

VCH-FC

Biotecnología

C764

C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO

**“SOBREEXPRESIÓN DE GENES CAROTENOGÉNICOS
ENSAMBLADOS MEDIANTE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA EN
Xanthophyllomyces dendrorhous”**

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

GABRIELA ISABEL CONTRERAS ARRIAGADA

Director de Seminario de Título:

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán

Co- Directora de Seminario de Título:

Dra. Jennifer Alcaíno Gorman

Enero de 2012

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta.

“GABRIELA ISABEL CONTRERAS ARRIAGADA”

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

Director Seminario de Título

Dr. Víctor Cifuentes

Una firma manuscrita en tinta verde, que parece ser la del Dr. Víctor Cifuentes, sobre una línea horizontal.

Co-Directora

Dra. Jennifer Alcaíno

Una firma manuscrita en tinta azul, que parece ser la de la Dra. Jennifer Alcaíno, sobre una línea horizontal.



Comisión de Evaluación

Dra. Claudia Stange (Presidenta)

Dra. Margarita Carú

Una firma manuscrita en tinta negra, que parece ser la de la Dra. Claudia Stange, sobre una línea horizontal.

Una firma manuscrita en tinta negra, que parece ser la de la Dra. Margarita Carú, sobre una línea horizontal.

AGRADECIMIENTOS

Estoy muy feliz por terminar esta etapa y ser finalmente Ingeniera en Biotecnología Molecular. Son varias las personas a las que debo agradecer por acompañarme en este proceso. Agradezco a mis amigos del curso, por su simpatía y alegría: Carolina O., Elizabeth, Fernando, Carolina P. y Manuel. Con ellos formé varios grupos de trabajos, en algunos proyectos nos fue bien y otros mal, pero siempre pasamos un rato muy agradable.

Agradezco al profesor Cifuentes, por aceptarme en el laboratorio, por sus valiosas recomendaciones y siempre estar dispuesto escucharme a pesar del poco tiempo que tiene. Agradezco especialmente a Jennifer por guiarme en todo el desarrollo de esta memoria. Ella es una persona a quien admiro mucho y no sé qué sería de mí si no estuviera ella. También agradezco a Salvador por enseñarme las técnicas cuando llegué al laboratorio en 3ºer año de Universidad. Al profesor Marcelo por las valiosas discusiones y aportes. A mis otros compañeros de laboratorio por hacer del laboratorio un lugar entretenido: Soledad, Iris, Oriana, Donny, Mario, Juan Manuel, Pablo, Natalia, Pamela, Nicole, Ignacio, Pilar y Mauricio.

Agradezco a mis padres porque fueron ellos los que me inculcaron las ganas por siempre seguir aprendiendo. También a mis hermanos: Mariana, Oscar y Loreto, por subirme el ánimo cada día. Los quiero mucho.

Muchas gracias a todos.



INDICE DE CONTENIDOS



INDICE DE TABLAS.....	v
INDICE DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Carotenoides.....	1
1.2. Astaxantina: Un carotenoide de interés comercial	3
1.3. <i>X. dendrorhous</i> , levadura productora de astaxantina	5
1.3.1. Biosíntesis de astaxantina en <i>X. dendrorhous</i>	6
1.3.1. Estrategias para mejorar la producción de astaxantina en <i>X. dendrorhous</i>	8
Hipótesis.....	13
OBJETIVOS	14
Objetivo general.....	14
Objetivos específicos	14
2. MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1 Plásmidos, cepas y condiciones de cultivo.....	15
2.2 Ácidos nucleicos y enzimas	15
2.3 Purificación de ácidos nucleicos	20
2.3.1 Extracción de DNA genómico de <i>X. dendrorhous</i>	20
2.3.2 Extracción de DNA plasmidial desde cultivos de <i>E. coli</i>	21
2.4 Digestiones de DNA plasmidial con enzimas de restricción.....	21
2.5 Electroforesis de DNA en geles de agarosa	22
2.6 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.....	22
2.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y <i>Overlap extensión</i> -PCR (OE-PCR).....	23
2.8 Secuenciación de DNA y análisis bioinformático.....	24
2.9 Ligado de los módulos de expresión al vector	25

2.10	Transformación mediante electroporación	25
2.10.1	Transformación de <i>E. coli</i> mediante electroporación	25
2.10.2	Transformación de <i>X. dendrorhous</i> por electroporación	26
2.11	Extracción y análisis de pigmentos mediante RP-HPLC	27
3.	RESULTADOS.....	29
3.1	Construcción de módulos de expresión de los genes carotenogénicos <i>crtYB</i> , <i>crtI</i> y <i>crtS</i> de <i>X. dendrorhous</i>	29
3.2	Adaptación del método de <i>DNA assembler</i> en <i>X. dendrorhous</i>	35
3.3	Aumento del número de copias de los genes <i>crtYB</i> , <i>crtI</i> y <i>crtS</i> en <i>X. dendrorhous</i> mediante <i>DNA assembler</i>	45
3.4	Evaluación del efecto del aumento de la dosis de los genes <i>crtYB</i> , <i>crtI</i> y <i>crtS</i> en la composición y cantidad de carotenoides de <i>X. dendrorhous</i>	52
3.5	Análisis de los loci <i>yhu</i> y <i>xhd</i> en el transcriptoma de la cepa UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i>	57
4.	DISCUSIÓN	59
4.1	Elección de promotores y terminadores para la construcción de módulos de expresión de genes carotenogénicos	59
4.2	Integración de un módulo de resistencia a higromicina B en el genoma de <i>X. dendrorhous</i>	60
4.3	Adaptación de la técnica de <i>DNA assembler</i> en <i>X. dendrorhous</i>	61
4.4	Impacto de la sobreexpresión de los genes <i>crtYB</i> , <i>crtI</i> y <i>crtS</i> en la composición y cantidad de carotenoides en <i>X. dendrorhous</i>	63
4.4.1	Gen <i>crtYB</i>	63
4.4.2	Gen <i>crtI</i>	65
4.4.3	Gen <i>crtS</i>	66
5	PROYECCIONES	68
6	CONCLUSIONES	69
7	BIBLIOGRAFÍA	70

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plásmidos utilizados y generados en este trabajo.....	16
Tabla 2. Cepas utilizadas y generadas en este trabajo.....	17
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados y generados en este trabajo	18
Tabla 4. Promotores y terminadores de <i>X. dendrorhous</i> utilizados para la construcción de módulos de expresión.....	31
Tabla 5. Partidores utilizados en la construcción de módulos de expresión.....	31
Tabla 6. Composición de carotenoides de la cepa silvestre y las cepas con copias adicionales de los genes <i>crtYB</i> , <i>crtI</i> y <i>crtS</i>	55

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Biosíntesis de carotenoides bicíclicos y monocíclicos en <i>X. dendrorhous</i>	7
Figura 2. Método de ensamblaje e integración de una vía metabólica mediante recombinación homóloga en <i>S. cerevisiae</i>	12
Figura 3. Construcción de módulos de expresión mediante <i>Overlap extension PCR</i> (OE-PCR).....	30
Figura 4. Mapa de los plásmidos con los módulos de expresión y evaluación de la construcción de ellos.....	33
Figura 5. Ubicación de los loci <i>yhu</i> y <i>xhd</i>	36
Figura 6. Ensamblaje e integración del módulo de resistencia a higromicina B en el genoma de <i>X. dendrorhous</i> mediante recombinación homóloga.....	38
Figura 7. Evaluación de la integración del módulo de resistencia a higromicina B en <i>xhd</i> e <i>yhu</i> mediante PCR.....	40
Figura 8. Fenotipo y producción de pigmentos de las cepas II.5, VI.1 y cepa silvestre.....	42
Figura 9. Fenotipo y genotipo de las cepas heterocigotas y homocigóticas para el módulo de expresión de resistencia a higromicina B en <i>xhd</i>	44
Figura 10. Ensamblaje e integración en el locus <i>xhd</i> del genoma de <i>X. dendrorhous</i> de los módulos de expresión de genes carotenogénicos mediante <i>DNA assembler</i>	46
Figura 11. Evaluación del número de los módulos de expresión de los genes <i>crtYB</i> , <i>crtI</i> y <i>crtS</i> en cepas transformantes.....	50
Figura 12. Fenotipo y producción de pigmentos de la cepa parental y los transformantes con copia simple y doble de los genes <i>crtYB</i> , <i>crtI</i> y <i>crtS</i> en el locus <i>xhd</i>	53
Figura 13. Mapa del estructural del gen <i>HIS3</i> , los loci <i>yhu</i> y <i>xhd</i> , y los posibles transcritos adyacentes.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
rDNA	DNA ribosomal
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
EDTA	Tetra acetato disódico de etilendiamina
RP-HPLC	Cromatografía líquida en fase reversa
Hyg	Higromicina
Kb	Kilobases
LB	Medio de Luria Bertani
min	Minutos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
TAE	Tris, acetato y EDTA
TE	Tris y EDTA
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UV	Ultravioleta
x-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
YM	Medio para levadura

RESUMEN

Los carotenoides son un diverso grupo de pigmentos liposolubles ampliamente distribuidos en la naturaleza que tienen un rol antioxidante. Dentro de ellos destaca la astaxantina, pigmento responsable del color rojo-anaranjado de una amplia variedad de organismos marinos, la cual es adquirida a través del alimento. Debido a sus características como colorante y antioxidante, la astaxantina es de gran importancia comercial principalmente por su uso como aditivo alimenticio en la salmonicultura. Uno de los sistemas biológicos más promisorios para una producción industrial de este pigmento es la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*, la cual requiere de sólo 4 genes para sintetizar astaxantina desde fitoeno: *crtI*, *crtYB*, *crtS* y *crtR*. Sin embargo, una de las mayores limitaciones para su explotación comercial como una fuente de astaxantina, es su bajo contenido en cepas silvestres y por esta razón, se han aplicado distintas estrategias para mejorar su rendimiento

El objetivo de este trabajo fue desarrollar una metodología de mejoramiento genético para la producción de astaxantina en *X. dendrorhous* utilizando la técnica de *DNA assembler*. Esta metodología consiste en transformar la levadura con fragmentos de DNA que poseen secuencias homólogas en sus extremos que mediante el proceso de recombinación homóloga, éstos se ensamblan entre sí y se integran en el genoma de la levadura. Para cumplir el objetivo propuesto, en primer lugar se adaptó y evaluó la técnica de *DNA assembler* para *X. dendrorhous*. Para ello, la levadura se transformó con un módulo de resistencia a higromicina B y dos fragmentos de DNA para dirigir la integración del módulo en su genoma. Se analizaron dos posibles sitios de integración de

la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*, *yhu* y *xhd*, cada uno correspondiente a un locus, y se seleccionó el locus *xhd*, ya que la integración en sólo este módulo de resistencia, no provocó cambios significativos en la producción de carotenoides. Posteriormente, se construyeron independientemente módulos de expresión de los genes carotenogénicos *crtYB*, *crtI* y *crtS* que fueron integrados en *X. dendrorhous* por *DNA assembler*. Dado que la cepa modelo utilizada es diploide, en primer lugar la integración de cada módulo ocurrió en una de las dos copias del sitio de integración. Luego, mediante el método del doble recombinante, fue posible obtener cepas con dos copias de cada módulo carotenogénico de expresión. La cepa con dos copias adicionales del gen *crtYB* no presentó cambios en la cantidad de carotenoides totales producidos, pero hubo una disminución en el contenido de astaxantina y un aumento en los otros carotenoides bicíclicos en comparación con la cepa parental. Las cepas portadoras de copias adicionales del gen *crtI*, presentaron una menor cantidad de carotenoides totales sin cambios significativos en la composición de pigmentos con respecto a la parental. Por otra parte, la cepa con dos copias adicionales del gen *crtS* presentó un mayor contenido de carotenoides monocíclicos y de astaxantina a costa de una disminución de otros carotenoides bicíclicos.

Como conclusión, la sobreexpresión de genes carotenogénicos individualmente, no es suficiente para aumentar el contenido de carotenoides y favorecer la producción de astaxantina en *X. dendrorhous*. Sin embargo, *DNA assembler* resultó ser un método rápido y efectivo de transformación de *X. dendrorhous* que permitirá desarrollar nuevas estrategias de transformación de esta levadura con varios genes simultáneamente.

ABSTRACT

Carotenoids are a diverse group of liposoluble pigments widely distributed in nature, which have antioxidant properties. Among carotenoids, astaxanthin stands out due to its potent antioxidant properties and for its use as a food additive in salmon farming, necessary for their flesh pigmentation. In animals, this pigment is acquired through the food chain and it is responsible for the orange-red color of a wide variety of marine animals. Due to these characteristics, astaxanthin is commercially important. One of the most promising biological sources of astaxanthin is the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. This yeast requires only 4 genes to synthesize astaxanthin from phytoene: *crtS*, *crtI*, *crtYB* and *crtR*. However, the major limitation to commercially exploit this yeast as a source of astaxanthin is the low content of astaxanthin, in wild type strains. For this reason, different strategies to improve the production of astaxanthin in *X. dendrorhous* have been applied.

The aim of this work was to develop a genetic improvement program for the production of astaxanthin in *X. dendrorhous* using the *DNA assembler* technology. This method involves the transformation of the yeast with DNA fragments with homologous ends. Once in the cell, these DNA fragments are assembled together by the endogenous homologous recombination machinery and integrated into the yeast genome. In first place, the *DNA assembler* method was adapted and evaluated for *X. dendrorhous*. For this, we transformed the yeast with a hygromycin B resistance module and two DNA fragments to direct the module integration in two alternative target sites in wild type *X. dendrorhous* UCD 67–385 strain, *yhu y xhd*, each them corresponding to a locus. We

selected *xhd* locus as an integration target, because its interruption did not cause significant changes in the carotenoids yeast production. In order to meet the main objective of this work, the *crtYB*, *crtI* and *crtS* gene expression modules were built and introduced by *DNA assembler* into a *X. dendrorhous* wild type strain. As the *X. dendrorhous* wild type strain used in this work is diploid, after the transformation event the expression module is integrated in only one of the two copies of the target site. However, the double recombinant method allowed us to generate strains with the expression module in the two homologous target sites. The strains with the *crtYB* gene additional copies did not showed changes in the total amount of carotenoids, but their composition was different: the astaxanthin content decreased and the proportion of the other bicyclic carotenoids increased, in contrast to the parental strain. Regarding the parental strain, the strains with additional *crtI* gene copies, had less total carotenoids with no significant changes in their composition. Finally, the strains with additional *crtS* gene copies did not had differences in the amount of total carotenoids with respect to the parental strain. However, the content of monocyclic carotenoids and astaxanthin increased at the expense of a decrease of the other bicyclic carotenoids

In conclusion, the overexpression of an individual carotenogenic gene is not sufficient to increase the content of carotenoids and to encourage the production of astaxanthin in *X. dendrorhous*. However, *DNA assembler* proved to be a fast and effective method for *X. dendrorhous* transformation. This will help the development of new strategies to increase the astaxanthin content by transforming this yeast with several genes simultaneously.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Carotenoides

Los carotenoides son un grupo diverso de pigmentos ampliamente distribuidos en la naturaleza, responsables del color amarillo, anaranjado o rojo de varios organismos. Están presentes en hojas (visibles en otoño al desaparecer la clorofila), frutos (tomate, pimiento, naranja, etc), flores y en tejidos animales, como en la yema de los huevos, caparazón de langostas y plumas de flamencos (Primo, 1995). Los carotenoides son sintetizados por organismos fotosintéticos, tales como plantas, algas y cianobacterias, y también por organismo no fotosintéticos como algunas bacterias, hongos filamentosos y levaduras (Lu y col, 2008). Sin embargo, los animales no son capaces de sintetizar carotenoides *de novo*, por lo que deben adquirirlos a través de la dieta (Maoka, 2011).

Estos pigmentos comprenden una familia de más de 700 compuestos (Britton y col, 2004). Están formados por 40 átomos de carbono, tetraterpenoides, sintetizados a partir de 8 moléculas de isopreno (C_5) (Britton, 1995). Estructuralmente, poseen un sistema polieno de dobles enlaces conjugados, lo que les otorga sus propiedades cromóforas (Britton, 1995). Adicionalmente, su estructura puede ser acíclica (como el licopeno) o contener un anillo de 6 carbonos, β ionona, en uno o ambos extremos. Es un grupo de moléculas extremadamente hidrofóbicas, con baja o nula solubilidad en agua. Por esta razón, los carotenoides comúnmente se encuentran en áreas hidrofóbicas de las células como las membranas lipídicas, o bien asociadas a proteínas que permiten su acceso a ambientes acuosos (Britton, 1995).

Los carotenoides se clasifican como carotenos y xantófilas. Los primeros se caracterizan por estar compuestos solo por átomos de carbono e hidrógeno, donde el β -caroteno es uno de los más conocidos. Las xantofilas son derivados oxigenados y entre ellas se encuentran la zeaxantina, luteína, cantaxantina y astaxantina (Britton, 1995).

En organismos fotosintéticos, los carotenoides son pigmentos accesorios en la fotosíntesis que disipan el exceso de energía y otorgan protección contra la fotooxidación (Lu y col, 2008). Además, en plantas participan de la síntesis de ácido abscísico y le otorgan el color a flores y frutos que atrae a animales y permite la polinización y dispersión de semillas (Bartley y col, 1995). Por otra parte, en organismos no fotosintéticos, éstos pueden secuestrar especies reactivas de oxígeno (ROS) por su propiedad antioxidante y algunos de ellos son precursores de la vitamina A. Uno de los carotenoides con mayor capacidad antioxidante es la astaxantina (Miki, 1991), la cual se ha estimado que es 10 veces mayor en relación a otros carotenoides como el β -caroteno y 100 veces mayor que el α -tocopherol (Miki, 1991). En relación a lo anterior, se ha observado que la suplementación de astaxantina puede prevenir enfermedades cardiovasculares, las cataratas (Iwamoto y col, 2000), estimular al sistema inmune (Lignell y col, 2001), reducir la inflamación gástrica y la carga bacteriana de *Helicobacter pylori* (Bennedsen y col, 2000), además de tener propiedades anticancerígenas (Higuera-Ciapara y col, 2006; Hussein y col, 2006).

1.2. Astaxantina: Un carotenoide de interés comercial

La astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β -carotene-4,4'-diona) es una xantófila que se caracteriza por ser la responsable del color rojo-anaranjado de la carne de los salmones, del caparazón de camarones y langostas, y de las plumas de aves como el flamenco, entre otros (Britton y col, 2008). Es sintetizada por algunas bacterias, microalgas, levaduras y plantas, y es adquirida por animales marinos a través de su alimento o también por la conversión metabólica de otros carotenoides absorbidos (Maoka, 2011).

La molécula de astaxantina tiene dos anillos terminales de β ionona. Cada anillo posee un grupo 3-hidroxilo (OH) y 4-ceto (C=O). Debido a los dos centros quirales en los carbonos 3 y 3' de cada anillo de β ionona, la astaxantina puede existir en tres formas estereoisómeras: dos enantiómeros (3R, 3'R y 3S, 3'S) y una forma meso (3R, 3'S y 3S, 3'R) (Schmidt y col, 2010). Por otra parte, la astaxantina se puede encontrar en forma libre, la cual es inestable y susceptible a la oxidación. Debido a ello, se ha sugerido que en la naturaleza generalmente se encuentra conjugada con proteínas (como en el exosqueleto de la langosta) o esterificada por una o dos cadenas de ácidos grasos, las cuales estabilizan la molécula (Hussein y col, 2006).

Debido a sus características de colorante y antioxidante, la astaxantina es de gran importancia comercial. Una de sus aplicaciones más importantes es en la salmonicultura, donde se utiliza obligadamente como aditivo alimenticio necesario para la pigmentación, crecimiento y reproducción de salmones y truchas (Higuera-Ciapara y col, 2006). Ello se debe a que en cautiverio, estos animales no tienen acceso a las fuentes naturales de

astaxantina, lo que resulta en que su carne no adquiere la coloración rojo-anaranjada característica, y en consecuencia, no satisfacen los requerimientos de pigmentación exigidos por el consumidor. En relación a lo anterior, el grado de pigmentación de la carne es un factor preponderante en la determinación del precio final del producto, por lo que los productores de salmones invierten sobre el 15% del costo total de producción en este pigmento (Mann y col, 2000). El mercado global de la astaxantina ha estado en constante crecimiento, el año 2007 alcanzó los US\$ 219 millones y se estima que el 2015 alcance los US\$ 253 millones (Schmidt y col, 2010). Aproximadamente el 95% de este mercado corresponde a astaxantina producida por síntesis química (Lorenz y col, 2000). Sin embargo, cada día hay una menor demanda por productos de origen sintético, lo que ha motivado la búsqueda de fuentes naturales de astaxantina. Los sistemas biológicos más promisorios para una producción comercial de este pigmento son el microalga *Haematococcus pluvialis* (Lorenz y col, 2000) y la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Schmidt y col, 2010).

