insertos de diferentes tamaños, dos de 5.0 kb (pRL5a y pRL5b), dos de 6.0 kb (pRL6a y pRL6b), uno de 8.0 kb (pRL8), uno de 3.0 (pRL3) kb y uno de 1.0 kb (pRL1).

Estos clones fueron analizados mediante digestión con enzimas de restricción para determinar la existencia de relaciones de semejanza entre ellos. En la figura 11 se muestra un análisis de digestión de dos de estos clones, pRL3 y pRL5a. Aunque no fue posible encontrar un patrón de digestión semejante entre los clones, ellos fueron utilizados en experimentos de transformación para complementar mutantes afectados en la ruta de biosíntesis de carotenoides de *X. dendrorhous*.

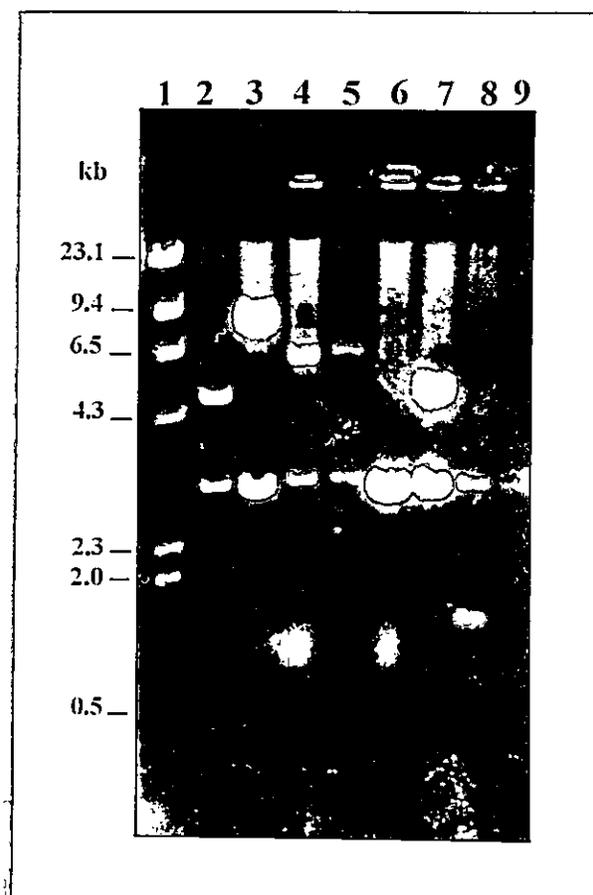


Figura 10. Electroforesis en geles de agarosa (0.8%) del DNA de los clones rescatados desde la genoteca de *X. dendrorhous*, digerido con *Bam*HI. Carril 1: DNA del fago  $\lambda$ /*Hind*III. Carril 2: pRL5a/*Bam*HI. Carril 3: pRL8/*Bam*HI. Carril 4: pRL6a/*Bam*HI. Carril 5: pRL6b/*Bam*HI. Carril 6: pBluescript SK<sup>+</sup>/*Bam*HI. Carril 7: pRL5b/*Bam*HI. Carril 8: pRL1/*Bam*HI. Carril 9: pRL3/*Bam*HI. Los tamaños del estándar de peso molecular ( $\lambda$ /*Hind*III) están en kilobases (kb).

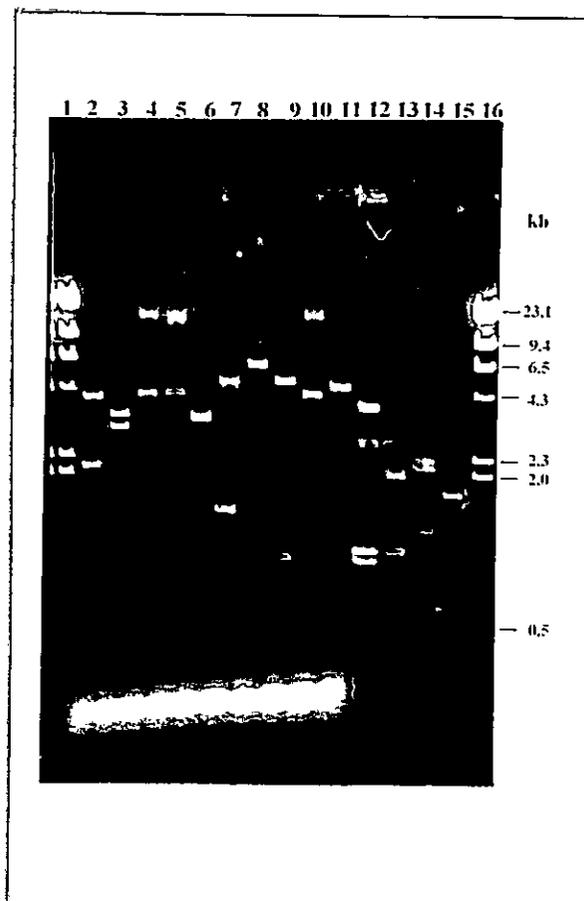


Figura 11.- Electroforesis en gel de agarosa (0.8%) del DNA de los clones pRL3 y pRL5a digeridos con endonucleasas de restricción. Carril 1 y 16 DNA del fago  $\lambda$ /HindIII. Carril 2: pRL3/AvaI. Carril 3: pRL3/BamHI. Carril 4: pRL3/BclI. Carril 5: pRL3/BglIII. Carril 6: pRL3/ClaI. Carril 7: pRL3/EcoRI. Carril 8: pRL3/EcoRV. Carril 9: pRL3/HindIII. Carril 10: pRL3/StuI. Carril 11: pRL3/StyI. Carril 12: pRL5a/PvuI. Carril 13: pBluescript/PvuI. Carril 14: pRL5a/BglII. Carril 15: pBluescript/BglII. Los tamaños del estándar de peso molecular ( $\lambda$ /HindIII) están en kilobases (kb).

1.1.- Transformación con los clones rescatados desde la genoteca de *X. dendrorhous*.

Se realizaron experimentos de transformación, mediante protoplastos, de mutantes de carotenogénesis con el DNA del plásmido pPR142H2 y DNA de los clones pRL. En la tabla 2 se muestra un resumen de los experimentos de transformación de las cepas mutantes Atx3 (albina) y Atx5 (amarilla), realizados con el plásmido pPR142H2.

**Tabla 2**

Experimentos de transformación, mediante protoplastos, de las cepas mutantes de *X. dendrorhous* Atx3 y Atx5, con el plásmido pPR142H2.

Cepa	Concentración de DNA ( $\mu\text{g}$ )	DNA linearizado	Concentración de protoplastos	% de regeneración
Atx5	7	-	$5 \times 10^7$	32
Atx5	12	-	$2 \times 10^7$	30
Atx5	9	-	$7 \times 10^7$	39
Atx5	8	+	$1 \times 10^7$	45
Atx5	14	+	$3 \times 10^7$	51
Atx5	10	-	$2 \times 10^7$	47
Atx3	6	-	$3 \times 10^7$	29
Atx3	9	+	$4 \times 10^7$	35
Atx3	8	+	$2 \times 10^7$	41

+ = DNA linearizado.

- = DNA no linearizado.

Las condiciones de los experimentos de transformación realizados en dos cepas mutantes (Atx3 y Atx5) de *X. dendrorhous* con los plásmidos rescatados desde la genoteca, son resumidas en la tabla 3. De este modo, se intentó determinar la capacidad de estos plásmidos para complementar estas mutaciones. Para examinar la posible complementación de estos mutantes se realizaron también experimentos de co-transformación con parejas de estos plásmidos aislados, considerando que cada uno de los plásmidos podría llevar solo un fragmento del gen (tabla 4).

En estos experimentos se observan diferencias en los porcentajes de regeneración de protoplastos, siendo en muchos casos inferiores o iguales al 30%. Estas diferencias se correspondían perfectamente con el cambio de "batch" de la enzima (Novozyma de SIGMA) utilizada para la remoción de la pared celular.

En ninguno de los experimentos de transformación, de estos mutantes, realizado con los plásmidos, en forma individual o en parejas, fue posible obtener transformantes que recuperaran la condición silvestre.

Tabla 3

Experimentos de transformación, mediante protoplastos, de las cepas mutantes de *X. dendrorhous* Atx3 y Atx5, con los plásmidos rescatados desde la genoteca.

Plásmido	Cepa	Concentración de DNA ( $\mu\text{g}$ )	*DNA linearizado	Protoplastos por ml	% de regeneración
pRL3	Atx5	4	-	$4 \times 10^7$	24
pRL3	Atx5	7	+	$1 \times 10^7$	29
pRL3	Atx5	9	+	$4 \times 10^7$	33
pRL5a	Atx5	6	+	$1 \times 10^7$	32
pRL6a	Atx5	9	+	$3 \times 10^7$	30
pRL6a	Atx5	10	-	$5 \times 10^7$	39
pRL6b	Atx5	6	+	$2 \times 10^7$	45
pRL6b	Atx5	8	+	$3 \times 10^7$	51
pRL8	Atx5	9	+	$1 \times 10^7$	47
pRL8	Atx5	12	+	$4 \times 10^7$	41
pRL8	Atx5	10	+	$2 \times 10^7$	35
pRL8	Atx5	10	-	$3 \times 10^7$	29
pRL5a	Atx3	8	+	$4 \times 10^7$	30
pRL6a	Atx3	10	+	$7 \times 10^7$	45
pRL6b	Atx3	8	-	$5 \times 10^7$	43
pRL6b	Atx3	8	+	$6 \times 10^7$	28
pRL8	Atx3	12	-	$4 \times 10^7$	32

\* - DNA no linearizado

Tabla 4

Experimentos de transformación, mediante protoplastos, de las cepas mutantes de *X. dendrorhous* Atx3 y Atx5, con parejas de plásmidos rescatados desde la genoteca.

Plásmidos	Cepa	Concentración de DNA ( $\mu\text{g}$ )	DNA linearizado	Protoplastos por ml	% de regeneración
pRL5a, pRL5b	Atx5	6 / 5	+ / +	$2 \times 10^7$	25
pRL5a, pRL6a	Atx5	6 / 8	+ / +	$3 \times 10^7$	21
pRL5a, pRL6b	Atx5	6 / 9	+ / +	$3 \times 10^7$	33
pRL5a, pRL8	Atx5	7 / 10	+ / +	$2 \times 10^7$	34
pRL6a, pRL8	Atx5	8 / 10	+ / +	$4 \times 10^7$	28
pRL6a, pRL8	Atx5	6 / 8	+ / +	$1 \times 10^7$	37
pRL6b, pRL8	Atx5	9 / 10	+ / +	$2 \times 10^7$	31
pRL6b, pRL8	Atx3	8 / 9	+ / +	$5 \times 10^7$	35

2. - Clonamiento de los genes crt de *E. uredovora*.
- 2.1. - Diseño de los partidores de PCR para la síntesis de los genes crtB, crtE, crtI y crtY de *E. uredovora*.

A partir de la secuencia nucleotídica del cluster que lleva los genes de la vía de síntesis de carotenoides, (Nº de acceso del GenBank es D90087) (Misawa *et al*, 1990), se diseñaron 4 parejas de partidores para amplificar los genes crtE, crtB, crtI y crtY, mediante PCR. Las reacciones que dichos genes controlan y que conducen a la síntesis de  $\beta$ -caroteno se muestran en la figura 12.

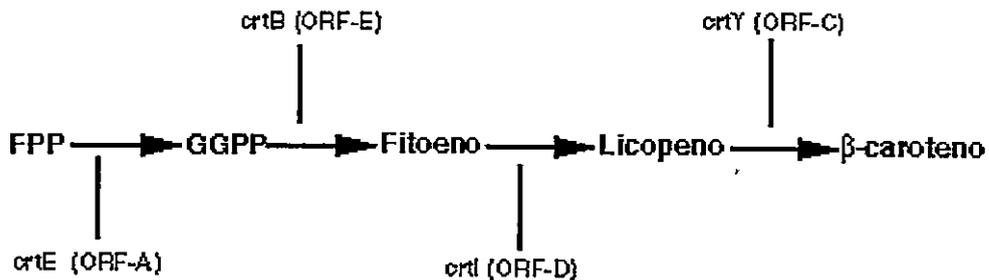


Figura 12. – Resumen de la vía de síntesis de carotenos de *E. uredovora*. En este caso, se muestran los genes e intermediarios de la vía, que serían necesarios para lograr la síntesis de  $\beta$ -caroteno en *E. coli* o *S. cerevisiae*.

2.1.1. -Partidores utilizados para la amplificación de los genes crt. de *E. uredovora*.

A cada partidor le fue adicionada una secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción, con el objeto de permitir una manipulación más fácil del gen amplificado una vez que éste ha sido clonado en pBluescript. De este modo, los sitios de restricción utilizados correspondieron a los descritos en la tabla 5.

**Tabla 5**

Secuencia nucleotídica de los partidores diseñados para amplificar los genes crtB, crtE, crtI y crtY de *E. uredovora*. Subrayados, en las secuencias, se indican los sitios de restricción.

Gen	Enzima	Sitio de restricción	Tamaño del gen (kb)	Secuencia nucleotídica de los partidores
crtE	Geranilgeranil pirofosfato sintetasa	BamHI	0.91	CrtE1: 5'- <u>ggatcc</u> atgacggctctgcgcaaaaaa- 3' CrtE2: 5'- <u>ggatcc</u> ttaactgacggcagcgagtt- 3'
crtB	Fitoeno sintetasa	BamHI	0.89	CrtB1: 5'- <u>ggatcc</u> atggcagttggctcgaaaag- 3' CrtB2: 5'- <u>ggatcc</u> ctagagcggcgctgccaga-3'
crtI	Fitoeno desaturasa	EcoRI	1.48	CrtI1: 5'- <u>gaattc</u> atgaaaccaactacggtaat-3' CrtI2: 5'- <u>gaattc</u> tcaatcagatcctccagca-3'
crtY	Licopeno ciclasa	BamHI	1.15	CrtY1: 5'- <u>ggatcc</u> atgcaaccgcattatgatct3' CrtY2: 5'- <u>ggatcc</u> ttaacgatgagtcgcatataa-3'

2.2. - Amplificación y clonamiento en el plásmido Bluescript SK<sup>-</sup> de los genes crt de *E. uredovora*.

Como resultado de los experimentos de amplificación con cada pareja de partidores, se logró obtener cuatro fragmentos de DNA de *E. uredovora* de igual tamaño a los descritos en la literatura (Misawa *et al*, 1990), (ver tabla 5 y figura 13) . Los cuatro genes, crtE, crtB, crtI y crtY, fueron clonados en el sitio *EcoRV* del plásmido Bluescript SK, para generar los plásmidos pBSE, pBSB, pBSI y pBSY respectivamente (figura 14). Los fragmentos amplificados pueden ser liberados del vector con las enzimas de restricción *BamHI* o *EcoRI* (figura 14). Se obtuvo varias colonias blancas a partir de cada una de las mezclas de ligado (pBluescript SK<sup>-</sup> más los genes crt). El DNA de estos clones fue analizado mediante enzimas de restricción y secuenciación, se logró determinar que llevaban un inserto de tamaño esperado y la secuencia parcial permitió confirmar en forma efectiva que los fragmentos de DNA clonados correspondían a estos cuatro genes. En la figura 15 se presenta un esquema ilustrativo de las construcciones realizadas, para lograr la expresión de estos cuatro genes de carotenogénesis en *S. cerevisiae*.

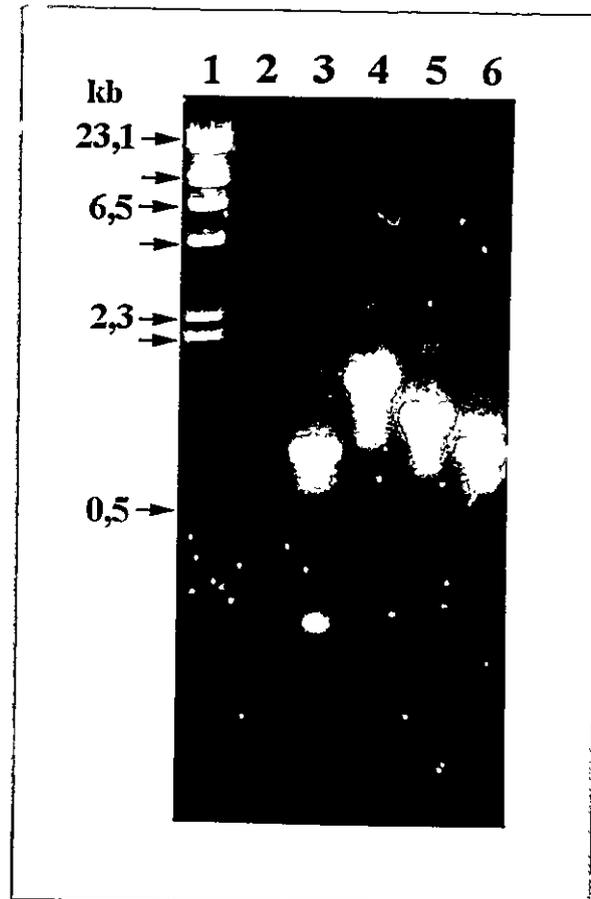


Figura 13.- Electroforesis en gel de agarosa (0,8%) de los productos de amplificación de los genes crt desde el genoma de *E. uredoovora*. Carril 1: DNA del fago  $\lambda$ /HindIII. Carril 2: Control, amplificación sin DNA. Carril3: Gen crtE. Carril 4: Gen crtI. Carril 5: Gen crtY. Carril 6 : Gen crtB. Los tamaños del estándar de peso molecular ( $\lambda$ /HindIII) son entregados en kilobases (kb).

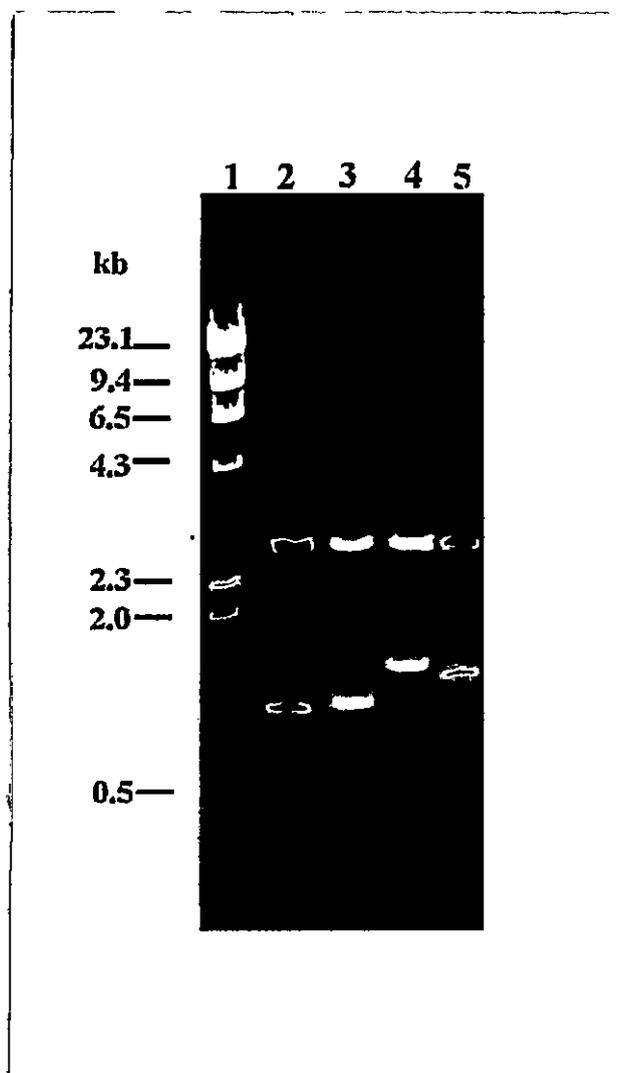


Figura 14.- Electroforesis en gel de agarosa (0.8 %) que muestra DNA de los plásmidos que llevan los genes crt de *E. uredovora*. Carril 1: DNA del fago  $\lambda$ HindIII. Carril 2: DNA del plásmido pBSB digerido con *Bam*HI. Carril 3: DNA del plásmido pBSE digerido con *Bam*HI. Carril 4: DNA del plásmido pBSI digerido con *Eco*RI. Carril 5: DNA del plásmido pBSY digerido con *Bam*HI. Los tamaños del estándar de peso molecular ( $\lambda$ HindIII) son entregados en kilobases (kb).

