

Raymundo Rosas-Quijano¹
Claude Gaillardin²

¹ Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, C.P. 88710, Tamaulipas, México. C. P. 88710. ² Microbiologie et Génétique Moléculaire, CNRS UMR 2582 INRA UMR 1238, Institut National Agronomique Paris-Grignon, Thiverval Grignon, 78850, France

The system Cre/loxP as a tool in the molecular study of *Yarrowia lipolytica*

Abstract. The non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* has been broadly studied, its whole genome sequence is known and public, and there are many molecular tools for study itself. However, their genetic markers are limited. Therefore, we need to recycle these markers. Taking advantage of *Y. lipolytica* has the ability for express different sources of recombinant protein, we constructed one replicating plasmid for Cre1 recombinase from one replicative plasmid under the direction of a strong promoter. The recombinase activity was evaluated in mutants obtained by transposition. The mTnY11 plasmid includes two Lox at ends who are target sequences of phage P1 recombinase. Our results indicated high efficiency and specificity of the recombinase activity. Based on this strategy we replaced the URA3 selective marker gene contained in mTnY11 and then we sequenced the segments generated after recombinase activity to corroborate its proper action. This strategy is simple as well as a powerful molecular biology tool for *Y. lipolytica* study under selection and use of one single marker.

Key words: heterologous expression, recombinase, genetic marker.

Resumen. La levadura no convencional *Yarrowia lipolytica* ha sido estudiada ampliamente, su genoma está totalmente secuenciado y existen numerosas herramientas moleculares para su estudio; sin embargo, los marcadores genéticos son limitados. Por tanto, surge la necesidad de reciclar dichos marcadores. Dada la ventaja de que *Y. lipolytica* expresa diferentes fuentes de proteína recombinante se construyó un plásmido de expresión para la recombinasa Cre1 a partir de un plásmido replicativo bajo la dirección de un promotor fuerte. La actividad de la recombinasa se evaluó en mutantes obtenidas por transposición. El plásmido mTnY11 contiene en sus extremos dos secuencias Lox que son blanco de la recombinasa del fago P1. Los resultados indicaron una alta eficiencia de actividad y especificidad de la recombinasa. Bajo esta estrategia, se hizo el recambio del gen marcador de selección URA3 contenido en mTnY11 y se secuenció el segmento generado después de la acción de la recombinasa para corroborar su adecuada acción. Esta estrategia es simple pero es una poderosa herramienta de biología molecular para realizar manipulaciones múltiples en ingeniería genética para el estudio de *Y. lipolytica* bajo la selección y utilización de un solo gen marcador.

Palabras clave: expresión heteróloga, recombinasa, marcadores genéticos.

Received 1 June 2010; accepted 27 February 2011.

Recibido 1 de junio 2010; aceptado 27 de febrero 2011.

Autor para correspondencia: Raymundo Rosas Quijano
rrosasq@ipn.mx

Introducción

La levadura no convencional *Yarrowia lipolytica* (Wick, Kurtzman & Herman) Vander Walt & Arx ha sido estudiada ampliamente. Es un hongo ascomiceto aerobio, con diversas aplicaciones a nivel biotecnológico, debido a que produce altas cantidades de ácidos orgánicos como ácido cítrico y 2-cetoglutarico a partir de hidrocarburos como única fuente de carbono; esta capacidad de metabolizar hidrocarburos y sus características secretoras de enzimas, hace que su potencial biotecnológico sea atractivo (Barth y Gaillardin, 1997). *Y. lipolytica* es un organismo ubicuo pero frecuentemente aislado de substratos complejos que contienen altos niveles de proteínas y de lípidos, incluso de ambientes marinos (Wang *et al.*, 2009). Esta levadura es considerada como no patógena, y varios procesos industriales que emplean a *Y. lipolytica* se han clasificados como “GRAS” (Generally Regarded As Safe) por la FDA (Food and Drug Administration) (Madzak *et al.*, 2004). Es un hongo heterotálico y dimórfico, capaz de formar tanto levaduras, como hifas o pseudohifas dependiendo de las condiciones de crecimiento (Barth y Gaillardin, 1997). *Y. lipolytica* es un excelente modelo de estudio, debido a la facilidad de manipulación con técnicas básicas de biología y genética molecular, las cuales están bien establecidas; además, la secuencia de su genoma se encuentra disponible al público desde hace algunos años y, es conocido que varios de sus fenómenos fisiológicos y bioquímicos son semejantes a los de otros eucariotas incluso a sistemas superiores como plantas y animales; en este organismo frecuentemente se estudia el metabolismo de alcanos y ácidos grasos (Wang *et al.*, 1999; Mauersberger *et al.*, 2001), el control del dimorfismo (Hurtado *et al.*, 2000; Pérez-Campo y Domínguez, 2001; Cervantes-Chávez *et al.*, 2006, 2009), la biogénesis de los peroxisomas (Titorenko y Rachubinski, 2009), las vías generales de secreción (Beckerich *et al.*, 1998), entre otras; esto a través de herramientas genético-