Una de las diferencias entre *H. pluvialis* y *X. dendrorhous* para una producción comercial del pigmento, es que el primero produce principalmente astaxantina mono esterificada (70%) y el estado no esterificado (libre) solo alcanza el 5% (Lorenz y col, 2000). Debido a esto, se ha reportado que la suplementación de astaxantina producida por el alga alcanza bajos niveles de pigmentación en trucha arcoíris (Sommer y col, 1991), ya que en el músculo de truchas y salmones predomina la astaxantina no esterificada (Torrissen y col, 1989). En cambio, *X. dendrorhous* sintetiza astaxantina 100% libre (Schmidt y col, 2010). Adicionalmente, el desarrollo de las tecnologías de

cultivo de *H. pluvialis* es menor en comparación con las levaduras, lo que disminuye el interés para su explotación comercial (Markovits, 1991). Estas razones le dan una ventaja competitiva a *X. dendrorhous* sobre el alga. Sin embargo, la principal desventaja de la levadura, es su bajo contenido de astaxantina (200-400 $\mu\text{m/g}$ peso seco) (Johnson y col, 1979), lo que ha motivado a investigadores a conocer y estudiar la regulación de la síntesis de astaxantina en esta levadura.

1.3. *X. dendrorhous*, levadura productora de astaxantina

X. dendrorhous es una levadura basidiomicete pigmentada rojo-anaranjada y es el estado teleomórfico (formadora de basidios) de *Phaffia rhodozyma* (Golubev, 1995), siendo esta última originalmente aislada desde exudados de árboles de zonas frías de Japón, Finlandia y Rusia (Phaff y col, 1972; Golubev, 1995). *X. dendrorhous* es de gran interés biotecnológico debido a su capacidad de sintetizar carotenoides, principalmente xantófilas, donde la astaxantina representa entre el 83-87% del total de carotenoides, seguido por la fenicoxantina (5-7%), 3-hidroxiéquinenona (3-4%), equinenona (2-4%) y β -caroteno (2-2,5%) (Andrewes y col, 1976; Schmidt y col, 2010). En cuanto a la función que la astaxantina cumpliría en *X. dendrorhous*, se sugiere que ésta actuaría como un antioxidante inactivando las ROS generadas en su hábitat natural (exudados de árboles) o producidas por el metabolismo oxidativo intracelular propio (Schroeder y col, 1995). Además, se ha planteado que la síntesis de astaxantina compensa la falta o la muy disminuida actividad de otras enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa y catalasa (Schroeder y col, 1993).

1.3.1. Biosíntesis de astaxantina en *X. dendrorhous*.

La astaxantina es un metabolito secundario, es decir, no tiene un rol directo en el crecimiento y reproducción en el organismo donde es sintetizado. En *X. dendrorhous* la producción de astaxantina se deriva de la vía del mevalonato (Figura 1). Tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar el mevalonato, que luego es transformado a isopentenil pirofosfato (IPP), precursor de los isoprenoides (Sandmann, 2001). A partir del IPP, se forma el dimetilalil pirofosfato (DMAPP) catalizado por la enzima IPP isomerasa, codificada por el gen *idi* (Kajiwara y col, 1997).

Una molécula de IPP y otra de su isómero DMAPP, se condensan para formar el geranil pirofosfato, GPP. La adición de unidades adicionales de IPP forma de manera consecutiva el farnesil pirofosfato, FPP, y el geranil-geranil pirofosfato, GGPP. En estos pasos participa la enzima GGPP sintasa (gen *crtE*) (Niklitschek y col, 2008) y posiblemente la enzima farnesil pirofosfato sintasa, codificada por el gen *FPS* que ha sido recientemente descrito en nuestro laboratorio (Romero, 2010).

La condensación de dos moléculas de GGPP produce el primer carotenoide de esta vía, el fitoeno (C₄₀), paso catalizado por la actividad fitoeno sintasa de la enzima bifuncional fitoeno β-caroteno sintasa (PBS, gen *crtYB*) (Verdoes y col, 1999a; Alcaíno 2002). Cuatro desaturaciones del fitoeno por la catálisis de la enzima fitoeno desaturasa (gen *crtI*) conducen a la formación de licopeno (Verdoes y col, 1999b), cuyos extremos son ciclados por la actividad licopeno ciclasa de la enzima PBS (gen *crtYB*) formando el β-caroteno (Verdoes y col, 1999a).

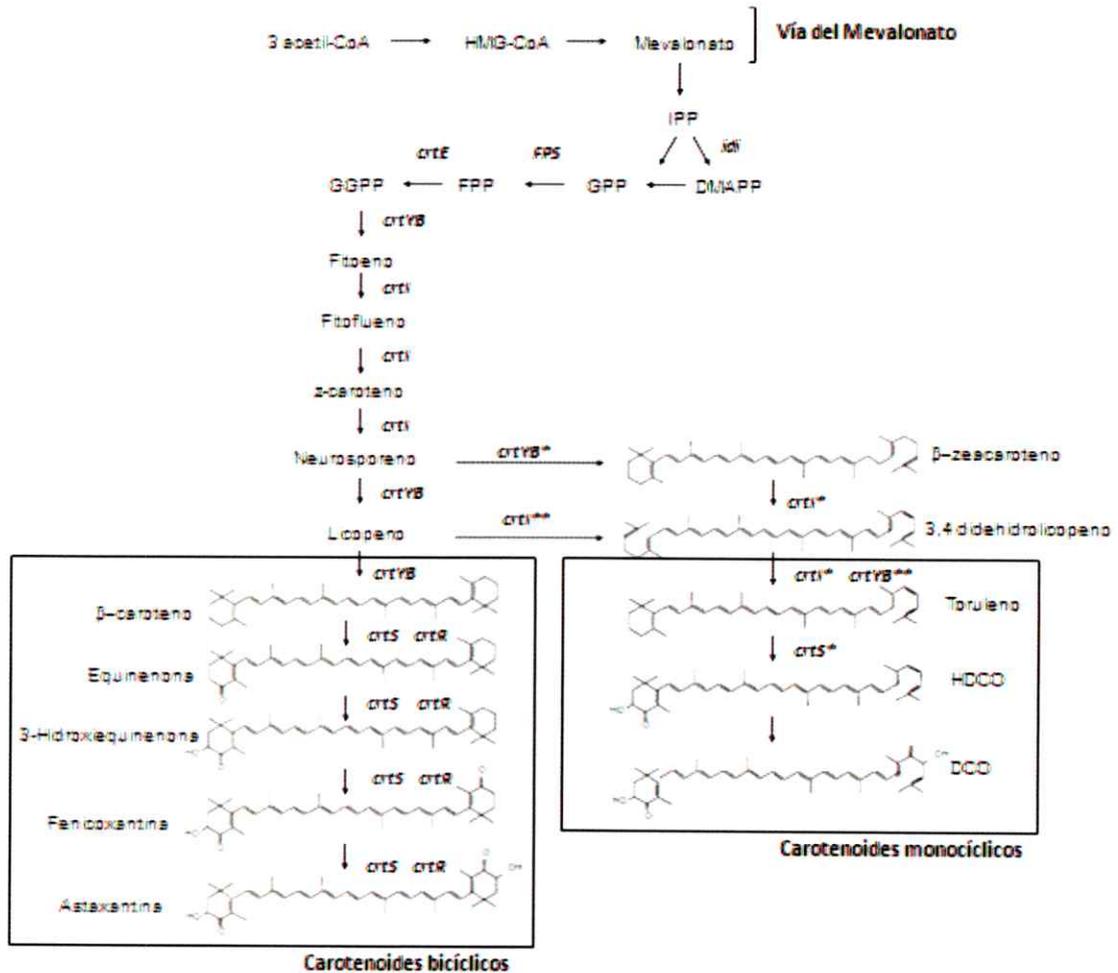


Figura 1. Biosíntesis de carotenoides bicíclicos y monocíclicos en *X. dendrorhous*. Isopentenil pirofosfato (IPP), dimetilalil pirofosfato (DMAPP), geranil pirofosfato (GPP), farnesil pirofosfato (FPP), geranilgeranil pirofosfato (GGPP). Se indica los genes estructurales participantes en la formación de carotenoides bicíclicos y monocíclicos desde la formación de fitoeno. Asteriscos (* y **) indican potenciales rutas para la formación de toruleno desde neurosporeno. Figura adaptada de Visser y col, 2003; Schmidt y col, 2010.

Finalmente, la formación de astaxantina involucra la oxidación secuencial del β -caroteno, al que se adicionan grupos ceto en los carbonos C4 y C4', e hidroxilo en los carbonos C3 y C3' de ambos anillos. Estos pasos requieren de las enzimas astaxantina sintasa (gen *crtS*) (Álvarez y col, 2006; Ojima y col, 2006) y citocromo P450 reductasa (gen *crtR*) (Alcaíno y col, 2008).

Paralelamente, se ha propuesto la existencia de una vía de síntesis de carotenoides monocíclicos (An y col, 1999), que diverge de la vía de los bicíclicos en el neurosporeno (uno de los productos de desaturación del fitoeno) y prosigue con β -zeacaroteno, γ -caroteno, toruleno y 3-hidroxi-3',4'-didehidro- β,ψ -caroteno-4-ono (HDCO) y el producto final 3,3'-dihidroxi- β,ψ -caroteno-4,4'-diona (DCD). Se desconoce las enzimas participantes en esta vía, sin embargo, se propone que las enzimas codificadas por los genes *crtI*, *crtYB* y *crtS*, participarían en esta ruta (Figura 1) (Visser y col, 2003).

1.3.1. Estrategias para mejorar la producción de astaxantina en *X. dendrorhous*.

Como se expuso anteriormente, la principal desventaja de *X. dendrorhous* como fuente industrial para la producción de astaxantina, es su bajo contenido de astaxantina en cepas silvestres. Por esta razón, se han desarrollado distintas estrategias para mejorar su rendimiento como: i) Optimización de las condiciones de cultivo y fermentación, que incluye el estudio de parámetros, tales como: niveles de glucosa, oxígeno, fosfato, intensidades de luz, inhibidores de la cadena respiratoria y la razón carbono/nitrógeno (Yamane y col, 1997; de la Fuente y col, 2010; Flores-Cotera y col, 2001; Chávez-

Cabrera y col, 2010). Estos estudios han contribuido al conocimiento de la carotenogénesis, pero los resultados de productividad de astaxantina alcanzados, no han sido satisfactorios para una explotación industrial. ii) Por mutagénesis clásica con mutágenos físicos, como la luz ultravioleta, o químicos, como el N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), se han obtenido cepas de la levadura con una mayor producción de astaxantina (An y col, 1989; Retamales y col, 1998) de hasta 1.400 µg/g [peso seco](Meyer y col, 1993). Sin embargo, la inestabilidad genética es el mayor problema de las mutantes hiperproductoras de carotenoides (An y col, 1989). Además, generalmente las cepas mutantes estables presentan una disminución en la tasa de crecimiento y/o biomasa (An y col, 1989; Fang y col, 1993; Meyer y col, 1993). iii) Ingeniería metabólica, mediante la cual se manipula los procesos metabólicos utilizando la tecnología del DNA recombinante (Verdoes y col, 2003).

El desarrollo de la ingeniería metabólica para permitir la biosíntesis de carotenoides en un hospedero heterólogo requiere que este sea capaz de sintetizar moléculas precursoras de isoprenoides y almacenar compuestos lipofílicos (Jonas y col, 2009). Por esta razón, uno de los principales candidatos para una producción heteróloga de astaxantina es la levadura no carotenogénica *Saccharomyces cerevisiae* (Yamano y col, 1994). En esta levadura se ha logrado obtener cepas productoras de astaxantina al sobreexpresar el gen endógeno *BTS1* (homólogo al gen *crtE* de *X. dendrorhous*) y al expresar los genes *crtYB*, *crtI*, *crtS* y *crtR* de *X. dendrorhous*, alcanzando bajas cantidades de astaxantina (3 µg/g [peso seco]). Al reemplazar estos dos últimos genes por los genes bacterianos *crtW* y *crtZ*, se alcanzó niveles mayores (29 µg/g [peso seco])

(Ukibe y col, 2009). Según los resultados expuestos, las cantidades producidas en hospederos heterólogos no son competentes a las cantidades alcanzadas en *X. dendrorhous*, ya que actualmente aún falta mucho por conocer de la biosíntesis del pigmento. Por lo tanto, *X. dendrorhous* sigue siendo un buen candidato para la producción de astaxantina de manera industrial.

En *X. dendrorhous* también se ha alterado la ruta de biosíntesis de carotenoides construyendo cepas con múltiples copias de estos genes luego de ser transformadas con un vector que dirige la integración en el DNA ribosomal de la levadura. Al aumentar el número de copias del gen *crtYB* hay un leve aumento en el contenido total de carotenoides, como de β -caroteno y equinenona, pero no así el de astaxantina, lo que indicaría el posible paso limitante de la actividad astaxantina sintasa (gen *crtS*). Además, se observó una disminución en los carotenoides monocíclicos (Verdoes y col, 2003). En oposición, al sobreexpresar el gen *crtI* se observó una disminución en el contenido de carotenoides totales y un 50% menos de astaxantina. Sin embargo, el contenido de carotenoides monocíclicos aumentó hasta 4 veces, como los casos del HDCO y toruleno (Verdoes y col, 2003). De la misma forma, al sobreexpresar el gen *idi*, se observó una disminución en el contenido de astaxantina y de carotenoides totales en comparación a la cepa silvestre (Visser y col, 2005). Sin embargo, es necesario destacar que estos resultados han sido un gran avance principalmente si consideramos la escasez de herramientas moleculares, por ejemplo la carencia de vectores, para la manipulación de *X. dendrorhous*.

Las estrategias de transformación que utilizan la propia maquinaria de recombinación de *X. dendrorhous* han resultado exitosas (Wery y col, 1998; Visser y col, 2005) y en nuestro laboratorio hemos desarrollado distintas técnicas que nos han permitido modificar genéticamente esta levadura. Dentro de ellas destacan la construcción de módulos de expresión de genes de resistencia a antibióticos (Niklitschek, 2007). Además, hemos logrado obtener mutantes de varios genes carotenogénicos utilizando la propia maquinaria de recombinación de la levadura (Alcaíno y col, 2008; Niklitschek y col, 2008; Romero, 2010). En relación a lo anterior, recientemente se ha reportado en *S. cerevisiae* un método eficiente de transformación por integración, llamado *DNA assembler*, que se basa en el proceso de recombinación homóloga (Shao y col, 2009). Utilizando este método, se logró el ensamblaje e integración de los genes de las vías de utilización de D-xilosa y biosíntesis de zeaxantina (8 genes en total equivalentes a 19 kb), en solo un evento de transformación. El sistema demostró ser eficiente para ensamblar genes tanto en un plásmido como su integración en un cromosoma de la levadura. Para esta técnica se requiere de fragmentos de DNA que contengan extremos homologos de al menos 40 pb entre sí. Uno de estos fragmentos puede ser un vector o un *helper fragment*, es decir, un fragmento de DNA compuesto por un marcador de selección y una secuencia homóloga a un sitio específico del cromosoma para dirigir la integración (Figura 2). Los fragmentos de DNA (módulos de expresión y vector linearizado o *helper fragment*) son incorporados en *S. cerevisiae* por electroporación y por el mecanismo de recombinación homóloga, los fragmentos de DNA se ensamblan entre sí y con el vector o se integran en el cromosoma de la levadura.

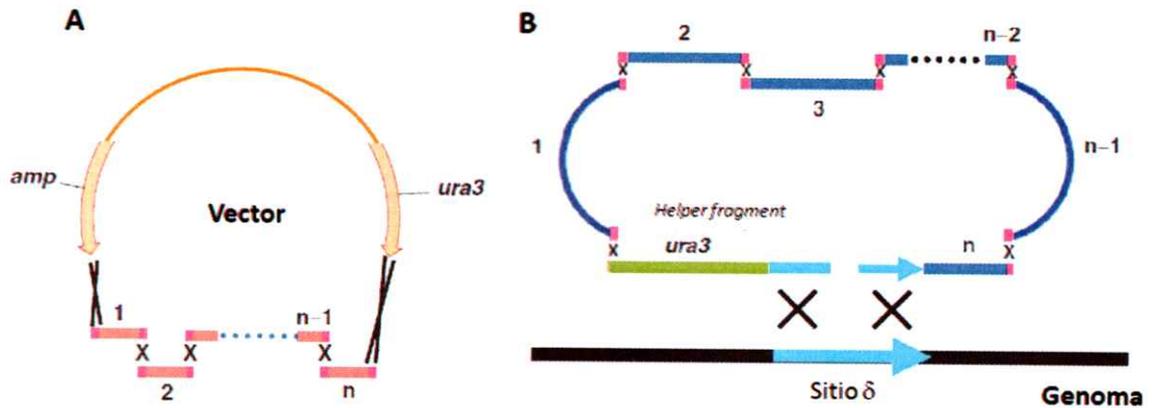


Figura 2. Método de ensamblaje e integración de una vía metabólica mediante recombinación homóloga en *S. cerevisiae*. A) Ensamblaje de los módulos en un vector con resistencia a antibiótico (*amp*) y marcador de selección (*ura3*) B) Ensamblaje e integración de los módulos y *helper fragment* en un sitio específico (sitio δ) del genoma de *S. cerevisiae*. 1,2,3, n-1 y n representan los módulos de expresión. Los extremos homólogos de los fragmentos de DNA se representan en rosado. X: evento de recombinación. Modificado de Shao y col, 2009.

Finalmente debemos destacar que aún falta mucho por comprender de la genética de la levadura *X. dendrorhous* y para poder estudiarla se requiere de un método efectivo y eficiente de transformación. El método de *DNA assembler* es una metodología potencial para estos propósitos y junto con la ingeniería metabólica, que no solo tiene por objetivo aumentar la producción de un compuesto dado, sino también entender el proceso de biosíntesis, son herramientas que posiblemente permitirán encontrar en un futuro una estrategia que mejore la producción de astaxantina en *X. dendrorhous*. De acuerdo a lo anteriormente descrito, se plantea la siguiente hipótesis:

Hipótesis

La técnica de *DNA assembler* es funcional en *X. dendrorhous* y permite aumentar el número de copias de los genes *crtYB*, *crtI* y *crtS*, alterando la composición y cantidad de carotenoides en la levadura.

OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar una metodología de mejoramiento genético utilizando la técnica de *DNA assembler* para incrementar la dosis de los genes de carotenogénesis en *X. dendrorhous*.

Objetivos específicos

- Construir módulos de expresión de los genes carotenogénicos *crtYB*, *crtI*, y *crtS*.
- Adaptar la técnica de *DNA assembler* para *X. dendrorhous*.
- Aumentar el número de copia de los genes *crtYB*, *crtI* y *crtS* en *X. dendrorhous* mediante *DNA assembler*.
- Evaluar el impacto de la sobreexpresión de los genes *crtYB*, *crtI* y *crtS* en la composición y cantidad de carotenoides en *X. dendrorhous*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Plásmidos, cepas y condiciones de cultivo

Los nombres y descripciones de los plásmidos y cepas utilizados en este trabajo se encuentran en la tabla 1 y 2, respectivamente.

Las cepas de *E. coli* se cultivaron a 37 °C y agitación constante en medio Luria Bertani (LB) (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 5 g/l) (Sambrook y col, 2001). Las cepas portadoras del plásmido pBluescript SK- se crecieron en medio LB suplementado con ampicilina 100 µg/ml (Amp).

Las cepas de *X. dendrorhous* se cultivaron a 22 °C y agitación constante en medio YM (extracto de levadura 3 g/l, extracto de malta 3 g/l, glucosa 10 g/l y peptona 5 g/l). Las cepas transformantes de UCD 67-385 se crecieron en medio YM suplementado con higromicina B a 15 µg/ml. Para el análisis de auxotrofia, la levadura se cultivó en medio mínimo (MM_v) con glucosa al 2% (Retamales y col, 2002). Para cultivos en medio sólido, los medios se suplementaron con agar al 1,5 %.