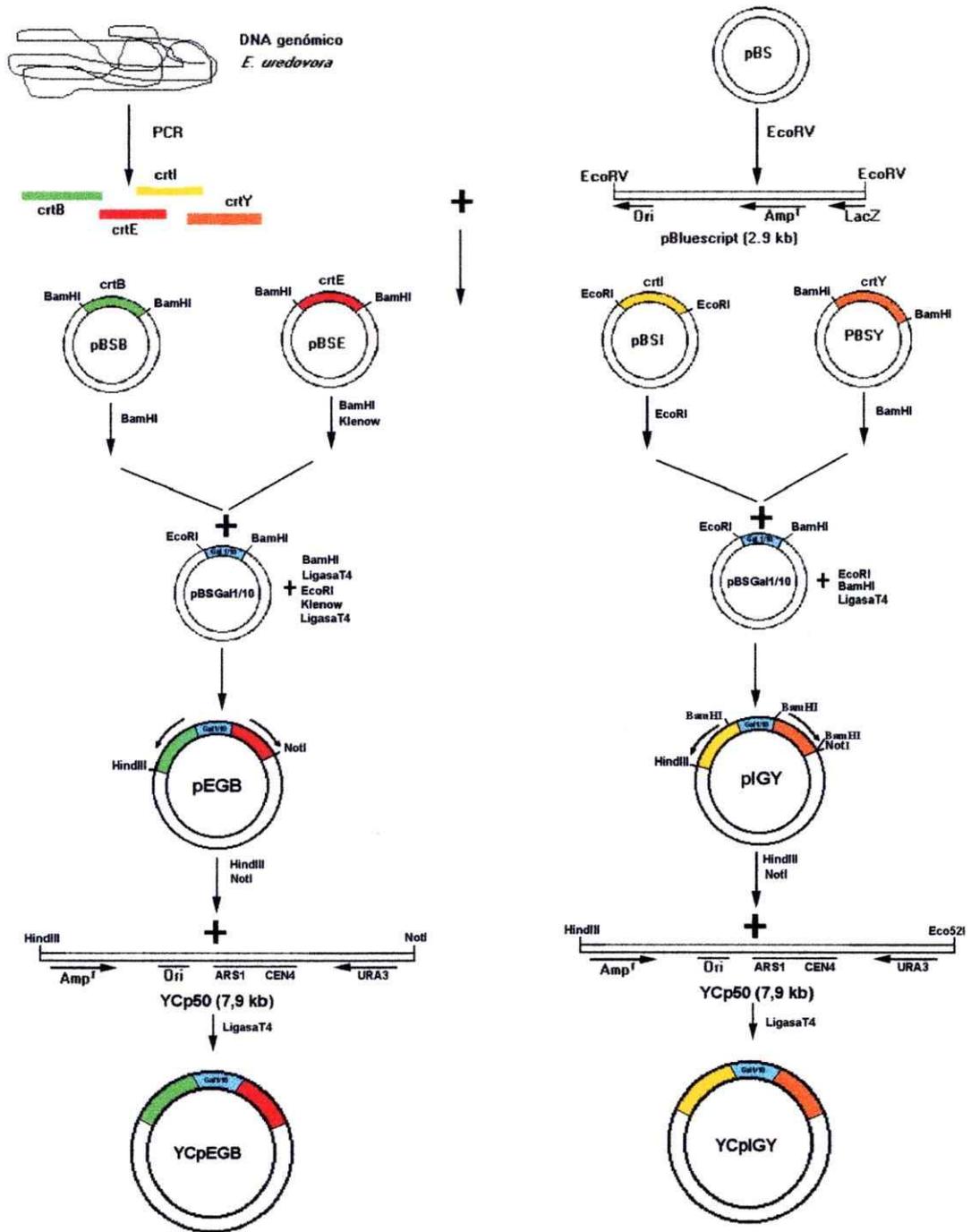


Figura 15.- Esquema de clonamiento de los genes *crt* de *E. uredovora* y fabricación de las construcciones (EGB y IGY), para la expresión de estos genes en *Saccharomyces cerevisiae*. Promotor Gal1/10 =

2.3.- Formación de las construcciones EGB e IGY en el plásmido Bluescript SK<sup>-</sup>. Y clonamiento de ellas, en el vector YCp50.

Con el propósito de ubicar los genes *crtE*, *crtB*, *crtI* y *crtY* bajo el control del promotor *Gal1/10*, se clonó este promotor en pBluescript SK<sup>-</sup>, ubicando los genes como se muestra en la figura 15, estas construcciones fueron denominadas EGB y IGY. Cada una de estas construcciones fue analizada mediante enzimas de restricción y resueltas en un gel de agarosa al 0.8 % como se muestra en las figuras 16 y 17. Mediante el análisis de restricción se determinó también si los genes se encontraban correctamente orientados con respecto al promotor *Gal1/10*. En el caso del plásmido pIGY la digestión con la enzima *BamHI* nos permitía determinar la orientación de los genes. La digestión de estos clones con *BamHI* da como resultado fragmentos de 4,3, 1,1 y 0,9 kilobases (kb) indicando que están apropiadamente orientados (figura 16, carril 5). Los resultados de un análisis similar pero para el caso del plásmido pEGB, utilizando las enzimas *AvaI* y *PvuI*, se muestra en la figura 17.

Luego, los segmentos EGB e IGY fueron subclonados en el vector centromérico de levadura YCp50, generando los plásmidos YCpEGB e YCpIGY respectivamente (Figura 15). El análisis de restricción de los constructos se muestra en las figuras 16 y 17.

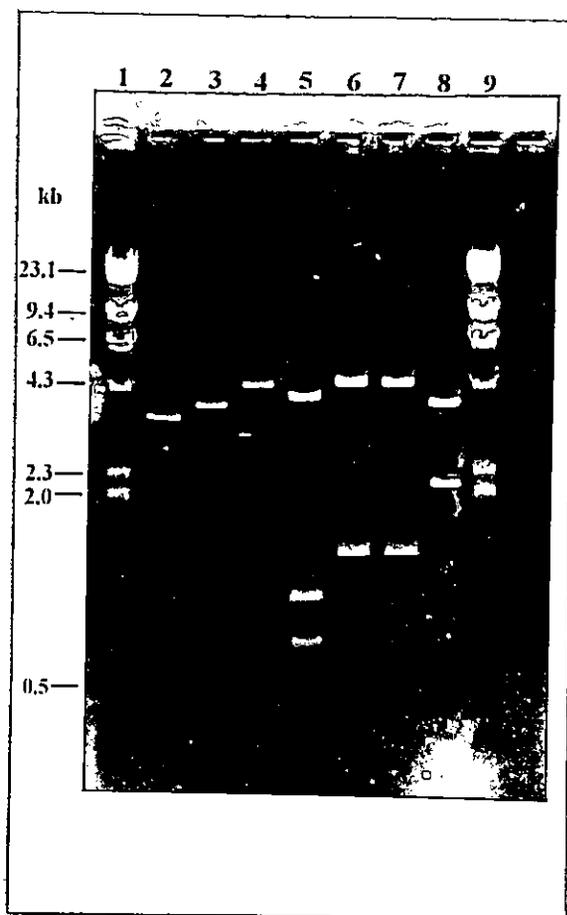


Figura 16.- Electroforesis en gel de agarosa (0.8%) donde se muestra el análisis de restricción del plásmido pIGY. Se determina la orientación de los genes (*crtI* y *crtY*) con respecto al promotor Gal1/10. pGY corresponde a una etapa intermedia en la construcción de pIGY. Carriles 1 y 9: DNA del fago  $\lambda$ /HindIII. Carril 2: pGY/BamHI. Carril 3: pGY/XhoI. Carril 4: pGY/HindIII. Carril 5: pIGY/BamHI. Carril 6: pIGY/HindIII. Carril 7: pIGY/XhoI. Los tamaños del estándar de peso molecular ( $\lambda$ /HindIII) son entregados en kilobases (kb).

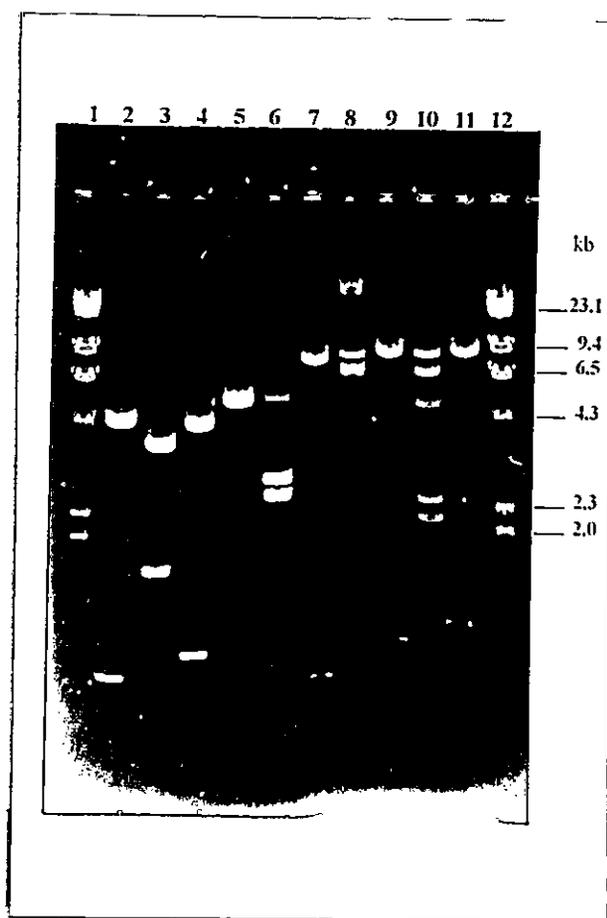


Figura 17.- Electroforesis en gel de agarosa (0.8%) se muestra el análisis de los plásmidos pEGB e YCpEGB mediante enzimas de restricción. Se determina la orientación de los genes *crtB* y *crtE* respecto al promotor Gal1/10. Carriles 1 y 12: DNA del fago  $\lambda$ /*HindIII*. Carril 2: pEGB/*BamHI*. Carril 3 : pEGB/*AvaI*. Carril 4: pEGB/*PvuI*. Carril 5: pEGB/*HindIII*. Carril 6: pEGB/*HindIII/XbaI*. Carril 7: YCpEGB/*BamHI*. Carril 8: YCpEGB/*AvaI*. Carril 9: YCpEGB/*PvuI*. Carril 10: YCpEGB/*PvuI/AvaI*. Carril 11: YCpEGB/*HindIII*.. Los tamaños del estándar de peso molecular ( $\lambda$ /*HindIII*) son entregados en kilobases (kb).

#### 2.4.- Transformación de *S. cerevisiae* y expresión de los genes *crt* de *E. uredovora*.

Las cepas FYBI2-5D $\alpha$  y FYBI1-8Ba de *S. cerevisiae* fueron transformadas con los plásmidos YCpEGB e YCpIGY, respectivamente. A través del análisis mediante PCR se pudo determinar si efectivamente los transformantes de *S. cerevisiae* poseían el plásmido con ambos genes en su interior. El análisis se realizó directamente desde las colonias obtenidas en las placas de transformación (figura 18).

Una vez establecidos que los transformantes portaban los plásmidos con los genes correspondientes y considerando que ambas cepas poseían un tipo de apareamiento diferente, se procedió a realizar un cruzamiento entre estos clones, para obtener una cepa diploide que llevara ambos plásmidos con los cuatro genes en su interior. Estas células diploides fueron analizadas por PCR, al igual como se realizó con sus parentales mencionados anteriormente, ver figura 19.

Las cepas fueron crecidas en medio mínimo con los suplementos apropiados agregándose, posteriormente galactosa, para inducir la expresión del promotor Gal1/10.

Para apreciar la producción de los pigmentos en estas cepas transformantes haploides y sus diploides se realizó una extracción y análisis de pigmentos mediante HPLC. Uno de estos análisis es mostrado en la figura 20. Como resultado se observa que las cepas transformantes, portadoras de los genes *crtB* y *crtE*, presentaban un pico de absorción a 286 nm. que correspondería a fitoeno. Sin embargo, en las cepas diploides analizadas se observa una modificación en la retención del pico de fitoeno que no corresponde a  $\beta$ -caroteno.

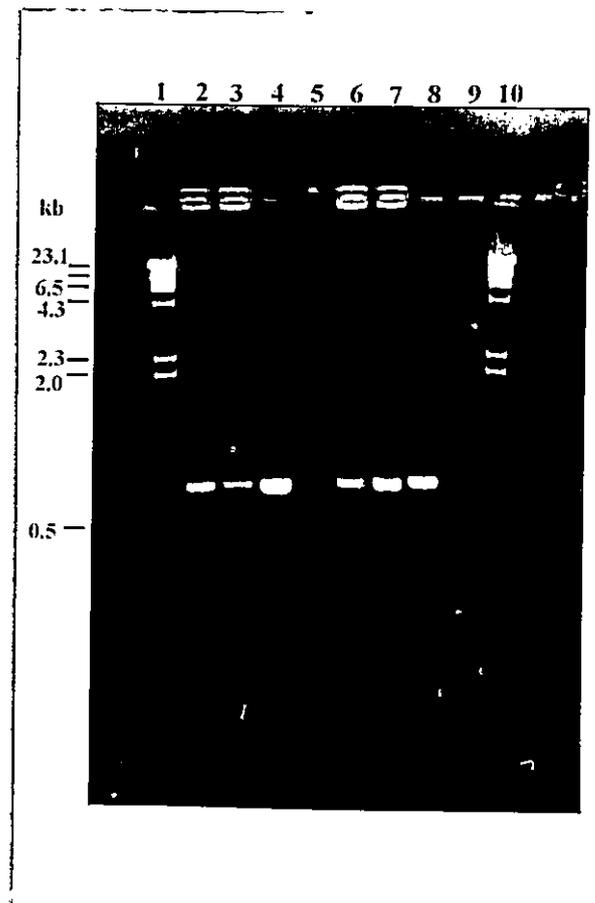


Figura 18.- Electroforesis en gel de agarosa (0,8%), se muestra el análisis mediante PCR de los transformantes de *S. cerevisiae* que llevan el plásmido YCpEGB. Se tomó parte de la colonia transformante y se disolvió en la mezcla de reacción de PCR, en algunos casos la levadura disuelta fue hervida y luego llevada al termociclador. Carril 1 y 10: DNA del fago  $\lambda$ HindIII. Carril 2 y 6: Transformante 9 hervido durante diez minutos. Carril 3 y 7: Transformante 9 sin hervir. Carril 4: Control, amplificación utilizando DNA del plásmido YCpEGB. Carril 5: Control, amplificación sin DNA. Carril 8: Control, amplificación utilizando DNA del plásmido YCpEGB. En las reacciones de los carriles 2 al 5 fueron utilizados partidores para el gen crtB. En las reacciones de los carriles 6 al 9 fueron utilizados partidores para el gen crtE. Los tamaños del estándar de peso molecular ( $\lambda$ HindIII) son entregados en kilobases (kb).

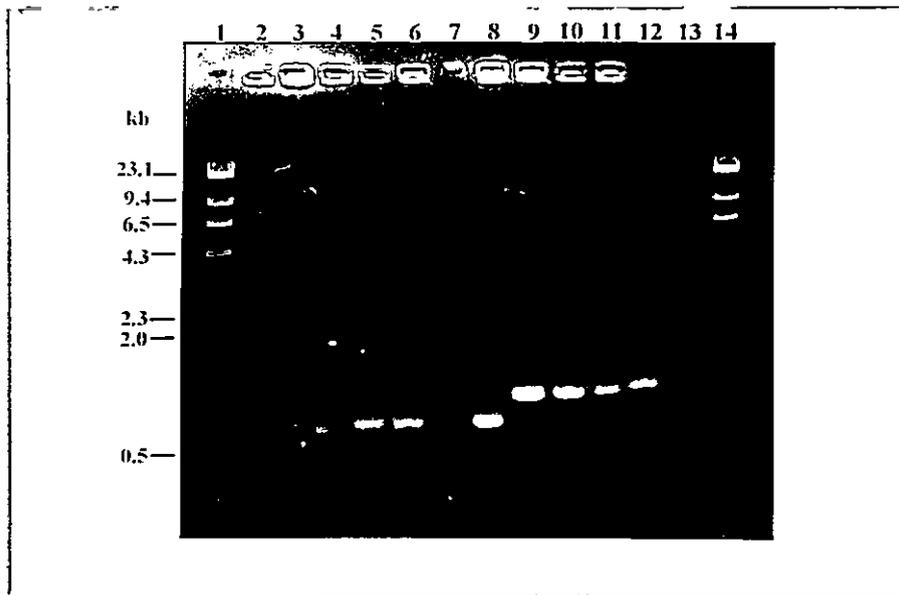


Figura 19.- Electroforesis en gel de agarosa (0,8%) se muestra el análisis, mediante PCR, de los diploides de *S. cerevisiae* que llevan los plásmidos YCpEGB e YCpIGY,. El análisis fue realizado al igual que en la figura 18. Carril 1 y 14: DNA del fago  $\lambda$ /HindIII. Carril 2: Cepa FYBI2-5D $\alpha$  que lleva el vector YCp50. Carril 3 y 9: Cepa diploide 1. Carril 4 y 10: Cepa diploide 2. Carril 5 y 11: Cepa diploide 3. Carril 6 : Cepa diploide 4. Carril 7: Control, plásmido YCpEGB. Carril 8: Gen crtE. Carril 12: Control, plásmido YCpIGY. Carril 13: Control, amplificación sin DNA. En las reacciones de los carriles 2 al 7 fueron empleados los partidores que permiten amplificar el gen crtE. En las reacciones de los carriles 9 al 13 fueron empleados los partidores que permiten la amplificación del gen crtI. Los tamaños del estándar de peso molecular ( $\lambda$ /HindIII) son entregados en kilobases (kb).