moleculares, que implican la caracterización y el análisis funcional de los genes correspondientes y sus productos; como en otros organismos, en *Y. lipolytica* algunos genes están formando parte de familias numerosas, por tanto el análisis funcional de un gen desconocido de esta clase implicaría interrumpir todos sus miembros para obtener la descripción del fenotipo real de una mutante nula, para ello es necesario generar mutantes múltiples; otro caso, es el análisis de mutantes nulas en un diploide a donde se requiere interrumpir los dos alelos; lo que conlleva a utilizar dos o más genes de selección. Desafortunadamente, el número de genes marcadores empleados en el estudio de *Y. lipolytica* son limitados; por esta razón, rescatar el marcador de selección para reutilizarlo, es un paso obligado durante un análisis funcional bajo estas condiciones; para el caso de *Y. lipolytica* se ha reportado un procedimiento eficiente conocido como pop-in, pop-out, que inicialmente fue diseñado para el estudio de *Saccharomyces cerevisiae* (Boeke *et al.*, 1984). Otro método también empleado es el “ura blaster” previamente descrito para *Candida albicans* (Fonzi e Irwin, 1993). En ambos procedimientos se emplea el ácido 5-fluororótico (5-FOA), agente que resulta tóxico en cepas que tienen la vía de síntesis de uracilo íntegra (Boeke *et al.*, 1984), por lo tanto este compuesto permite la selección de cepas *URA3* las cuales han perdido este gen marcador. El procedimiento es efectivo, sin embargo genera el crecimiento de falsos positivos debido a mutaciones puntuales espontáneas en el gen *URA5* lo que no es deseable; aparte, son métodos laboriosos que consumen tiempo y están limitados exclusivamente al gen *Y1URA3*; por lo tanto, un procedimiento alternativo es necesario. La estrategia *Cre-loxP* ha sido una herramienta genético-molecular altamente eficiente por su sencillez y eficacia para el rescate de genes marcadores en sistemas bacterianos (Weng *et al.*, 2009), fungicos (Carter y Delneri, 2010), en insectos (Nimmo *et al.*, 2006), en animales (Miller *et al.*, 2008) y en vegetales (Chakraborti *et al.*, 2008). El sistema *Cre-loxP* contiene dos elementos: la recombinasa del bacteriófago P1 (*Cre*), y dos

secuencias específicas que son el blanco de la recombinasa, denominadas *loxP1*. Estas secuencias constan de 34 pb, compuesta por dos repetidos invertidos idénticos de 13 pb separados por una región de 8 pb (Hamilton y Abremski, 1984). Los sitios de reconocimiento del sistema *Cre-loxP* median el intercambio de las moléculas de DNA que participan en la recombinación de manera intra o inter específica, tal reacción es catalizada por la recombinasa *Cre* (Sauer, 1987). Dependiendo de la localización y de la orientación de estos sitios, la recombinasa puede invertir, insertar, suprimir o intercambiar fragmentos de DNA en sistemas procariotes o eucariotes (Kilby *et al.*, 1993; Sauer, 1994; Ow, 2002). El primer reporte sobre la aplicación del sistema *Cre-loxP* en las levaduras fue descrito por Sauer (1987) en *S. cerevisiae*; a partir de entonces, este sistema ha sido adaptado a otras como *Kluyveromyces lactis* (Steensma y Ter Linde, 2001; Gueldener *et al.*, 2002), *Candida albicans* (Dennison *et al.*, 2005), *Schizosaccharomyces pombe* (Iwaki y Takegawa, 2004; Hentges *et al.*, 2005), y *Hansenula polymorpha* (Krappmann *et al.*, 2000); sin embargo, a la fecha este sistema no ha sido explorado totalmente en *Y. lipolytica*. Por lo anterior, en este trabajo se desarrolló una estrategia para expresar la recombinasa *Cre* bajo un promotor fuerte de *Y. lipolytica* (*XPR2*), se probó su actividad en mutantes que fueron obtenidas por transposición, el transposón contiene el gen de selección *Y1URA3* flanqueado por las secuencias *Lox* (Neuvéglise *et al.*, 1998). El sistema *Cre-loxP* puede ser una herramienta molecular que permita el estudio de los genes de interés de una manera simple y económica, además de reciclar el gen de selección y generar mutantes seriadas bajo un mismo marcador de selección.

