

AISLAMIENTO DE GENES DE CAROTENOGENESIS DE *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Ex. Phaffia rhodozyma*) MEDIANTE PCR*

(Isolation of carotenogenesis genes of *Xanthophyllomyces dendrorhous*
(*Ex. Phaffia rhodozyma*) through PCR)

Salvador Barahona, Jennifer Alcaíno,
Patricia Lodato, Patricio Retamales,
Victor Cifuentes #

Laboratorio de Genética, Depto de Cs. Ecológicas,
Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Las Palmeras 3425,
Casilla 653, Email: vcifuent@uchile.cl

*: Financiado por: Proyecto ENL 2000/17,
D.I.D. Universidad de Chile

#: A quien dirigir la correspondencia.

Palabras clave: Carotenoides, fitoeno deshidrogenasa, astaxantina, *Xanthophyllomyces dendrorhous*

Key words: Carotenoides, fitoeno deshidrogenasa, astaxantina, *Xanthophyllomyces dendrorhous*

RESUMEN

Xanthophyllomyces dendrorhous (*Ex. Phaffia rhodozyma*) es una levadura basidiomicética carotenogénica, en la cual aspectos importantes de su biología, como la organización general de su genoma, número de cromosomas y nivel de ploidía aún no son completamente entendidos. En atención a esto, se han orientado esfuerzos en estudios moleculares con el objetivo de aumentar el conocimiento de su genética. En el presente trabajo, se describe un eficiente procedimiento para seleccionar y clonar genes a partir de una genoteca de DNA genómico de *X. dendrorhous* mediante la amplificación de DNA por PCR, utilizando parejas de partidores específicos para el gen *CrtI*. Adicionalmente, se describe la síntesis de cDNA a partir de RNA total de la levadura mediante transcripción reversa acoplada a amplificación de DNA (RT-PCR).

INTRODUCCION

Xanthophyllomyces dendrorhous es una levadura basidiomicética carotenogénica aislada recientemente (Miller *et al.*, 1976), en la cual se ha descrito la formación de holobasidios con basidiosporas terminales (Golubev, 1995). Su principal carotenoide es la astaxantina con una proporción menor de β -caroteno y otros pigmentos (Andrewes *et al.*, 1976; Johnson & Lewis, 1979). Astaxantina es el pig-

SUMMARY

Xanthophyllomyces dendrorhous (*Ex. Phaffia rhodozyma*) is a carotenogenic basidiomycetous yeast, in which main aspect of its biology, such as genome organization, chromosome number and ploidy level are not yet well understood. Considering this fact, efforts in molecular studies have been oriented to increase the knowledge of their genetics. In this paper, an efficient procedure is described for the selection and cloning genes from a genomic library of *X. dendrorhous*, by amplification of DNA through PCR and by using pairs of specific primers of *CrtI* gene. Additionally, the cDNA synthesis from total RNA of the yeast by means of a reverse transcription coupled to an amplification of DNA (RT-PCR) is described.

mento responsable del color rojo de la carne de salmónes (Johnson *et al.*, 1977) y sus propiedades antioxidantes han sido estudiadas (Schroeder & Johnson, 1993). La producción de carotenoides en *X. dendrorhous* puede ser incrementada en forma reversible mediante cambios ambientales, principalmente en las condiciones de cultivo, composición de nutrientes y aireación. También puede ser incrementada en forma estable mediante tratamiento mutagénico clásico (An *et al.*, 1989; Cifuentes *et al.*, 1997; Retamales *et al.*, 1998). Sin embargo, el desarrollo eficiente

de cepas sobreproductoras de astaxantina depende de un mejor conocimiento del control genético de su biosíntesis. Para ello, la existencia de mutantes afectados en carotenogénesis, es útil para realizar estudios genéticos como el análisis de complementación mediante fusión de protoplastos. Adicionalmente, la transformación genética de esta levadura resulta ser una herramienta esencial para entender la carotenogénesis en *X. dendrorhous* (Adrio *et al.*, 1995; Martínez *et al.*, 1998). La transformación genética de cepas mutantes afectadas en la carotenogénesis, se logró utilizando DNA plasmidial proveniente de una genoteca de la levadura construida en el vector de integración YIp5 de *S. cerevisiae* (Martínez *et al.*, 1998). El análisis molecular de los transformantes sugiere que el DNA dador se incorporó al genoma del huésped mediante eventos de integración, los cuales ocurren en baja frecuencia. En la actualidad, no existe un vector plasmidial para *X. dendrorhous*, portador de un replicador de esta levadura que permita la transformación genética con gran eficiencia. La eficiencia de los sistemas de clonado de genes en hongos, depende de la disponibilidad de vectores para el desarrollo de los respectivos sistemas de transferencia y expresión génica y de la disponibilidad de genes clonados que puedan ser utilizados como marcadores genéticos. En este trabajo se describe un procedimiento eficiente de detección, selección y clonado de genes que controlan la síntesis de carotenoides de *X. dendrorhous*.