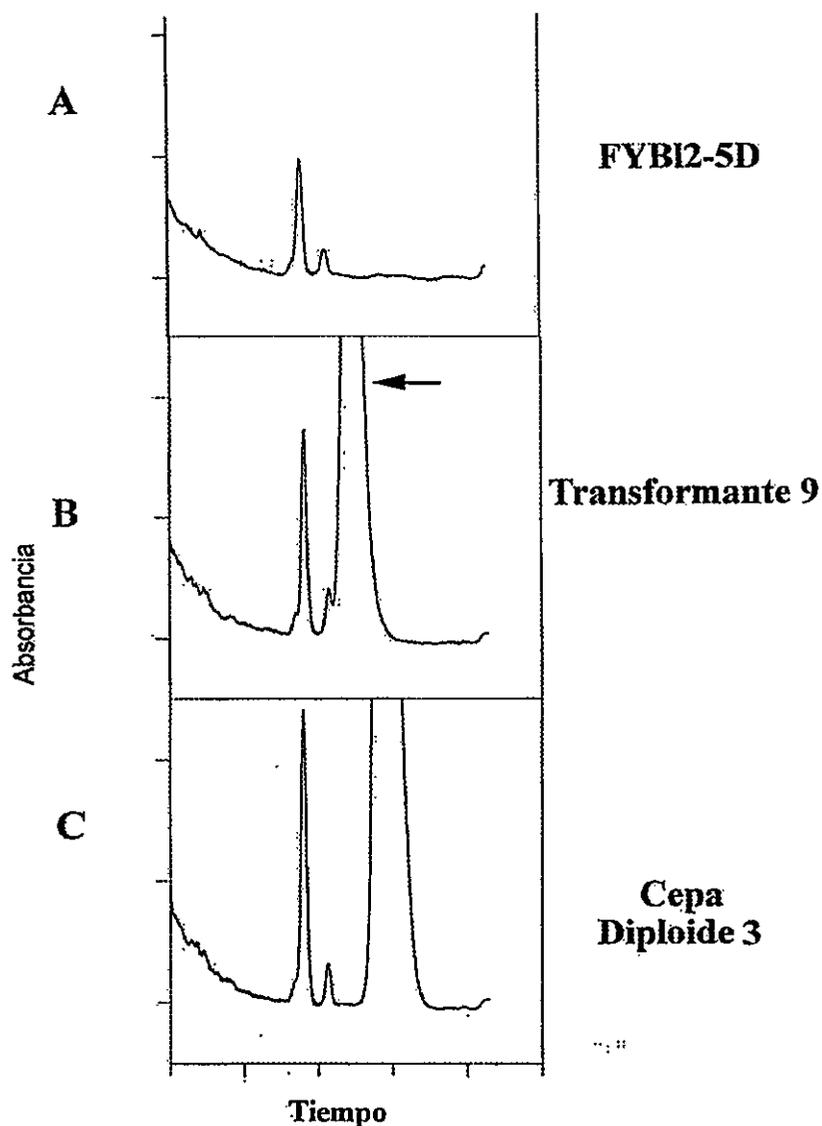


Figura 20.- Análisis mediante HPLC de los cepas transformantes y diploides, de *Saccharomyces cerevisiae*, que llevan los genes de carotenogénesis de *E. uredovora*.

En A se muestra el perfil cromatográfico de una de las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas para la transformación con los plásmidos YCpEGB e YCpIGY. En B el perfil correspondiente a la cepa transformante 9, esto corresponde a la cepa FYBI2-5D $\alpha$  transformada con el plásmido YCpEGB. En C se muestra el perfil cromatográfico de la cepa Diploide 3, esta cepa lleva ambos plásmidos, YCpEGB e YCpIGY. La flecha indica el pico que corresponde a fitoeno.

- 3.- Aislamiento, clonamiento y secuenciación del gen ATX3 (*crtI*), que codifica para la enzima fitoeno deshidrogenasa de *X. dendrorhous*.

Una comparación de las secuencias nucleotídicas de los genes, así como de las secuencias aminoacídicas de fitoeno deshidrogenasas de distintos organismos, presentes en la base de datos del Genbank, permitió distinguir dos zonas que son medianamente conservadas en dichas enzimas. De este modo, se confeccionaron partidores degenerados que permitieron amplificar y clonar una parte del gen ATX3 de *X. dendrorhous*. Posteriormente, un análisis más exhaustivo de la base de datos con el programa GCG (Genetics Computers Group) permitió encontrar una secuencia ingresada como el posible gen que codificaba para la enzima fitoeno deshidrogenasa de una cepa silvestre, correspondiente a la cepa UCD 67-210 de *X. dendrorhous*. Al comparar las parejas de partidores diseñados y utilizados anteriormente (P1-2 y P3-4) con la secuencia de la cepa UCD 67-210, se pudo observar que ellos, presentaban una gran similitud con regiones de ella, por lo que se decidió diseñar nuevos partidores utilizando ambas informaciones (los partidores iniciales y la secuencia de la cepa tipo de *X. dendrorhous*) para lograr amplificar el gen ATX3 desde el genoma la cepa UCD 67-385. Al realizar experimentos de amplificación con estos partidores, utilizando como molde DNA genómico de la cepa UCD 67-385, se obtuvo tres productos de amplificación: uno de 1,4 kb otro de 2,0 kb y uno de 3,6 kb (figura 21). Este último fragmento de 3,6 kb correspondería al gen completo de la fitoeno deshidrogenasa. Este fragmento de DNA de 3,6 kb fue clonado en el sitio *EcoRV* del plásmido Bluescript SK<sup>-</sup>. Luego de transformar la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* con la mezcla de ligado, se seleccionaron las colonias blancas, a las

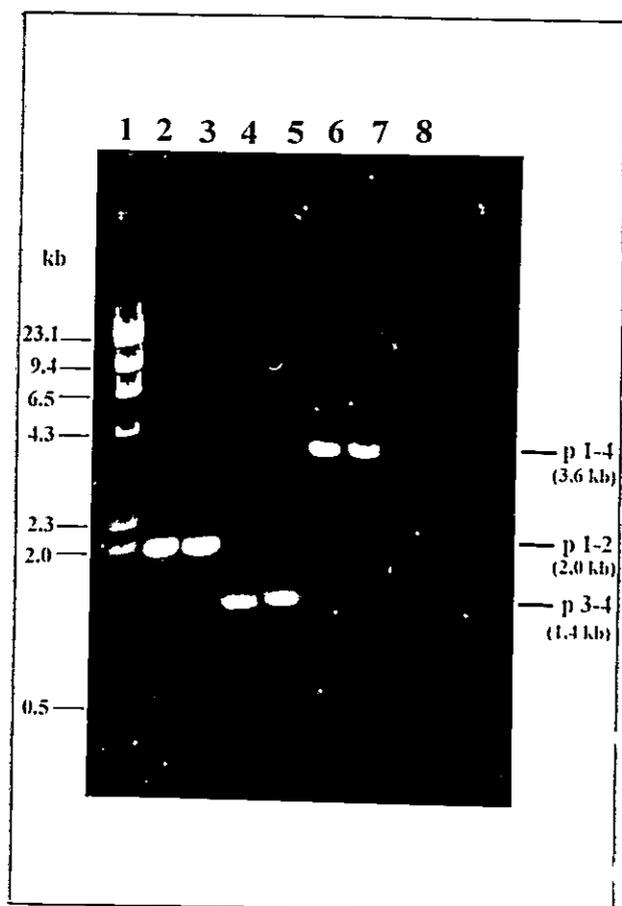


Figura 21.- Gel de agarosa 0,8 % en buffer TAE 1X. Se presentan los productos de amplificación obtenidos desde el genoma de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*, utilizando los partidores diseñados para la fitoeno deshidrogenasa. Carril 1: DNA del fago  $\lambda$ /HindIII. Carril 2 y 3: Producto de amplificación al utilizar la mezcla de partidores P1-2. Carril 4 y 5: Producto de amplificación al utilizar la mezcla de partidores P3-4. Carril 6 y 7: Producto de amplificación al utilizar la mezcla de partidores P1-4. Carril 8: Control de amplificación sin DNA.

cuales se les extrajo DNA plasmidial. El DNA de varios clones fue analizado mediante enzimas de restricción, todos ellos presentaban un inserto de 3,6 kb. Se escogieron dos clones al azar, que fueron llamados L2\_2 y L2\_5, los cuales presentaban el inserto en orientación opuesta, detectado por análisis de restricción de ambos clones como se muestra en la figura 22. Como resultado de la digestión de los clones L2\_2 y L2\_5 con las enzimas *BamHI*, *EcoRI* y *HindIII*, así como la doble digestión con ellas, se observa la diferencia en la orientación del inserto. En la figura 23 se presenta un esquema de los clones L2\_2 y L2\_5 con la ubicación de algunas enzimas de restricción presentes en el inserto que lleva el gen de la fitoeno deshidrogenasa (*atx3*) de la cepa UCD 67-385.

### 3.1 Secuenciación de los clones L2\_2 y L2\_5

Los clones, L2\_2 y L2\_5, fueron secuenciados completamente a partir de ambos extremos, utilizando un secuenciador automático ABS de Perkin Elmer. Para ello se utilizó partidores que permitían extender la secuencia desde los extremos de la región anteriormente secuenciada. Las secuencias totales de ambos clones son mostradas en las figura 24 y 25.

La comparación de estas secuencias permitió determinar que presentaban una gran similitud entre ellas, solo se observa una diferencia de 21 nucleótidos, con un 52 % de estas diferencias ubicadas en zonas no codificantes. Una comparación de las secuencias nucleotídicas se presentan en la figura 26. Las cajas representan las regiones codificantes.

Al analizar la secuencia mediante el programa GCG (Genetic Computer Group) y comparar las secuencias nucleotídicas de estos clones (L2\_2 y L2\_5) con las secuencias

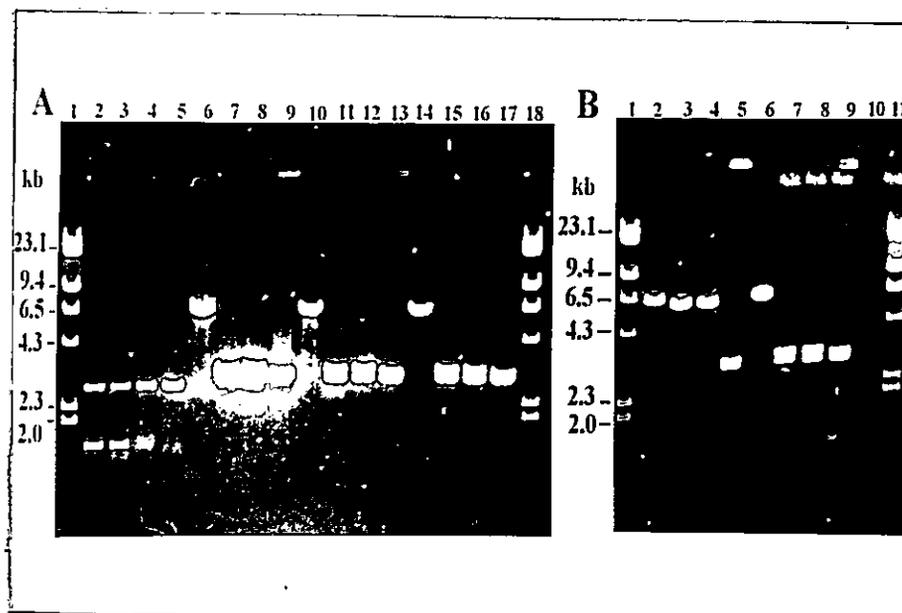


Figura 22.- Electroforesis en gel de agarosa 0,8 % (buffer TAE 1X). Se presentan seis clones que llevan como inserto el fragmento de 3,6 kb, amplificado a partir de la cepa silvestre de *X. dendrorhous* (UCD 67-385). Gel A: Carril 1 y 18 : DNA del fago  $\lambda$ HindIII. Carriles 2-5 Clon A2 digerido con *Bam*HI, *Eco*RI, *Bam*HI/*Eco*RI y *Hind*III/*Eco*RI, respectivamente. Carriles 6-9: ClonB2 digerido con *Bam*HI, *Eco*RI, *Bam*HI/*Eco*RI y *Hind*III/*Eco*RI respectivamente. Carril 10-13: ClonL2\_2 digerido con *Bam*HI, *Eco*RI, *Bam*HI/*Eco*RI y *Hind*III/*Eco*RI, respectivamente. Carril 14-17: ClonL2\_4 digerido con *Bam*HI, *Eco*RI, *Bam*HI/*Eco*RI y *Hind*III/*Eco*RI, respectivamente. Gel B: Carril 1 y 11: DNA del fago  $\lambda$ HindIII. Carril 2-5: Clon L2\_5 digerido con *Bam*HI, *Eco*RI, *Bam*HI/*Eco*RI y *Hind*III/*Eco*RI, respectivamente. Carril 6-9 Clon L4\_4 digerido con *Bam*HI, *Eco*RI, *Bam*HI/*Eco*RI y *Hind*III/*Eco*RI, respectivamente. Carril 10: vacio.

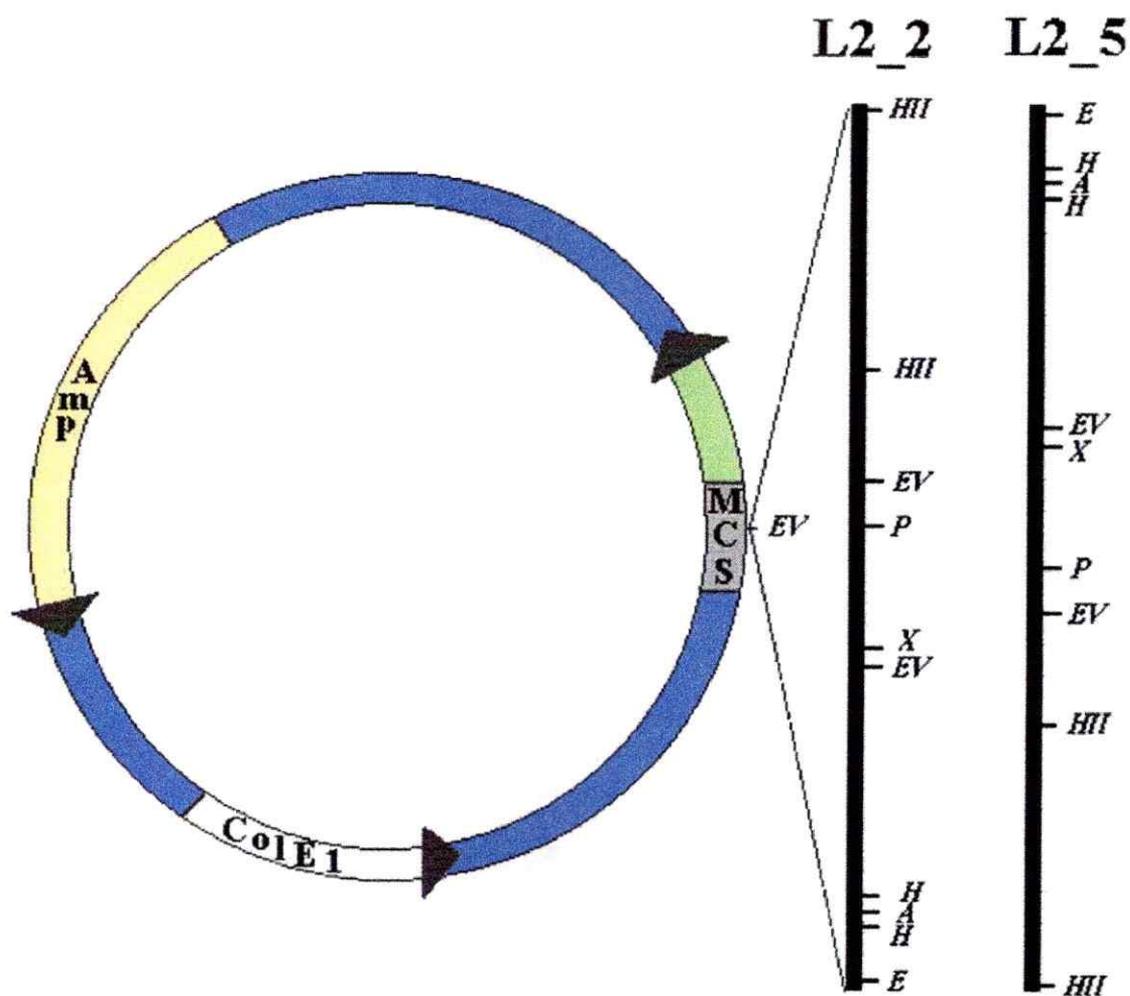


Figura 23.- Representación esquemática de los clones L2\_2 y L2\_5. Se muestra que ambos se encuentran clonados en pBluescript SK- en orientación opuesta. El fragmento de 3,6 kb fue clonado en el sitio *EcoRV* (EV) del sitio de multiclonamiento (MCS) de este plásmido. HII: *HincII*, P: *PstI*, X: *XbaI*, H: *HindIII*, A: *AvaI*, E: *EcoRI*.



CTTGCTGCTCAGTCCITGCAGAAGAACCTCCCTGGCTTCAGGCTACAGTTCATTTGGCCAAATCCTTGGCTCTTCACCCCTTCGAGG 2000  
 TCAGTGCATCTGCCAAAACATATTCGTTTCACATGGCCCTTTTTTGACTACTCGATAGTGTGTTGTCAATATCACCCAGTCTATCTGGACAAGATTTGTCG 2100  
 ATATTTCAAGACCGACAGATACGAAGAGTCTTCTCGTTTGCAGTGATGTACATGGTCAAAGCCCATACAGTGCGCCCGGAACATATTCCTTGTCTCCAA 2200  
 TACACCGAATGACCGAGGGCATCTGGTATCCGAGAGGAGGCTTTTGGGAGTTCGTGCTCATCCCTGATCCTTATGATTTGGTCTTTCCGCTTCAGAGAAAT 2300  
 TAACAATTACTGACAGAAAATCGGTATCAATGCACCGTCTTCTCCAATAGGGTTCCTAATACTCTCTTTAGATCGTCAAAGCCCAACAATCCCTCAGCCAAG 2400  
 TTCAAATTAACCGTCCAGTTTCCAGGTTCTTCTCTCTCCTGCCAAGGACCGGACTGGTGTGACTTTGAATCCGGCGGAGGAACATCACGGCCGATG 2500  
 TTTGGATGTCAATGCTGACCTCGTTTACGCCCTCCGAGCACTTGATTCCTGACGATGCCAGAAAACAAGATTTGGCCAACTGGGTGAAGTCAAGAGAAGTTG 2600  
 GTGGGCTGACTTAGTTGGTGGAAAAGAAGCTCAAAGGAAAGTTGCAGTAGTTGAGCTTCTACTGGAGCATGGACCGAATCCTGGACGGTCTGGGCGGACAC 2700  
 AGTGCTPAGTCCATCCCGCGAAAATCCTCTTTCAAATACTGTAAGTGCAGAGGCTGAAAGTTTATTTTACACTTTTATCTAGATATCTTCTTGGCCGAGGACT 2800  
 TCAAGGGATCATTCGACACAATCTTCGAGGAGTTGGGCTCTCCAGCCGATCCTTCTTTACGTGAACGTTCCCTCGCGAAATCGATCCTTCTGGCCGCTCC 2900  
 CGAAGGCAAAGATGCTATCGTCAATCTTTGTGGTATGTGCTATTCCTCTGTACTTTCGTTTTCGCCCGTAATGATGCTCGATTCCTCAAACATATATATC 3000  
 GAACCCCTTAGCCGTTGGCCATATCGACGCTTCGAACCCCTCAAGATTACAACAAGCTTGTGCTCGGGCAAGGAAATTTGTGATCCACACCGCTTCC 3100  
 GCCAAGCTTGGACTTCCCGACTTGAATAAATGATTTGGCAGAGAAGGTTACGATGCTCCCTCTTTGGGAGAAAAGAAATCAACCTCAAGGACGGAAGCA 3200  
 TCTTTGGACTGGCTCACAACTTTATGCAAAGTTCTTGGTTTCAGGCCGAGCACAGACATCCCAAGTATGACAAAGTTGTCTTTGTGGGGCTTCGACTCA 3300  
 TCCCGAACTGGGGTTCCTGCTTGGCTGGAGCCAAGTTAACTGCCAACCAAGTTCTCGAATCCTTTGACCCGATCCCCAGCTCCAGATCCCAATATG 3400  
 TCACCTCCGTACCATATGGAAAACCTCTCAAAATCAAAATGGAACGGGTATCGATTTCTCAGTCCAGCTGAAAGTTCAATGGATTTGGAGAGATGGGTATACC 3500  
 TTTTGGTATTTGATTTGGGGCCGTGATCGCTCGATCCGTTGGTGTCTTCTGAAATTC 3563

VIII

IX

X

XI

Figura 24.- Se presenta la secuencia nucleotídica total del inserto del clon L2\_2. En mayúscula la secuencia correspondiente al gen de la fitoeno deshidrogenasa de *X. dendrorhous*. Las zonas en amarillo corresponderían a las regiones codificantes de este gen (exones). La zona subrayada codificaría para la región de la proteína que uniría nucleótido. La caja en celeste sería la región codificante que en la proteína dará lugar al sitio de unión a carotenos (fitoeno). En números romanos y de color rojo se indican los intrones de este gen.