Materiales y métodos

Cepas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Cepas bacterianas. Las bacterias empleadas para mantenimiento y construcción de los plásmidos fueron *Escherichia coli DH5α* (Difco BRL, France), y *HB101* (Stratagene, France); éstas se cultivaron en medio Luria-Bertani suplementado con ampicilina (100 mg/l) a 37°C de 16 a 24 h según los requerimientos.

Cepas fúngicas. Se empleó la cepa isogénica P01a (MatA, *ura3-302, leu2-270*), obtenida de la colección del laboratorio del Dr. Gaillardin (Institute National de la Recherche Agronomique, Paris-Grignon, France); además de tres cepas mutantes interrumpidas por un minitransposon (mTnY11) (Neuvéglise *et al.*, 1998) derivadas de la cepa parental P01a (P01aFil) denominadas Fil209, Fil246 y Fil354 (Richard *et al.*, 2001), las cuales poseen en sus extremos dos secuencias *Lox* (P1 y R1). Dichas cepas fueron multiplicadas en medio YPD (Barth y Gaillardin, 1996), y en medio YNB w/o aa (1.7 g/l de Yeast Nitrogen Base sin aminoácidos, 5 g/l de sulfato de amonio; Difco, France) adicionado uracilo (50 mg/ml) o leucina (50 mg/ml) cuando se requiriera.

Técnicas genéticas. Se emplearon técnicas básicas de biología molecular (Sambrook *et al.*, 1989). Las enzimas de restricción y enzimas de amplificación fueron suministradas por la compañía Invitrogen (France), o New England Biolabs (France). El DNA genómico de las levaduras se aisló y purificó siguiendo el protocolo descrito por Hoffman y Winston (1987). Un termociclador Perkin-Elmer Thermal Cycler 9600 fue utilizado para llevar a cabo las reacciones de amplificación bajo las siguientes condiciones: 2 min a 94°C, seguido por 10 ciclos de 10 s a 94°C, 30 s a 56°C, y 10 min a 68°C; 20 ciclos de 10 s a 94°C, 30 s a 56°C, y 10 min a 68°C

con 15 s de rampa en cada ciclo, y un paso de extensión final de 15 min at 68°C utilizando la enzima Expand Long Template PCR system (Roche). La secuenciación de los segmentos fue realizada en un equipo ABI 373 DNA Sequencer siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante. Para el análisis de las secuencias se emplearon los paquetes bioinformáticos: GCG package (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison) y Lasergen (DNASTar v.o 7.0).

Construcción del plásmido que expresa la recombinasa Cre. El vector de expresión de la recombinasa Cre fue

construido como sigue: El promotor del gen XPR2 contenido en el plásmido pINA 1269 fue recuperado por restricción con las enzimas *Kpn1* y *Sal1* y se ligó al plásmido replicativo pINA1053 cuyo marcador es *YILEU*, el cual previamente había sido digerido con las enzimas *Kpn1* y *Sal1* para dar origen al plásmido pRRQ1; por otro lado, el gen de la recombinasa Cre contenido en el plásmido pSH47 (proporcionado por J. H. Hegemann) fue obtenido por restricción con las enzimas *Kpn1* y *Sma1* y fue ligado directamente dentro del plásmido pRRQ1 previamente digerido con *Kpn1* y *Pml1* generando el plásmido pRRQ2 que conserva el marcador de auxotrofia a leucina (Figura 1).