MATERIALES Y METODOS

1.- Cepas

Se utilizó la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*, American Type Culture Collection (ATCC) 24230 como dador de DNA genómico para la construcción de la genoteca. *X. dendrorhous* fue cultivada en medio YM con agitación a 22°C, según la técnica descrita por An *et al.*, (1989). *Escherichia coli*, fue cultivada en medio LB en presencia de ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml.

2.- Análisis de los plásmidos:

El DNA plasmidial fue purificado mediante la técnica de la lisis alcalina (Birboin & Doly, 1979) y fue analizado mediante digestión con la endonucleasa de restricción *Bam*HI, seguido de electroforesis en geles de agarosa al 0.7% en TBE (Tris 8.9 mM, Acido Bórico 8.9 mM, EDTA 2 mM) en presencia de bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml. Para el subclonamiento, las bandas de DNA inserto en el vector YIp5, previamente separadas por electroforesis, fueron cortadas del gel y el DNA purificado mediante la técnica de gene-clean. Luego, cada banda de DNA fue mezclada con el vector pBluescript, ligada con T4 DNA ligasa y se utilizó

dicha mezcla para transformar *E. coli* DH-5α por electroporación.

3.- Síntesis de cDNA mediante RT-PCR.

La extracción de RNA total de *X. dendrorhous* fue realizada de acuerdo al método de Chomczynski (Chomczynski & Sacchi, 1987) y modificado de la siguiente manera. Las células fueron suspendidas en solución de Chomczynski con fenol (Solución Ch-P), luego se agregó perlas de vidrio de 600 µm hasta que se forma un menisco entre la fase líquida y sólida. La ruptura celular fue realizada mediante agitación vigorosa en vórtex durante 30 segundos, seguido de incubación en hielo. Esta etapa se repitió 10 veces, se agregó 0.2 ml de cloroformo por cada ml de solución Ch-P, mezclado por agitación en vórtex y la mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego de una centrifugación a 10.000 rpm, la fase acuosa que contenía el RNA fue transferida a un tubo limpio. El RNA fue precipitado y el pellet fue lavado con etanol al 75%, resuspendido en agua tratada con dietilpirocabonato (DEPC) y guardado a -20 °C hasta su utilización.

La síntesis de cDNA de hebra simple fue realizada con la enzima M-MLV reverse transcriptase H minus de Promega (RT reacción) a 42 °C durante 1 hora. La amplificación fue realizada utilizando como templado cDNA de hebra simple obtenido a partir de la reacción RT, parejas de partidores específicos de cada gen y Taq polimerasa. El programa de amplificación fue diseñado en relación a los partidores como sigue: 3 min. a 95 °C, 28 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 3 min, seguido de una extensión final de 72 °C por 10 min.

Los productos de la amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.7 % en presencia de Bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml.

RESULTADOS Y DISCUSION

1.- Selección de mezclas de la genoteca que contienen el gen *CrtI* de *X. dendrorhous*.

Con el objetivo de clonar genes de interés a partir de una genoteca de *X. dendrorhous*, se desarrolló una estrategia en la cual, se formaron sobre 65 mezclas de la genoteca de la levadura construida en el vector YIp5 (Alcaíno *et al.*, 2000). Cada una contenía de 100 a 150 clones recombinantes y fueron denominadas como PR1 a PR65. El DNA purificado de cada mezcla fue utilizado como molde en reacciones de PCR utilizando partidores específicos del gen *crtI*, que codifica para la enzima fitoeno deshidrogenasa. La figura 1 A, muestra los resultados de la reacción de PCR de 9 mezclas diferentes e indica que en la mezcla 59, denominada como PR59 (fig. 1A, carril 10) se detecta la presencia de una banda de DNA correspondiente al gen *crtI*.