2000 GCTTGTGCTCCTGCAGAAAGAACTTCCCCTGGCTTGCAGCAATCTTACGGCTACAGTTCAATGGCCAAATCCTGGCTCTTCAACCCCTTCGAG  
 2100 GTCAAGTACATCTGCCAAAACATATTCGTTTACATGGCCCTTTTTTGGACTATCGATAGTGTGTCAATATCACCAGTCTATCTGGACAAGAGTTTGTCTC  
 VIII  
 2200 GATATTTCAAGACCGACAGATTAACGAAGAGTCTTCTCGTTTGCAGTGATGTACATGGGTCAAAGCCCATACAGTGGCCCGGAACATATTCCTTGTCTCCA  
 2300 ATACACCGAATTTGACCGGAGGCACTCTGGTATCCGAGAGAGGCTTTTTGGCAAGTTCGTGCTCATCCTGATCCTTATGATTTGGTTCTTTCCGCTTCAGAGAA  
 IX  
 2400 TTAACAATTAAGTACAGAAAATCGTATCAATGCACGGCTTCTCCAATAGGGTTCCTAATACTCTTTCAGATCGTCAAGCGCAACAATCCCTCAGCCAA  
 2500 GTTCAATTTCAACGGTCCAGTTTCCAGAGTTCTTCTCTCTCTGCCAAGGACCGGACTGGTGTTCGACTTGAATGGGCAAGGAAACACCACGCCGAT  
 2600 GTTGGGATTTGGCAATGCTGACCTCGTTACGGTTCCGAGCACTTGATTTCTGACGATGCCAGAAAACAAGATTTGGCCAACCTGGTGAAGTCAAGAGAAGTT  
 2700 GGTGGGCTGACTTAGTTGGTGAAGAAGCTCAAGGGAAGTTGCAGTAGTTGAGCTTCTACTGGAGCATGGACCGAATCGTGGACGGTCTGGGCGGACA  
 2800 CAGTCCGTAGTCCATCCCGGAAATCCTCTTTCAAAATCGTAAGTGCAGAGCTGAAGTTTATTTTACACTTTTATCTAGATATCTTCTTGGCCCGAGGAC  
 X  
 2900 TTCAAGGATCATTCGACACAATCTTCGAGGAGTTGGGTCTCCCAGCCGATCCTTCTTTTACGTGAACGTTCCCTTCGGCAATCGATCCTTCTGCCGCTC  
 3000 CCGAAGGCAAGAGATGCTATCGTCAATCTTGTGGTATGTGCTATCTCTGTACTTTCGTTTTTCCGCCCGTAATGATGTCTCGATTCICAACAATATATAT  
 XI  
 3100 CGAAACCCCTTAGCCGTGTGGCCATATCGACGCTTCGAACCCCTCAAGATTACAACAAGCTTGTGTCTCGGGCAAGGAAGTTTGTGATCCACACGCTTTC  
 3200 CGCCAAAGCTTGGACTTCCCAGCTTTGAAAANAATGATTTGTGGCAGAGAAGTTACCGATGCTCCCTCTTTGGGAGAAAAGAAATCAACCTCAAGGACGGAAGC  
 3300 ATCTTGGGACTGGCTCAACAATTTATGCAAGTTCTTGGTTTTCAGGCCGAGCACCAGACATCCCAAGTATGACAAGTTGTTCTTTGTGGGGCTTCGACTC  
 3400 ATCCCGGAACCTGGGTTCCCATCGTCTGGCTGGAGCAAGTTAACTGGCAACCAAGTTCTCGAATCCTTTGACCGATCCCCAGCTCCAGATCCCAATAT  
 3500 GTCACTCTCCGTACCATATGGAAAACCTCTCAAAATCAAATGGAACGGGTATCGAATTCAGGTCCAGCTGAAGTTCAATGGATTTGGAGAGATGGGTATAC  
 CTTTTGGTATTGTTGATTTGGGCCCGTGTGATCGCTCGATCCGTTGGTGTCTTGTGATTC 3564

Figura 25.- Se presenta la secuencia nucleotídica total del inserto en el clon L2\_5. En mayúscula se indica la secuencia correspondiente al gen de la fitoeno deshidrogenasa de *X. dendrorhous*. Las zonas en amarillo corresponderían a las regiones codificantes de este gen (exones). La zona subrayada codificaría para la región de la proteína que se uniría al nucleótido. La caja en celeste sería la región codificante que en la proteína daría lugar al sitio de unión a carotenos (fitoeno). En números romanos y de color rojo se indican los intrones de este gen.

701 L2\_5RL .....//actt gacacataac tctagtatct atactcga**atg** gaaaaa**gaac** aagatcagga taaacc**ca** gctatca**tcg** tgggtgagtg tcagggccatc 800  
 L2\_2RL .....//actt gacacataac tctagtatct atactcga**atg** gaaaaa**gaac** aagatcagga taaacc**ca** gctatca**tcg** tgggtgagtg tcagggccatc  
 801 L2\_5RL ACCTTTTGAA GCATATACCC ATCACTTTGAT TGATGGGTTT TCCATTTGAT TCAAA**cccttg** tttccgga**atg** gtttccctag tttta**atccgt** atcagctaac 900  
 L2\_2RL ACCTTTTGAA GCATATACCC ATCACTTTGAT TGATGGGTTT TCCATTTGAT TCAAA**cccttg** tttccgga**atg** gtttccctag tttta**atccgt** atcagctaac  
 901 L2\_5RL ATTCTTTGA TCAATTTTG CTTTGTGCTA CTCGTGACTC TTTCCGTTCC TACTTTGTTAG GATGTGGTAT CGGTGGAA**TC** GCCACTGCGG CTCGTCTTGC 1000  
 L2\_2RL ATTCTTTGA TCAATTTTG CTTTGTGCTA CTCGTGACTC TTTCCGTTCC TACTTTGTTAG GATGTGGTAT CGGTGGAA**TC** GCCACTGCGG CTCGTCTTGC  
 1001 L2\_5RL TAAAGAA**ag** TTTCCAGGTC ACGGTGTTCC AGAAG**ctatg** CTTCCCGCT CACTCATGAA ATGTA**ccctca** catcgggt**caa** atatgga**atc** gagatcgtac 1100  
 L2\_2RL TAAAGAA**ag** TTTCCAGGTC ACGGTGTTCC AGAAG**ctatg** CTTCCCGCT CACTCATGAA ATGTA**ccctca** catcgggt**caa** atatgga**atc** gagatcgtac  
 1101 L2\_5RL AAAACTGATC GACCGGCTAT TCTTATTGTG TCCACCTCT TCTTTTCCCT CTCATCA**ttc** gtccaca**ag** ctatcc**ccg** cttgtca**ac** cttaga**acga** 1200  
 L2\_2RL AAAACTGATC GACCGGCTAT TCTTATTGTG TCCACCTCT TCTTTTCCCT CTCATCA**ttc** gtccaca**ag** ctatcc**ccg** cttgtca**ac** cttaga**acga**  
 1201 L2\_5RL CTACTCCGGA GGTCCGATGCT CTTTAA**TCGA** GCGAGATGGT TATGT**CGATT** GCTCCGATCA TCAGG**caaga** GCATC**gTTCA** TTTCT**CCAAT** ACTA**ACCAG** 1300  
 L2\_2RL CTACTCCGGA GGTCCGATGCT CTTTAA**TCGA** GCGAGATGGT TATGT**CGATT** GCTCCGATCA TCAGG**caaga** GCATC**gTTCA** TTTCT**CCAAT** ACTA**ACCAG**  
 1301 L2\_5RL CGGCCCTTTC TCCTCTCTC CGTCTCGACC CTCGGATTTA ACAG**CGATT** GATCAG**TTA** GAATA**CTCTC** TTGGGCTGT CTCTCA**ACAC** AATATCA**AAA** 1400  
 L2\_2RL CGGCCCTTTC TCCTCTCTC CGTCTCGACC CTCGGATTTA ACAG**CGATT** GATCAG**TTA** GAATA**CTCTC** TTGGGCTGT CTCTCA**ACAC** AATATCA**AAA**  
 1401 L2\_5RL GACTGACCIC AACTTTAATG CTTGGCCCTC CAGGGCCCA GT**CTTCCG** TCTTCCAG TCTCTT**CAAG** CAGACA**ITTCG** AAGAT**TTGGG** AGAGA**AGATG** 1500  
 L2\_2RL GACTGACCIC AACTTTAATG CTTGGCCCTC CAGGGCCCA GT**CTTCCG** TCTTCCAG TCTCTT**CAAG** CAGACA**ITTCG** AAGAT**TTGGG** AGAGA**AGATG**  
 1501 L2\_5RL GAAGATTGGG TCGATCTCAT CAAGT**CTATG** TCTAGAGCTT GTA**CTTTCAG** AATCGTCTTG GTTGC**TATC** CTCTCT**CAT** TTCCT**TTCT** TTCAA**ACAA** 1600  
 L2\_2RL GAAGATTGGG TCGATCTCAT CAAGT**CTATG** TCTAGAGCTT GTA**CTTTCAG** AATCGTCTTG GTTGC**TATC** CTCTCT**CAT** TTCCT**TTCT** TTCAA**ACAA**  
 1601 L2\_5RL ATATAAGGTG AACCCAACTA TGTTTGCCAC TTCCACGA**tg** TATGTACCCT CGTAGGCTCG ATATCA**TTCT** TCTTTCC**AAAG** ACCACTGACA TCCTA**CAACC** 1700  
 L2\_2RL ATATAAGGTG AACCCAACTA TGTTTGCCAC TTCCACGA**g** TATGTACCCT CGTAGGCTCG ATATCA**TTCT** TCTTTCC**AAAG** ACCACTGACA TCCTA**CAACC**  
 1701 L2\_5RL ATATTACCG TTCCAGAA**GA** GACTTTCACT CTTTCA**ACCG** ACATGGGCTT GCTCA**AGCGG** GAAGT**CGAGC** GTTTT**GAAGG** CAAAGATGGA TTTGAT**CGGG** 1800  
 L2\_2RL ATATTACCG TTCCAGAA**GA** GACTTTCACT CTTTCA**ACCG** ACATGGGCTT GCTCA**AGCGG** GAAGT**CGAGC** GTTTT**GAAGG** CAAAGATGGA TTTGAT**CGGG**  
 1801 L2\_5RL TCTTTGCTGT TTATCCAA**GA** TTTTCGTGAA TGTTTGT**CAAT** CTCACTCATG ACCAAGTGGC GGT**TCTGACT** CCATCG**CAAT** ACGGT**CTATA** GCCC**ACAGA** 1900  
 L2\_2RL TCTTTGCTGT TTATCCAA**GA** TTTTCGTGAA TGTTTGT**CAAT** CTCACTCATG ACCAAGTGGC GGT**TCTGACT** CCATCG**CAAT** ACGGT**CTATA** GCCC**ACAGA**  
 1901 L2\_5RL CATTTACGAGC TTTGCTGTGT TCCAGTCC**CTG** CAGA**AACT** TCCCTGGCTT CGCAGCA**ttc** tttagg**ctac** agttca**ttg** c**aaatccctg** gctctt**cacc** 2000  
 L2\_2RL CATTTACGAGC TTTGCTGTGT TCCAGTCC**CTG** CAGA**AACT** TCCCTGGCTT CGCAGCA**ttc** tttagg**ctac** agttca**ttg** c**aaatccctg** gctctt**cacc**  
 2001 L2\_5RL CCTTCG**GGT** CAGTGACATC TGCCAA**ACAT** AITCGT**TTCA** CATGGC**TTT** TTTTGACTAT CGATAGT**GTG** TTGTCA**ATAT** CACC**ACTCTA** TCTGG**ACAAC** 2100  
 L2\_2RL CCTTCG**GGT** CAGTGACATC TGCCAA**ACAT** AITCGT**TTCA** CATGGC**TTT** TTTTGACTAT CGATAGT**GTG** TTGTCA**ATAT** CACC**ACTCTA** TCTGG**ACAAC**  
 2101 L2\_5RL AGTTTGT**CGA** TATTTC**AAGA** CCGACAG**ATT** ACGA**AGTc** TTT**CGTTTG** CAGTGA**TGTA** CATGGG**TCAA** AGCC**CA**TACA**** GTGGC**CCCG** AACAT**TTCC** 2200  
 L2\_2RL AGTTTGT**CGA** TATTTC**AAGA** CCGACAG**ATT** ACGA**AGTc** TTT**CGTTTG** CAGTGA**TGTA** CATGGG**TCAA** AGCC**CA**TACA**** GTGGC**CCCG** AACAT**TTCC**

2201 L2\_5RL TTGCTCCAAT ACACGGAAAT GACCGAGGC ATCTGGTATC CGAGAGGAG CTTTITGGCAG TTCTGTCTCA TCCTGATCCT TATGATTGGT TCTTTCCGGT  
 L2\_2RL TTGCTCCAAT ACACGGAAAT GACCGAGGC ATCTGGTATC CGAGAGGAG CTTTITGGCAG TTCTGTCTCA TCCTGATCCT TATGATTGGT TCTTTCCGGT  
 2301 L2\_5RL TCAGAGAAT AACAAATACT GACAGAAAAT CGTATCAATG CACGCTTCTT CCAATAGGGT TCCTAATACT CTTCTTCCAG TCGTCAAGCG CAACAATCCC  
 L2\_2RL TCAGAGAAT AACAAATACT GACAGAAAAT CGTATCAATG CACGCTTCTT CCAATAGGGT TCCTAATACT CTTCTTCCAG TCGTCAAGCG CAACAATCCC  
 2401 L2\_5RL TCAGCAAGT TCAATTTCAA CGCTCCAGTT TCCAGGTTT TCCCTCTCC TGCCAAGGAC CGAGCGACTG GTGTTCCGACT TGAATGGGGC AAGGAACACC  
 L2\_2RL TCAGCAAGT TCAATTTCAA CGCTCCAGTT TCCAGGTTT TCCCTCTCC TGCCAAGGAC CGAGCGACTG GTGTTCCGACT TGAATGGGGC AAGGAACACC  
 2501 L2\_5RL ACGCCGATG TGGGATGGC AATGCTGACC TCGTTTACGC TCCGAGCAC TTGATTCCTG ACGATGCCAG AAACAAGATT GGCCAACTGG GTGAAGTCAA  
 L2\_2RL ACGCCGATG TGGGATGGC AATGCTGACC TCGTTTACGC TCCGAGCAC TTGATTCCTG ACGATGCCAG AAACAAGATT GGCCAACTGG GTGAAGTCAA  
 2601 L2\_5RL GAGAAATTGG TGGGCTGACT TAGTTGGTGG AAGAAGCTC AAGGAAGTT GCAATAGTTT GAGTTCTAC TGGAGCATGG ACCGAATCGT GGACGGTCTG  
 L2\_2RL GAGAAATTGG TGGGCTGACT TAGTTGGTGG AAGAAGCTC AAGGAAGTT GCAATAGTTT GAGTTCTAC TGGAGCATGG ACCGAATCGT GGACGGTCTG  
 2701 L2\_5RL GGGGACACA GTGGGTAGTC CATCCCGGGA AATCCCTTTT CAAAATCGTA AGTGCAGAGG CTGAAGTTTA TTTTACACT TTATCTAGT ATCTTCTTTGG  
 L2\_2RL GGGGACACA GTGGGTAGTC CATCCCGGGA AATCCCTTTT CAAAATCGTA AGTGCAGAGG CTGAAGTTTA TTTTACACT TTATCTAGT ATCTTCTTTGG  
 2801 L2\_5RL CCGGAGACTT CAAGGGATCA TTGACACAA TCTTCGAGGA GTTGGTCTC CCAGCCGATC CTTCCCTTTTA CBTGAACGTT CCTCCGGAA TCGATCCTTC  
 L2\_2RL CCGGAGACTT CAAGGGATCA TTGACACAA TCTTCGAGGA GTTGGTCTC CCAGCCGATC CTTCCCTTTTA CBTGAACGTT CCTCCGGAA TCGATCCTTC  
 2901 L2\_5RL TGCCGCTCCC GAAGGCAMAAG ATGCTATCGT CATTCTTGTG GTATGTCCTA TTCTGTGAC TTTTGGTTTT CGCCCCGTAATG ATGTCTCGAT TCTCAAAACAT  
 L2\_2RL TGCCGCTCCC GAAGGCAMAAG ATGCTATCGT CATTCTTGTG GTATGTCCTA TTCTGTGAC TTTTGGTTTT CGCCCCGTAATG ATGTCTCGAT TCTCAAAACAT  
 3001 L2\_5RL ATTATATCGA ACCCCCCCTTA GCGTGTGGC CATATCGACG CTTCCGAACCC TCAAGATTAC AACAAGCTTG TTGCTCGGGC AAGGAAGTTT GTGATCCACA  
 L2\_2RL ATTATATCGA ACCCCCCCTTA GCGTGTGGC CATATCGACG CTTCCGAACCC TCAAGATTAC AACAAGCTTG TTGCTCGGGC AAGGAAGTTT GTGATCCACA  
 3101 L2\_5RL CGCTTCCGC CAAGCTTGGG CTTCCCGACT TTGAAAAAT GATTFGGCA GAGAAGTTTC ACGATGCTCC CTTCTTGGGAG AAAGAATTCA ACCTCAAGGA  
 L2\_2RL CGCTTCCGC CAAGCTTGGG CTTCCCGACT TTGAAAAAT GATTFGGCA GAGAAGTTTC ACGATGCTCC CTTCTTGGGAG AAAGAATTCA ACCTCAAGGA  
 3201 L2\_5RL CGGRAGCATC TTGGGACTGG CTCACAACCTT TATGCAAGTT CTTGGTTTCA GCGCGAGCAC CAGACATCCC AAGTATGACA AGTTGTCTTT TGTCCGGGGT  
 L2\_2RL CGGRAGCATC TTGGGACTGG CTCACAACCTT TATGCAAGTT CTTGGTTTCA GCGCGAGCAC CAGACATCCC AAGTATGACA AGTTGTCTTT TGTCCGGGGT  
 3301 L2\_5RL TCGACTCATC CCGGAACITGG GGTTCCTCATC GTCTTGGCTG GAGCCAAAGT AACTGCCAAC CAACTTCTCG AATCTTTTGA CCGATCCCCA GCTCCAGATC  
 L2\_2RL TCGACTCATC CCGGAACITGG GGTTCCTCATC GTCTTGGCTG GAGCCAAAGT AACTGCCAAC CAACTTCTCG AATCTTTTGA CCGATCCCCA GCTCCAGATC  
 3401 L2\_5RL CCAATATGTC ACTCTCCGTA CCATATGGAA AACCTCTCAA ATCRAATGGA ACGGGTATCG ATTCTCAGGT CCAGCTGAAG TTCATGGATT TGGAGAGATG  
 L2\_2RL CCAATATGTC ACTCTCCGTA CCATATGGAA AACCTCTCAA ATCRAATGGA ACGGGTATCG ATTCTCAGGT CCAGCTGAAG TTCATGGATT TGGAGAGATG  
 3501 L2\_5RL GGTATACCTT TTGGTATTGT TGATTTGGGC CGTATCGCTT CGATCCGTTG GTGTTCTTGC TTTCTGAATTT  
 L2\_2RL GGTATACCTT TTGGTATTGT TGATTTGGGC CGTATCGCTT CGATCCGTTG GTGTTCTTGC TTTCTGAATTT

Figura 26.- Alineamiento y comparación de las secuencias nucleotídicas de los clones L2\_2 y L2\_5. Las cajas corresponden a las secuencias codificantes (exones). Las bases marcadas en amarillo corresponden a las diferencias entre ambas secuencias.

nucleotídicas de otras fitoeno deshidrogenasas provenientes de otros organismos y la comparación de las regiones intron-exon del gen de la proteína ribosomal L41, el gen de la gliceraldeido3fosfato deshidrogenasa y el gen de actina de *X. dendrorhous* se pudo determinar que en este gen se encuentran 11 intrones (figura 26). La secuencia aminoacídica, deducida a partir de la secuencia nucleotídica, de ambos clones se muestran en la figuras 27. Ambas secuencias aminoacídicas presentan una gran similitud y en la figura se muestra en color verde las diferencias que presentan ambas proteínas. En amarillo se destaca una posible zona de unión a nucleótido y en rojo, cerca del carboxilo terminal, la región que uniría fitoeno.