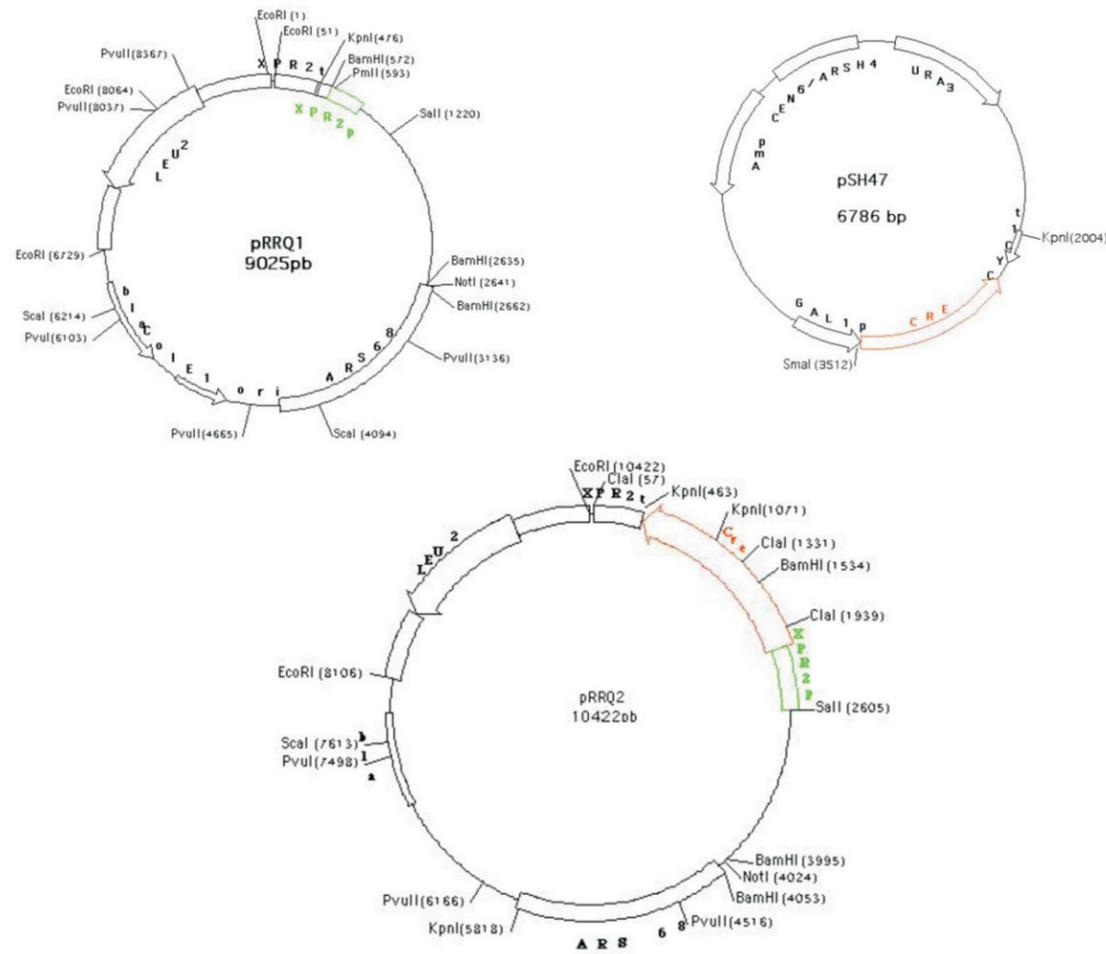


Figura 1. Construcción del plásmido pRRQ2, que dirige la expresión de la recombinasa Cre bajo un promotor híbrido XPR2p. El gen de la recombinasa fue obtenido del plásmido pSH47 con el corte *Kpn1/Sma1* y clonado en el plásmido pRRQ1 previamente digerido con las enzimas *Kpn1/Pml1*, generando el plásmido pRRQ2.