2.2 Ácidos nucleicos y enzimas

Como marcador de peso molecular se utilizó el DNA del bacteriófago lambda digerido con la enzima de restricción *HindIII* (Fermentas). Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y secuenciación se indican en la tabla 3, los que fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies. Para crear fragmentos de DNA con homología, se

Tabla 1. Plásmidos utilizados y generados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Fuente/referencia
pBluescript SK-	Vector clonamiento MCS incluido en el gen <i>lacZ</i> . Amp ^r , ColE1 ori	Invitrogen
pMN-Hyg	pBluescript SK- con el módulo de resistencia a higromicina B (gen <i>hph</i> bajo el promotor del factor de elongación 1 α y el terminador de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de <i>X. dendrorhous</i>) en el sitio <i>EcoRV</i> .	(Niklitschek, 2007)
pXd_Ex_crtYB	pBluescript SK- con el cDNA del gen <i>crtYB</i> en el sitio <i>EcoRV</i> .	(Alcaño, 2002)
pXd_Ex_crtI	pBluescript SK- con el cDNA del gen <i>crtI</i> en el sitio <i>EcoRV</i> .	(Lodato, 2002)
pXd_Ex_crtS	pBluescript SK- con el cDNA del gen <i>crtS</i> en el sitio <i>EcoRV</i> .	(Carmona, 2007)
pBS-PTEF-crtS-Tact	pBluescript SK- con el módulo de expresión del gen <i>crtS</i> (gen <i>crtS</i> bajo el promotor TEF y el terminador de actina de <i>X. dendrorhous</i>) en el sitio <i>EcoRV</i> .	Este trabajo.
pBS-Pact-crtYB-TgdhA	pBluescript SK- que contiene en el sitio <i>EcoRV</i> , el módulo de expresión del gen <i>crtYB</i> (gen <i>crtYB</i> bajo el promotor de actina y el terminador de la glutamato deshidrogenasa de <i>X. dendrorhous</i>).	Este trabajo.
pBS-PADH1-crtI-TINV	pBluescript SK- que contiene en el sitio <i>EcoRV</i> , el módulo de expresión del gen <i>crtI</i> (gen <i>crtI</i> bajo el promotor de la alcohol deshidrogenasa y el terminador de β -fructofuranosidasa de <i>X. dendrorhous</i>).	Este trabajo.

MCS. Sitio de múltiple clonamiento; Amp^r: Resistencia a ampicilina; ColE1 ori: Origen de replicación bacteriano

Tabla 2. Cepas utilizadas y generadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Fuente/referencia
<i>E. coli</i> DH5 α	Amp ^s	(Sambrook y col, 2001)
<i>X. dendrorhous</i> UCD 67-385	Cepa parental (diploide e Hyg ^s)	ATCC 24230
VI.I	Transformante de la cepa UCD 67-385, Hyg ^f . Contiene una copia del módulo de resistencia a higromicina B en <i>xhd</i> ^a	Este trabajo.
VI.I.c2	Transformante de la cepa UCD 67-385, Hyg ^f . Contiene dos copias del módulo de resistencia a higromicina B en <i>xhd</i> ^a	Este trabajo.
II.5	Transformante de la cepa UCD 67-385, Hyg ^f . Contiene una copia del módulo de resistencia a higromicina B en <i>yhu</i> ^b	Este trabajo.
IV.1,1.c1	Transformante de la cepa UCD 67-385, Hyg ^f . Contiene una copia adicional del gen <i>crtS</i> y del módulo de resistencia a higromicina B en <i>xhd</i> ^a	Este trabajo.
IV.1,1.c2	Transformante de la cepa UCD 67-385, Hyg ^f . Contiene dos copias adicionales del gen <i>crtS</i> y del módulo de resistencia a higromicina B en <i>xhd</i> ^a .	Este trabajo.
V.A2.c1	Transformante de la cepa UCD 67-385, Hyg ^f . Contiene una copia adicional del gen <i>crtYB</i> y del módulo de resistencia a higromicina B en <i>xhd</i> ^a .	Este trabajo.
V.A2.c2	Transformante de la cepa UCD 67-385, Hyg ^f . Contiene dos copias adicionales del gen <i>crtYB</i> y del módulo de resistencia a higromicina B en <i>xhd</i> ^a .	Este trabajo.
V.B3.c1	Transformante de la cepa UCD 67-385, Hyg ^f . Contiene una copia adicional del gen <i>crtI</i> y del módulo de resistencia a higromicina B en <i>xhd</i> ^a .	Este trabajo.
V.B3. c2	Transformante de la cepa UCD 67-385, Hyg ^f . Contiene dos copias adicionales del gen <i>crtI</i> y del módulo de resistencia a higromicina B en <i>xhd</i> ^a .	Este trabajo.

Amp^s: Sensible a ampicilina; Hyg^s: Sensible a higromicina B; Hyg^f: Resistente a higromicina B; ATCC = American Type Culture Collection; *xhd*^a: locus ubicado río abajo del gen *HIS3*; *yhu*^b: locus ubicado río arriba del gen *HIS3*

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados y generados en este trabajo.

Nº	Nombre	Secuencia (5' a 3')	Dirección
Construcción módulos de expresión			
1	TEF. 1F	GGCTCATCAGCCGACAGTTC	D
2	21TEF-13crtS. R	CCAAGATGAACAT TGAAGCTGTTTCGAGATAGATT	R
3	13TEF-21crtS. F	TCGAACAGCTTCAAT GTTTCATCTTTGGTCTTTGCTC	D
4	21 crtS- 13ACTt. R	AGACTTTTGGTTGACT CATTCGACCCGGCTTGACCTG	R
5	21ACTt-13crtS. F	GCCGGTTCGAATGAG TCAACAAAGTCTTTCTATCC	D
6	21 actT. R	TATTTATTACGTCTAATGTA	R
7	adhP. F	TCTGTCATTCGCTCGTTTTT	D
8	20adhP- 13crtI. R	GTTCTTTTCCCATTGTGGGGTTCAGATGATGTG	R
9	20 crtI- 13 adhP. F	TCTGAACCCCAACAAT GGGAAAAGAACAAGATCA	D
10	20 crtI- 13 invT. R	GATAGTAGGATACT CAGAAAGCAAGAACCACAA	R
11	20 invT- 13 crtI. F	TCTTGGCTTTCTGAG TATCCTACTATCGTACTTT	D
12	invT. R	TCCTCATCTCTCGGCTTTTGG	R
13	actP. F	TACAAGAGCATTTACAGCCTA	D
14	20 actP-13 crtYB. R	CGAGAGCCGTCAT GGTGGGCTAGACTGTTTCTT	R
15	20crtYB-13 actP. F	AGTCTAGCCCACC ATGACGGCTCTCGCATATTA	D
16	20crtYB- 13 gdhaT. R	GAGGCGGGGTAAT TTACTGCCCTTCCCATCCGC	R
17	20gdhaT- 13 crtYB. F	GGAAGGGCAGTAAAT TACCCCGCTCTCTCACA	D
18	gdhaT. R	CGCAAGAGCCGTGTTCGAAG	R
Transformación de <i>X. dendrorhous</i>			
19	x.His.up.F	TTGCAACCTCGAGTTGATAG	D
20	x.His.up.R	TTGGTCTCGTCTTTGTTCGC	R
21	x.H.up-50TEF.R	GACGATCTAGGCAAAGAGCTTTGTGT CGGATGAACTG TCGGCTGATGAGCCT TTGGTCTCGT	D
22	TEF-50.x.H.up.F	TCGTCTTCTTTTTTCGATCTAAGGCACAGACGCGAAC AAA GACGAGACCAAGGCTCATCAG	R
23	gpd-50xH.dw. R	ATATCTGAAGGGAAAAAAGAAAAACGAAAGAACCTC ACTCAACCGATGTCATCATGAGAG	D
24	xH.dw-50gpdT. F	TTCAATCACATCTGTTGACCATCACCATCATCTCCG TCATCTCTCATGATGACATCGGTT	R
25	xHis.dw. F	GACATCGGTTGAGTGAGGTT	D
26	xHis.dw. R	AATTTGTGATGTGTGACGGGC	R
27	yHisU.up.F	TAGATGTCCTCGTAGACGAG	D
28	yHisU.up. R	AACCTATCAAACGTCAACC	R
29	yHisU.up-48TEF. R	CGATCTAGGCAAAGAGCTTTGTGTTCGGATGAACTGTC GGCTGATGAGCCAACCTATCAAAC	R
30	TEF-50yHis.U.up. F	GTAAGCATAAAACAAGCAACAGGACTGTGTGGGTTGA CAGTTTGATAGGTTGGCTCATCAG	D
31	gpdT-50yH.dw. R	TCTTTGTACATTTCTCAATTTCTCCGCTTTCTCTCC AACTCTTTTCTTGCATCATGAGAG	R

D: Directo, R: Reverso; nucleótidos de superposición se indica en negrita

Tabla 3 (continuación).

Nº	Nombre	Secuencia (5' a 3')	Dirección
32	yHisU. dw-50gpd. F	TTCAATCACATCTGTTGACCATCACCATCATCTCCGT CATCTCTCATGATGCAAGAAAAG	D
33	yHisU.dw. F	GCAAGAAAAGAGTTGGGAGG	D
34	yHisU.dw. R	AAATCTCCGGATACTGCTCC	R
35	10TEF-50gpd.F	TTCAATCACATCTGTTGACCATCACCATCATCTCCGT CATCTCTCATGATGGCTCATCAG	D
36	ACTt-50xHis.R	ATATCTGAAGGGAAAAAAGAAAAACGAAAGAACCTCA CTCAACCGATGTCATTTTATTAC	R
37	xHis.49actF.F	ATGAGATTTATTCAACTACTAAATAACGATACATTAG ACGTAATAAATAGACATCGGTTG	D
38	x.His.up-50x.R	CCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGT CAGTCAGTCAGTCCTTGGTCTCGT	R
39	sx50 TEF.R	GACGATCTAGGCAAAGAGCTTGTGTCCGGATGAACTGT CGGCTGATGAGCCCCAGTCAGTC	R
40	gpdT.50X.R	CCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGT CAGTCAGTCAGTCATCATGAGAG	R
41	Sx50Padh.R	GACGTTTCTGAGGAGCCCCCTCGATGGGAAGAAAAACG AGGCAATGACAGACCAGTCAGTC	R
42	Tinv.50xHis.dw.R	ATATCTGAAGGGAAAAAAGAAAAACGAAAGAACCTCA CTCAACCGATGTCCTCATCTC	R
43	xHisdw.49Tinv.F	TACAAGACGGAAAGAAAGAGAGCCAATGTCAAAGCC GAGAGATGAGGAGACATCGGTTG	D
44	Sx50ACTp.R	TGACTTCCACCTCTCACTTCCATTCACATATAGGCTG TAATGCTCTTGTACCAGTCAGTC	R
45	Tgdh50xHis.dw.R	ATATCTGAAGGGAAAAAAGAAAAACGAAAGAACCTCA CTCAACCGATGCCGCAAGAGCC	R
46	xHis.dw-50gdhT.F	GATGATCTTCTTTTCGCCAFTTTCTTTCCCCCTTGAAC AACGGCTCTTGGCGACATCGGTT	D
47	gpd.R	ATCATGAGAGATGACGGAGA	R
Evaluación de la transformación en <i>X. dendrorhous</i>			
48	1.out.xHis.F	GAGAGGAAGATAGAGGAGAG	D
49	2.out.xHis. R	CGTTCAGGAGTGTGAAAACG	R
50	1.out.yHis.F	CTTCGACCACTACTTCAACG	D
51	2.out.yHis. R	ACTGTCTCCATGCTGAAACC	R
52	HF	ATGAAAAGCCTGAACTCACC	D
53	HR	CTATTCCTTTGCCCTCGGAC	R
54	1.in.xHis.F	AGATCATTAGCAGGTGAGCC	D
55	2.in.xHis.R	GTTTACCACCTGCCCTCAAAC	R

D: Directo, R: Reverso; nucleótidos de superposición se indica en negrita.

utilizaron partidores con secuencias de superposición en sus extremos 5', indicados en negritas en la tabla 3.

Las enzimas *Pfu* DNA Polimerasa, Rnasa A, T4 DNA ligasa y la endonucleasa de restricción *EcoRV* fueron adquiridas de las empresas Promega, New England BioLabs, Agilent, Sigma y Gibco-BRL, y se usaron de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

2.3 Purificación de ácidos nucleicos

2.3.1 Extracción de DNA genómico de *X. dendrorhous*

La extracción de DNA genómico se realizó mediante perlas de vidrio (Sambrook y col, 2001). Se cosecharon células provenientes de placa o de medio líquido por centrifugación a 4.000 x g y se resuspendieron en 400 µl de buffer TE (Tris- EDTA 10:25, pH 8.0) y 250 µl de perlas de vidrio 0,5 mm. Posteriormente, se agitó en un vórtex a máxima velocidad durante 10 min. Luego, se agregó 400 µl fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se llevó 1 min a vórtex y se centrifugó a 10.976 x g por 5 min. A la fase acuosa obtenida se le realizó una segunda extracción fenólica y para eliminar los restos de fenol, se lavó con 400 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). El DNA se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto y la mezcla se incubó a -20 °C al menos por 2 h. Finalmente, el DNA se colectó por centrifugación a 10.976 x g por 10 min y se suspendió en buffer TE (Tris-EDTA 10:1, pH 8,0) con 34 µg/ml de RNasa A. Luego, la mezcla se incubó durante 30 min a 37 °C. El DNA obtenido se evaluó en un gel de agarosa según 2.6 y posteriormente se guardó a -20 °C hasta su utilización.

2.3.2 Extracción de DNA plasmidial desde cultivos de *E. coli*

La extracción de DNA plasmidial de *E. coli* se realizó por el método de lisis alcalina (Sambrook y col, 2001). Las células de 7 ml de cultivo suplementado con antibiótico se recolectaron por centrifugación durante 5 min a 4.000 x g. El pellet celular se suspendió en 100 µl de Solución I (Tris-HCl 25 mM; EDTA 10 mM; glucosa 50 mM; pH 8,0) y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió 200 µl de solución II (NaOH 0,2 N; SDS 1%), se mezcló suavemente y se dejó 5 min en hielo. Después, se agregó 150 µl de solución III (acetato de potasio 5 M), se agitó suavemente y se mantuvo por 5 min en hielo. La mezcla se centrifugó a 10.976 x g durante 5 min. La fase acuosa se lavó dos veces con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y una vez con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Para la precipitación del DNA se añadió 2 volúmenes de etanol absoluto y se mantuvo por al menos 2 h a -20 °C. Luego, se centrifugó 5 min a 10.976 x g y se eliminó el sobrenadante. Finalmente, el DNA plasmidial se secó y se suspendió en buffer TE (Tris-EDTA 10:1; pH 8,0) con Rnasa A a 34 µg/ml. La mezcla se incubó durante 30 min a 37 °C, se evaluó en un gel de agarosa según sección 2.6 y luego el DNA se guardó a -20° C hasta su utilización. Para efectos de secuenciación, el DNA plasmidial se purificó con el kit comercial de Axygen AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit, según las indicaciones del fabricante.

2.4 Digestiones de DNA plasmidial con enzimas de restricción

Para la digestión del plásmido Bluescript SK- se utilizó la endonucleasa de restricción *EcoRV* (Fermentas), según las especificaciones del fabricante. Un µg de

vector se digirió con 10 unidades enzimáticas en buffer 1X a un volumen final de 50 µl, durante 1 h a 37 °C.

2.5 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

El DNA cromosómico, plasmidial o fragmentos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0) con bromuro de etidio 0,5 µg/ml. Las muestras de DNA se mezclaron con buffer de carga GLD 1X (Ficoll 0,3%; azul de bromofenol 0,04%; glicerol 5,8%) y las bandas de DNA se visualizaron por la fluorescencia emitida al irradiar con luz ultravioleta. El tamaño y la concentración del DNA se determinó utilizando el programa Kodak 1D versión 2.0.1 utilizando como estándar de peso molecular el DNA del fago lambda digerido con la enzima de restricción *HindIII* (Fermentas).

2.6 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Para purificar fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se utilizó el método de perlas de sílica (Boyle y col, 1995). La banda de DNA de interés se cortó con un bisturí desde un gel de agarosa y se transfirió a un tubo Eppendorf. Se añadió 3 volúmenes de KI 6 M, de acuerdo al peso del trozo de gel, y se incubó a 55 °C hasta que la agarosa estuviese totalmente disuelta. Luego, se añadió 7 µl de *glassmilk* (perlas de sílica suspendidas en KI 3 M) y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó por 30 s a 10.976 x g, se eliminó el sobrenadante y se lavó dos veces con 500 µl de "New Wash" (Tris-HCl 10 mM; NaCl 50 mM; EDTA 2,5 mM; etanol 50 %; pH 7,5), centrifugando 30 s a 10.976 x g en cada lavado. Las perlas se

suspendieron en 14 μ l de agua y se incubó durante 5 min a 65 °C. Para recuperar el DNA, se centrifugó a 10.976 x g por 30 s y luego se evaluó en un gel de agarosa. El DNA se guardó a -20 °C hasta su utilización.

2.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y *Overlap extensión*-PCR (OE-PCR)

Las reacciones de amplificación se realizaron con la DNA polimerasa *Taq* (Genlab). Sin embargo, para la amplificación de cDNA se utilizó la enzima *Pfu* (Agilent), ya que la tasa de error de la última es menor que la primera (Cline y col, 1996). Cada reacción estaba compuesta por: 1X de buffer (Tris-HCl 200 mM; KCl 500 mM; pH 8,4); MgCl₂ 2mM; 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 1 μ M de cada partidor; 10-20 ng de DNA molde y 1 unidad enzimática de DNA polimerasa en un volumen final de 25 μ l. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Applied Biosystems 2720 con el siguiente programa: 3 min de desnaturalización (ó 5 min para PCR de colonias) a 94 °C, seguido por 35 ciclos de: 30 s a 94 °C de desnaturalización, 30 s a 55 °C para el alineamiento de partidores y 3 min a 72 °C de extensión. Finalmente, la reacción se mantuvo 10 min a 72 °C para una elongación final y luego a 4 °C hasta su análisis.

Los distintos módulos de expresión se construyeron por *Overlap extension* PCR (OE-PCR) (Horton y col, 1989; Niklitschek y col, 2008) con la DNA polimerasa *Pfu*. Cada elemento del módulo de expresión (promotor, cDNA de gen *crtS*, *crtI* o *crtYB*, y terminador) se amplificó por PCR con partidores diseñados de tal manera que los

fragmentos de DNA a unir, complementaran entre sí (Tabla 3). Los fragmentos de DNA se unieron en un volumen final de 25 µl de una solución compuesta por: 0,2 mM de cada dNTPs, buffer de PCR 1X, 1 unidad enzimática de *Pfu* DNA polimerasa y 1 ng por pb de cada fragmento de DNA. Las reacciones se realizaron en un termociclador Applied Biosystems 2720 con el siguiente programa: 1 min de desnaturalización inicial a 94 °C, 10 ciclos compuestos por: 30 s a 94 °C de desnaturalización, 45 s a 55 °C para el alineamiento de los fragmentos y 1,5 min a 72 °C para la elongación. Luego, 10 min a 72 °C para la elongación final. De esta reacción, se utilizó 8 µl para una reacción estándar de PCR para amplificar el producto generado con los partidores adecuados (según los fragmentos de DNA unidos).

2.8 Secuenciación de DNA y análisis bioinformático

La secuenciación de DNA se realizó en un secuenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) con el kit de terminadores fluorescentes BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Las secuencias se analizaron con los programas de Vector NTI Advance v.10 (Invitrogen) y programas disponibles en línea, como BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para comparar secuencias nucleotídicas y aminoacídicas con la bases de datos y ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf>) para buscar posibles marcos de lectura abiertos. Además, se analizó el transcriptoma y genoma de la cepa UCD 67-385 disponible en nuestro laboratorio.

2.9 Ligado de los módulos de expresión al vector

Para ligar los módulos de expresión al vector pBluescript SK-, previamente digerido con *EcoRV* y purificado, se utilizó la enzima T4 DNA ligasa de Invitrogen, según las especificaciones del fabricante. Se utilizó 10 unidades enzimáticas, buffer 1X, 50 ng de vector previamente digerido y una relación inserto-vector de 5:1 en un volumen final de 20 μ l. La reacción se incubó a 22 °C por al menos 1 h. Antes de electroporar, la mezcla de ligado se dializó por 10 min.

2.10 Transformación mediante electroporación

2.10.1 Transformación de *E. coli* mediante electroporación

Para la preparación de células electrocompetentes se incubó *E. coli* DH5 α en 500 ml de medio LB a 37 °C con agitación constante hasta alcanzar una absorbancia de 600 nm a 0,5 y 0,8. Todos los procedimientos siguientes se realizaron a 4 °C, manteniendo las soluciones y células en hielo. Las células se colectaron por centrifugación y se lavaron dos veces con agua destilada estéril, el primer lavado con 500 ml y el segundo con 250 ml. Luego, las células se suspendieron en 2 a 3 ml de glicerol 10% (v/v). La suspensión se fraccionó en alícuotas de 40 μ l y se almacenaron a -80 °C.