4.- Análisis genético molecular del gen *atx3*, que codifica para la fitoeno deshidrogenasa, en *X. dendrorhous*.

Con la finalidad de conocer la estructura de este gen y su ubicación dentro del genoma de la levadura, se optó por determinar su localización en el cariotipo electroforético. De este modo, se realizó una electroforesis de campo pulsado, como es descrito en el punto 7.1 y 7.2 de Material y Métodos. En la figura 28A, se muestra una electroforesis de campo pulsado de la cepa silvestre UCD 67-385, utilizando como control la cepa AB-1380 de *S. cerevisiae*. El gel fue transferido a una membrana de nylon para realizar posteriormente un Southerblot y determinar en que banda cromosómica electroforética se encuentra este gen. En la figura 28 B, se muestra una autoradiografía donde se distingue una clara banda de hibridación correspondiente a la primera banda del cariotipo electroforético de esta levadura. En este caso se utilizó como

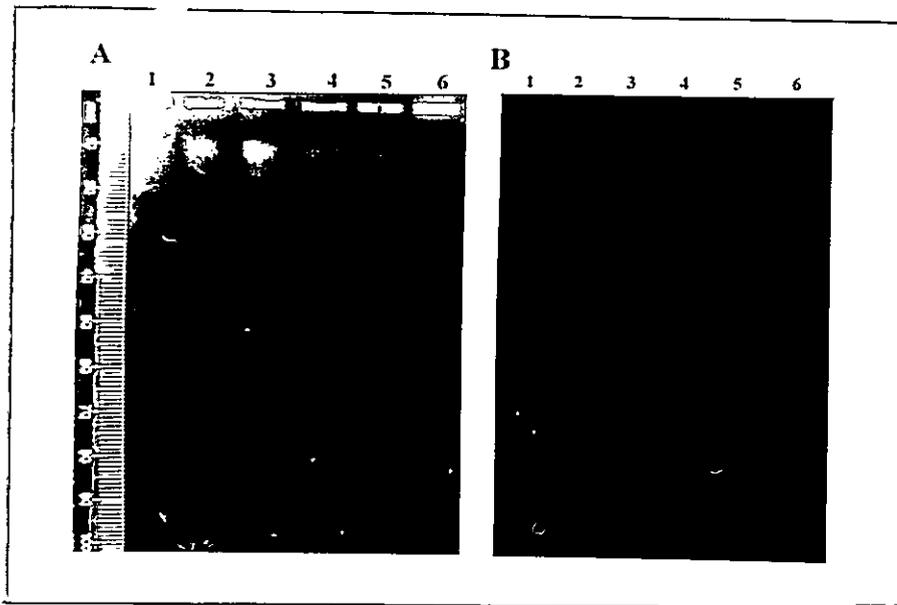


Figura 28.- Hibridación de la sonda del fragmento interno *EcoRV* del gen ATX3 (fitoeno deshidrogenasa) con la banda cromosómica I de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*. Las condiciones de electroforesis fueron, un pulso inicial y final de 60 s durante 24 horas a 6 Volts/cm y luego un pulso de 120 s durante 24 horas en un gel de agarosa al 0,9 %. A: Cariotipo electroforético teñido con bromuro de etidio. Carril 1 : Cepa AB1380 de *S. cerevisiae*. Carril 2-6: Cepa UCD 67-385. B: Autoradiografía luego de la hibridación.

sonda un fragmento *EcoRV* interno de 1128 pb, el cual se obtiene al digerir el gen con la enzima *EcoRV*.

4.1.- Análisis de restricción de DNA genómico de *X. dendrorhous*, utilizando como sonda el fragmento interno *EcoRV* del gen ATX3.

El análisis de restricción del DNA genómico de *X. dendrorhous* con posterior hibridación con una sonda interna del gen ATX3 nos podría indicar algunas características de la ubicación de este gen, así como la posibilidad de determinar si este gen se encuentra como simple copia en el genoma de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*. La digestión del DNA genómico de *X. dendrorhous* con diferentes enzimas de restricción y su hibridación con una sonda de 1128 pb correspondiente a un fragmento interno *EcoRV* del gen ATX3 se muestra en la figura 29. A partir de los resultados observados en la radioautografía, se desprende que este gen estaría contenido en el genoma de esta levadura en un fragmento *BamHI* de aproximadamente 18,5 kb y en un fragmento *EcoRI* de 10,9 kb. También es posible distinguir en la autoradiografía una banda de hibridación de 4,5 kb cuando el DNA genómico de la levadura es digerido con la enzima *AvaI* y dos bandas cuando la digestión se realiza con *PstI*, una de aproximadamente 19 kb y otra de 10,9 kb. En la figura 23 se puede ver que el fragmento de 3,6 kb posee un sitio *PstI* cercano a uno de los sitios *EcoRV*. El control de este análisis corresponde al DNA genómico de *X. dendrorhous* digerido con *EcoRV* y en

el carril 5 de la figura 29 se puede distinguir una clara banda de hibridación, la cual posee un tamaño de 1,3 kb. Una banda de similar tamaño se observa en el carril 7, que corresponde al control positivo de esta hibridación.

También se realizó la digestión del DNA genómico con dos y tres enzimas de restricción para luego hibridar con la sonda de 1128 pb. Las enzimas utilizadas en este caso fueron fundamentalmente las mismas del experimento anterior, más las enzimas *XhoI*, *KpnI* y *HindIII*. Las dos primeras enzimas no muestran un sitio de restricción dentro del gen ATX3, de acuerdo al análisis de la secuencia de los clones L2\_2 y L2\_5. No obstante, *HindIII* tendría tres sitios de restricción, de los cuales, ninguno se encuentra en el fragmento *EcoRV*. Además dos de ellos se encuentran a una distancia de 48 pb. En la figura 30 se muestra una radioautografía correspondiente al análisis de hibridación. Como se puede apreciar en esta figura el número de bandas producido por las doble y triple digestiones es bajo, observándose, en general, dos bandas de hibridación en la mayoría de los casos (ver tabla 6). También se puede apreciar que la enzima *KpnI* no tendría un sitio de restricción en el gen, lo cual concuerda con la secuencia nucleotídica de los clones, L2\_2 y L2\_5.

En la figura 31 se muestra una representación esquemática del mapa de restricción de un segmento del genoma de *X. dendrorhous* en el cual se encontraría el gen que codifica para la enzima fitoeno deshidrogenasa.

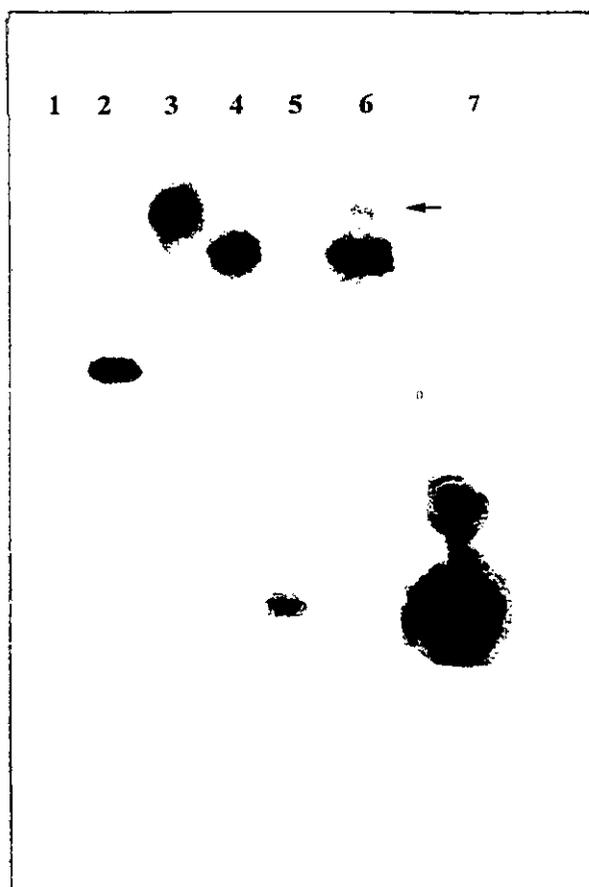


Figura 29.- Análisis de restricción de DNA genómico total de *X. dendrorhous* (cepa UCD 67-385), utilizando como sonda el fragmento interno *EcoRV* que se encuentra dentro del gen ATX3. En cada uno de los carriles se depositó 5  $\mu$ g de DNA genómico digerido con las enzimas *AvaI*, *BamHI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *PstI*, Carril 2, Carril 3, Carril 4, Carril 5 y Carril 6, respectivamente. Carril 1: DNA del fago  $\lambda$ *HindIII*. Carril 7: 10 ng del DNA del clon L2\_5 digerido con *EcoRV*. La flecha en el Carril 6 indica una banda tenue de hibridación, que se aprecia cuando el filtro es expuesto más tiempo.

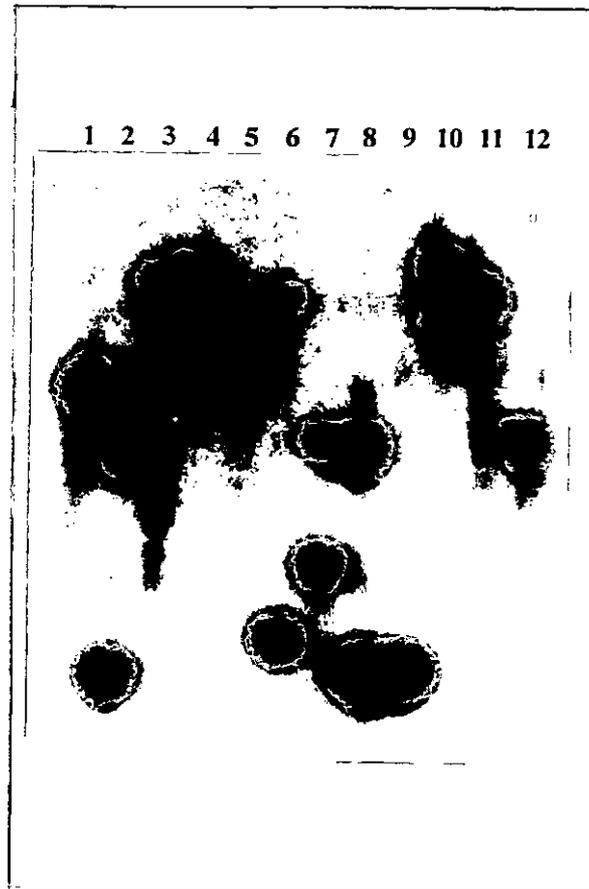


Figura 30.- Análisis de restricción de DNA genómico total de *X. dendrorhous* (cepa UCD 67-385). Se digirieron 5 µg de DNA genómico y se utilizó como sonda el fragmento interno *EcoRV* que se encuentra dentro del gen ATX3. En cada carril se indican las enzimas utilizadas. Carril 1: *AvaI* y *BamHI*. Carril 2: *AvaI* y *PstI*. Carril 3: *BamHI* y *EcoRI*. Carril 4: *PstI* y *BamHI*. Carril 5: *XhoI* y *BamHI*. Carril 6: *PstI* y *EcoRI*. Carril 7: *XhoI* y *PstI*. Carril 8: *AvaI*, *BamHI* y *PstI*. Carril 9: *EcoRV* y *KpnI*. Carril 10: *BamHI* y *KpnI*. Carril 11: *EcoRI* y *KpnI*. Carril 12: *HindIII* y *KpnI*.

**Tabla 6**

Tamaño de las bandas, en kilobases, obtenidas a partir de la hibridación de la figura 31.

Carril	Banda 1 (kb)	Banda 2 (kb)	Enzimas de restricción
1	4,5		<i>AvaI / BamHI</i>
2	3,2	1,7	<i>AvaI / PstI</i>
3	11,2		<i>BamHI / EcoRI</i>
4	16,0	5,4	<i>BamHI / PstI</i>
5	5,6		<i>XhoI / BamHI</i>
6	10,5	1,7	<i>PstI / EcoRI</i>
7	3,4	2,1	<i>XhoI / PstI</i>
8	3,2	1,6	<i>AvaI / BamHI / PstI</i>
9	1,4		<i>EcoRV / KpnI</i>
10	18,0		<i>BamHI / KpnI</i>
11	11,4	5,7	<i>EcoRI / KpnI</i>
12	3,4		<i>HindIII / KpnI</i>

## 5.- Transformación de *X. dendrorhous* con el DNA de los clones

L2\_2 y L2\_5.

### 5.1.- Electrotransformación de la cepa albina (Atx3) de *X. dendrorhous*.

Con la finalidad de determinar la presencia del gen estructural de la enzima fitoeno deshidrogenasa, en el fragmento de 3,6 kb, en los clones L2\_2 y L2\_5 se realizó experimentos de transformación de la cepa albina, Atx3 de *X. dendrorhous*, con DNA de ambos clones. La transformación fue realizada mediante electroporación de acuerdo al protocolo descrito en la sección 5.2.2 de Material y Métodos.

Se realizaron siete experimentos de transformación. En estos ensayos el DNA fue utilizado en su forma circular cerrada y en forma lineal, este último fue obtenido luego de digerir los plásmidos con la enzima *BamHI*. Además, se utilizó el fragmento de 3,6 kb que porta el gen de la fitoeno deshidrogenasa, el que fue obtenido al digerir cada plásmido con las enzimas *BamHI* y *XhoI*, respectivamente. En la tabla 7 se muestran los resultados de cada uno de estos experimentos. En ninguno de los ensayos se obtuvo transformantes que mostraran características de la cepa silvestre (UCD 67-385) o que sintetizara astaxantina.

Tabla 7

Resumen de los experimentos de transformación de la cepa albina (Atx3) con los plásmidos L2\_2 y L2\_5.

Experimento	L2_2	L2_5	Concentración de DNA.	Número de células/ml.
1	C.C	C.C	5,0 µg	$1,2 \times 10^{10}$
2	C.C	C.C	4,3 µg	$8,5 \times 10^9$
3	L	L	3,2 µg	$5,0 \times 10^9$
4	L	L	6,4 µg	$6,3 \times 10^9$
5	F	F	6,4 µg	$5,8 \times 10^9$
6	F	F	5,3 µg	$3,2 \times 10^9$
7	F	F	5,3 µg	$4,7 \times 10^9$

C.C= circular cerrado.

L= linearizado.

F= fragmento de 3,6 kb.

5.2.- Electrotransformación de la cepa silvestre de *X. dendrorhous* (UCD 67-385), con una deleción en el gen de la fitoeno deshidrogenasa.

Con el objetivo de inducir una mutación en el gen silvestre de *X. dendrorhous* se realizó una electrotansformación de la cepa silvestre de esta levadura con un fragmento que lleva una deleción del gen de la fitoeno deshidrogenasa. Para construir el fragmento con la deleción se digirió el DNA de cada uno de los plásmidos que portan este gen (L2\_2 y L2\_5) con la enzima *EcoRV*. De este modo se elimina un fragmento del gen de 1128 pb (figura 23). Posterior a la digestión se fenolizó la reacción para eliminar la enzima de restricción, el DNA se religó y se transformó *E. coli*. El DNA de los clones resultantes fue analizado mediante electroforesis en gel. Se seleccionaron dos clones, uno proveniente del clon L2\_2 y otro del clon L2\_5. Estos clones fueron llamados L2\_2delV y L2\_5delV, poseen un plásmido de 5,4 kb, los cuales al ser digeridos con las enzimas *BamHI* y *XhoI* liberan un fragmento de 2,4 kb (figura 32).

Con el DNA de los plásmidos L2\_2delV y L2\_5delV se transformó la cepa UCD 67-385 en forma similar al punto 4.1. Se realizaron tres experimentos de electrotransformación con el fragmento de 2,4 kb que corresponde al fragmento de 3,6 kb con una deleción de 1128 pb dentro del gen *atx3*. El DNA de los plásmidos se digirió con las enzimas *BamHI* y *XhoI* simultaneamente, para liberar el fragmento de 2,4 kb y así transformar la cepa UCD 67-385.

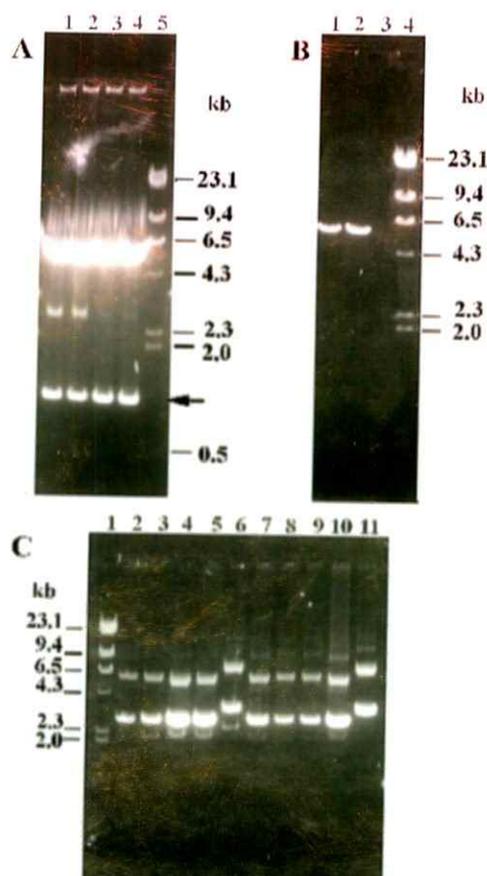


Figura 32.- Geles de agarosa (0.8 %) que muestran la construcción de los plásmidos que llevan el fragmento de 2,4 kb correspondiente al gen de la fitoeno deshidrogenasa con una deleción de 1,2 kb. En la parte A se muestra un gel donde se han digerido los plásmidos L2\_2 y L2\_5 con *EcoRV*, la flecha indica el fragmento de 1,2 kb. Carriles 1 y 2 DNA del plásmido L2\_2 con *EcoRV*. Carriles 3 y 4 DNA del plásmido L2\_5 digerido con *EcoRV*. Carril 5 DNA del fago lambda digerido con *HindIII*. En B se observa los plásmidos L2\_2delV (Carril 1) y L2\_5delV (Carril 2) lineales, ambos de 5,3 kb el Carril 3 esta vacío y el Carril 4 corresponde al DNA del fago lambda digerido con *HindIII*. En C se observan los plásmidos L2\_2delV (Carriles 2 al 5) y L2\_5delV (Carriles 7 al 10) sin digerir. Se observa que son de menor tamaño que los plásmidos L2\_2 (Carril 6) y L2\_5 (Carril 11). En el Carril 1 se encuentra el estándar de peso molecular (DNA del fago  $\lambda$ /*HindIII*).