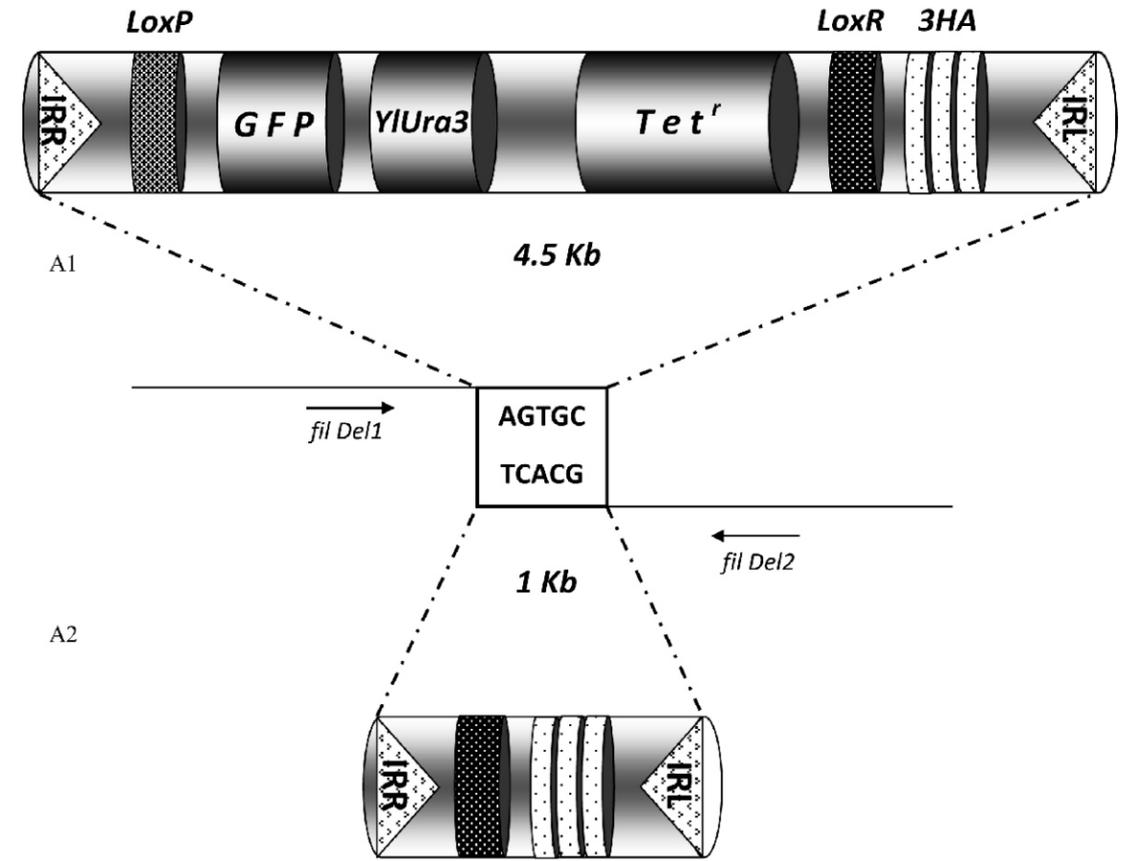


Figura 2. Representación esquemática de la inserción del mTnY11 en la cepa Fil (A1) y después del tratamiento con la recombinasa Cre (A2), señalándose los elementos y los sitios *Lox*. Los triángulos son los extremos repetidos del mTnY1; IRR, repetido invertido derecho e IRL, repetido invertido izquierdo; 3HA, epítipo de hemaglutinina; *Lox R1* y *Lox P1*, son los sitios de reconocimiento de la recombinasa del fago P1; *Tet^R*, gen que confiere resistencia a tetraciclina; *YIUra3*, gen de selección Ura3; *GFP*, gen reportero proteína verde fluorescente.

Transformación de las levaduras. Las levaduras (P01a, Fil209, Fil246 y Fil354) fueron sujetas a un ensayo de transformación por electroporación con el plásmido replicativo pRRQ2 y pRRQ1 como control negativo (Vector sin Cre, Figura 1). La preparación de las células electrocompetentes, se hizo conforme a lo establecido por Becker y Guarente (1991), donde 50 µl de células competentes fueron mezcladas suavemente con 500 ng del plásmido pRRQ2 y transferidas a un electroporador (Jouan GHT 1287). Se aplicó un pulso eléctrico de 1.5 kV, 200 Ω y capacitancia de 25 µF. Después del choque eléctrico, 1 ml de

YPD suplementado con 1 M de sorbitol se adicionó a la suspensión celular y se mezcló suavemente, posteriormente se distribuyó en una placa con medio de cultivo YNB sin aminoácidos y adicionado de uracilo. Se recuperaron 100 transformantes de cada cepa, se multiplicaron en el medio YNB adicionado de uracilo y se almacenaron a -80 °C.

Análisis de las transformantes. Para la actividad Cre, se estudiaron las transformantes primeramente por auxotrofia a uracilo y posteriormente a 5 clonas de cada transformación se analizaron por PCR, amplificando un segmento blanco