Para cada transformación, se descongeló una alícuota de *E. coli* DH5 α electrocompetente y se agregó hasta 25 ng de DNA plasmidial (en un volumen máximo de 5 μ l). La mezcla se conservó en hielo y posteriormente se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,2 cm preenfriada. Se electroporó con el equipo BioRad Gene Pulser X Cell, bajo las condiciones de 25 μ F, 200 Ω y 2,5 KV. Posteriormente, se agregó 1 ml

de medio LB y se transfirió a un tubo Eppendorf estéril, el cual se incubó por 1 h a 37 °C. Finalmente, el cultivo se sembró en alícuotas de 100 µl en placas LB-agar, suplementado con ampicilina 100 µg/ml y X-gal 80 µg/ml (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido). El vector pBluescript SK- confiere resistencia a ampicilina, por lo tanto, en presencia de este antibiótico se seleccionan las células portadoras del vector. La presencia de X-gal permite discriminar entre colonias portadoras de vector con y sin inserto. Esto se debe a que el sitio de múltiple clonamiento (MCS) interrumpe al gen *lacZ* que codifica la enzima β-galactosidasa, la cual tiene la capacidad de degradar el X-gal a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo, un producto de coloración azul. Por lo tanto, las colonias portadoras del vector sin inserto son azules y las colonias con vector e inserto son blancas (Sambrook y col, 2001). Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C y se seleccionaron las colonias blancas. A estas colonias se les extrajo el DNA plasmidial para su posterior análisis.

2.10.2 Transformación de *X. dendrorhous* por electroporación

La preparación de células electrocompetentes de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* se realizó según el protocolo descrito por Kim y col. (1998), y Adrio y col (1995). Las células electrocompetentes se prepararon a partir de cultivos con una absorbancia a 600 nm de 2-4, crecidos en 100 ml de medio YM a 22 °C con agitación constante. Las células se colectaron por centrifugación, se suspendieron en 25 ml de buffer fosfato de potasio (fosfato de potasio 50 mM; DTT 25 mM; pH 7,0) y se incubaron 15 min a 22 °C. Los siguientes procedimientos se realizaron a 4 °C, manteniendo las células y soluciones en hielo. Luego, las células se lavaron dos veces

con 25 mL de solución STM (sacarosa 270 mM; Tris-HCl 10 mM; MgCl₂ 1 mM; pH 7,5). Finalmente, las células se suspendieron en 500 µl de solución STM y se guardaron en hielo para su uso en el mismo día.

La transformación de *X. dendrorhous* se hizo según el protocolo descrito por Kim y col (1998) y para la selección de colonias transformantes se utilizó un módulo de resistencia al antibiótico higromicina B, compuesto con el gen *hph*, bajo el promotor del factor de elongación 1 α , codificado por el gen *TEF1* y el terminador de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa codificada por el *gpd* de *X. dendrorhous* (Niklitschek, 2007). A una alícuota de 60 µl de células electrocompetentes se agregó 5 µl de DNA (1 µg de cada fragmento de DNA) y se electroporó en el equipo BioRad Gene Pulser X Cell, bajo las siguientes condiciones: 125 µF, 600 Ω y 450 V. Luego, las células se suspendieron en 1 ml de medio YM y se mantuvieron por 4 h a 22 °C. El cultivo se sembró en alícuotas de 200 µl en placas YM suplementadas con higromicina B 15 µg/ml, las que se incubaron por tres días a 22 °C. Los transformantes se confirmaron como *X. dendrorhous* por la presencia de elementos de dsRNA (Castillo y col, 1994) y por la secuencia ITS1, 5.8, ITS2 e IGS (Reyes y col, 2004).

2.11 Extracción y análisis de pigmentos mediante RP-HPLC

La extracción de carotenoides de *X. dendrorhous* se realizó con acetona desde precipitados celulares (An y col, 1989). Para ello, se recolectó el pellet celular por centrifugación de 50 ml de un cultivo de 5 días crecido en medio YM a 22 °C con agitación constante. Luego, el pellet celular se suspendió en 1 ml de agua y se agregó

500 µl de perlas de vidrio de 0,5 mm. Se llevó a moedor durante 3 min, se agregó 1 ml de acetona y nuevamente se llevó al moedor durante otros 3 min. Se repitieron las extracciones con 2 ml de acetona hasta que el extracto celular fuese incoloro. Cada extracción se llevó por 3 min al moedor, seguido por 5 min de centrifugación a 4.000 x g, recolectando el sobrenadante cada vez. Posteriormente, a la colección de sobrenadantes se le agregó 1/5 del volumen de éter de petróleo, se mezcló y se centrifugó por 5 min a 4.000 x g. La fase superior (éter de petróleo) se transfirió a un tubo de vidrio y se determinó su absorbancia a 474 nm. La cantidad de carotenoides se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Total de carotenoides}(\mu\text{g/g peso seco}) = \frac{(\text{v éter})(A)(100)}{(\epsilon)(\text{peso seco levadura})}$$

Donde: A= Absorbancia a 474 nm, v éter= volumen de éter de petróleo recuperado (ml) y ϵ = coeficiente extinción 1 % = 2.100 (An y col, 1989). Para la determinación del peso seco de levadura, se recolectó y pesó por triplicado el pellet celular de 5 ml del cultivo secado por toda la noche a 80 °C.

A continuación se dejó evaporar totalmente el éter del extracto de carotenoides, los que luego se disolvieron en 100 µl de acetona. La composición de pigmentos se determinó mediante cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC), usando una columna Lichrospher RP18 125-4 (Merck) y como fase móvil, una mezcla de acetonitrilo:metanol:isopropanol (85:10:5) con un flujo de 1 ml/min. Cada pigmento se identificó de acuerdo a su tiempo de retención y su espectro de absorción, en comparación a estándares.

3. RESULTADOS

3.1 Construcción de módulos de expresión de los genes carotenogénicos *crtYB*, *crtI* y *crtS* de *X. dendrorhous*

Para aumentar el número de copias de los genes *crtYB*, *crtI* y *crtS* en *X. dendrorhous*, se construyeron módulos de expresión compuestos por el cDNA de cada gen bajo el control de un promotor fuerte y un terminador de la transcripción de la levadura (Tabla 4). Los módulos se construyeron mediante la técnica de *Overlap extensión-PCR* (OE-PCR) (Horton y col, 1989; Heckman y col, 2007) que básicamente consiste en generar un fragmento de DNA híbrido por la elongación de la DNA polimerasa (Figura 3). Para ello, el promotor, el cDNA de cada gen y el terminador de cada módulo se amplificaron con partidores, indicados en la tabla 5, que originan secuencias que se superponen en sus extremos (Figura 3 A). Para amplificar los cDNA se utilizaron como molde los plásmidos portadores de los cDNA de los genes *crtYB*, *crtI* y *crtS* (pXd_Ex_crtYB, pXd_Ex_crtI y pXd_Ex_crtS, respectivamente). El promotor *TEF1* se amplificó utilizando el plásmido pMN-Hyg, portador del módulo de resistencia a higromicina B bajo el control del mencionado promotor (Niklitschek, 2007). Para los otros promotores y terminadores se utilizó el DNA genómico de *X. dendrorhous* como molde de amplificación. Para el caso de promotores, se amplificó 500 pb río arriba del codón de inicio de la traducción de cada gen, mientras para terminadores, 300 pb río abajo del codón de término del gen.

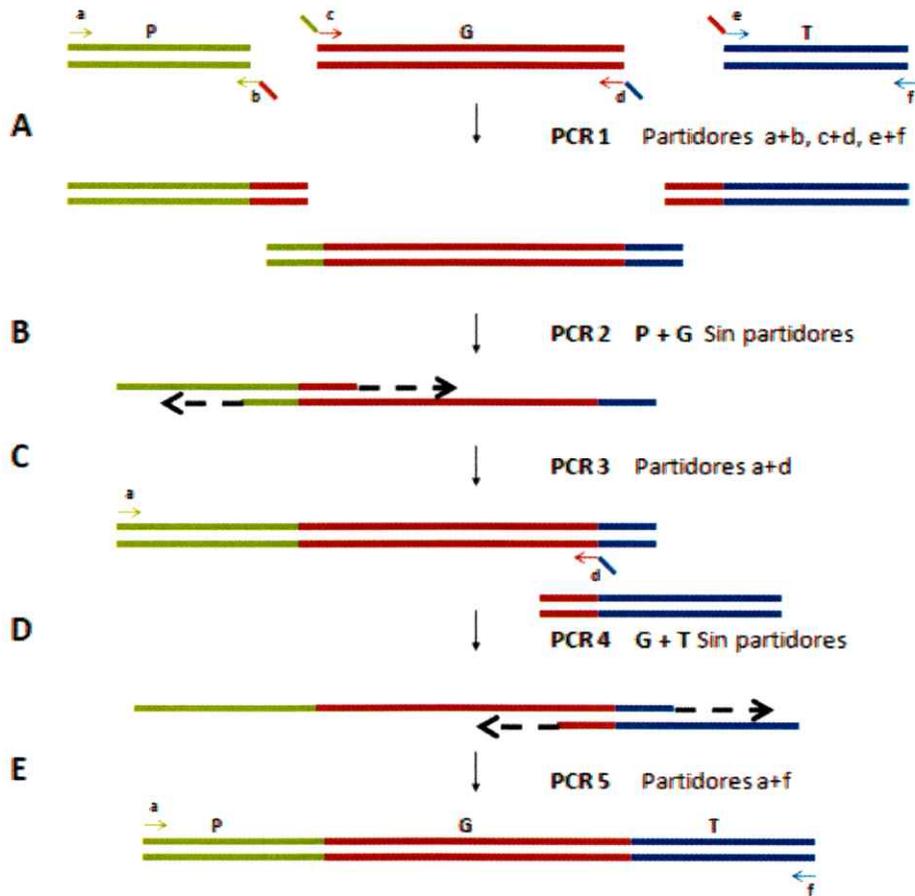


Figura 3. Construcción de módulos de expresión mediante *Overlap extension PCR* (OE-PCR). **A)** Partidores b, c, d y e originan secuencias que se superponen entre el promotor (P), cDNA de gen (G) y terminador (T). **B)** En una segunda reacción de PCR se origina el producto híbrido promotor-cDNA del gen por la elongación de la DNA polimerasa **C)** El producto promotor-cDNA es amplificado en una tercera reacción de PCR usando los partidores a y d. **D)** Se forma el producto promotor-cDNA del gen-terminador por la elongación de la DNA polimerasa. **E)** El producto promotor-cDNA-terminador es amplificado en un quinto PCR usando los partidores a y f.

Tabla 4. Promotores y terminadores de *X. dendrorhous* utilizados para la construcción de módulos de expresión.

Gen	Promotor	Terminador
<i>crtS</i>	Factor de elongación 1 α (gen <i>TEF1</i>) (N° acceso: NP ^a)	Actina (gen <i>act</i>) (N° acceso: NP)
<i>crtYB</i>	Actina (gen <i>act</i>) (N° acceso: NP)	Glutamato deshidrogenasa (gen <i>gdhA</i>) (N° acceso: NP)
<i>crtI</i>	Alcohol deshidrogenasa (gen <i>ADH1</i>) (N° acceso: NP)	β - fructofuranosidasa (gen <i>INV</i>) (N° acceso: FJ539193.2)

^a: N° acceso en base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) aún no publicados

Tabla 5. Partidores utilizados en la construcción de módulos de expresión

	Promotor (a-b)	cDNA del gen (c -d)	Terminador (e-f)
Módulo <i>crtS</i>	1-2	3-4	5-6
Módulo <i>crtYB</i>	7-8	9-10	11-12
Módulo <i>crtI</i>	13-14	15-16	17-18

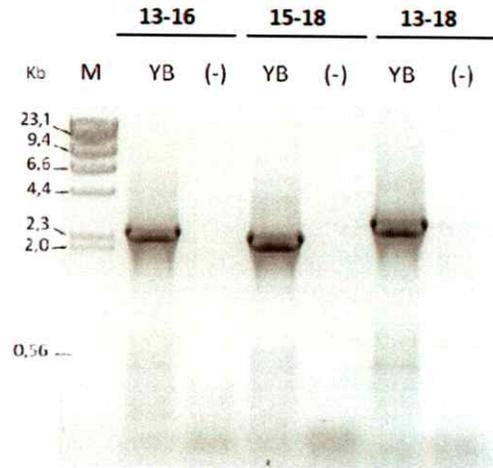
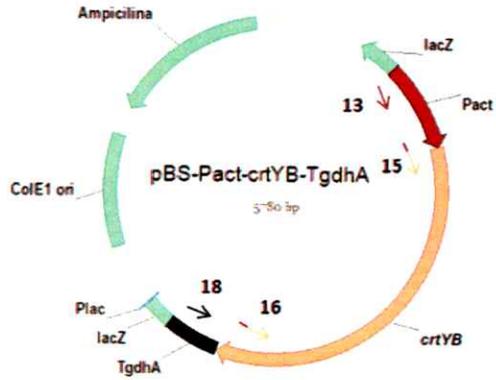
a,b,c,d,e y f indican los partidores representados en la figura 3

Nota: Los partidores 1- 18 se indican en la tabla 3.

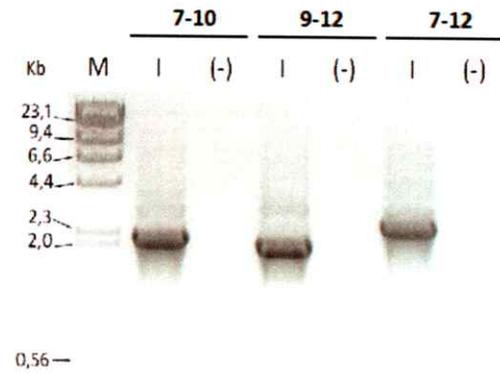
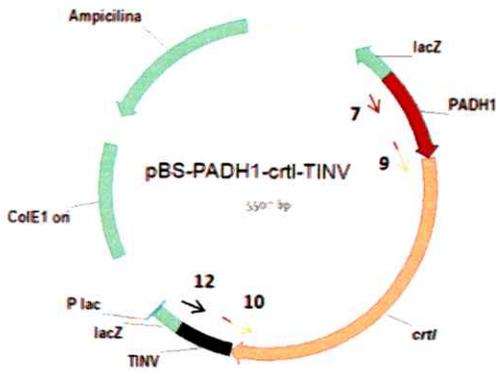
Los productos de PCR se verificaron en un gel de agarosa y posteriormente se purificaron. En una segunda reacción de PCR, pero sin partidores, se unió el promotor y cDNA de cada módulo de expresión, ya que al hibridar entre ellos dejan extremos 3'-OH libre y por la elongación de la DNA polimerasa se origina el fragmento híbrido (promotor-cDNA del gen). Este producto se amplificó en una tercera reacción de PCR (Figura 3 C), se evaluó y purificó desde un gel de agarosa. Este nuevo fragmento híbrido de promotor-cDNA, se unió el terminador mediante la misma técnica OE-PCR (Figura D-E).

Cada módulo de expresión se ligó al vector pBluescript SK- linearizado por digestión con la endonucleasa de restricción *EcoRV*. Con la mezcla de ligado dializada, se transformó la cepa DH5 α de *E. coli* y se sembró en placas LB con ampicilina y x-gal (Ver Materiales y Métodos, sección 2.10.1). Para detectar la presencia del módulo de expresión de interés (*crtYB*, *crtI* o *crtS*), las colonias transformantes blancas se analizaron por PCR de colonias, y se seleccionó una colonia positiva para la reacción de PCR de cada transformación para la extracción de DNA plasmidial. El DNA plasmidial obtenido se utilizó como molde para una reacción de PCR donde se verificó la correcta construcción del módulo: promotor, cDNA del gen y terminador (Figura 4). El inserto del DNA plasmidial de aquellos clones con la construcción correcta, se secuenció completamente en ambas direcciones. Los plásmidos de pBluescript SK- portadores del módulo de expresión de los genes *crtYB*, *crtI* y *crtS*, se llamaron: pBS-Pact-*crtYB*-TgdhA, pBS-PADH1-*crtI*-TINV y pBS-PTEF1-*crtS*-Tact, respectivamente (Figura 4).

A



B



C

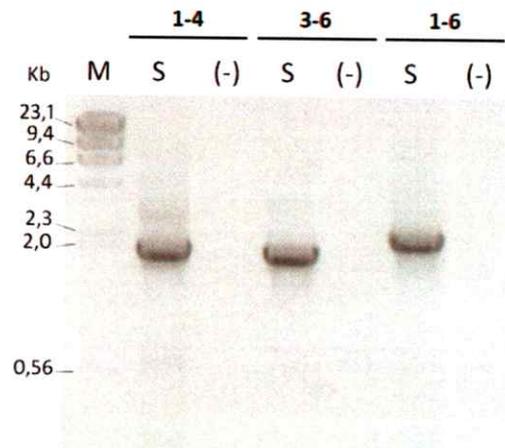
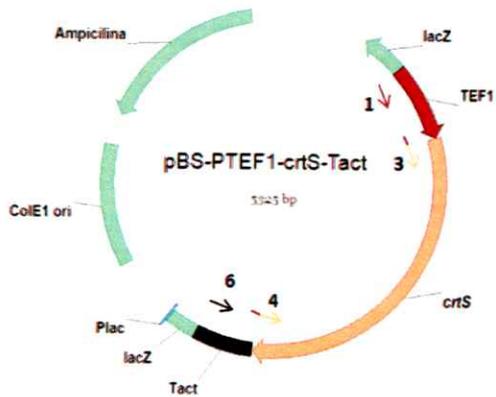


Figura 4. Mapa de los plásmidos con los módulos de expresión y evaluación de la construcción de ellos. En el sitio de restricción *EcoRV* del vector pBluescript SK- se clonaron los módulos de expresión de los genes *crtYB*, *crtI* y *crtS*. Los plásmidos formados se llamaron: **A)** pBS-Pact-crtYB-TgdhA, **B)** pBS-PADH1-crtI-TINV y **C)** pBS-PTEF1-crtS-Tact, respectivamente. Los elementos del plásmido pBluescript SK- se indican en verde, lo cuales corresponden a: gen que confiere resistencia a ampicilina (Ampicilina), gen que codifica para β -galactosidasa (*lacZ*), promotor del gen *lacZ* (pLac) y origen de replicación bacteriano ColE1(ColE1 ori). Los promotores de los módulos de expresión se indican en café, el cDNA de cada gen en anaranjado y los terminadores en negro. Se evaluó la construcción de los módulos mediante amplificación por PCR (derecha) utilizando como molde: YB, I y S (arriba de cada carril) que corresponden a pBS-Pact-crtYB-TgdhA, pBS-PADH1-crtI-TINV y pBS TEF-crtS-Tact, respectivamente. El control negativo (-), corresponde a la reacción de PCR sin DNA molde. Los números sobre las fotografías indican los partidores utilizados en cada reacción, los cuales se representan como flechas en los esquemas de plásmidos. M: Marcador peso molecular: DNA del bacteriófago Lambda digerido con *HindIII*.

3.2 Adaptación del método de *DNA assembler* en *X. dendrorhous*

Para integrar en el genoma de *X. dendrorhous* los módulos de expresión de los genes *crtYB*, *crtI* y *crtS* mediante *DNA assembler*, primero fue necesario identificar un sitio de integración que no genere cambios en la producción natural de pigmentos y luego se evaluó la factibilidad de implementar la técnica en la levadura. Con estos propósitos y luego de un análisis bioinformático se eligieron dos regiones (cada una correspondiendo a un locus) del genoma de *X. dendrorhous* para integrar el módulo de resistencia al antibiótico higromicina B. Una de ellas, ubicada a 2.506 pb río arriba del codón de inicio del gen *HIS3* (N° de acceso: JN849374.1), que codifica la enzima imidazol glicerol fosfato-hidratasa, la cual se nombró como *yhu*. El otro locus, ubicado a 2.110 pb desde el codón de término del mismo gen, fue nombrado como *xhd*. Adicionalmente, para confirmar que ambos loci no codificaran una proteína que al ser interrumpida provocasen alguna alteración en la levadura, sus secuencias se compararon con la base de datos del NCBI, mediante blastx. Los únicos alineamientos significantes arrojados por este análisis fueron los siguientes: una proteína de la familia de las fosfatasas del hongo *Aspergillus fumigates* (N° de acceso: XP_753850.1) con un 45 % de identidad con sólo un 16 % de cobertura, para *yhu* y una proteína hipotética del protozoo *Entamoeba histolytica* (N° de acceso: XP_001913424.1) con un 31 % de identidad con solo un 22 % de cobertura para *xhd*. Las secuencias de estas proteínas tienen baja identidad y cobertura con los loci *xhd* e *yhu*, por lo tanto, probablemente no son codificantes o codifican un gen aún no descrito de *X. dendrorhous*. Para cada uno de los loci *xhd* e *yhd*, se definieron dos sectores que llamamos “up” y “down” (Figura 5).