Se realizaron varios experimentos de transformación con DNA portador de la delección del gen. Como resultado se obtuvieron 8 colonias que presentaban una coloración más pálida que la cepa silvestre (colonias pálidas). En la tabla 8 se presentan las características y los resultados de estos experimentos. La frecuencia de transformantes por colonia analizada fue de  $1,1 \times 10^{-4}$ .

Con la finalidad de confirmar que estas cepas pálidas eran transformantes originados a partir de la cepa UCD 67-385, ellas fueron analizadas observándolas bajo el microscopio óptico y un análisis de sus ácidos nucleicos para determinar la presencia de RNA de doble hebra (Castillo y Cifuentes, 1994). Las colonias analizadas presentaban las características de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*, en cuanto a forma y presencia de las bandas de RNA de doble hebra.

Un análisis de los carotenoides de una de las transformantes pálidas (transformante 5), mediante HPLC mostró un perfil semejante al de la cepa silvestre con un pico de astaxantina con un tiempo de retención de aproximadamente dos minutos. Sin embargo, no fue posible observar el pico de  $\beta$ -caroteno que posee un tiempo de retención cercano a los 24 minutos (ver figura 33).

### 5.3.- Transformación de una de las transformantes pálidas, con la delección del gen de la fitoeno deshidrogenasa utilizada en 5.2.

Una de las cepas transformantes pálidas (transformante 5), obtenidas en 5.2, fue electrotransformada con el segmento de DNA 2,4 kb correspondiente al segmento de DNA de 3,6 kb con una delección en el gen ATX3. En este experimento se

utilizó aproximadamente 8  $\mu\text{g}$  del fragmento de 2,4 kb, de ambos clones (L2\_2delV y L2\_5 delV) y número inicial de células por ml, utilizadas, fue de  $9,2 \times 10^8$ . A partir de este ensayo se obtuvo 97 colonias blancas, con una frecuencia de  $9,8 \times 10^{-4}$  retransformantes por colonias analizadas. La figura 34 muestra una de las placas de esta transformación, se observan colonias transformantes pálidas y colonias transformantes blancas.

**Tabla 8**

Electrotransformación de la cepa silvestre de *X. dendrorhous* con el gen ATX3, portando una deleción de 1,1 kb.

Experimento	Plásmido	Número de células/ml	Concentración de DNA	Colonias palidas
1	L2_2delV	$4,5 \times 10^9$	1,2 $\mu\text{g}$	0
	L2_5delV	$4,5 \times 10^9$	0,9 $\mu\text{g}$	0
2	L2_2delV	$6,0 \times 10^9$	2,0 $\mu\text{g}$	0
	L2_5delV	$6,0 \times 10^9$	2,8 $\mu\text{g}$	0
3	L2_2delV	$7,3 \times 10^9$	5,0 $\mu\text{g}$	8
	L2_5delV	$7,3 \times 10^9$	4,8 $\mu\text{g}$	0

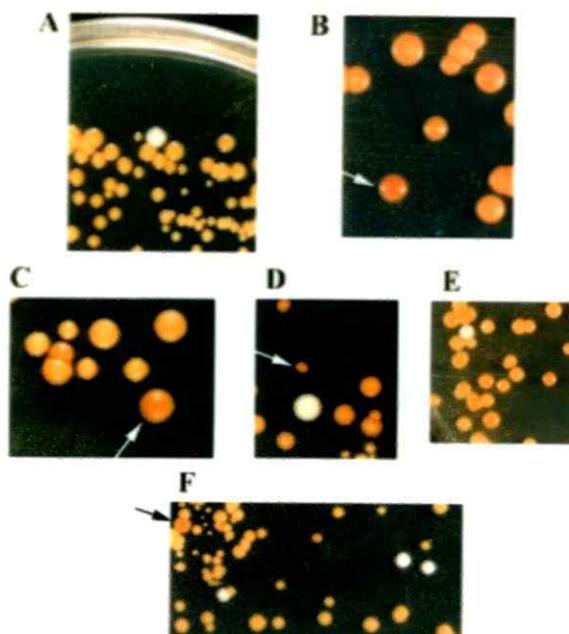


Figura 34.- Se muestran las colonias obtenidas a partir de la electrotransformación de una de las colonias “pálidas”, transformada con el DNA que porta una delección del gen ATX3. En A y E se pueden distinguir colonias blancas y “pálidas”. En B se se señala con flecha una colonia que presenta el fenotipo silvestre y además se encuentra sectorizada. En C, D, F las flechas señalan colonias que han recuperado el fenotipo de la cepa silvestre.

El análisis de estos transformante pálidos y blancos, mediante PCR, utilizando los partidores que amplifican el fragmento de 3,6 kb desde el genóma de *X. dendrorhous* se aprecia en la figura 35. Se puede distinguir claramente una banda de amplificación de 3,6 kb en el control de la cepa silvestre (UCD 67-385), carril 2. Las cepas transformantes pálidas 3 y 5, carriles 3 y 4, muestran dos bandas de amplificación; una de 3,6 y otra de 2,4 kb. Los carriles 5 y 6 muestran la reacción de amplificación de dos colonias blancas, obtenidas en el experimento de electrotransformación, en ellos se distingue claramente una banda de amplificación de 2,4 kb.



Figura 35.- Gel de agarosa (0.8 %) que muestra DNA amplificado, utilizando los partidores que amplifican el fragmento de 3,6 kb. Se utilizó DNA de la cepa silvestre UCD 67-385, de las dos transformantes pálidas y el DNA de dos colonias transformantes blancas. Carril 1 y 8: DNA del fago  $\lambda$ /*HindIII*. Carril 2: UCD 67-385. Carriles 3 y 4: Transformantes pálidas. Carriles 5 y 6: Transformantes blancas. Carril 7: Control de amplificación sin DNA. Los tamaños del estándar de peso molecular ( $\lambda$ /*HindIII*) son entregados en kilobases (kb). El fenotipo de los transformantes analizados corresponde a las colonias ubicadas sobre cada uno de los carriles. En la parte inferior derecha se observa una colonia sectorizada obtenida en los experimentos de transformación.

## DISCUSION

Análisis genético del clon pPR142H2 y los clones rescatados desde la genoteca de *X. dendrorhous*.

En la búsqueda de los genes que controlan la ruta de biosíntesis de carotenoides en *X. dendrorhous* se logró rescatar un plásmido derivado de un transformante rojo, el cual fue denominado pPR142H2. Este plásmido está compuesto por el vector pBluescript SK. y un segmento de DNA de 2,5 kb de *X. dendrorhous*. Como parte del análisis de dicho DNA se elaboró un mapa de restricción parcial, el subclonamiento de dos fragmentos generados por la endonucleasa *HincII* y su secuenciación parcial. Las secuencias de los subclones que portaban los fragmentos *HincII* de 0,5 y 1,3 kilobases provenientes del plásmido pPR142H2 fueron comparadas con la base de datos del GenBank y las bases de datos del programa GCG, el análisis no permitió encontrar una similitud significativa con ninguna secuencia. Sin embargo, esto era esperable ya que, en eucariontes, solo se ha descrito una secuencia para un gen que participa en la vía de síntesis de astaxantina a partir  $\beta$ -caroteno. En el alga unicelular *Haematococcus pluvialis* se aisló un cDNA que codifica para la enzima llamada  $\beta$ -C-4 oxigenasa que cataliza la conversión de  $\beta$ -caroteno a cantaxantina vía equinenona. (Donkin, 1976). Sin embargo, se ha comprobado que la enzima  $\beta$ -C-4 oxigenasa no convierte zeaxantina en astaxantina, por lo cual se ha postulado la existencia de otra enzima que catalizaría la conversión de cantaxantina a astaxantina, mediante una actividad C-3-hidroxilasa (Lotan, *et al*, 1995). Por otra parte, en *X. dendrorhous* no es posible encontrar la

xantófila cantaxantina como intermediario de la síntesis de astaxantina (Andrewes, *et al*, 1976). De este modo, las enzimas que participarían en los pasos de oxidación de  $\beta$ -caroteno para originar posteriormente astaxantina, probablemente, son distintas en estos dos organismos. Es importante hacer notar, que la literatura así como nuestro laboratorio no describe el aislamiento de ningún mutante que acumule algún intermediario entre  $\beta$ -caroteno y astaxantina (ver figura 3), por lo cual se ha planteado la hipótesis que en *X. dendrorhous* dicho paso estaría controlado por una enzima compleja con más de una actividad y codificada por un solo gen (An *et al*, 1989., Martínez, 1995). Una alternativa a esta explicación sería la participación de un sistema multienzimático que realizaría las dos reacciones de oxidación necesarias para obtener astaxantina a partir de  $\beta$ -caroteno.

En la bacteria marina *Agrobacterium aurantiacum* se han aislado todos los genes que participan en la síntesis de astaxantina (Misawa, *et al*, 1995). Sin embargo, los intermediarios que se encuentran en los pasos posteriores a  $\beta$ -caroteno, en este organismo, son diferentes a los que sintetizan *H. pluvialis* y *X. dendrorhous* (Donkin, 1976; Andrewes *et al*, 1976). En *A. aurantiacum*, se pueden encontrar los intermediarios adonixantina,  $\beta$ -criptoxantina, fenicoxantina, cantaxantina y 3-hidroxiquinona de los cuales, tres (adonixantina,  $\beta$ -criptoxantina y cantaxantina) no se encuentran en *X. dendrorhous*. Estos intermediarios serían productos de la actividad de dos enzimas con una baja especificidad de sustrato y que son codificadas por dos genes *crtW* y *crtZ* (Misawa *et al*, 1995).

Estos datos sugieren el porqué las secuencias nucleotídicas de los subclones del clon pPR142H2, así como las secuencias de los extremos de este plásmido, obtenidas

con los partidores T7 y T3 de pBluescript, no presentan similitud con secuencias presentes en la base de datos. Aún las posibles secuencias de aminoácidos de los péptidos obtenidos, al analizar los posibles marcos de lecturas, no presentan similitud significativa con ninguna proteína de las bases de datos.

Paralelamente, los intentos por transformar mutantes albinos (Atx3) y amarillos (Atx5) de *X. dendrorhous*, con el plásmido pPR142H2 así como con los plásmidos seleccionados de la genoteca mediante hibridación, no permitió obtener transformantes con un fenotipo rojo. Basados en lo descrito por Nelson *et al* (1989) en el aislamiento del gen al-3 de *Neurospora crassa*, se realizaron experimentos de co-transformación con estos plásmidos, los cuales también fueron negativos.

Dado el origen del plásmido pPR142H2, existen otras posibles explicaciones que pueden dar cuenta del hecho de no encontrar similitud entre la secuencia de este plásmido con genes o proteínas involucradas en la síntesis de carotenoides de otros organismos. Así como, el no obtener transformantes rojos en los experimentos de transformación de mutantes de carotenogénesis de *X. dendrorhous*, con el DNA de los clones aislados desde la genoteca. Estas explicaciones pueden estar basadas en posibles rearrreglos de las secuencias integradas en los transformantes, de los cuales proviene el plásmido pPR142H2, así como eventos de co-integración de DNA transformante en los genomas de eucariontes (Riggs & Bates, 1986). Tales eventos pueden haber determinado el aislamiento de una secuencia perteneciente al genoma de *X. dendrorhous*, la cual probablemente no tiene relación con los genes que participan en la síntesis de pigmentos en este organismo. Este tipo de fenómeno está ampliamente descrito en hongos, los cuales pueden ocurrir con una frecuencia de hasta un 95% (Aleksenko, 1994., Brückner,

*et al*, 1992). Además, las secuencias del vector integradas en el genoma de la levadura probablemente sirvieron como regiones de homología para la integración de plásmidos recombinantes que portaban distintos insertos no relacionados con la carotenogénesis. La metodología por la cual se obtuvo el plásmido pPR142H2 (Martínez, 1995) y los fenómenos mencionados anteriormente podrían ser responsables de la presencia de un segmento de DNA del genoma de *X. dendrorhous* en este plásmido, el cual no tenía relación con la síntesis de astaxantina en esta levadura, o bien, alteraron considerablemente la organización de dicho segmento.

Utilización de los genes de *E. uredovora* para el aislamiento de los genes de carotenogénesis de *X. dendrorhous*.

Con la finalidad de aislar el o los genes involucrados en la síntesis de astaxantina entre  $\beta$ -caroteno y astaxantina en la levadura *X. dendrorhous* se elaboró una estrategia que consistía en expresar los genes de la bacteria carotenogénica *E. uredovora* en *E. coli* y *S. cerevisiae*, los cuales naturalmente no producen estos pigmentos. La fácil manipulación de estos organismos, las posibilidades de mejorar ostensiblemente las condiciones de cultivo y especialmente las grandes ventajas que presentan en cuanto a su manejo a nivel molecular (clonamiento y expresión de genes) motivaron dicha idea. De este modo, al expresar cada uno de los genes de la vía de síntesis de  $\beta$ -caroteno de *E. uredovora* en *S. cerevisiae* y transformar a su vez la levadura con una genoteca de cDNA de *X. dendrorhous* sería posible aislar los genes que completarían la vía hasta

astaxantina. Estos transformantes sintetizarían astaxantina y presentarían un fenotipo coloreado, diferente al productor de  $\beta$ -caroteno.

Las transformaciones de las cepas de *S. cerevisiae* con estas construcciones fueron positivas; pues cada uno de los transformantes así como las cepas diploides presentaban los genes en su interior, al ser analizados mediante PCR. Al analizar la expresión de ellos, agregando en el medio galactosa, se pudo ver, que las cepas transformante que llevaban los dos primeros genes de la ruta, la construcción EGB (parte B en figura 20), presentaban un pico que correspondería a fitoeno, sin embargo, al analizar la cepa diploide (parte C figura 20), la cual lleva los cuatro genes, presenta un perfil ligeramente diferente a fitoeno pero que no corresponde a  $\beta$ -caroteno. Ninguna de las cepas diploides probadas que llevaban los cuatro genes de *E. uredovora* bajo el promotor Gal1-10, en su interior sintetizó  $\beta$ -caroteno. Las posibles causas de esto no son claras. Sin embargo, ultimamente se ha descrito que en organismos recombinantes, tales como *Candida utilis* y *S. cerevisiae* que portan los genes de carotenogénesis de *E. uredovora*, necesitan la presencia de otro gen para que ellos adquieran la habilidad de sintetizar carotenoides (Misawa & Shimada, 1997). Estas dos levaduras, las cuales no sintetizan naturalmente carotenoides, son capaces de sintetizar estos pigmentos si llevan los genes de carotenogénesis de *E. uredovora* o *A. aurantiacum* y además el gen para la enzima isopentenil difosfato isomerasa de *X. dendrorhous* o *H. pluvialis*. Esta enzima cataliza la isomerización entre isopentenil pirofosfato (IPP) y dimetilalilpirofosfato (DMAPP) (ver figura1), dos isoprenoides que son parte de fundamental en la síntesis de compuestos como son los esteroides, las quinonas, hormonas como la guiberelina y

carotenoides. Probablemente el equilibrio mantenido por la isopentenil difosfato isomerasa entre estos dos intermediarios en la cepa de *S. cerevisiae* utilizada, no sea suficiente como para que el flujo de carbono de la vía de síntesis de ergosterol sea parcialmente desviado hacia la ruta de síntesis de carotenoides y de este modo los pigmentos no pueden ser producidos por este organismo. Por otra parte, es probable que los componentes membranosos de esta cepa no sean adecuados o suficientes para una interacción apropiada entre las enzimas que llevan la síntesis de carotenoides, posterior a la síntesis de fitoeno. De hecho, se ha descrito ampliamente que las dos primeras enzimas de la vía, geranilgeranil pirofosfato sintetasa y fitoeno sintetasa se encuentran en forma soluble dentro de la célula. Sin embargo, las enzimas como fitoeno deshidrogenasa y licopeno ciclasa requieren estar unidas a membrana para que puedan ser activas (Bramley & Mackenzie, 1988; Bonk *et al*, 1997)

Aislamiento, clonamiento y secuenciación del gen de la fitoeno deshidrogenasa de *X. dendrorhous*.

Para aislar el gen que codifica la enzima fitoeno deshidrogenasa, de la levadura *X. dendrorhous*, se analizaron y compararon diferentes secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de esta enzima, aisladas desde diferentes organismos procariontes y eucariontes y que se encuentran almacenadas en la base de datos del Genbank. El análisis de las secuencias proteicas logró identificar dos zonas que son medianamente conservadas en esta enzima. Sin embargo, el análisis de las secuencias nucleotídicas de los diferentes genes, que codifican para la fitoeno deshidrogenasa, no mostró una gran

similitud entre estas secuencias. De este modo, se confeccionaron partidores degenerados que permitieron amplificar un segmento de 1,4 kb, al utilizar DNA genómico de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*.

Un análisis más exhaustivo de la base de datos que se entrega con el programa GCG (Genetics Computers Group) permitió encontrar una secuencia que se encontraba ingresada como el posible gen que codificaba para la enzima fitoeno deshidrogenasa de otra cepa silvestre, UCD 67-210, de esta levadura. Se compararon los partidores anteriormente diseñados, con esta secuencia y se observó una gran semejanza a unas zonas de este gen. Se diseñaron partidores, basados en la secuencia descrita para la cepa UCD 67-210, y se obtuvo la amplificación de un segmento de 2,0 kb, cuando se utilizó DNA genómico de la cepa UCD 67-385. Su tamaño era correspondiente con lo esperado del análisis de la secuencia de la cepa UCD 67-210 de *X. dendrorhous*. Por consiguiente, se optó por fabricar partidores a partir de la secuencia de la base de datos que permitiera amplificar un fragmento de 3,6 kb donde se encontraba incluido el gen que codifica la enzima fitoeno deshidrogenasa. Luego de clonar dicho fragmento, fueron seleccionados dos clones que presentaban el inserto en orientación opuesta. Ambos fueron secuenciados completamente en ambas direcciones, permitiendo confirmar la secuencia. Al realizar la comparación con las secuencias nucleotídicas de los genes y de aminoácidos de la fitoeno deshidrogenasas provenientes de otros organismos presentes en la base de datos, se pudo ver que el gen supuesto se encontraba en un fragmento de DNA de 2,8 kb dentro del amplificado de 3,6 kb. Esta comparación, la comparación de las secuencias intron-exon de los genes de actina (Wery *et al*, 1996) y de la proteína ribosomal L41 (Kim *et al*, 1998) de *X. dendrorhous* y la utilización del

programa de análisis genético GCG permitió estimar los posibles marcos de lectura presentes en nuestra secuencia, indicando que el gen, posee 11 intrones y codifica para una proteína que tiene 582 aminoácidos. Por otra parte, la comparación de la secuencia nucleotídica de ambos fragmentos de DNA secuenciados desde ambos extremos, a partir de los clones L2\_2 y L2\_5, evidenció que ellas presentaban solo 21 bases diferentes, de las cuales, el 55 % se encuentran en zonas no codificantes para la enzima. La comparación de las secuencias nucleotídicas de los clones L2\_2, L2\_5 y la secuencia descrita para la cepa UCD 67-210, nos muestra una gran similitud entre ellas. Solo aparecen 43 bases diferentes, con un 68 % de ellas, ubicadas en zonas no codificantes.