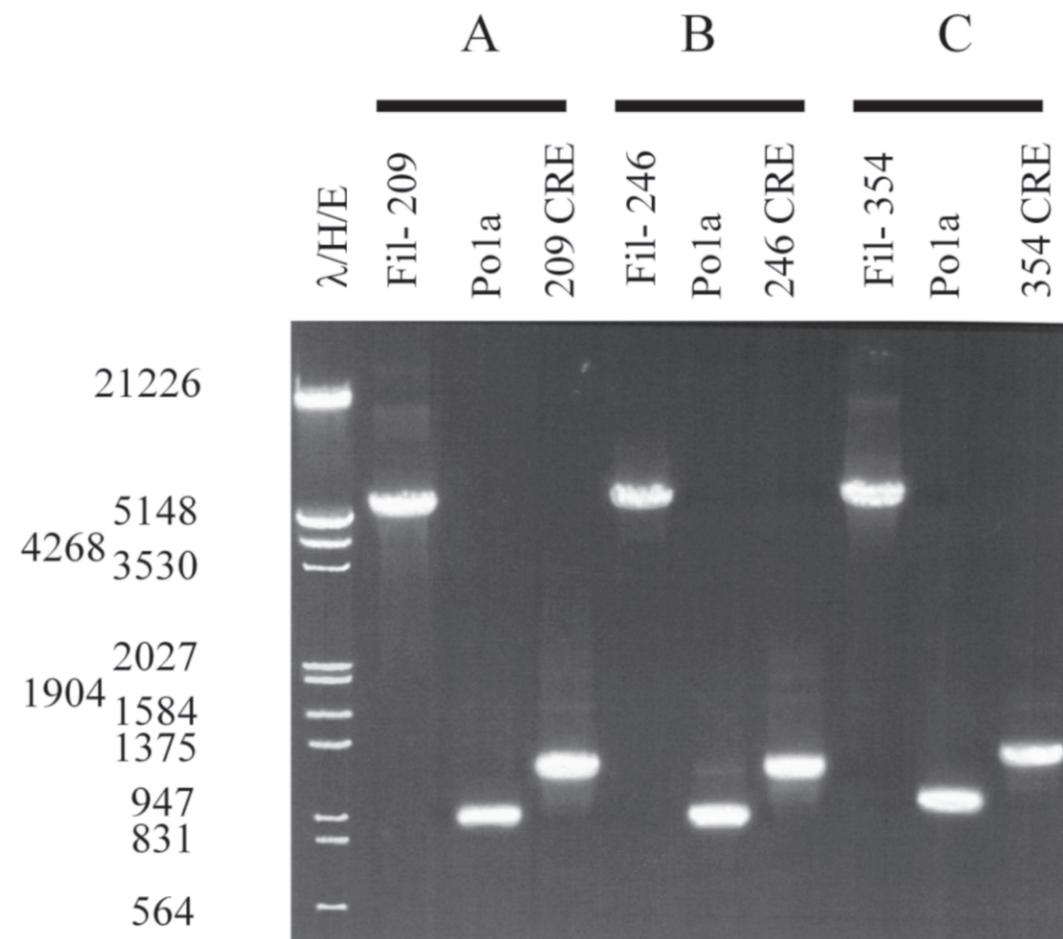


Figura 3. Gel de agarosa donde se separan los productos de PCR obtenidos de las cepas utilizadas para demostrar la actividad de la recombinasa Cre. Carril 1, marcador de peso molecular λ /EcoRI/HindIII; carril 2, cepa fil-209; carril 3, cepa P01a (wt); carril 4, cepa 209Cre; carril 5, cepa fil-246; cepa P01a (wt); carril 6, cepa 246Cre; carril 7, cepa fil 354; carril 8, cepa P01a (wt); carril 9 354Cre; carril 10, λ /EcoRI/HindIII. A) amplificación con el par de oligonucleótidos 209 Del1 y 209 Del2; B) amplificación con el par de oligonucleótidos 246 Del1 y 246 Del2; C) amplificación con el par de oligonucleótidos 354 Del1 y 354 Del2.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo. Se describe su secuencia en dirección 5' a 3', temperatura de asociación (T_m) y tamaño en pares de bases del fragmento que amplifica el par de oligonucleótidos en las diferentes cepas P01a (Wt), P01aFil (Fil) y P01aFilCre (FilCre)

Nombre del oligo	Secuencia (5' a 3')	T_m (°C)	Tamaño (pb)		
			Wt ¹	Fil ¹	FilCre ²
209 Del1	GACATAGTTACGTGGCTGTCCAAGG	52	930	5400	1230
209 Del2	GATGCTTCTCTGAGGAAAAAGCAAG	53			
246 Del1	CGATAGTGACGCTGACATTCGTCTG	52	950	5400	1250
246 Del2	GGGTCTGAGATGGAACGAAATAAGC	52			
354 Del1	CACCCCACTACACAACTATGCAAC	53	1000	5500	1300
354 Del2	CATCTGATGCTGGCAATCGACGAAC	51			

1. Valor en pb (Richard *et al.*, 2001) 2.- Valor aproximado en pb.

limitado por un par de oligonucleótidos específicos, diseñados hacia las zonas que flanquean el sitio donde el mTnY11 estaba insertado en el genoma (Tabla 1, Figura 2). El análisis consistió en comparar el tamaño del segmento amplificado, entre la cepa parental (P01a), la mutante (Fil) y la mutante transformada con Cre (FilCre). En un estudio previo, Richard *et al.*, (2001), reportaron que existe una diferencia de tamaños entre la cepa parental y la mutante de aproximadamente 4.5 Kb que corresponde al tamaño del mini transposón utilizado (Figura 2). El segmento amplificado en la mutante Fil después de la acción de Cre, fue sujeto a secuenciación para confirmar la correcta acción de la recombinasa Cre del fago P1 dentro de *Y. lipolytica*.

Resultados

Se construyó el plásmido replicativo pRRQ2 (Figura 1), el cual porta el gen de la recombinasa Cre bajo un promotor híbrido de *Y. lipolytica* (XPR2), este es un promotor que dirige la expresión génica de manera fuerte (Madzak *et al.*, 2004). La construcción del plásmido se verificó por análisis de restricción (dato no mostrado).