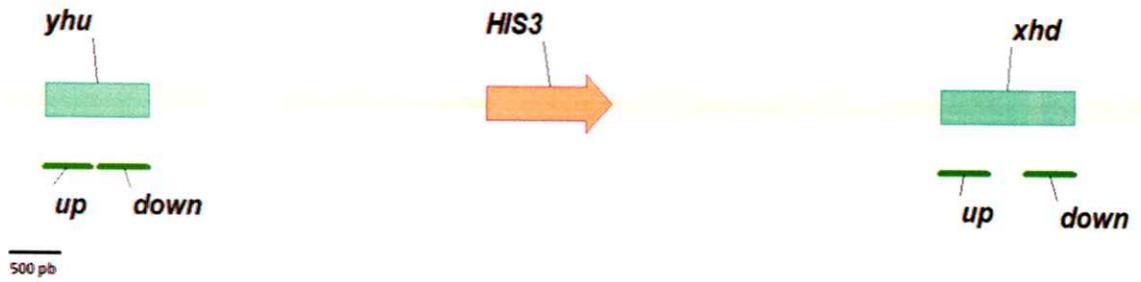


Figura 5. Ubicación de los loci *yhu* y *xhd*. Loci *yhu*, *xhd* y sus respectivos sectores “*up*” y “*down*”, con respecto al gen *HIS3* que codifica a la imidazol glicerol fosfatohidratasa en *X. dendrorhous*.

Como se mencionó anteriormente, con el objetivo de determinar la funcionalidad de la técnica de *DNA assembler* en *X. dendrodrous* y evaluar el efecto de la interrupción de los dos potenciales loci de integración seleccionados, *xhd* e *yhu*, se integró un módulo de resistencia al antibiótico higromicina B (Niklitschek, 2007) en ambas zonas, mediante esta técnica en la cepa silvestre UCD 67- 385 de la levadura. Para ello, los fragmentos de DNA genómico “up” y “down” de *yhu* y *xhd* se amplificaron por PCR con las parejas de partidores 19 -20 y 27 -28 (para amplificar “up” de *xhd* e *yhu*, respectivamente) y 25-26 y 33-34 (para amplificar “down” de *xhd* e *yhu*, respectivamente). Luego, estos amplicones y el plásmido pMN-Hyg (portador de un módulo de resistencia a higromicina B) se utilizaron como DNA molde en nuevas reacciones de PCR utilizando partidores de 60 pb, donde las 10 pb del extremo 3’ son complementarias al DNA molde y las otras 50 pb son homólogas al fragmento de DNA con el que se desea ensamblar (Figura 6 A). De esta forma se originaron fragmentos de DNA con 50 pb de secuencias homólogas en sus extremos (con un total de 100 pb de superposición).

Los amplicones se verificaron en un gel de agarosa y luego se purificaron. La levadura se transformó por electroporación con los tres fragmentos (módulo de higromicina, “up” y “down”) de tal manera de integrar el módulo de resistencia higromicina en *xhd* o *yhu*.

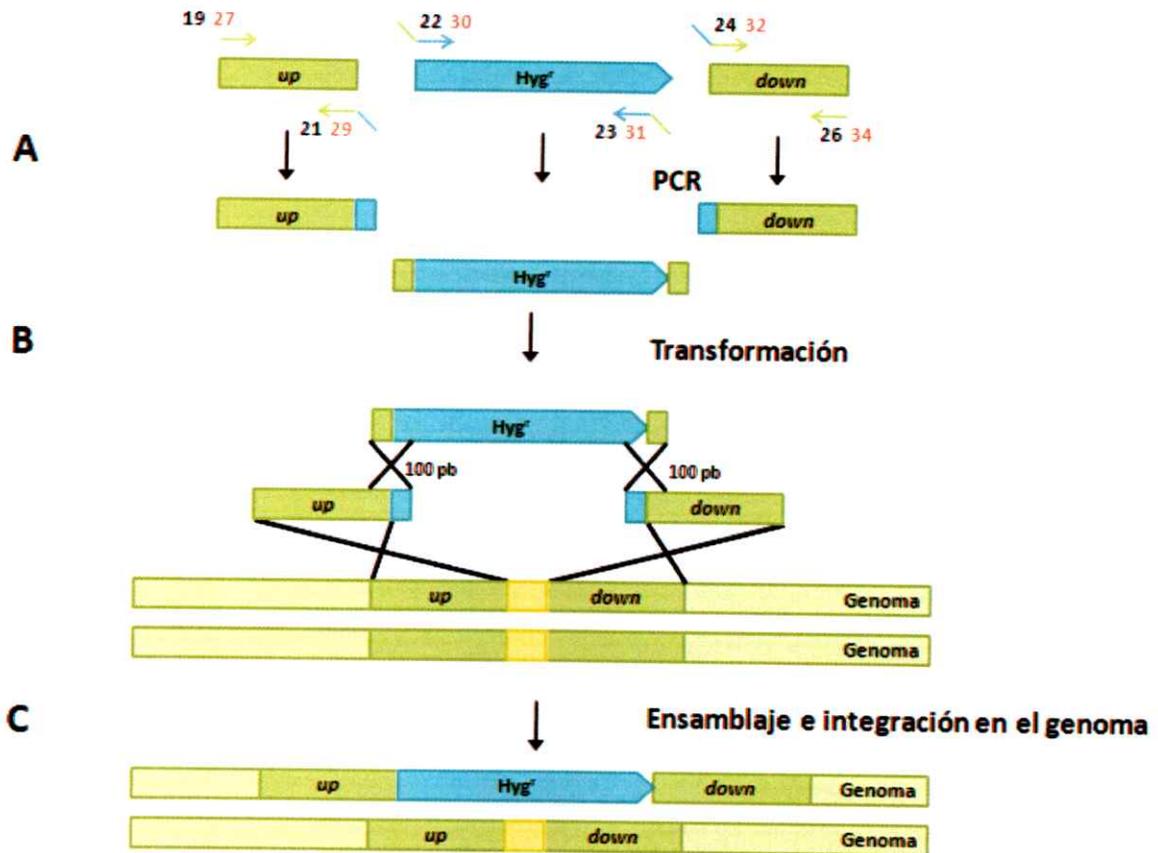


Figura 6. Ensamblaje e integración del módulo de resistencia a higromicina B en el genoma de *X. dendrorhous* mediante recombinación homóloga. A) Fragmentos de DNA para integrar en el genoma: dos fragmentos de DNA genómico (“up” y “down”), amplificados por PCR para dirigir la integración del módulo de expresión de resistencia al antibiótico higromicina B (Hyg^r), en celeste, en el locus *yhu* o *xhd* del genoma de *X. dendrorhous*. B) Amplicones con secuencias complementarias en sus extremos. C) Ensamblaje e integración de los fragmentos de DNA en el genoma de la cepa silvestre de *X. dendrorhous* UCD 67-385. Segmento verde oscuro: sitio de integración en el locus *yhu* o *xhd* y segmento verde claro: gDNA que flanquea el locus. Las flechas con un número sobre ellas, esquematizan los partidores utilizados y su color indica la complementariedad con el DNA y la secuencia que origina superposición con el fragmento de DNA aledaño. Los números en negro indican los partidores utilizados para la integración en *xhd*, mientras que en rojo, los partidores utilizados para la integración en *yhu*. En cruces se representa los eventos de recombinación en la levadura y se indica la longitud de superposición entre los fragmentos de DNA en pb.

De esta manera, los fragmentos de DNA se ensamblarían entre sí y se integrarían en el sitio deseado del genoma mediante el proceso de recombinación homóloga al incorporarlos en la levadura (Figura 6 C). Con este procedimiento, se obtuvieron 9 y 6 colonias resistentes a higromicina B cuando la integración del módulo de resistencia se dirigió al locus *xhd* e *yhu*, respectivamente.

La correcta inserción del módulo de resistencia en el sitio deseado del genoma de la levadura en los transformantes, se analizó mediante PCR (Figura 7). Las 9 colonias resistentes al antibiótico (módulo de resistencia en el sitio *xhd*), contenían el gen *hph* (gen que confiere resistencia a higromicina B) en la ubicación esperada (9/9) (Figura 7 A). De las 6 colonias resistentes al antibiótico cuando el módulo de resistencia se dirigió en *yhu*, 4 contenían el gen *hph* en la ubicación esperada (4/6) (Figura 7 B).

De las colonias con el gen *hph* en el sitio esperado se escogió una de cada tipo. Para la integración del módulo en *xhd* se escogió la colonia 1, que fue llamada VI.1. Mientras que para la integración del módulo en *yhu*, se escogió la colonia 5, la que fue llamada II.5

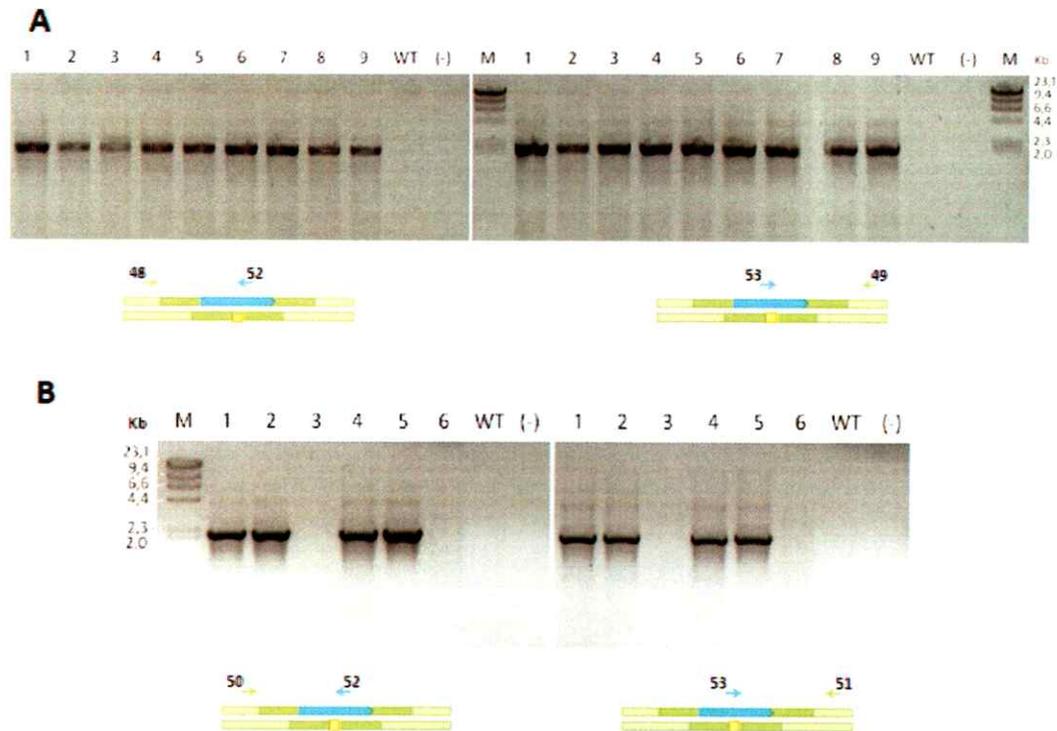


Figura 7. Evaluación de la integración del módulo de resistencia a higromicina B en *xhd* e *yhu* mediante PCR. Evaluación de la integración en A) *xhd* y B) *yhu* mediante amplificación por PCR. El número de cada carril representa el DNA genómico molde de las colonias resistentes a higromicina B, WT: DNA genómico de la cepa parental UCD 67-385, (-): control negativo sin DNA. Bajo cada gel se incluye un esquema que indica los partidores (flechas) y la secuencia blanco analizada. El color de la secuencia se corresponde al de la figura 6 C. El número de cada flecha indica el partidor utilizado y el color de la flecha representa la secuencia blanco con la que hibrida. M: Marcador peso molecular, DNA del bacteriófago Lambda digerido con *HindIII*.

Contrario a lo esperado, el fenotipo de la cepa II.5 fue distinto al de la cepa parental, UCD 67-385 (Figura 8 A), en cuanto a la pigmentación de las colonias, no así para la otra cepa transformante, VI.1. Se evaluó la producción de carotenoides de ambas cepas transformantes mediante la determinación de la absorbancia a 474 nm y por cromatografía en fase reversa (RP-HPLC). La cepa II.5 no presenta cambios en la cantidad de carotenoides totales en comparación con la cepa silvestre (Figura 8 B). Sin embargo, si hubo alteración en la composición de carotenoides. La astaxantina alcanzó el 97% con respecto a los carotenoides totales equivalente a $368,5 \pm 8,4$ ppm, superior a lo alcanzado en la cepa parental (63%, equivalente a $223,9 \pm 18,4$ ppm) (Figura 8 C). Es decir, la interrupción provocó un aumento del 64,5% de astaxantina. Por otra parte, la producción de carotenoides de la cepa VI.1 fue similar a la parental, UCD 67-385 (Figura 8 B y C). Debido a que la interrupción en el locus *yhu* provoca cambios en la producción de pigmentos en la levadura, se descartó para los experimentos de integración de los módulos de expresión de los genes carotenogénicos, pero esta región será estudiada en un futuro como estrategia para mejorar la producción de astaxantina.

La cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* es diploide, por lo tanto, como resultado de la transformación se generó una cepa heterocigota donde la integración del módulo resistencia a higromicina B sólo ocurrió en una copia del locus. Para lograr que el módulo se integre en ambos alelos del locus de integración en el genoma, se utilizó el método del doble recombinante (DRM), metodología que se basa en la capacidad de la levadura de recombinar mitóticamente (Niklitschek y col, 2008). Básicamente esta técnica consiste en aumentar gradualmente la concentración del antibiótico favoreciendo

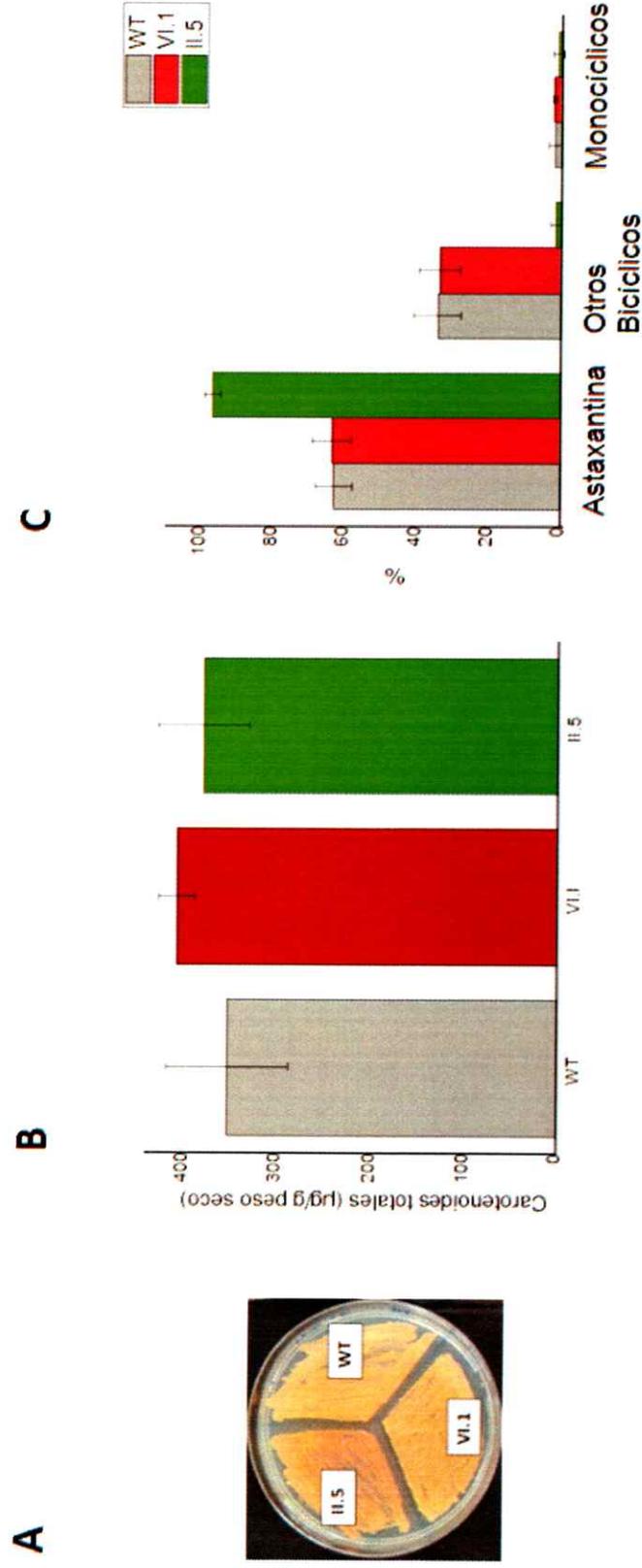


Figura 8. Fenotipo y producción de pigmentos de las cepas II.5, VI.1 y cepa silvestre. A) Fenotipo de las cepas transformantes portadoras del módulo de higromicina en *yku* (II.5) y *xhd* (VI.1) en comparación a la cepa silvestre UCD 67-385 (WT). B) Producción de carotenoides totales de las cepas II.5, VI.1 y silvestre (WT) expresado en µg/ g peso seco de la levadura. C) Porcentaje de astaxantina, carotenoides bicíclicos distintos a astaxantina (Fenicoxantina, 3-hidroxiéquienona, equienona y β-caroteno) y carotenoides monocíclicos (HDCO y toruleno) con respecto a los carotenoides totales de las cepas II.5, VI.1 y UCD 67-385 (WT).

la selección de transformantes con doble copia (homocigótico) del módulo de resistencia de los antibióticos generados por recombinación mitótica.

Se sometió a la cepa IV.1 al método DRM. Para ello, se realizaron cultivos sucesivos con concentraciones crecientes de higromicina B, empezando a 50 µg/ml hasta una concentración final de 200 µg/ml. Se sembraron alícuotas del cultivo final en placas YM con 15µg/ml higromicina B y se eligieron 8 colonias al azar, a las que se les extrajo el DNA genómico para comprobar el estado homocigoto mediante PCR. En las 8 colonias no se detectó el alelo silvestre del locus *xhd*, indicando que son cepas homocigotas que contienen el módulo de resistencia a higromicina B en sus dos alelos (+2). De estas 8 colonias, se eligió una al azar que se denominó VI.1.c2 a la cual se le confirmó su genotipo homocigoto mediante PCR. Para ello se utilizaron partidores que hibridan con la zona que fue eliminada de la secuencia blanco y reemplazada por el módulo de resistencia luego de su integración en el genoma. De esta manera, no hubo amplificación cuando se utilizó como molde el DNA de las cepas homocigóticas para el módulo de expresión. Por otra parte, estos partidores sí amplificaron cuando se utilizó como molde el DNA genómico de la cepa silvestre o de la cepa con una sola copia del módulo de expresión del gen carotenogénico particular (Figura 9 B).

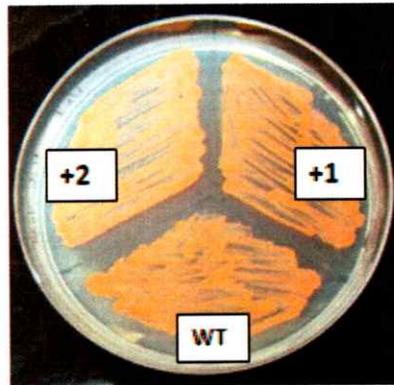
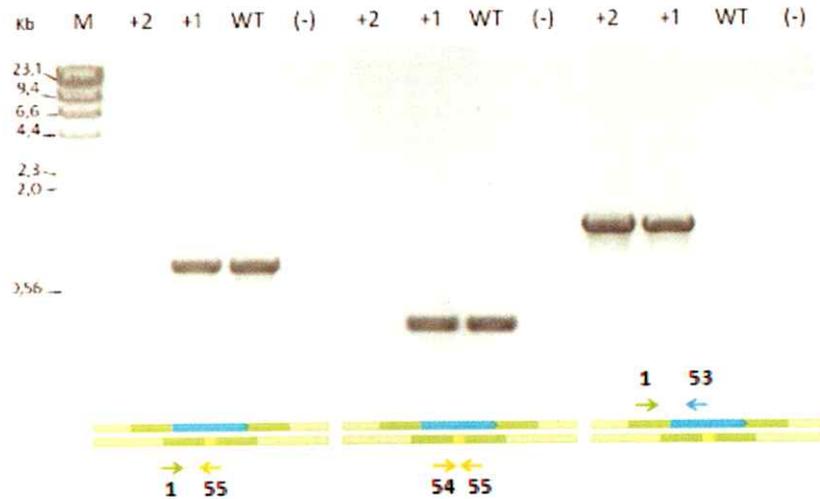
A**B**

Figura 9. Fenotipo y genotipo de las cepas heterocigotas y homocigóticas para el módulo de expresión de resistencia a higromicina B en *xhd*. A) Fenotipo de la cepa IV.1, heterocigota con una copia del módulo de higromicina (+1), cepa IV.1.c2, homocigota con dos copias del módulo de higromicina (+2) y la cepa parental UCD 67-385 (WT) crecidas en medio MM_v. B) Evaluación número de copia del módulo de higromicina B de las cepas. IV.1 (+1), cepa IV.1.c2 (+2), cepa parental UCD 67-385 (WT) y control sin DNA (-). Bajo cada gel se incluye un esquema que representa los partidores y secuencia blanco analizada. Los colores del esquema se corresponden con los de la figura 6. Partidores se representan como flechas cuyo número indica el partidor utilizado y su color representa la complementariedad con DNA molde. M: Marcador peso molecular, DNA del bacteriófago Lambda digerido con *Hind*III.