En la figura 36 se muestra una comparación de las tres secuencias aminoacídicas deducidas, de la fitoeno deshidrogenasa de los clones L2\_2, L2\_5 y de la cepa UCD 67-210, ellas presentan un alto grado de similitud. La secuencia obtenida a partir del clon L2\_2 es la que presenta más diferencias, con 43 aminoácidos distintos agrupados, principalmente, en una región de la secuencia (ver zonas verdes en la figura 36). La secuencia obtenida a partir del clon L2\_5 solo presentó 11 diferencias con aquella de la cepa UCD 67-210.

En las figuras 27, 28 y 36 se destacan dos zonas dentro de la secuencia proteica, la zona en color amarillo correspondería a una región de unión a nucleótido, hecho que ha sido ampliamente descrito para estas enzimas. Se ha determinado que estas enzimas necesitan unirse a un nucleótido para lograr su actividad. Se ha encontrado que la fitoeno desaturasa de *Narcissus pseudonarcissus* y *Capsicum annuum* requieren la unión de flavina adenina dinucleótido (FAD) como cofactor para su activación (Al-Babili *et al*, 1996; Hugueney *et al*, 1992). De igual forma, en el hongo filamentoso *Phycomyces*

*blakesleeanus*, cuya proteína posee 583 residuos aminoacídicos, se ha determinado que requiere tanto NADP como FAD para que realice las reacciones de deshidrogenación (Fraser & Bramley, 1994). Sin embargo, la fitoeno desaturasa de *E. uredovora* requiere FAD para su actividad y es inhibida por NAD y NADP (Fraser *et al.*, 1992). La gran semejanza que existe entre las fitoeno desaturasa de *X. dendrorhous* y *P. blakesleeanus* permite pensar que ambas presentan características similares, respecto al requerimiento de los nucleótidos NAD, NADP y FAD para su actividad.

La zona en celeste presente en las secuencias de la fitoeno deshidrogenasa de las figuras 27, 28 y 36 correspondería a la región en la cual la enzima se uniría al fitoeno y sus posteriores sustratos en las reacciones de deshidrogenación para dar como resultado licopeno. La comparación con las secuencias aminoacídicas de las fitoeno deshidrogenasas de *N. crassa*, *P. blakesleeanus*, *E. uredovora* y *R. capsulatus* muestra una región similar, a la cual se le ha asignado dicha función (Armstrong *et al.*, 1989).

Cabe hacer notar que todas las diferencias encontradas entre las tres secuencias proteicas (figura 36), se encuentran fuera de las regiones que se unirían al nucleótido (amarillo) y al sustrato (celeste). Este hecho, así como las diferencias encontradas a nivel de la secuencia nucleotídica, donde la mayor parte de estas variaciones se ubican en las regiones no codificantes, pueden inducir a pensar que las secuencias de los clones L2\_2 y L2\_5 corresponderían a dos alelos del gen presentes en el genoma de nuestra cepa silvestre de *X. dendrorhous*, UCD 67-385. De esta manera, estos resultados entregan información adicional que apoya la sugerencia de un estado diploide natural de *X. dendrorhous* como ha sido descrito anteriormente (Calo *et al.*, 1996; Hermosilla, 1997).

Adicionalmente, el análisis de la secuencia aminoacídica deducida, de la fitoeno deshidrogenasa de *X. dendrorhous* en relación a su perfil de hidrofobicidad, como se muestra, en la figura 37, nos permite observar gráficamente que la enzima posee, a lo menos, 7 regiones hidrofóbicas claras. Estas, podrían ser responsables de una asociación de dicha proteína con estructuras membranosas. En relación a lo anteriormente indicado, se ha descrito que las enzimas relacionadas con la síntesis de carotenoides se encuentran generalmente asociadas a membranas (Isler, 1979; Sandman, 1991) y aparentemente nuestra enzima no sería la excepción. En otros organismos, tal como el guisante, se ha determinado la ubicación de diferentes enzimas involucradas en la síntesis de carotenoides, por ejemplo, la enzima geranigeranildifosfato sintetasa permanece en la región soluble del estroma del cloroplasto en forma libre, mientras que, la enzima fitoeno sintetasa se encuentra asociada a la membrana del tilacoide. Sin embargo, sorprendentemente en este organismo las enzimas fitoeno deshidrogenasa y licopeno ciclasa permanecen en la región soluble del estroma, aunque su actividad es totalmente dependiente de su asociación a membranas (Bonk *et al*, 1997). En *Narcissus pseudonarcissus* la fitoeno deshidrogenasa se encuentra en el cloroplasto, en forma soluble y unida membrana, sin embargo, la forma soluble es enzimáticamente inactiva y la forma que se encuentra asociada a membrana es completamente funcional (Al-Babili *et al*, 1996). En bacterias, como es el caso de *E. uredovora*, se ha determinado que esta enzima se encuentra unida a membrana en su forma totalmente activa (Fraser *et al*, 1992). En el hongo *P. blakesleeanus*, dicha enzima también se encuentra unida a membrana, condición requerida para mantener su actividad (Fraser & Bramley, 1994). Adicionalmente, se puede deducir a partir de la gráfica de la figura 37, que la zona com-

prendida aproximadamente entre los aminoácidos 65 y 101 no tendrían un papel preponderante en el establecimiento de algún dominio de unión a membrana en esta proteína. Esto es relevante si se considera que es la zona que presenta mayores diferencias en la secuencia, de aminoácidos, de la proteína deducida a partir del clon L2\_2 (figura 36).

Al analizar la secuencia aminoacídica de la enzima fitoeno deshidrogenasas de *X. dendrorhous*, en el conjunto de varias otras fitoeno deshidrogenasas aisladas desde diferentes organismo, tales como plantas, eubacterias, hongos y cianobacterias; se pudo determinar que existe una relación entre las enzimas aisladas desde estos diferentes grupos. Un alineamiento entre tales proteínas permitió elaborar un dendrograma el cual se presenta en la figura 38. En dicho dendrograma se puede observar que las fitoeno deshidrogenasas de hongos y bacterias se encuentran más relacionadas entre sí formando un grupo claramente diferente al que forman las enzimas provenientes de plantas y cianobacterias.

En resumen, con los antecedentes expuestos hasta el momento podríamos indicar que la enzima fitoeno deshidrogenasa de *X. dendrorhous* presenta claramente, en su secuencia proteica, un dominio de unión a nucleótido (FAD, NAD o NADP) y se distingue además la zona en que se uniría el sustrato de la enzima. Por otra parte, un análisis de la hidropatia de esta proteína indica que en la enzima, a lo menos, seis zonas tendrían la posibilidad de constituir dominios de unión o interactuar con membranas. Las relaciones de semejanza de la fitoeno deshidrogenasa de esta levadura nos indicaría que existe una mayor relación con las enzimas provenientes de hongos y bacterias que las fitoeno deshidrogenasas provenientes de plantas y cianobacterias. Desde este punto de

Análisis genético molecular y funcional del gen (ATX3) de la fitoeno deshidrogenasa de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*

De acuerdo a los experimentos de hibridación realizados sobre el cariotipo electroforético de la cepa UCD 67-385 *X. dendrorhous*, se pudo determinar que este gen se encuentra localizado en la banda de mayor tamaño de este cariotipo y no presenta hibridación con ninguna otra banda cromosomal. Sin embargo, es importante hacer notar que esta primera banda corresponde a un triplete (Cifuentes *et al*, 1997) y de acuerdo a la intensidad de la hibridación se podría afirmar que este gen se encontraría en solo una de estas bandas, haciendo posible su identificación. El cambio de las condiciones de electroforesis podría permitir la separación de estas bandas cromosómicas, lo que llevaría a una asignación más exacta de esta secuencia.

El análisis de restricción, simple y doble, del DNA genómico de la cepa silvestre UCD 67-385 y la hibridación con el fragmento interno del gen (fragmento *EcoRV*) dio como resultado solo unas pocas bandas de hibridación en ambos casos (ver figura 29, 30 y tabla 6), esto indicaría que el gen de la fitoeno deshidrogenasa, en *X. dendrorhous*, se encuentra como simple copia en el genoma. Si este gen se encontrara en un número de copia superior a uno se podría esperar un número de bandas hibridación mayor, ya que los sitios de restricción que se encontrarían cercanos a los diferentes genes serían distintos, lo que a su vez generaría fragmentos de DNA, que llevan el gen, de diferente tamaño. Además, también fue posible determinar un mapa de restricción de una zona de aproximadamente 30 kb que involucra dos sitios *PstI* en el cual se encontraría el gen de la enzima fitoeno deshidrogenasa (ver figura 31).

Para probar si efectivamente el gen ATX3, que codifica para la enzima fitoeno deshidrogenasa, se encuentra en el fragmento de DNA clonado a partir de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*, se intentó transformar una cepa mutante albina, Atx3 que acumulaba fitoeno (Martínez, 1995). La complementación de esta mutante con el alelo silvestre ATX3, debía corregir la etapa de la vía que se encontraba bloqueada permitiendo la síntesis de astaxantina. No obstante, los experimentos realizados mediante electrotransformación de dicha cepa, con el DNA plasmidial proveniente de los clones L2\_2 y L2\_5 no dieron resultados positivos y no fue posible obtener complementación de la mutación en dicha cepa. Una explicación posible es el hecho de que la cepa albina fue obtenida a partir de repetidos experimentos de mutagénesis (Martínez, 1995) y probablemente presenta otras mutaciones en su genoma que impedirían que se recobrará el fenotipo silvestre al introducir el gen de la enzima fitoeno deshidrogenasa.

Como alternativa a esta situación se optó por transformar la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* con el gen de la fitoeno deshidrogenasa, del mismo organismo, pero portando una deleción interna. Como resultado se podría esperar obtener un mutante portador de la deleción y albino, indicando que efectivamente el gen para la fitoeno deshidrogenasa se encontraba en estos clones. De este modo, se realizó una deleción en el gen digiriendo con la enzima de resticción *EcoRV* liberando un fragmento interno de este gen, de aproximadamente 1,2 kb (ver figura 23). Ahora con el gen que portaba dicha deleción se electrotransformó la cepa silvestre UCD 67-385, obteniéndose como resultado algunas colonias que presentaban una coloración más pálida que la cepa silvestre. El fenotipo de estas colonias, tanto a simple vista como al

exámen microscopico, se asemejaba a las características de la cepa silvestre. El análisis de sus ácidos nucleicos indicó la presencia de las cuatro bandas de RNA de doble hebra característicos de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* (Castillo & Cifuentes, 1994) lo que confirmó el origen de estas colonias pálidas. El análisis mediante HPLC (figura 33) de una de estas transformantes, presentó un perfil semejante al de la cepa silvestre, se observa claramente el pico correspondiente a astaxantina, sin embargo no es posible observar el pico de  $\beta$ -caroteno, esto probablemente se debe a que en la cepa silvestre, UCD 67-385, el pico correspondiente a este pigmento siempre es pequeño y en el caso de los transformantes pálidos probablemente la cantidad de  $\beta$ -caroteno es aún más baja y por esto no fue posible detectarlo.

Un experimento de transformación mediante electroporación de una de las colonias pálidas, denominada transformante5, con el DNA portador de la deleción *EcoRV* de 1,2 kb, dio como resultado una serie de colonias blancas. La forma y textura de la colonia, las caraterísticas microscópicas y la presencia de RNA de doble hebra nos indicó que correspondía a *X. dendrorhous*. Aquí surgen las preguntas ¿ porqué al transformar la cepa silvestre con DNA con una deleción de 1,2 kb, en el gen ATX3, no se obtienen transformantes albinos?, ¿ porqué los clones albinos solo se obtienen luego de transformar una cepa transformante pálida?. Estas preguntas tienen respuesta si consideramos a la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*, como un diploide natural. De esta manera, el transformante pálido podría ser un heterocigoto en el cual ha ocurrido un evento de integración del DNA transformante, dejando solo una copia normal del gen, induciendo a una disminución de la cantidad de astaxantina total del

clon. Esto podría ser causado por un efecto de dosis génica. Los transformantes albinos sólo surgen luego de transformar los clones pálidos con DNA del gen ATX3 portador de la delección, mediante un segundo evento de integración, reemplazando la copia completa del gen ATX3 por la mutada. Así, se genera un homocigoto con la delección.

Efectivamente, un análisis mediante PCR, de los clones transformantes, utilizando la mezcla de partidores, P1-4, que amplifican el fragmento de 3,6 kb, correspondiente al gen completo de la fitoeno deshidrogenasa, muestra que los transformantes pálidos presentan dos bandas de amplificación: a) una correspondiente al gen completo, en una banda de 3,6 kb y b) otra banda de 2,4 kb correspondiente al gen con la delección de 1,2 kb. Adicionalmente, la amplificación a partir del DNA genómico de las transformantes albinas muestra solamente una banda de 2,4 kb correspondiente al gen con la delección (figura 35). De esto se desprende que la integración, en ambos casos de transformación, se realizó mediante recombinación homóloga reemplazando al gen silvestre. La obtención de un transformantes pálidos en un primer paso de transformación y la obtención de dos bandas de diferente tamaño, 3,6 y 2,4 kb, mediante PCR, nos indica que esta cepa transformante pálida sería heterocigota para el gen ATX3, con un alelo silvestre de 3,6 kb y un alelo mutado con delección de 2,4 kb. Posteriormente, al transformar las colonias pálidas, con el mismo DNA del experimento anterior, se generó colonias blancas, con solo una banda, correspondiente al gen con delección, de 2,4 kb, sugiriendo que esta cepa podría ser homocigota, en ambos alelos mutados por la delección de 1,2 kb. Debido a esto, y como se mencionó anteriormente, las cepas obtenidas en el primer paso de transformación presentan una coloración más pálida que la cepa silvestre, ya que presentarían solo un alelo que codifica para una

enzima funcional, a diferencia de la cepa silvestre, la cual es homocigota para el gen ATX3 de 3,6 kb. Además, se ha observado que algunas colonias de estas transformantes pálidas presentan sectorización, lo cual evidenciaría la ocurrencia de recombinación mitótica, y por lo tanto segregación de ambos alelos (figura 34). Por otra parte, al sembrar algunas de estas colonias pálidas en placas con medio YM/agar se ha podido ver algunas colonias con fenotipo silvestre para la acumulación de pigmento, confirmando las observaciones antes descritas.

La amplificación de solo una banda, de 2,4 kb , en las transformantes blancas, nos indica que ambos alelos estarían mutados. Estos resultados, apoyan la teoría de la diploidía de este organismo (Calo & Johnson, 1996; Hermosilla, 1997) ya que al menos el gen ATX3 se encontraría en una condición diploide en esta levadura.

En organismos tales como *Phycomyces blakesleeanus* y en la cianobacteria *Anacystis*, se a comprobado que existe regulación de la via de síntesis de pigmentos a nivel de la enzima fitoeno deshidrogenasa (Sandmann & Kowalczyk, 1989; Ruíz-Hidalgo *et al*, 1997). Probablemente, este sería un paso dentro de la vía de síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*, importante de analizar ya que podría ser la limitante para la síntesis de pigmentos en la levadura. Esto estaría de acuerdo a lo descrito a través del análisis de mutantes de carotenogénesis ( Martínez, 1995), donde existirían dos pasos de regulación uno antes de  $\beta$ -caroteno, el cual es representado por la mutante atxS1 y otro paso de regulación posterior a  $\beta$ -cartoteno representado por la mutante atxS2, ambas obtenidas en nuestro laboratorio (Martínez, 1995). Sería muy relevante para los estudios de ingeniería metabólica, en esta levadura, el determinar los efectos

que tendría en la biosíntesis de astaxantina la desregulación o sobreexpresión de este gen así como el aumento de su dosis génica. Por otra parte, el aislamiento y caracterización de este gen permite proyectar con mayor facilidad los estudios de regulación de la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de astaxantina en la levadura *X. dendrorhous*.

## CONCLUSIONES

- 1.- El análisis de la secuencia nucleotídica del gen de la fitoeno deshidrogenasa de, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, permitió determinar que este gen posee 11 intrones y codifica para una proteína de 582 aminoácidos.
- 2.- La hibridación sobre DNA genómico digerido con enzimas de restricción y sobre el cariotipo electroforético de la cepa silvestre UCD 67-385, de *X. dendrorhous*, con una sonda correspondiente a un fragmento del gen ATX3 indican que este gen se encuentra en un fragmento PstI de aproximadamente 30 Kb en la banda cromosómica I.
- 3.- La secuencia de aminoácidos, deducida, de la enzima fitoeno deshidrogenasa de *X. dendrorhous* ha permitido observar: a) una estrecha relación con fitoeno deshidrogenasas de bacterias y hongos, estimándose que esta sería una enzima del tipo CrtI. b) que posee dos zonas altamente conservadas que corresponderían a, un motivo de unión a sustrato (fitoeno) y otro de unión a nucleótido (FAD o NAD). c) su perfil de hidrofobicidad muestra a lo menos siete zonas que posiblemente se unirían o asociarían a membranas.

- 4.- El análisis de la secuencia nucleotídica y aminoácídica de dos clones portadores del gen ATX3, así como el análisis, mediante PCR, de las colonias pálidas y albinas obtenidas luego de transformaciones sucesivas de la cepa silvestre (UCD 67-385) con un producto de delección de este gen, a permitido concluir que el gen de la fitoeno deshidrogenasa se presenta en una condición diploide en el genoma de la levadura, lo que apoya fuertemente las teorías de una diploidía natural de *X. dendrorhous*.

## APENDICE N° 1

### Medios de cultivo.

#### 1.- Medios de Cultivo:

##### a) Medio LB (Luria Bertani).

Triptona	1.0 %
Extracto de levadura	0.5 %
Cloruro de Sodio	0.5 %.

##### b) Medio LB-agar.

Medio LB	
agar	2.0 %

##### c) Medio YM.

Glucosa	1.0 %
Extracto de levadura	0.3 %
Extracto de malta	0.3 %
Peptona	0.5 %

##### d) Medio YM-agar.

Medio YM	
Agar	2.0 %

##### e) Medio YM-KCl

Medio YM	
KCl	0.8 M

##### f) Medio YM-KCl-agar 0.5 %

Medio YM-KCl	
agar	0.5 %

##### g) Medio Mínimo (MM).

Glucosa	2.0 %
Vogel	1.0 X

## h) Medio Mínimo-agar (MM-agar).

Medio Mínimo (MM)	
Agar	2.0 %

i) Medio  $\phi$ .

Triptona	2.0 %
Extracto de levadura	0.5 %
Cloruro de potasio	10 mM
Sulfato de Magnesio	0.4 % p/v

El medio fue llevado a pH 7.6 con hidróxido de potasio 1M.  
Se utiliza agua desionizada.

## j) Medio YEP

Extracto de levaduras	1.0 %
Peptona	2.0 %
Glucosa	2.0 %

## k) Medio YNB (w/o aminoácidos)

## l) Medio con galactosa para levadura.

## APENDICE N° 2

### SOLUCIONES:

#### 1.- Transformación de *E. coli*.

##### a) Solución TfβI.

Cloruro de Rubidio	100.0 mM
Cloruro de manganeso tetrahidratado	50.0 mM
Acetato de Potasio	30.0 mM
Cloruro de Calcio	10.0 mM
Glicerol	15.0 %

La solución es llevada a pH 5.8 con 0.2 M de ácido acético.