Después de la transformación de las diferentes cepas (P01a, Fil209, Fil246 y Fil354) con el plásmido pRRQ2, se recuperaron numerosas clonas seleccionadas en placas de YNB sin aminoácidos y suplementadas con uracilo, debido a

que si Cre tuvo acción, escinde la mayor parte del mTnY11 incluyendo el gen marcador *YIURA3* como se puede ver en la Figura 2. De las transformantes seleccionadas de cada cepa (100 clonas), se hicieron réplicas en medio YNB sin aminoácidos adicionales de uracilo, en todos los casos las clonas fueron capaces de crecer (100%); en réplicas en medio YNB sin aminoácidos el crecimiento de las transformantes Fil fue como máximo del 10%, a diferencia del control negativo correspondiente a donde el crecimiento siguió siendo del 100%; en las células transformantes de la cepa parental, el crecimiento fue negativo (0%), esto indica que la recombinasa Cre había ejercido su actividad en un porcentaje igual o superior al 90%, en la Tabla 2 se resumen los datos. Dichas transformantes se denominaron: P01aCre, 209Cre, 246Cre y 354Cre según su origen (P01aFilCre).

Las cepas que fueron auxótrofas a uracilo por la actividad de Cre fueron analizadas a través de PCR para valorar la actividad de recombinasa directamente sobre el DNA, en la Figura 3 se muestran los resultados de la amplificación, un caso tipo de cada una de las tres mutantes analizadas, se puede observar que la cepa parental y mutantes arrojan un producto de amplificación de tamaño similar al reportado (Richard *et al.*, 2001), y que las transformantes sujetas a la actividad de Cre generaron un fragmento de 300 pb por encima del que corresponde a la cepa parental y que es del tamaño aproximado esperado (Tabla 1). Esto, sugiere que la auxotrofia a uracilo mostrada en las mutantes

Tabla 2. Análisis de la actividad Cre. Porcentaje de crecimiento de las transformantes

Clonas	pRRQ1		pRRQ2	
	YNB + uracilo	YNB w/o a a	YNB + uracilo	YNB w/o a a
P01a	100	0	100	0
Fil209	100	100	100	6
Fil249	100	100	100	10
Fil354	100	100	100	7