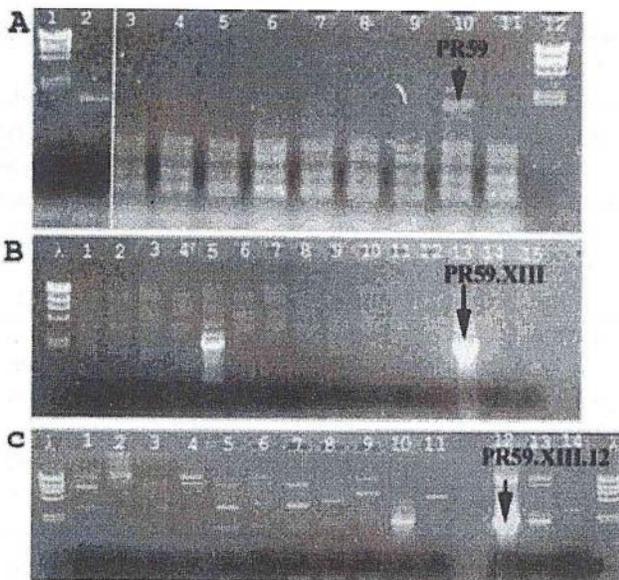


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR a partir de la genoteca de *X. dendrorhous*.

A) Amplificación a partir de las mezclas de 100–150 clones de la genoteca. Carriles: 1 y 12 Marcador de tamaño molecular DNA 100 bp; 2: Control con DNA puro de *X. dendrorhous*. 3 al 11: mezclas PR 52 al PR60 de la genoteca. B). Amplificación usando como DNA molde sub-mezclas de 25 clones diferentes originados del pool PR59. Carril λ : DNA del bacteriófago lambda digerido con *Hind*III, utilizado como estándar de tamaño molecular. Carriles 1 al 15 amplificaciones de las sub-mezclas PR58.2 a PR59.XV. C) Amplificación de clones que contienen plásmidos individuales que constituyen la sub-mezcla PR59.XIII. Carriles 1: DNA del bacteriófago lambda digerido con *Hind*III, utilizado como estándar de tamaño molecular. Carriles 1 al 14 amplificaciones usando como DNA molde a los plásmidos PR59.XIII.1 al PR59.XIII.14. Los partidores utilizados fueron pha1 y pha4 que amplifican un fragmento de 3.6 kb del gen *crtI* de *X. dendrorhous*.

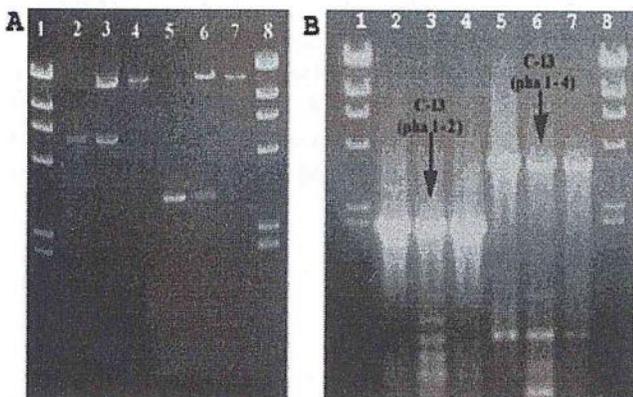


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de plásmidos que contienen el gen *crtI* digerido con *Bam*HI.

A). Análisis de digestión con la endonucleasa de restric-

ción *Bam*HI del plásmido pPR59.XIII.12 aislado de la genoteca (ver figura 1 C carril 12). Carril 1: DNA del bacteriófago lambda digerido con *Hind*III utilizado como estándar de tamaño molecular. Carriles 2): vector YIp5; 3): pPR59.XIII.12; 4): Inserto *Bam*HI de DNA de 18.5 kb purificado de pPR59.XIII.12; 5): vector pBluescript SK; 6): clon pC-13; 7): fragmento de DNA de 18.5 kb purificado de pC-13. B). Amplificación con dos parejas de partidores del gen *CrtI* de *X. dendrorhous* utilizando como molde DNA de los plásmidos pPR59.XIII.12 y pC-13. Carril 1 y 8: DNA de lambda *Hind*III. Carriles 2 al 4: PCR de pC-13; fragmento C-13 de 18.5 kb purificado y pPR59.XIII.12 con partidores pha1 y pha2 respectivamente (Producto de 2.0 kb). Carriles 5 al 7: PCR de pC-13; fragmento C-13 de 18.5 kb purificado y pPR59.XIII.12 con partidores pha1 y pha4 respectivamente (Producto de 3.6 kb)