##### b) Solución TfβII.

MOPS pH 7.0	10.0 mM
Cloruro de rubidio	10.0 mM
Cloruro de calcio	75.0 mM
Glicerol	15 %

#### 2.- Hibridación de ácidos nucleicos

##### a) Solución de prehibridación.

SSC	6 X
Reactivo de Denhardt	5 X
SDS	0.5 %
DNA esperma de salmón	100 µg/ml
Formamida	50 %

##### b) Solución de hibridación.

SSC	6.0 X
Reactivo de Denhardt	5.0 X
SDS	0.5 %
DNA esperma de salmón	100 µg/ml
Formamida	50.0 %
Sonda radioactiva denaturada	> 10 <sup>9</sup> cpm/ug.

##### c) Solución de Denhart

Ficoll	1.0 %
Polivinilpirrolidona	1.0 %
BSA (fracción IV)	1.0 %

d) SSC 20 X	
NaCl	175.3 g/l
Citrato de sodio	88.2 g/l

### 3.- Marcado radiactivo de ácidos nucleicos.

#### a) Mezcla de partidores sintéticos

HEPES	0.67 M
Tris-HCl	0.17 M
MgCl <sub>2</sub>	17.0 mM
β-Mercaptoetanol	33.0 mM
BSA	1.33 mg/ml
Partidores sintéticos (hexámeros)	18.0 DO <sub>256</sub> unidades/ml

#### b) Mezcla de desoxinucleótidos

Tris-HCl pH= 7.0	3.0 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	0.2 mM
dATP, dGTP, dTTP	0.5 mM

#### c) Solución fragmento Klenow

Fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de <i>E. coli</i>	3.0 unidades/μl
Tampón fosfato de potasio pH= 7.0	100 mM
β-Mercaptoetanol	10 mM
Glicerol	50.0 % (v/v).

#### d) Solución "Stop Buffer"

Na <sub>2</sub> EDTA, pH= 7.5	0.2 M
-------------------------------	-------

## 4.- Electroforesis de DNA

## a) TAE 50.0 X

Tris	242.0 g/lt
Acido acético glacial	57.1 ml/lt
EDTA (0.5 M) pH= 8.0	100 ml/lt

## b) TBE 5.0 X

Tris base	54.0 g/lt
Acido bórico	27.5 g/lt
EDTA (0.5 M) pH 8.0	20 ml/lt

## 5.- Soluciones para la secuenciación

## a) Tampón de reacción (5.0 X)

Tris-HCl, pH 7.5	200.0 mM
MgCl <sub>2</sub>	100.0 mM
NaCl	250.0 mM

## b) Mezcla de terminación

ddG: dGTP 80 $\mu$ M, dATP 80 $\mu$ M, dCTP 80 $\mu$ M, dTTP 80 $\mu$ M, ddGTP 8 $\mu$ M, NaCl 50 $\mu$ M
ddA: dGTP 80 $\mu$ M, ddATP 8 $\mu$ M, dCTP 80 $\mu$ M, dTTP 80 $\mu$ M, dGTP 80 $\mu$ M, NaCl 50 mM
ddT: dGTP 80 $\mu$ M, dATP 80 $\mu$ M, dCTP 80 $\mu$ M, dTTP 8 $\mu$ M, dGTP 80 $\mu$ M, NaCl 50 mM
ddC: dGTP 80 $\mu$ M, dATP 80 $\mu$ M, ddCTP 8 $\mu$ M, dTTP 80 $\mu$ M, dGTP 80 $\mu$ M, NaCl 50 mM

## d) Mezcla de marcaje

dGTP	7.5 $\mu$ M
dCTP	7.5 $\mu$ M
dTTP	7.5 $\mu$ M

## e) Tampón de dilución de la enzima.

Tris-HCl, pH 7.5	10.0 mM
DTT	5.0 mM

BSA	0.5 mg/ml
-----	-----------

## f) Solución "Stop Buffer"

Formamida	95 %
EDTA	20 mM
Azul bromofenol	0.05 %
Cianol xileno	0.05 %

## 6.- Gel de secuenciación.

## a) Solución acrilamida-bisacrilamida

Acrilamida	38.0 gr
Bisacrilamida	2.0 gr
H <sub>2</sub> O	100 ml

Filtrar la solución y mantener a 4°C en oscuridad.

## b) Gel 6 %

Urea ultra pura	23.0 gr
Solución Acrilamida-bisacrilamida	7.5 ml
TBE 5 X	10.0 ml
H <sub>2</sub> O	40.0

Filtrar antes de utilizar.

## 7.- Soluciones para medios de cultivo

## a) Vogel 50.0 X

Citrato de Sodio x 5 H <sub>2</sub> O	150.0 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> anhidro	250.0 g/l
NH <sub>4</sub> N <sub>3</sub> anhidro	100.0 g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	10.0 g/l
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	5.0 g/l
Elementos trazas	5.0 ml
Biotina	48 mg/l

## 8.- Soluciones para electroforesis de campo pulsado

## a) LET

EDTA (0.5 M) pH 8.0	925.0 ml/lt
Tris, pH 7.5	1.5 g/lt
$\beta$ -mercaptoetanol	75.0 ml/lt

## b) NDS

EDTA (0.5 M) pH 8.0	890.0 ml/lt
Tris, pH 7.5	1.5 g/lt
N-lauroilsarcosina	100.0 ml/lt

## 9.- Soluciones electrotransformación.

## a) BD

Buffer fosfato de potasio 1.0 M, pH 7.0	50.0 ml/lt
Ditiotritol 0.25 M	100.0 ml/lt

## b) STM

Sacarosa 1M	270.0 ml/lt
Tris 0.5 M, pH 7.5	20.0 ml/lt
MgCl <sub>2</sub> 0,5 M	20.0 ml/lt

### APENDICE N° 3

Marcador de tamaño molecular.

Tamaño y peso molecular de los fragmentos obtenidos al tratar el DNA del bacteriófago lambda con la endonucleasa de restricción HindIII.

N° fragmento	Tamaño Molecular (kb)	Peso Molecular (Megadalton)
1	23.130	15.00
2	9.419	6.12
3	6.557	4.26
4	4.371	2.84
5	2.322	1.51
6	2.028	1.32
7	0.564	0.37
8	0.125	0.08

## BIBLIOGRAFIA

- Aleksenko, A. 1994. Cointegration at transforming DNAs in *Aspergillus nidulans*: a model using autonomously-replicating plasmids. *Curr. Genet.* 26: 352-358.
- Al-Babili, S., von Lintig, J., Haubruck, H. & Beyer, P. 1996. A novel, soluble form of phytoene desaturase from *Narcissus pseudonarcissus* chromoplasts is Hsp70-complexed and competent for flavinylation, membrane association and enzymatic activation. *Plant J.* 9:601-612.
- An, G, Schuman, D. & Johnson, E.1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 116-124
- Andrewes, A.; Phaff, J. & Starr, M. 1976. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*. A red-pigmented fermenting yeast. *Phytochem.*15: 1003-1007.
- Armstrong, G., Alberti, M., Leach, F. & Hearst, J. 1989. Nucleotide sequence, organization, and nature of the protein products of the carotenoid biosynthesis gene clusters of *Rhodobacter capsulatus*. *Mol. Gen. Genet.* 216: 254-268.
- Armstrong, G. 1994. Eubacteria show their true colors: Genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *J. Bacteriol.* 176: 4795-4802.
- Armstrong, G. & Hearst, J. 1996. Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *The FASEB J.* 10: 228- 237.
- Armstrong G. 1997. Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale. *Annu. Rev. Microbiol.* 51:629-59.

- Bartley, G.; Schmidhauser, T., Yanofsky, C. & Scolnik, P. 1990. Carotenoid desaturases from *Rhodobacter capsulatus* and *Neurospora crassa* are structurally and functionally conserved and contain domains homologous to flavoprotein disulfide oxidoreductases. *J. Biol. Chem.* 265: 16020-16024.
- Bartley G, Viitanen, P., Pecker, I., Chamovitz, D., Hirschberg, J. and Scolnik, P. 1991. Molecular cloning and expression in photosynthetic bacteria of a soybean cDNA coding for phytoene desaturase, an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:6532-6536.
- Biel, A., Marrs, B. 1985. Oxygen does not directly regulate carotenoid biosynthesis in *Rhodospseudomonas capsoluta*. *J. Bacteriol.* 162: 1320-1321
- Bird, C., Ray, J., Fletcher, J., Boniwell, J., Bird, A., Teulieres, C., Blain, I., Bramley, P. & Schuch, W. 1991. Using antisense RNA to study gene function: inhibition of carotenoid biosynthesis in transgenic tomatoes. *BioTechnology.* 9: 635-639.
- Birnboim, H. & Doly, J. 1979. A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 3: 2303-2308.
- Bonk, M., Hoffmann, B., Von Lintig, J., Schledz, M., Al-Babili, S., Hobeika, E., Kleinig, H. & Beyer, P. 1997. Chloroplast import of four carotenoid biosynthetic enzymes in vitro reveals differential fates prior to membrane binding and oligomeric assembly. *Eur. J. Biochem.* 247: 942-950-
- Bramley, P. & Mackenzie, A. 1988. Regulation of Carotenoid Biosynthesis. In *Current Topics in Cellular Regulation*. Ed. Horecker, H. L. & Stadtman, E. R. Academic Press, Inc. pp:291-337

- Brückner, B., Unkles, S., Weltring, K. & Kinghorn JR . 1992. Transformation of *Gibberella fujikuroi*: effect of the *Aspergillus nidulans* AMA1 sequence on frequency and integration. *Curr. Genet.* 22: 313-316.
- Calo, P., Velázquez, J., Sieiro, C., Blanco, P., Longo, E. & Villa, T. 1995. Analysis of astaxanthin and other carotenoids from several *Phaffia rhodozyma* mutants. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1396-1399.
- Calo, P. & Johnson, E. 1996. Ploidy determination of *Phaffia rhodozyma* by flow cytometry. The congress yeast genetics and molecular biology. Madison, Wisconsin, U.S.A.
- Castillo, A. and Cifuentes, V. 1994. Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Phaffia rhodozyma*. *Curr. Genet.* 26: 364-368
- Chamovitz, D., Misawa, N., Sandmann, G. & Hirschberg, J. 1992. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of a cyanobacterial gene coding for phytoene synthase, a carotenoid biosynthesis enzyme. *FEBS Lett.* 296: 305-310.
- Chu, G., Vollrath, D. & 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. & Jiménez, A. 1997. Genetics and electrophoretic karyotyping of wild-type and astaxanthin mutant strains of *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 72: 111-117.
- Craft, N. 1992. Carotenoid reverse-phase high-performance liquid chromatography methods: reference compendium. *Methods Enzymol.* 213:185-205.

- Dogbo, O., Laferriere, A., D'Harligue, A., & Camara, B. 1988. Carotenoid biosynthesis: Isolation and characterization of a bifunctional enzyme catalyzing the synthesis of phytoene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 7054-7058.
- Donkin, P. 1976. Ketocarotenoid biosynthesis by *Haematococcus lacustris*. *Phytochemistry.* 15: 711-715.
- Ehrenshaft, M. & Daub, M. 1994. Isolation, sequence and characterization of the *Cercospora nicotianae* phytoene dehydrogenase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2766-2771.
- Eslava, A., Alvarez, M. & Cérda-Olmedo, E. 1974. Regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces* by vitamin A and  $\beta$ -ionone. *Eur. J. Biochem.* 48: 617-623.
- Fraser, P., Misawa, N., Linden, H., Yamano, S., Kobayashi, K. & Sandmann, G. 1992. Expression in *Escherichia coli*, purification, and reactivation of the recombinant *Erwinia uredovora* phytoene desaturase. *J. Biol. Chem.* 267: 19891-19895.
- Fraser, P. & Bramley, P. 1994. The purification of phytoene dehydrogenase from *Phycomyces blakesleeanus*. *Biochim Biophys Acta.* 1212: 59-66.
- Girard, P., Falconnier, B., Bricout, J., Vladescu, B. 1994.  $\beta$ -Carotene producing mutants of *Phaffia rhodozyma*. *Microbiol. Biotechnol.* 41: 183-191.
- Golubev, W. 1995. Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Yeast* 11: 101-110.
- Hermosilla, G., León, R., Martínez, C. & Cifuentes, V. 1995. Formación y regeneración de protoplastos de *Phaffia rhodozyma*. *Bol. Micológico.* 10: 71-75.

- Hermosilla, G. 1997. Estudio de la organización del genoma de *Phaffia rhodozyma*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Hoshino, T., Fujii, R., Nakahara, T. 1993. Molecular cloning and sequence analysis of the crtB gene of *Thermus thermophilus* HB27, an extreme thermophile producing carotenoid pigments. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3150-3153.
- Hugueney, P., Römer, S., Kuntz, M. & Camara, B. 1992. Characterization and molecular cloning of flavoprotein catalyzing the synthesis of phytofluene and  $\zeta$ -carotene in *Capsicum* chromoplasts. *Eur. J. Biochem.* 209: 399-407.
- Isler, O. 1979. History and industrial application of carotenoids and vitamin A. En *Carotenoids-5*. Ed. Goodwin, T. W. International Union of Pure and Applied Chemistry (Organic Chemistry Division). 51: 447-462. Pergamon Press.
- Johnson, E., Conklin, D. & Lewis, M. 1977. The yeast *Phaffia rhodozyma* as a dietary pigment source for Salmonids and Crustaceans. *J. Fish. Res. Board Can.* 34: 2417-2421.
- Karnaukhov, V. N. 1990. Carotenoids: Recent progress, problems and prospects. *Comp. Biochem. Physiol.* 95b: 1-20.
- Kim, I.-G., Nam, S., Sohn, J., Rhee, S., An, G., Lee, S. & 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.

- Kucsera, J., Pfeiffer, I. & Ferenczy, L. 1998. Homothallic life cycle in the diploid red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 163- 168.
- Li, Z., Matthews, P., Burr, B. & Wurtzel, E. 1996. Cloning and characterization of a maize cDNA encoding phytoene desaturase, an enzyme of the carotenoid biosynthetic pathway. *Plant Mol. Biol.* 30: 269-279.
- Linden, H., Misawa, N., Saito, T. & Sandmann, G. 1994. A novel carotenoid biosynthesis gene coding for  $\zeta$ -carotene desaturase: functional expression, sequence and phylogenetic origin. *Plant Mol. Biol.* 24: 369-379.
- Lotan, T. & Hirschberg, J. 1995. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding  $\beta$ -C-4-oxygenase, that converts  $\beta$ -carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. *FEBS Lett.* 364: 125-128.
- Lukner, M. 1990. Secondary metabolism in microorganism, plants and animals. Third revised and enlarged edition. Springer-Verlag, Berlin, Alemania.
- 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. & Cifuentes, V. 1998. Genetic transformation of astaxanthin mutants of *Phaffia rhodozyma*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 73: 147 - 53.
- Martínez-Férez, I., Fernández-González, B. Sandmann, G & Vioque, A. 1994. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene coding for phytoene

- synthase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta.* 1218:145-152.
- Miller, M., Yoneyama, M. & 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. & 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.
- Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A. Kajiwara, S., Saito, T., Ohtani, T & Miki, W. 1995. Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *J. Bacteriol.* 177: 6575-6584.
- Misawa, N. & Shimada, H. 1997. Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. *J Biotech.* 59:169-181.
- Moore, M, Breedveld, M, & Autor, A. P. 1989. The role of carotenoids in preventing oxidative damage in the Pigmented yeast, *Rhodotorula mucilaginosa*. *Arch. Bioch. Biophys.* 270: 419-431.
- Nelson, M., Morelli, G. Caratolli, A., Romano, N. & Macino, G. 1989. Molecular cloning of a *Neurospora crassa* carotenoid biosynthetic gene (Albino-3) regulated by blue light and the products of the white collar genes. *Mol. Cell. Biol.* 9:1271-1276.

- Pecker, I., Gabbay, R., Cunningham, F. & Hirschberg, J. 1996. Cloning and characterization of the cDNA for lycopene  $\beta$ -cyclase from tomato reveals decrease in its expression during ripening. *Plant Mol. Biol.* 30: 807-819.
- Pouwels, P., Engervalk, B. & Brammar, W. 1988. Cloning vectors. En A laboratory manual (supplementary update). Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- Ray, J., Bird, C., Maunders, M., Grierson, D. & Schuch, W. 1987. Sequence de pTOM5, a ripening related cDNA from tomato. *Nucleic. Acids Res.* 15: 10587.
- Riggs, C. & Bates, G. 1986. Stable transformation of Tobacco by electroporation: evidence for plasmid concatenation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:5602-5606.
- Rose, M., Winston, F., & Heiter, P. 1990. Techniques and protocols. In *Methods in yeast genetics: A laboratory course manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, U.S.A.
- Ruiz-Hidalgo, M., Benito, E., Sandmann, G., Eslava A. 1997. The phytoene dehydrogenase gene of *Phycomyces*: regulation of its expression by blue light and vitamin A. *Mol. Gen. Genet* 253: 734-744.
- Sambroock, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press,
- Sanderson, G. & Jolly, S. 1994. The value of *Phaffia* yeast as a feed ingredient for salmonid fish. *Aquaculture*. 124: 193-200.

- Sandmann, G. & Kowalczyk, S. 1989. In vitro carotenogenesis and characterization of the phytoene desaturase reaction in *Anacystis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163: 916-921.
- Sandmann, G. 1991. Biosynthesis of cyclic carotenoids: Biochemistry and molecular genetics of the reaction sequence. *Physiol. Plant.* 83: 186-193.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5468.
- Schena, M., Picard, D. & Yamamoto, K. 1991. Vectors for constitutive and inducible gene expression in Yeast. *En: Methods Enzymol.*, 194: 389-398.
- Schmidhauser, T., Lauter, F., Russo, V. & Yanofsky, C. 1990. Cloning, sequence and photoregulation of *al-1*, a carotenoid biosynthetic gene of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* 10: 5064-5070.
- Schmidhauser, T., Lauter, F., Schumacher, M., Zhou, W., Russo, V. & Yanofsky, C. 1994. Characterization of *al-2* the phytoene synthase gene of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 269: 12060-12066.
- Schnurr, G., Misawa, N. & Sandmann, G. 1996. Expression, purification and properties of lycopene cyclase from *Erwinia uredovora*. *Biochem. J.* 315: 869-874.
- Schumann, G., Nürnberger, H., Sandmann, G. & Krügel, H. 1996. Activation and analysis of cryptic crt genes for carotenoid biosynthesis from *Streptomyces griseus*. *Mol. Gen. Genet.* 252: 658-666.
- Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.

- Ulthermohlen, J. 1994. RbCl transformación procedure for improved efficiency. The NEB Transcrip. 6:7.
- Wery, J., Dalderup, M. Linde, J., Boekhout, T. & van Ooyen, A. 1996. Structural and phylogentic analysis of the actin gene from the yeast *Phaffia rhodozyma*. Yeast 12: 641-651.
- Wieland, B, Feil, C., Gloria-Maercker, E., Thumm, G., Lechner, M., Bravo, J., Poralla, K. and Götz, F. 1994. Genetic and biochemical analyses of the biosynthesis of the yellow carotenoid 4,4'-diaponeurosporeno of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 176: 7719-7726.
- Yamada, Y. & Kawasaki, H. 1989. The genus *Phaffia* is phylogenetically separate from genus *Cryptococcus* (*Cryptococcaceae*). Agric. Biol. Chem. 53: 2845-2846.
- Yamada, Y., Nagahama, T. & 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.