Las cepas VI.1, heterocigota y IV.1.c2, homocigota para el módulo de resistencia a higromicina en el locus *xhd*, respectivamente, son capaces de crecer en placas con medio mínimo (MM_v), indicando que son protótrofas (Figura 9 A). Además, la cepa VI.1.c2 no presentó cambios en el fenotipo de color en comparación con las cepas parental silvestre y heterocigota, VI.1. La producción de carotenoides fue evaluada y no se observaron diferencias significativas en la cantidad de carotenoides totales ni la composición de estos. Por lo tanto, la integración del módulo en el locus *xhd* no origina auxotrofia, ni cambios en la producción de carotenoides.

3.3 Aumento del número de copias de los genes *crtYB*, *crtI* y *crtS* en *X. dendrorhous* mediante *DNA assembler*

Mediante la técnica de *DNA assembler*, los módulos de expresión de los genes *crtYB*, *crtI* y *crtS* se integraron en el locus *xhd*. Para ello, se amplificaron los fragmentos “up” y “down” con las parejas de partidores 19-20 y 25-26, respectivamente y como molde, el DNA genómico de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*. Luego, estos amplicones, el plásmido portador del módulo de resistencia a higromicina B (pMN-Hyg) y los plásmidos portadores de los módulos de expresión de los genes carotenogénicos, pBS-Pact-*crtYB*-TgdhA, pBS-PADH11-*crtI*-TINV y pBS-PTEF1-*crtS*-Tact, se utilizaron como DNA molde en reacciones de PCR con partidores de 60 pb diseñados de tal manera de permitir el ensamblaje de los fragmentos y dirigir la integración al sitio deseado por recombinación homóloga en la levadura (Figura 10).

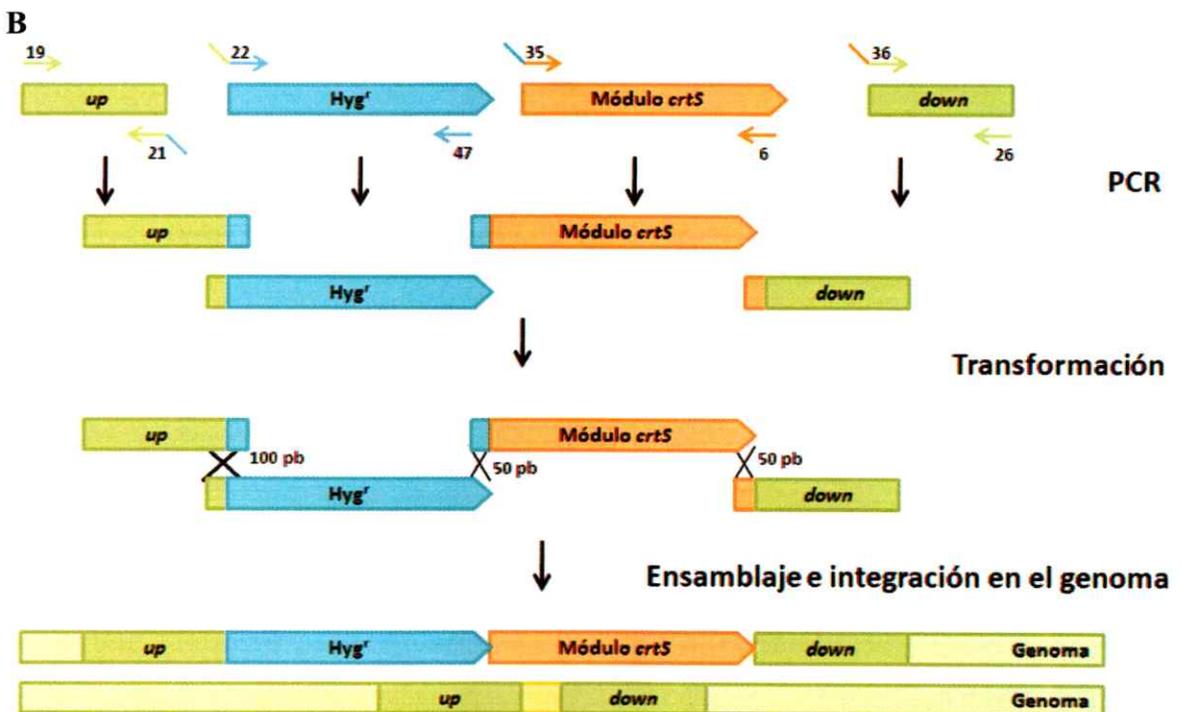
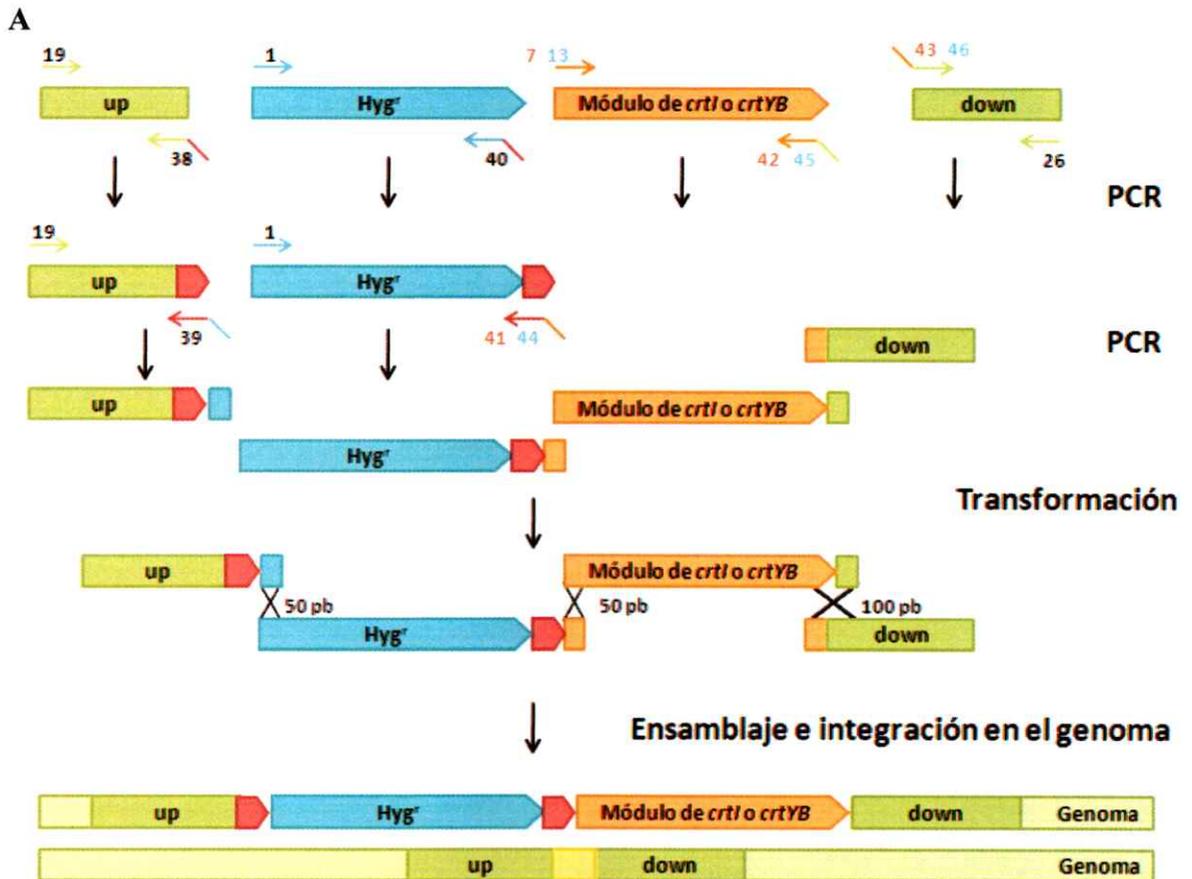


Figura 10. Ensamblaje e integración en el locus *xhd* del genoma de *X. dendrorhous* de los módulos de expresión de genes carotenogénicos mediante *DNA assembler*. A) Integración de los módulos de expresión *crtI* y *crtYB*. B) Integración del módulo de expresión del gen *crtS*. Hyg^r: Módulo de resistencia a higromicina B. Flechas con un número esquematiza los partidores utilizados. El color de flecha indica la complementariedad con el DNA molde y secuencia que origina superposición. Los números rojos corresponden a los partidores necesarios para amplificar o crear secuencia de superposición del módulo de *crtI*, mientras que los azules para el *crtYB*. Segmento rojo: Repetido directo (DR); Segmento amarillo: secuencia genómica reemplazada por el módulo de expresión; Segmento anaranjado: módulo de expresión del gen carotenogénico; Segmento verde oscuro: sitio de integración, locus *xhd* y segmento verde claro: gDNA que flanquea el locus. En cruces se representa las zonas de recombinación en la levadura y se indica la longitud de superposición entre los fragmentos de DNA en pb.

Posteriormente, los amplicones se purificaron y se transformó la cepa silvestre UCD 67-385 con una mezcla de ellos de tal manera de integrar los módulos de expresión de los genes *crtYB*, *crtS* o *crtI*, de una manera similar a la integración del módulo de resistencia a higromicina B en el genoma de la levadura desarrollado en la etapa previa.

Para realizar transformaciones adicionales de las cepas transformantes el marcador de selección no puede ser utilizado y por lo tanto, otros marcadores deben estar disponibles. Por ello, se consideró una estrategia para escindir el marcador de selección. El procedimiento se diseñó de tal manera que en el caso de los transformantes resultantes con copias extras de los genes *crtI* y *crtYB*, 2 secuencias de repetidos directos (DR) quedasen flanqueando al módulo de resistencia a higromicina B. De esta manera, esperábamos que el marcador de resistencia se escindiera por un evento de recombinación entre los DRs. Los DRs se crearon con partidores de 60 pb: 10 pb en su extremo 3' complementarias al DNA molde y 50 pb de la secuencia (GACT)₁₂GG. Los DRs fueron ubicados en los extremos 3' del fragmento up y del módulo de resistencia higromicina B, (Figura 10 A). No se incorporaron DRs en el caso de sobreexpresión del gen *crtS*, ya que el módulo de *crtS* comparte el mismo promotor que el módulo de resistencia a higromicina B. Por lo tanto, en este caso el promotor del factor de elongación 1- α es un DR (Figura 10 B).

Mediante esta metodología se obtuvieron 4, 5 y 1 colonias resistentes a higromicina B en la transformación para aumentar del número de copias del gen *crtS*, *crtI* y *crtYB*, respectivamente. Todas las colonias resistentes al antibiótico contenían el gen *hph* (gen que confiere resistencia a higromicina B) en la ubicación esperada. De estas colonias se

escogió una para cada caso y fueron nombradas: cepa IV.1,1.c1; donde existe una copia extra del gen *crtS*; V.B3.c1, con una copia extra del gen *crtI* y V.A2.c1, con una copia extra del gen *crtYB*. El correcto ensamblaje e integración de los fragmentos de DNA en *xhd* fue confirmado por PCR para cada uno de los transformantes, con los partidores adecuados.

Para evaluar la escisión del marcador de selección, un cultivo de dos días de las cepas portadoras de una copia adicional de los genes *crtS*, *crtI* y *crtYB* (IV.1,1.c1, V.B3.c1 y V.A2.c1), fue secuencialmente subcultivado en medio completo (YM) líquido sin presión selectiva, sembrando en cada etapa alícuotas en placas con medio completo (YM) y replicado en placas YM y YM + higromicina B por *replica plating*. Este procedimiento se realizó hasta el subcultivo 30, sin resultados satisfactorios ya que el marcador de selección permaneció integrado en el genoma. Por otra parte, el mismo procedimiento se repitió luego de transformar cepas IV.1,1.c1, V.B3.c1 y V.A2.c1 sólo con *DNA carrier* (DNA de esperma de salmón) de modo de inducir la recombinación homóloga entre los DRs, también sin resultados satisfactorios.

Como se mencionó anteriormente, la cepa UCD 67-385 es diploide, por lo tanto, la integración de los módulos fue en un alelo del locus *xhd* del genoma. Los transformantes heterocigotos para el módulo de expresión se sometieron a DRM de tal manera de obtener cepas homocigotas en el locus de integración que posean doble copia adicional del gen carotenogénico. Este procedimiento se realizó de la misma manera como se seleccionaron las colonias homocigotas del módulo de resistencia a higromicina B en *xhd*. En todos los casos se analizó el genotipo de los transformantes portadores de los

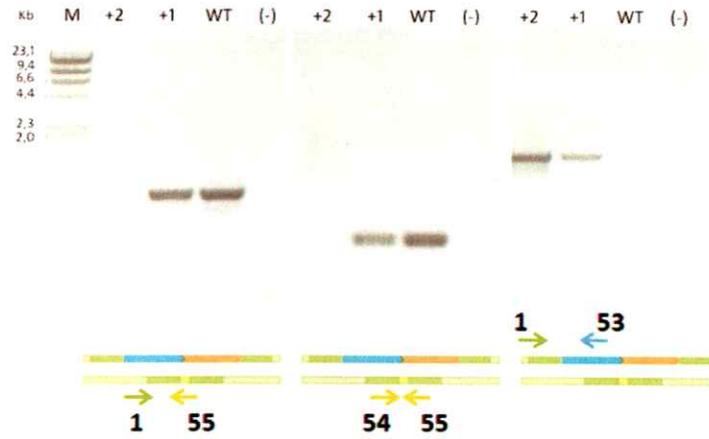
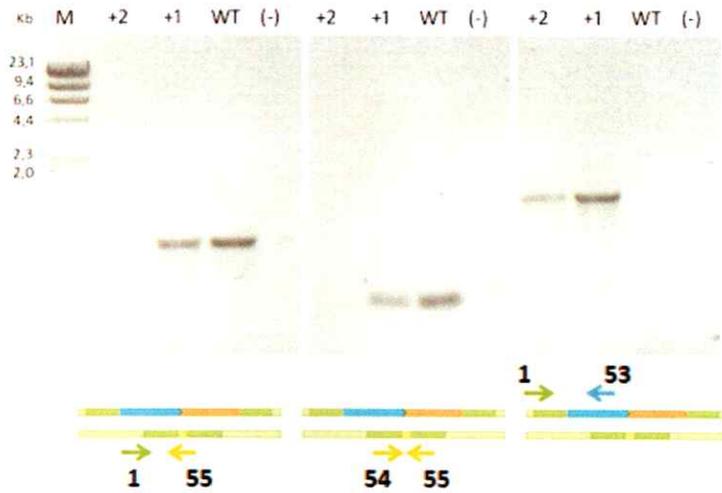
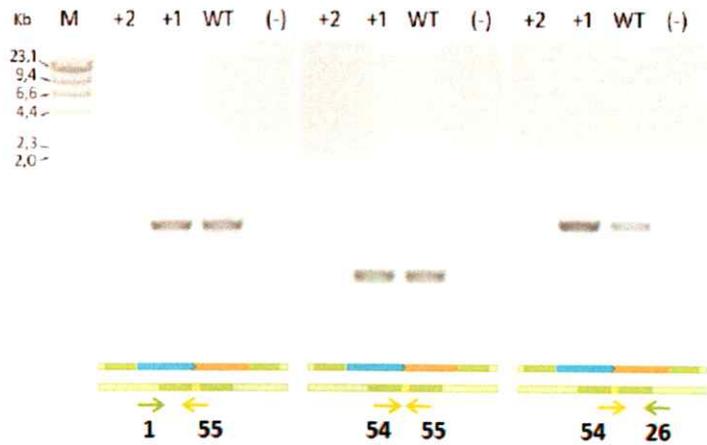
A**B****C**

Figura 11. Evaluación del número de los módulos de expresión de los genes *crtYB*, *crtI* y *crtS* en cepas transformantes. Evaluación del número de copias de los módulos de expresión de los genes A) *crtYB*, B) *crtI* y C) *crtS*. Cada carril representa el resultado de una reacción de amplificación por PCR utilizando como molde: +2: DNA genómico de las cepas transformantes homocigotas, con dos copias extras del gen carotenogénico (V.A2c2; V.B3c2 ó IV.1,1c2); +1: DNA genómico de las cepas heterocigotas, con una copia extra del gen carotenogénico (V.A2c1; V.B3c1 ó IV.1,1c1); WT: DNA genómico de la cepa parental UCD 67-385; (-): control negativo sin DNA. Bajo cada gel se incluye un esquema que representa los partidores y secuencia blanco que es analizada. Los colores de estas secuencias se corresponden con los de la figura 11. Flecha con un número corresponden a los partidores utilizados y el color de flecha indica la complementariedad con el DNA molde. M: Marcador peso molecular, DNA del bacteriófago Lambda digerido con *HindIII*.

módulos de expresión de los genes *crtS*, *crtI* y *crtYB* mediante PCR con parejas de partidores que hibridan con la zona que fue eliminada y reemplazada por los módulos de expresión, determinando así su condición heterocigota y homocigota respectivamente (Figura 11).

3.4 Evaluación del efecto del aumento de la dosis de los genes *crtYB*, *crtI* y *crtS* en la composición y cantidad de carotenoides de *X. dendrorhous*.

Las cepas transformantes portadoras de una o dos copias adicionales de los genes *crtYB*, *crtI* y *crtS* muestran leves diferencias fenotípicas respecto a la cepa parental UCD 67-385, como se observa en la Figura 12 A. Cepas con copias adicionales del gen *crtYB* presentaron una pigmentación más amarilla en comparación a la cepa silvestre. Por otra parte, cepas con copias adicionales del gen *crtS* su coloración fue levemente mas rosada. Por otro lado, cepas con copias adicionales del gen *crtI* no mostraron cambios en la coloración con respecto a la parental.

La cantidad y composición de carotenoides fue evaluada mediante la determinación de la absorbancia a 474 nm y por cromatografía en fase reversa (RP-HPLC), a partir de cultivos de 5 días en triplicado. Se comparó la cepa silvestre con las cepas que poseen una y dos copias adicionales de los genes *crtYB*, *crtI* ó *crtS* (Tabla 6, Figura 12 B, Figura 12 C).

La cantidad de carotenoides totales de las cepas portadoras de copias adicionales de los genes *crtS* y *crtYB* no presenta cambios significativos con respecto a la parental, por otra parte, hay una disminución, en cepas con copias adicionales del gen *crtI*.

En cuanto a la composición de carotenoides, se observa que cepas con copias adicionales del gen *crtS* tienen un incremento de 1,2 veces en el porcentaje de astaxantina y una disminución en los otros carotenoides bicíclicos en comparación a la cepa parental. En oposición, en cepas con doble copia del gen *crtYB*, hay un incremento en el contenido de carotenoides bicíclicos y disminución de astaxantina de 1,8 veces. Por otra parte, al aumentar el número de copias del gen *crtI*, no se observa cambios significativos con respecto a la cepa silvestre. En todas las cepas transformantes la composición de precursores del β -caroteno, como neurosporeno, licopeno y γ -caroteno no cambian con respecto a la cepa parental.