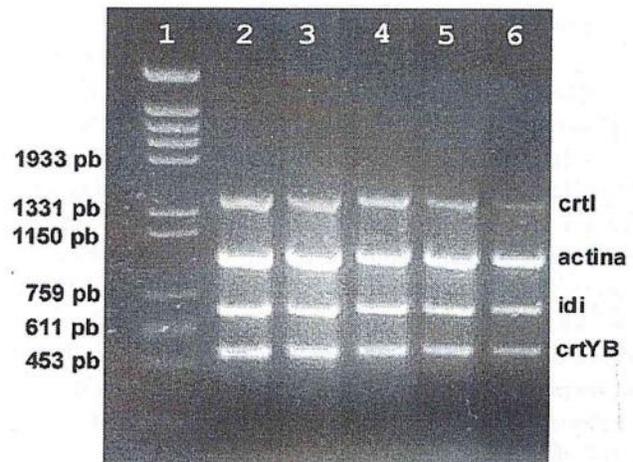


Figura 3. Reacción de RT-PCR a partir de RNA total de *X. dendrorhous*. Carril 1: DNA 100 bp como estándar de tamaño molecular. Carriles 2 al 6: RT-PCR de RNA total de *X. dendrorhous* utilizando 4 parejas de partidores de los genes *crtI*, *actina*, *idi*, *crtYB*. Números a la izquierda corresponden a los tamaños en pares de bases de los fragmentos de DNA del estándar. A la derecha se muestra el gen correspondiente a cada banda producto de la reacción de RT-PCR.

Se tomó una alícuota de células de 0.1 ml del tubo con la mezcla PR-59 y se sembró en medio LB sólido suplementado con ampicilina a una concentración final de 100 μ g/ml. Las colonias fueron replicadas en placas que contenían 25 clones diferentes a partir de 20 placas se construyó 20 sub-mezclas que contenían 25 clones diferentes de la genoteca de *X. dendrorhous* en *E. coli*. Para cada una de las sub-mezclas, las cuales fueron denominadas como PR59.I al PR59.XX, se dejó una placa de replica como respaldo con las 25 colonias individuales. La figura 1 B muestra que en dos sub-clones (PR59.V y PR59.XIII) se detecta

la presencia de una banda de DNA correspondiente al gen *crtI* (fig 1B carriles 6 y 14).

Se purificó DNA plasmidial de cada una de las 25 colonias de la placa replica PR59.XIII y se utilizó como molde para reacciones de PCR con los partidores *pha1* y *pha4*, que amplifican específicamente un fragmento de DNA de 3.6 kb correspondiente al gen *crtI*. Como resultado se observó que dos plásmidos amplifican una banda de DNA de 3.6 kb aproximadamente que corresponden al tamaño esperado para el gen *crtI* de *X.dendrorhous*. En la figura 1 C en los carriles 11 y 14 se puede apreciar claramente que la banda de DNA amplificado es similar para ambas muestras. Como la banda de DNA amplificado que aparece en la fig. 1C, carril 14 es de alta intensidad, se seleccionó el clon que contiene esa muestra de DNA plasmidial y se denominó como clon PR59.XIII.12.

2.- Análisis del plásmido pPR59.XIII.12.