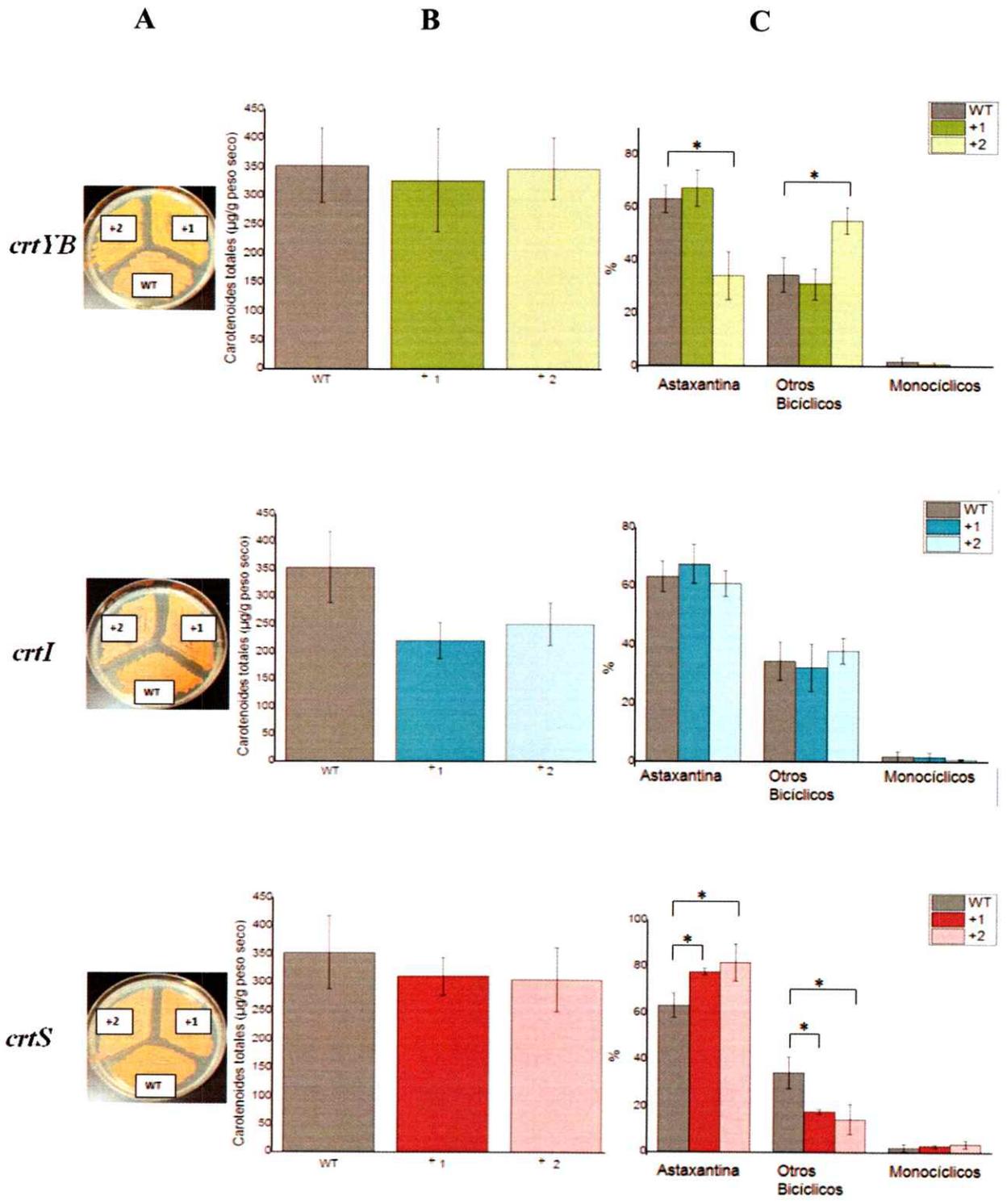


Figura 12. Fenotipo y producción de pigmentos de la cepa parental y los transformantes con copia simple y doble de los genes *crtYB*, *crtI* y *crtS* en el locus *xhd*. A) Comparación fenotípica de la cepa parental UCD 67-385 (WT) con respecto a las cepas con copia simple y doble de los genes *crtYB*, *crtS* y *crtI* en el locus *xhd*. B) Producción de carotenoides totales, expresado en $\mu\text{g/g}$ peso seco. C) Composición de carotenoides: astaxantina, otros carotenoides bicíclicos (Fenicoxantina, 3-hidroxiéquinenona, equinenona, y β -caroteno) y monocíclicos (HDCO y toruleno), de las cepas portadoras de una o dos copias de los genes de carotenogénesis. Arriba: V.A2.c1 y V.A2.c1; heterocigoto y homocigoto para la copia extra del gen *crtYB*; Medio: V.B3.c1 y V.B3.c2; heterocigoto y homocigoto para la copia extra del gen *crtI* y Abajo: IV.1,1.c1 y IV.1,1.c2; heterocigoto y homocigoto para la copia extra del gen *crtS*. +1: Cepa con una copia extra del gen; +2: Cepa con dos copias extras del gen. WT: Cepa parental, UCD 67-385. Prueba t de Student: * $P \leq 0.05$

Tabla 6. Composición de carotenoides de la cepa silvestre y las cepas con copias adicionales de los genes *crtYB*, *crtI* y *crtS*.

Carotenoide ^a	UCD 67-385	V.A2.c1	V.A2.c2	V.B3.c1	V.B3.c2	IV.1.1.c1	IV.1.1.c2
Astaxantina	63,4 ± 5	67,5 ± 7	34,3 ± 9	65,4 ± 7	60,9 ± 4	77,9 ± 1	81,8 ± 8
Fenicoxantina	19,9 ± 3	17,7 ± 2	25,0 ± 8	17,2 ± 3	21,2 ± 1	12,6 ± 1	8,8 ± 8
Cantaxantina	3,8 ± 1	3,5	7,5 ± 3	3,2 ± 2	6,1 ± 2	1,5 ± 1	3,4 ± 1
HDCO	2,0 ± 1	0,8	ND	2,8 ± 1	0,9	2,7 ± 1	3,6 ± 1
OHK y caroteno	ND ^b	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3-hidroxiéquinenona	2,9 ± 1	2,6 ± 2	2,5 ± 4	1,4	2,3	0,5	0,2
K gama caroteno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Equinenona	2,9 ± 1	2,7 ± 2	8,4 ± 4	1,3	3,5 ± 1	0,9	0,5
Licopeno	0	0,0062	0	0	0	0,6 ± 1	0,2
Toruleno	0,97 ± 0,7	ND	ND	ND	ND	ND	0,03
Neurosporeno	0,03	0,1	0	0,3	ND	ND	ND
β-caroteno	5,1 ± 3	4,5 ± 3	13,4 ± 6	2,4 ± 1	5,0 ± 1	1,8	1,3
Total^c	353,5 ± 65	327,7 ± 90	348 ± 54	220,6 ± 33	249,9 ± 38	311,6 ± 33	305,8 ± 57

^a: Composición de carotenoides expresado en porcentaje.

^b: No detectado

^c: Carotenoides totales expresado en µg/g peso seco

3.5 Análisis de los loci *yhu* y *xhd* en el transcriptoma de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*.

Resultados recientes de nuestro laboratorio, relacionado con el estudio de la organización genómica estructural y funcional de *X. dendrorhous*, hemos logrado obtener el genoma, transcriptoma y proteoma de la cepa UCD 67-385 de esta levadura. Ello nos permitió realizar un análisis bioinformático del transcriptoma con la secuencia de las regiones *yhu* y *xhd* que resultó en la identificación mRNAs potenciales para ambos loci. El estudio de los posibles marcos de lectura abiertos (ORF) en el transcrito de *yhu* resultó en un posible ORF de 2.745 pb (N° de acceso: JN849375.1) y al compararlo con la base de datos Genbank mediante blastx, la mayor similitud encontrada fue con una proteína hipotética conservada de *Sporisorium reilianum* (N° de acceso: CBQ67945.1) un 32% de identidad con un 21% de cobertura. Al comparar este transcrito con su gDNA se encontró seis probables exones (Figura 13), además la secuencia posee un dominio conservado NYN, característico de las nucleasas (Anantharaman y col, 2006).

El análisis del transcrito de *xhd* permitió identificar un posible ORF de 2.430 pb que cuando se comparó con su gDNA y se encontró trece exones probables (N° de acceso: JN849376.1). Al analizar la secuencia de la proteína deducida con la base de datos mediante BLAST, se encontró un 30% de identidad con un 99% de cobertura con una proteína hipotética de *Laccaria bicolor* (N° de acceso: XP_001884409.1). Esta secuencia presenta el dominio conservado ARS2, característico de las proteínas de resistencia a arsenito (Rossman y col, 1999).

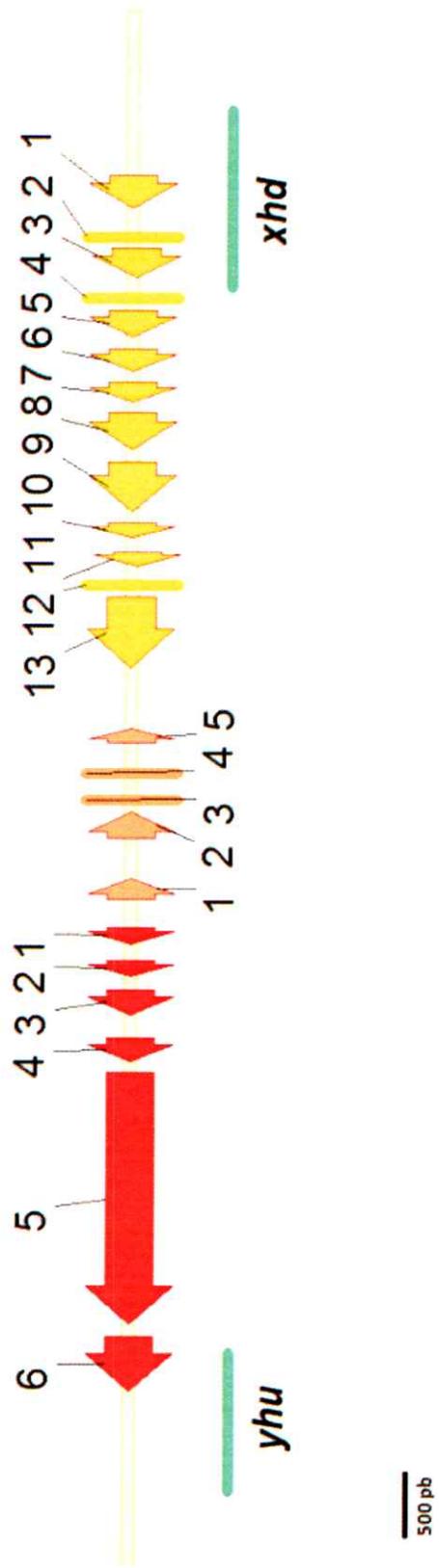


Figura 13. Mapa estructural del gen *HIS3*, los loci *yhu* y *xhd*, y los posibles genes adyacentes. Dos probables genes se encuentran adyacentes al gen *HIS3* (anaranjado), uno de ellos se ubica en el locus *yhu* indicado en rojo. El otro, se encuentra en el locus *xhd* y se representa en amarillo. Los exones del gen *HIS3* y los probables exones de los posibles genes se indican con números.

4. DISCUSIÓN

4.1 Elección de promotores y terminadores para la construcción de módulos de expresión de genes carotenogénicos

Para la construcción de los módulos de expresión se eligieron promotores fuertes y constitutivos, como los promotores de los genes de actina (*act*), factor de elongación 1 α (*TEF1*) y alcohol deshidrogenasa (*ADHI*), que han sido ampliamente utilizados para la construcción de vectores de expresión en *S. cerevisiae* (Mumberg y col, 1995). Además, los promotores de los genes *act* y *TEF1* ya se han utilizado en *X dendrorhous*, para la construcción de módulos de resistencia a antibióticos, con bastante éxito (Wery y col, 1997; Niklitschek, 2007).

Una transcripción eficiente también requiere de una eficiente terminación (Romanos, 1992), sin embargo, en *S. cerevisiae* es escaso el conocimiento sobre ello y menos aun en *X. dendrorhous*. En este trabajo se escogieron al azar los terminadores de los genes de invertasa (*INV*), actina (*act*) y glutamato deshidrogenasa (*gdhA*). Además, en la elaboración del diseño de los módulos se utilizó promotores y terminadores distintos para cada gen con el objetivo de evitar la pérdida de éste mediada por recombinación mitótica en las zonas duplicadas de homología que se genere entre estos elementos regulatorios. Indudablemente que el escaso conocimiento sobre promotores en *X. dendrorhous* pone en relieve la necesidad de estudiarlos, ya que es fundamental para futuras investigaciones que requieran el aumento del número de copias y expresión heteróloga de genes en esta levadura.

4.2 Integración de un módulo de resistencia a higromicina B en el genoma de *X.*

dendrorhous

En trabajos anteriores de sobreexpresión de los genes *crtYB*, *crtI* e *idi* en *X. dendrorhous*, la integración de sus módulos de expresión se dirigió al DNA ribosómico de la levadura (Verdoes y col, 2003; Visser y col, 2005). Se ha estimado que en *X. dendrorhous* existen alrededor de 60 copias del rDNA (Wery y col, 1997) lo que favorecería la integración múltiple de los genes de interés en el genoma. Sin embargo, debido a las repeticiones en tándem de esta región, los genes integrados podrían escindirse por recombinación homóloga generando cepas inestables. Adicionalmente, utilizar como blanco de integración esta región dificulta evaluar el efecto de la dosis génica en la producción de carotenoides, ya que es difícil cuantificar el número de copias del correspondiente módulo que puede estar integrado en el genoma de la levadura. Por estos motivos, en este trabajo se excluyó la región de rDNA como sitio blanco de integración para los módulos de expresión. Además, se cauteló que el sitio blanco de inserción estuviese ligado a un gen marcador, que la integración del módulo y la interrupción resultante del sitio blanco no alterase fuertemente la fisiología de la levadura. En relación a lo anterior, se ha descrito en *S. cerevisiae* que los niveles de expresión de genes heterólogos es dependiente de las zonas de integración en el genoma, siendo mayor en sectores cercanos al origen de replicación, baja en regiones cercanas a telómeros e intermedia cuando es cercana a genes (Bai Flagfeldt y col, 2009). Debido a que no se conocen los orígenes de replicación en *X. dendrorhous*, se escogió como blanco de integración dos loci, *yhu* y *xhd*, los cuales se encuentran cercanos a un gen, en

este caso, el gen *HIS3* que codifica la enzima imidazol glicerol-fosfato deshidratasa que cataliza el sexto paso en la síntesis de histidina (Fink, 1964).

Al comparar la secuencia nucleotídica de *yhu* y *xhd* con la base de datos Genbank mediante blastx, el alineamiento sólo arrojó una secuencia aminoacídica para cada región con baja identidad y cobertura para ambos loci y por lo tanto, éstos podrían ser no codificantes o bien codificar un gen aún no descrito de *X. dendrorhous*. Recientemente, en 2011, al acceder al transcriptoma de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*, se determinó que los loci *yhu* y *xhd* se expresan produciendo sus respectivos mRNA. A pesar de que efectivamente estas regiones se transcriben, aún no se conoce la funcionalidad de las proteínas hipotéticas homólogas. Sin embargo, la interrupción de *yhu* provocó un aumento en el contenido de astaxantina, por ello en un futuro sería interesante estudiar la función que cumpliría la proteína codificada por este locus y su relación con la producción de carotenoides en *X. dendrorhous*. Por otra parte, la interrupción de *xhd*, no afectó la producción de pigmentos ni el crecimiento, por lo que es un buen candidato para ser utilizado como blanco de integración en estudios de aumento de dosis génica de genes carotenogénicos y/o para la expresión de otros genes en esta levadura.

4.3 Adaptación de la técnica de *DNA assembler* en *X. dendrorhous*.

Actualmente existen pocas herramientas para manipular genéticamente *X. dendrorhous*, por ejemplo, no existen vectores de clonamiento. Dentro de las herramientas desarrolladas en nuestro laboratorio destacan la construcción de módulos

de expresión de genes de resistencia a antibióticos, los cuales han permitido interrumpir genes carotenogénicos mediante el proceso de recombinación homóloga. Sin embargo, para llevar a cabo este proceso se requiere construir varios plásmidos. La generación de un plásmido portador de una construcción o fragmento de DNA de interés para transformar levaduras es un proceso lento que involucra varios pasos tales como: amplificación de DNA, digestión con endonucleasas, ligado *in vitro* y transformación en *E. coli* para replicarlo. Cuando se quiere clonar más de un gen, este proceso es aun más lento y dependerá de los sitios de restricción disponibles. En oposición, la metodología de *DNA assembler* sólo requiere de fragmentos de DNA con secuencias homólogas en sus extremos. Debido a los pocos pasos requeridos para ello, se podría aumentar el número de fragmentos a ensamblar y así aumentar el número de copia de más de un gen a la vez. Por esto, para futuras investigaciones, sería interesante estudiar las limitaciones y alcances de la técnica, como el máximo de fragmentos a ensamblar, la mínima longitud de superposición entre los fragmentos y la concentración óptima de cada fragmento requerido para transformar, entre otros.

DNA assembler resultó un eficiente procedimiento de modificación genética, ya que se obtuvieron entre 1 a 9 colonias transformantes al utilizar 1 µg de cada fragmento de DNA, cantidad similar a lo obtenido, al transformar con 10-15 µg de plásmidos (5-10 colonias transformantes). No obstante, la baja cantidad de colonias transformantes podría ser un factor crítico cuando se desee aumentar el número de genes a insertar. Así, una estrategia para aumentar la tasa de integración debe considerar el incremento de la longitud de superposición entre los fragmentos de DNA a ensamblar.

En este trabajo también se consideró una estrategia para escindir el marcador de resistencia utilizado en la selección, lo que favorecería posteriores transformaciones de las cepas resultantes para utilizar el mismo marcador y no depender de la disponibilidad de otros marcadores de selección. Para ello, se utilizó el método de DR sin resultados exitosos. Probablemente este método podría ser optimizado aumentando la longitud de los DRs para favorecer el proceso de recombinación que permita la eliminación del marcador.

4.4 Impacto de la sobreexpresión de los genes *crtYB*, *crtI* y *crtS* en la composición y cantidad de carotenoides en *X. dendrorhous*.

En este trabajo se aumentó el número de copias de los *crtYB*, *crtI* y *crtS*, independientemente. Sin embargo, no se evaluó si efectivamente hay un aumento en la expresión de dichos genes en las cepas transformantes, por lo que se propone en un futuro determinar los niveles de transcrito mediante RT-PCR y proteínas mediante Western blot. En relación a lo anterior, aún está en desarrollo la síntesis de los anticuerpos necesarios para realizar este último experimento.

4.4.1 Gen *crtYB*.

En este estudio se aumentó el número de copias del gen *crtYB* que codifica la enzima bifuncional PBS involucrada en la síntesis de fitoeno, el primer carotenoide sintetizado en la ruta de biosíntesis a partir de GGPP, y de β -caroteno a partir de licopeno (Figura 1) (Verdoes y col, 1999a; Alcaíno, 2002). Dado que el producto del gen *crtYB* cataliza la síntesis del primer carotenoide, esperábamos que la sobreexpresión de

este gen aumentara la producción de carotenoides totales, lo que no se observó en este trabajo. En *Thermus thermophilus* la conversión de GGPP a fitoeno es el paso limitante para la síntesis de carotenoides y la sobreexpresión del gen involucrado gatilla la producción de 3 veces más carotenoides en comparación a la cepa parental (Hoshino y col, 1993). Sin embargo, en *X. dendrorhous* se publicó que la sobreexpresión del gen *crtYB* integrado en múltiples copias del rDNA, los carotenoides totales aumentaron en tan solo un 1,3 %, aproximadamente (Verdoes y col, 2003). Para favorecer la síntesis de fitoeno en la levadura, seguramente es necesario sobreexpresar adicionalmente los genes que participan en la síntesis de los precursores de los carotenoides, incluyendo aquellos involucrados en la vía del mevalonato (Figura 1). Sin embargo, es necesario aumentar el conocimiento de la síntesis de los precursores, ya que contrario a lo esperado, la sobreexpresión del gen *idi*, que codifica la enzima IPP isomerasa, no aumentó el contenido de carotenoides totales en esta levadura (Visser y col, 2005).

Como se mencionó anteriormente, el producto del gen *crtYB* también cataliza la síntesis de β -caroteno desde licopeno cuyos extremos son ciclados por la actividad licopeno ciclasa. En trabajos previos la sobreexpresión del gen *crtYB* provocó un aumento en el porcentaje de carotenoides bicíclicos β -caroteno y equinenona con respecto a los carotenoides totales de 2,1 y 3,9 veces con respecto a la cepa parental, además las cepas presentaron una disminución en el porcentaje de astaxantina de 1,5 veces. Estos resultados se corresponden a lo observado en este trabajo, ya que la cepa con dos copias adicionales del gen *crtYB* también presentó un aumento de β -caroteno de 2,6 veces, por lo tanto, la sobreexpresión del gen *crtYB* en *X. dendrorhous* sugiere que

favorecería la actividad β -caroteno sintasa en comparación a la actividad fitoeno sintasa. Adicionalmente, en este trabajo las cepas con copias adicionales del gen *crtYB* también aumentaron los carotenoides bicíclicos distintos a astaxantina que se sintetizan a partir del β -caroteno, como equinenona, 3-hidroequinenona y fenicoxantina. Dentro de ellos y en comparación con la cepa silvestre, equinenona fue el de mayor aumento (2,9 veces) y fenicoxantina, el de menor aumento de solo 1,25 veces. La síntesis de equinenona, 3-hidroequinenona y fenicoxantina no son catalizados por el producto del gen *crtYB*, pero al parecer su síntesis si es favorecida por la mayor disponibilidad de β -caroteno. A pesar que estos carotenoides son productos de la enzima astaxantina sintasa al igual que la astaxantina (Álvarez y col, 2006; Ojima y col, 2006) el contenido de esta última no aumentó en esta cepa, lo que deja a entrever un paso limitante en la actividad de esta enzima. Con respecto a los carotenoides monocíclicos, la cepa con dos copias adicionales del gen *crtYB* no presentó estos carotenoides (Figura 12). Este resultado se corresponde a lo observado en trabajos previos, donde la sobreexpresión de este gen provocó una disminución en los carotenoides monocíclicos (Verdoes y col, 2003).

4.4.2 Gen *crtI*.

El gen *crtI* codifica una desaturasa que cataliza la síntesis de licopeno desde fitoeno. En trabajos previos, el incremento del número de copias del gen *crtI* bajo su propio promotor e integradas en el rDNA de la levadura, gatilló una disminución de un 29,8% en los carotenoides totales (Verdoes y col, 2003). Además, en aquel trabajo se reportó que la sobreexpresión del gen *crtI* provocó cambios en la composición de pigmentos: una disminución de 2,8 veces de carotenoides bicíclicos, incluyendo

astaxantina, y un aumento de 2,5 veces en los carotenoides monocíclicos. Por otra parte, en este trabajo, al aumentar el número de copias de este gen, controlado por el promotor *ADHI*, también se observó una disminución en la producción de carotenoides totales del 30,3 %, pero sin un cambio significativo en la composición de ellos en comparación a la cepa silvestre, en oposición a lo observado en trabajos previos.

La diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo y los previamente reportados por Verdoes y col. (2003) probablemente se deba al promotor *ADHI* utilizado en este trabajo, ya que, como se mencionó anteriormente dicho promotor no había sido utilizado previamente en *X. dendrorhous*. Otra variable puede ser el tamaño de este promotor, que arbitrariamente fue de 500 pb. El tamaño de los promotores en *S. cerevisiae* es variable y puede oscilar entre los 200 pb hasta 1.500 pb, y en *X. dendrorhous* no hay estudios al respecto.

4.4.3 Gen *crtS*.

En este trabajo se estudió el efecto de alterar el flujo metabólico en las etapas entre β -caroteno y astaxantina, catalizado por la enzima astaxantina sintasa, mediante el incremento de la dosis del gen *crtS*. Las cepas con una y dos copias adicionales de este gen no presentaron cambios fenotípicos de color evidentes en comparación a la cepa parental (Figura 12). De hecho, el contenido de carotenoides totales no difiere al de la cepa silvestre parental. Sin embargo, la composición de los pigmentos muestra un aumento en el contenido de astaxantina y una disminución de los otros carotenoides bicíclicos intermediarios entre β -caroteno y astaxantina, sugiriendo que su catálisis

estaría limitada por la cantidad de su sustrato, el β -caroteno. Estos resultados sugieren que para lograr una producción de astaxantina significativamente superior, sería necesario incrementar además la síntesis del β -caroteno. Por otra parte, el β -caroteno disminuyó 3,9 veces con respecto a la cepa silvestre, sin agotarse, por lo tanto deja a entrever un paso limitante de la actividad de la enzima astaxantina sintasa. Esta enzima, pertenece a la familia de proteínas citocromo P450s que requieren de la actividad auxiliar de la citocromo P450 reductasa (CPR) y en *X. dendrorhous* la enzima CPR es codificada por el gen *crtR*, la cual provee a la enzima astaxantina sintasa, los electrones necesarios para la oxigenación del sustrato (Alcaíno y col, 2008). Por lo tanto, para lograr una producción de astaxantina significativamente superior, sería necesario además incrementar el número de copia del gen *crtR*.

El aumento de copias del gen *crtS* gatilló un leve incremento (1,8 veces) de carotenoides monocíclicos, constituidos principalmente por HDCO. Este hecho confirmaría la participación de este gen en la síntesis de HDCO a partir de toruleno. Probablemente este leve aumento se deba a la escasa cantidad de toruleno registrado en la cepa silvestre UCD 67- 385, que alcanza los $0,97 \pm 0,7$ % con respecto a los carotenoides totales.

Cabe destacar que no se observaron cambios significativos entre las cepas heterocigotas (con una copia adicional de *crtS*) u homocigotas (con dos copias adicionales), entonces al utilizar el promotor *TEF1* sólo bastaría con la condición heterocigota para provocar el efecto en la composición de los carotenoides.

5 PROYECCIONES

Con el objetivo de aumentar la síntesis de astaxantina en *X. dendrorhous* mediante ingeniería metabólica es importante estudiar los promotores de esta levadura, ya que es fundamental para una eficiente sobreexpresión de genes. Bajo el mismo objetivo, la metodología utilizada en este trabajo, *DNA assembler*, permitiría integrar en el genoma de la levadura más de un gen a la vez, por ello es necesario estudiar los alcances y limitaciones de esta metodología.

Para mejorar la producción de astaxantina en *X. dendrorhous* es necesario ampliar el conocimiento sobre esta levadura, ya que aún se desconoce mucho sobre la biosíntesis del pigmento y su regulación. Según los resultados revelados en este trabajo, un factor crítico para aumentar los carotenoides es la disponibilidad de precursores de éstos. Por ello, es importante estudiar los genes que controlan su biosíntesis, incluyendo la vía del mevalonato. En un futuro se podría sobreexpresar un gen participante en la síntesis de precursores en conjunto con el gen *crtYB*, para aumentar la cantidad de carotenoides. Por otra parte, nuestros resultados revelan que la síntesis de astaxantina desde β -caroteno es un paso limitante, lo que podría ser favorecido con la sobreexpresión conjunta de los genes *crtS* y *crtR*.

6 CONCLUSIONES

- El método *DNA assembler* es una herramienta rápida y efectiva para transformar *X. dendrorhous*, la cual permite interrumpir una zona de interés y aumentar la dosis génica.
- La interrupción en el locus *xhd* no provoca auxotrofia ni cambios en la producción de carotenoides y es un buen blanco de integración para el aumento de la dosis génica en *X. dendrorhous*.
- La cepa con dos copias adicionales del gen *crtYB* no presentó cambios en la cantidad de carotenoides totales producidos, pero sí una disminución en el contenido de astaxantina y un aumento en los otros carotenoides bicíclicos en comparación con la cepa parental.
- Las cepas portadoras de copias adicionales del gen *crtI*, presentaron una menor cantidad de carotenoides totales, sin cambios significativos en la composición de pigmentos con respecto a la cepa parental.
- Cepas con copias adicionales del gen *crtS* presentaron un mayor contenido de carotenoides monocíclicos y de astaxantina a costa de una disminución de otros carotenoides bicíclicos.
- Las evidencias sugieren que la sobreexpresión de un solo gen no es suficiente para aumentar la síntesis de astaxantina.
- La metodología, *DNA assembler*, es una potencial herramienta que podría facilitar la integración de varios genes en el genoma de la levadura de una manera más rápida a la transformación con vectores, hasta ahora utilizados.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Adrio, J. y Veiga M. 1995. "Transformation of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*." *Biotechnology techniques* **9**: 509-512.
- Alcaíno, J. 2002. Organización estructural del gen de la fitoeno sintasa en el genoma de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Ex: *Phaffia rhodozyma*). Tesis para optar al título de Ingeniera en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile.
- Alcaíno, J., Barahona S., Carmona M., Lozano C., Marcoleta A., Niklitschek M., Sepúlveda D., Baeza M. y Cifuentes V. 2008. "Cloning of the cytochrome P450 reductase (*crtR*) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *BMC microbiology* **8**: 169.
- Álvarez, V., Rodríguez-Sáiz M., de la Fuente J. L., Gudiña E. J., Godio R. P., Martín J. F. y Barredo J. L. 2006. "The *crtS* gene of *Xanthophyllomyces dendrorhous* encodes a novel cytochrome-P450 hydroxylase involved in the conversion of [beta]-carotene into astaxanthin and other xanthophylls." *Fungal Genetics and Biology* **43**: 261-272.
- An, G. H., Schuman D. B. Johnson y E. A. 1989. "Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content." *Applied and environmental microbiology* **55**: 116.
- An, G. H., Cho M. H. y Johnson E. A. 1999. "Monocyclic carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*)." *Journal of bioscience and bioengineering* **88**: 189-193.
- Anantharaman, V. y Aravind L. 2006. "The NYN domains: novel predicted RNAses with a PIN domain-like fold." *RNA biology* **3**: 18.
- Andrewes, A. G., Phaff H. J. y Starr M. P. 1976. "Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast." *Phytochemistry* **15**: 1003-1007.
- Bai Flagfeldt, D., Siewers V., Huang L. y Nielsen J. 2009. "Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **26**: 545-551.
- Bartley, G. E. y Scolnik P. A. 1995. "Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health." *The Plant Cell* **7**: 1027.
- Bennedsen, M., Wang X., Willén R., Wadström T. y Andersen L. P. 2000. "Treatment of *H. pylori* infected mice with antioxidant astaxanthin reduces gastric inflammation, bacterial load and modulates cytokine release by splenocytes." *Immunology Letters* **70**: 185-189.
- Boyle, J. y Lew A. 1995. "An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification." *Trends in genetics* **11**: 8.
- Britton, G. 1995. "Structure and properties of carotenoids in relation to function." *The FASEB journal* **9**: 1551.
- Britton, G., Liaaen-Jensen S. y Pfander H. 2004. pp 5-6. *Carotenoids handbook*. Birkhäuser, Berlín.
- Britton, G., Liaaen-Jensen S. y Pfander H. 2008. pp 89-91. *Carotenoids: Natural Functions*. Birkhäuser, Berlín.

- Carmona, M. 2007. Caracterización estructural del gen *ast* de *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas c/m Genética. Universidad de Chile.
- Castillo, A. y Cifuentes V. 1994. "Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Phaffia rhodozyma*." *Current genetics* **26**: 364-368.
- Cline, J., Braman J. C. y Hogrefe H. H. 1996. "PCR fidelity of *Pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases." *Nucleic acids research* **24**: 35-46.
- Chávez-Cabrera, C., Flores-Bustamante Z. R. y Flores-Cotera L. B. 2010. "Una Vista Integral de la Síntesis de Astaxantina en *Phaffia rhodozyma*." *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C.* **14**: 24-38.
- de la Fuente, J. L., Rodríguez-Saiz M., Schleissner C., Diez B., Peiro E. y Barredo J. L.. 2010. "High-titer production of astaxanthin by the semi-industrial fermentation of *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *Journal of biotechnology* **148**: 144-146.
- Fang, T. J. y Cheng Y. S. 1993. "Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions." *Journal of fermentation and bioengineering* **75**: 466-469.
- Fink, G. 1964. "Gene-enzyme relations in histidine biosynthesis in yeast." *Science* **146**: 525-527.
- Flores-Cotera, L., Martin R. y Sanchez S. 2001. "Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium." *Applied microbiology and biotechnology* **55**: 341-347.
- Golubev, W. I. 1995. "Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*)." *Yeast* **11**: 101-110.
- Heckman, K. L. y Pease L. R. 2007. "Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension." *Nature Protocols* **2**: 924-932.
- Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela L. y Goycoolea F. 2006. "Astaxanthin: a review of its chemistry and applications." *Critical reviews in food science and nutrition* **46**: 185-196.
- Hoshino, T., Fujii R. y Nakahara T. 1993. "Molecular cloning and sequence analysis of the *crtB* gene of *Thermus thermophilus* HB27, an extreme thermophile producing carotenoid pigments." *Applied and environmental microbiology* **59**: 3150-3153.
- Horton, R. M., Hunt H. D., Ho S. N., Pullen J. K. y Pease L. R. 1989. "Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension." *Gene* **77**: 61-68.
- Hussein, G., Sankawa U., Goto H., Matsumoto K. y Watanabe H. 2006. "Astaxanthin, a Carotenoid with Potential in Human Health and Nutrition." *Journal of natural products* **69**: 443-449.
- Iwamoto, T., Hosoda K., Hirano R., Kurata H., Matsumoto A., Miki W., Kamiyama M., Itakura H., Yamamoto S. y Kondo K. 2000. "Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by astaxanthin." *Journal of atherosclerosis and thrombosis* **7**: 216.
- Johnson, E. A. y Lewis M. J. 1979. "Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*." *Journal of General Microbiology* **115**: 173-183.

- Jonas, S. y Hollfelder F. 2009. Mechanism and catalytic promiscuity: Emerging mechanistic principles for identification and manipulation of catalytically promiscuous enzymes. *Protein Engineering Handbook*, WILEY-VCH. 1.
- Kajiwara, S., Fraser P. D., Kondo K. y Misawa N. 1997. "Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*." *Biochemical Journal* **324**: 421-426.
- Kim, I. G., Nam S. K., Sohn J. H., Rhee S. K., An G. H., Lee S. H. y Choi E. S. 1998. "Cloning of the ribosomal protein L41 gene of *Phaffia rhodozyma* and its use as a drug resistance marker for transformation." *Applied and environmental microbiology* **64**: 1947-1949.
- Lignell, A. y Bottiger P. 2001. Use of xanthophylls, astaxanthin e. g. for treatment of autoimmune diseases, chronic viral and intracellular bacterial infections. WO01/24787 A1.
- Lodato, P. 2002. Estudio de la expresión de genes de la carotenogénesis en *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex *Phaffia rhodozyma*). Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias c/m en Biología. Universidad de Chile.
- Lorenz, R. T. y Cysewski G. R. 2000. "Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin." *Trends in Biotechnology* **18**: 160-167.
- Lu, S. y Li, L. 2008. "Carotenoid metabolism: biosynthesis, regulation, and beyond." *Journal of Integrative Plant Biology* **50**: 778-785.
- Mann, V., Harker M., Pecker I. y Hirschberg J. 2000. "Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers." *Nature Biotechnology* **18**: 888-892.
- Maoka, T. 2011. "Carotenoids in Marine Animals." *Marine Drugs* **9**: 278-293.
- Markovits, A. 1991. "Potencial fuente vegetal de astaxantina." *Chile pesquero* **69**: 25-26.
- Meyer, P., Preez J. C. y Kilian S. 1993. "Selection and evaluation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*". *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **9**: 514-520.
- Miki, W. 1991. "Biological functions and activities of animal carotenoids." *Pure Appl. Chem* **63**: 141-146.
- Mumberg, D., Muller R. y Funk M. 1995. "Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds." *Gene* **156**: 119-122.
- Niklitschek, M. 2007. Desarrollo de un casete de resistencia a antibiótico en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Seminario de Título para optar al grado de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile.
- Niklitschek, M., Alcaíno J., Barahona S., Sepúlveda D., Lozano C., Carmona M., Marcoleta A., Martínez C., Lodato P., Baeza M., Cifuentes V. 2008. "Genomic organization of the structural genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *Biol Res* **41**: 93-108.
- Ojima, K., Breitenbach J., Visser H., Setoguchi Y., Tabata K., Hoshino T. y Sandmann G. 2006. "Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a beta-carotene 3-hydroxylase/4-ketolase." *Molecular Genetics and Genomics* **275**: 148-158.
- Phaff, H., Miller M., Yoneyama M. y Soneda M. 1972. A comparative study of the yeast floras associated with trees on the Japanese islands and on the west coast of

- North America. Gyozo Terui (ed.). pp 759-774. Fourth International Fermentation Symposium Proceedings: Fermentation Technology Today, Society of Fermentation Technology, Osaka.
- Primo, E. 1995. Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria
- Retamales, P., Hermosilla G., León R, Martínez C., Jiménez A. y Cifuentes V. 2002. "Development of the sexual reproductive cycle of *Xanthophyllomyces dendrorhous*." Journal of microbiological methods 48: 87-93.
- Retamales, P., León R., Martínez C., Hermosilla G., Pincheira G. y Cifuentes V. 1998. "Complementation analysis with new genetic markers in *Phaffia rhodozyma*." Antonie van Leeuwenhoek 73: 229-236.
- Reyes, E., Barahona S., Fischman O., Niklitschek M., Baeza M. y Cifuentes V. 2004. "Genetic polymorphism of clinical and environmental strains of *Pichia anomala*". Biol Res 37: 747-57.
- Romero, I. 2010. Participación del gen farnesil pirofosfato sintasa (*FPS*) en la biosíntesis de astaxantina en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile.
- Rossman, T. G. y Wang Z. 1999. "Expression cloning for arsenite-resistance resulted in isolation of tumor-suppressor fau cDNA: possible involvement of the ubiquitin system in arsenic carcinogenesis." Carcinogenesis 20: 311-316.
- Sambrook, J. y Russell D. W. 2001. Molecular cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandmann, G. 2001. "Carotenoid biosynthesis and biotechnological application." Archives of biochemistry and biophysics 385: 4-12.
- Schmidt, I., Schewe H., Gassel S., Jin C., Buckingham J., Hümbelin M., Sandmann G. y Schrader J. 2010. "Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*." Applied microbiology and biotechnology 89: 555-571.
- Schroeder, W. A. y Johnson E. 1993. "Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*." Microbiology 139: 907-912.
- Schroeder, W. A. y Johnson E. A. 1995. "Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 14: 502-507.
- Shao, Z. y Zhao H. 2009. "DNA assembler, an *in vivo* genetic method for rapid construction of biochemical pathways." Nucleic acids research 37: e16.
- Sommer, T., Potts W. y Morrissy N. 1991. "Utilization of microalgal astaxanthin by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Aquaculture 94: 79-88.
- Torrissen, O., Hardy R. y Shearer K. 1989. "Pigmentation of salmonids-carotenoid deposition and metabolism." CRC Crit. Rev. Aquat. Sci 1: 209-225.
- Ukibe, K., Hashida K., Yoshida N. y Takagi H. 2009. "Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for astaxanthin production and oxidative stress tolerance." Applied and environmental microbiology 75: 7205-7211.
- Verdoes, J. C., Misawa N. y van Ooyen A. J. J. 1999a. "Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*." Biotechnology and bioengineering 63: 750-755.

- Verdoes, J., Krubasik P., Sandmann G. y Van Ooyen A. 1999b. "Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *Molecular and General Genetics MGG* **262**: 453-461.
- Verdoes, J. C., Sandmann G., Visser H., Diaz M., Van Mossel M. y van Ooyen A. J. J. 2003. "Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*)." *Applied and environmental microbiology* **69**: 3728-3738.
- Visser, H., Ooyen A. J. J. y Verdoes J. C. 2003. "Metabolic engineering of the astaxanthin biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *FEMS yeast research* **4**: 221-231.
- Visser, H., Sandmann G. y Verdoes J. C. 2005. Xanthophylls in Fungi: Metabolic Engineering of the Astaxanthin Biosynthetic Pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Microbial Process and Products*. **18**: 257-272
- Wery, J., Gutker D., Renniers A. C. H. M., Verdoes J. C. y van Ooyen A. J. J. 1997. "High copy number integration into the ribosomal DNA of the yeast *Phaffia rhodozyma*." *Gene* **184**: 89-97.
- Wery, J., Verdoes J. C. y van Ooyen A. J. J. 1998. "Efficient transformation of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*." *Biotechnology techniques* **12**: 399-405.
- Yamane, Y., Higashida K., Nakashimada Y., Kakizono T. y Nishio N. 1997. "Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis." *Applied and environmental microbiology* **63**: 4471-4478.

2.10	Transformación mediante electroporación	25
2.10.1	Transformación de <i>E. coli</i> mediante electroporación	25
2.10.2	Transformación de <i>X. dendrorhous</i> por electroporación	26
2.11	Extracción y análisis de pigmentos mediante RP-HPLC	27
3.	RESULTADOS.....	29
3.1	Construcción de módulos de expresión de los genes carotenogénicos <i>crtYB</i> , <i>crtI</i> y <i>crtS</i> de <i>X. dendrorhous</i>	29
3.2	Adaptación del método de <i>DNA assembler</i> en <i>X. dendrorhous</i>	35
3.3	Aumento del número de copias de los genes <i>crtYB</i> , <i>crtI</i> y <i>crtS</i> en <i>X. dendrorhous</i> mediante <i>DNA assembler</i>	45
3.4	Evaluación del efecto del aumento de la dosis de los genes <i>crtYB</i> , <i>crtI</i> y <i>crtS</i> en la composición y cantidad de carotenoides de <i>X. dendrorhous</i>	52
3.5	Análisis de los loci <i>yhu</i> y <i>xhd</i> en el transcriptoma de la cepa UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i>	57
4.	DISCUSIÓN	59
4.1	Elección de promotores y terminadores para la construcción de módulos de expresión de genes carotenogénicos	59
4.2	Integración de un módulo de resistencia a higromicina B en el genoma de <i>X. dendrorhous</i>	60
4.3	Adaptación de la técnica de <i>DNA assembler</i> en <i>X. dendrorhous</i>	61
4.4	Impacto de la sobreexpresión de los genes <i>crtYB</i> , <i>crtI</i> y <i>crtS</i> en la composición y cantidad de carotenoides en <i>X. dendrorhous</i>	63
4.4.1	Gen <i>crtYB</i>	63
4.4.2	Gen <i>crtI</i>	65
4.4.3	Gen <i>crtS</i>	66
5	PROYECCIONES	68
6	CONCLUSIONES	69
7	BIBLIOGRAFÍA	70