El plásmido pPR59.XIII.12, fue analizado mediante digestión con la endonucleasa de restricción *Bam*HI, seguido de electroforesis en gel de agarosa para determinar si era portador de un inserto de DNA de *X.dendrorhous*. Tal como se muestra en la fig. 2 A, la digestión con *Bam*HI del plásmido pPR59.XIII.12, indica que está constituido por un fragmento de 5.8 kb que corresponde al vector YIp5 y un inserto de DNA de aproximadamente 18.5 kb (ver fig. 2 A carril 3). La identificación del fragmento de 18.5 kb como perteneciente a *X.dendrorhous*, fue mediante un experimento de hibridación utilizando DNA genómico de esta levadura, el inserto de 18.5 kb y una sonda de 1.2 kb, correspondiente a un fragmento *Eco*RV interno del gen *CrtI*. (dato no mostrado). Posteriormente, el fragmento de 18.5 kb fue reclonado en el vector pBluescript SK para su posterior secuenciación. Para ello el vector pBS fue digerido con la enzima de restricción *Bam*HI y la banda de DNA plasmidial de 2.96 kb, correspondiente al vector lineal fue purificada y mezclada con el fragmento de 18.5 kb de *X.dendrorhous* purificado y tratada con la enzima DNA ligasa de T4. Posteriormente la mezcla fue utilizada para transformar la cepa DH-5 α de *E.coli* mediante electroporación, seleccionándose un clon portador de un plásmido constituido por el vector pBS y un inserto de 18.5 kb. Este plásmido fue denominado como pC-13 y las pruebas de secuenciación utilizando partidores

específicos del gen *crtI*, permitieron confirmar la identidad del gen en este nuevo plásmido.

Adicionalmente, se realizó pruebas de PCR utilizando dos parejas de partidores específicos del gen *CrtI* que amplifican dos fragmentos de 2 y 3.6 kb respectivamente, corroborando la presencia del gen en el fragmento de 18.5 kb de *X.dendrorhous* (ver fig. 2B carriles 4 y 7).

3.- Síntesis de cDNA de genes de carotenogénesis mediante RT-PCR.

A partir de un cultivo fresco de *X.dendrorhous* se purificó RNA total mediante la técnica de Chomczynski (Chomczynski & Sacchi, 1987) a partir del cual se sintetizó cDNA de hebra simple utilizando la enzima transcriptasa reversa y oligo dT15 como partidador (Reacción RT). El productor de la reacción RT fue utilizado como DNA molde en una reacción de PCR, utilizando parejas de partidores específicos para los genes *CrtI* (fitoeno deshidrogenasa) *idi* (isopentenil difosfato isomerasa), *CrtYB* (fitoeno sintetasa - licopeno ciclasa) y *actina* (utilizado como control interno de la reacción RT-PCR). La figura 3 muestra bandas de DNA que corresponden a los productos de amplificación de cDNA esperados para los genes *CrtI* (1.4 kb), *actina* (0.9 kb) *idi* (0.68 kb) y *CrtYB* (0.5 kb).

El disponer de un sistema eficiente de clonado y selección de genes a partir de una genoteca de la levadura carotenogénica *X.dendrorhous*, será de enorme beneficio para desarrollar los estudios genéticos tales como la identificación de genes específicos de alguna ruta metabólica como la carotenogénesis. Esta metodología permitirá clonar los genes genómicos que controlan la carotenogénesis de la levadura a partir de la genoteca. De la misma manera, será posible clonar los cDNA obtenidos a partir del RNA total. Como se puede deducir de estos resultados, el procedimiento es relativamente sencillo y eficiente. La combinación con procedimientos de bioinformática, permitirá ampliar su potencial y luego del diseño de partidores a partir de secuencias conservadas, será posible aplicarlo a la búsqueda de genes de interés en la biología del organismo, los cuales podrían ser aislados a partir de la genoteca o sintetizados a partir de RNA total para su clonamiento y posterior estudio. Esto será de gran utilidad en el entendimiento de procesos biológicos básicos de esta levadura.

REFERENCIAS

- Adrio, J.L. & Veiga, M. (1995). Transformation of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. Biotechnol. Techniques 9:509-512
- Alcaíno, J.; Carvajal, N.; Urzúa, B.; Martínez, C. & Cifuentes, V. (2000). Aislamiento de secuencias de replicación autónoma de *Xanthophyllomyces dendrorhous* en *Saccharomyces cerevisiae*. Boletín Micológico. 15:17-22
- An, G.H.; Schuman, D.B. & Johnson, E.A. (1989). Isolation of *X.dendrorhous* mutants with increased astaxanthin content. Appl. Environ. Microbiol. 55:116-124
- Andrewes, A.G.; Phaff, H.J. & Starr, M.P. (1976). Carotenoids of *Phaffia*

rhodozyma, a red pigmented fermenting yeast. Phytochemistry 15:1003-1007

Birboin, H.C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acid. Res. 7:1513-1523

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

Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry 162:156- 159

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

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

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

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

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

Schroeder, W.A. & Johnson, E.A. (1993). Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. J. Gen. Microbiol. 139:907-912