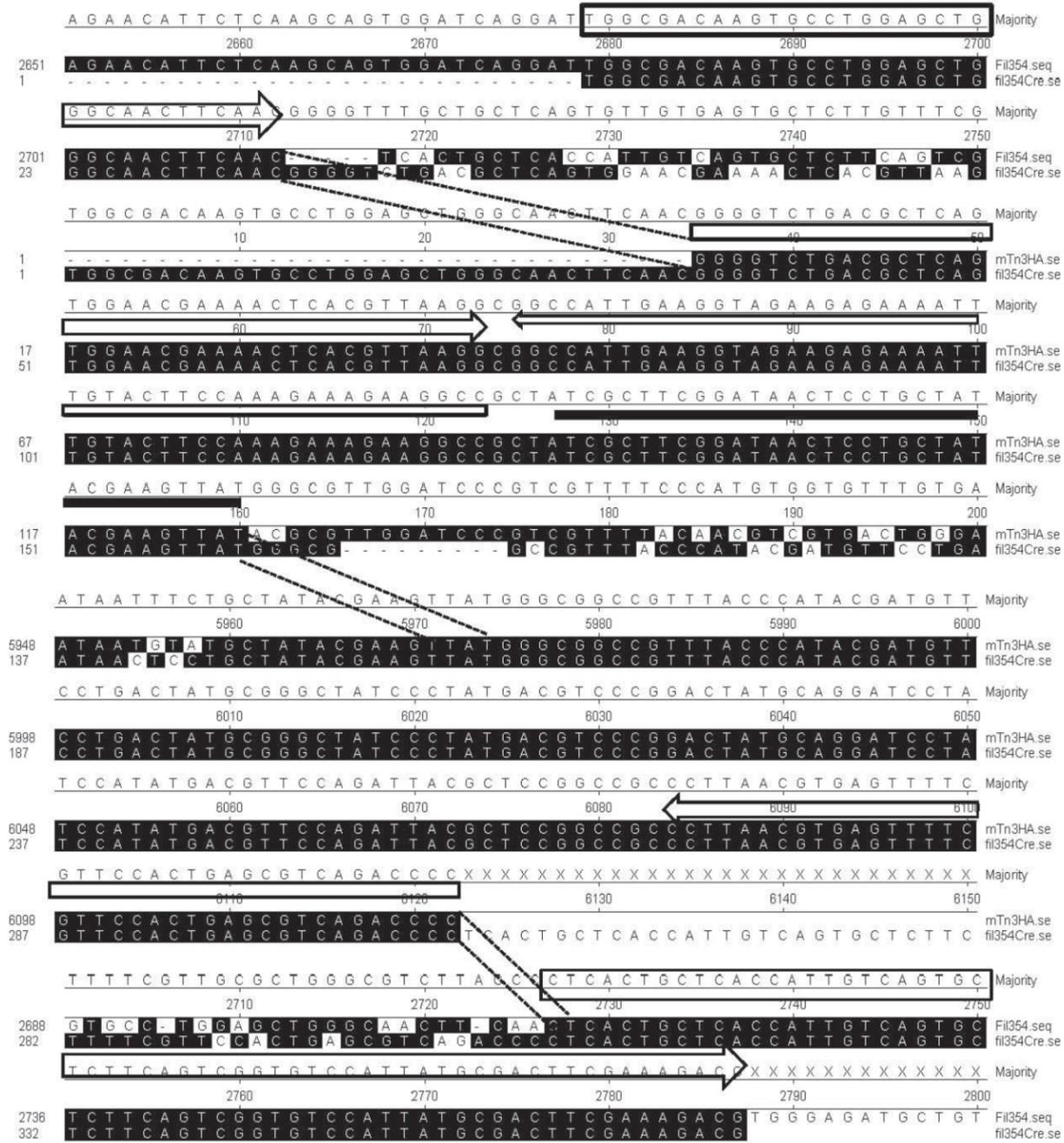


Figura 4. Actividad de la recombinasa Cre. Secuencia de DNA obtenida del segmento amplificado en la cepa Fil354Cre, y su alineamiento con la secuencia del segmento Fil354 y del mTnY11, se muestra la región con homología, se señalan los elementos en la secuencia; las flechas vacías indican la secuencia que el mTnY11 interrumpió, la punta de la flecha indica el extremo 3'. Con líneas punteadas, se indica la continuidad de la secuencia obtenida del segmento amplificado en la cepa Fil354Cre.

transformadas con el plásmido pRRQ2 era debida a la acción correcta de la recombinasa Cre. Los segmentos de amplificación por PCR de las cepas Fil209Cre, Fil246Cre y Fil354Cre fueron secuenciados; en el análisis de las secuencias, se identifica el sitio exacto de inserción del mTnY11 dentro del gen interrumpido, los repetidos invertidos del mTnY11 y una huella del sitio *lox* que para los casos analizados siempre fue el sitio R1 presente originalmente en el mTnY11 (Figura 4), este segmento adicional es de 310 pb exactamente, que es la diferencia de tamaño observado entre la cepa parental y las mutantes tratadas con la recombinasa (Figura 3, Tabla 1), confirmando la expresión y función correcta de la recombinasa Cre del fago P1 en *Y. lipolytica*.

Discusión

Yarrowia lipolytica es un excelente modelo de estudio, la generación de herramientas moleculares han contribuido fuertemente al avance en el conocimiento de este organismo, aun así, nuevas estrategias que permitan disminuir el tiempo que consumen los análisis son necesarias, uno de los principales retos en las nuevas investigaciones.

En este trabajo, se comprueba nuevamente la habilidad y potencial biológico que tiene *Y. lipolytica* para expresar proteínas heterólogas (Madzak *et al.*, 2004), cuya fuente ha sido muy diversa, como de plantas (Kopečný *et al.*, 2005), de animales (Hamsa *et al.*, 1998), de levaduras (Förster *et al.*, 2007) entre otros; pero en este caso, la expresión de una proteína de origen viral como es la recombinasa del fago P1 y que además mostró actividad y funcionalidad dentro de la misma levadura.

La expresión de la proteína Cre, se ha realizado en diversos sistemas biológicos con la principal aplicación de remover el DNA flanqueado por los sitios *LoxP1*, estos sitios y debido a que son idénticos llega a ocurrir recombinación espontánea entre ellos, por lo cual diferentes estrategias se

han realizado, una de ellas es modificar los sitios *Lox*. La recombinación entre los sitios *LoxP1* y *LoxR1* vía la recombinasa Cre ya había sido descrita para el caso de *Saccharomyces cerevisiae* (Ross-Macdonald *et al.*, 1997), a donde reportan que existe un 90% de escisión vía la actividad de la recombinasa Cre, y registran menos del 1% de escisión en condiciones de no inducción, es decir, la que ocurre sin mediación de la recombinasa (de manera espontánea). Para este caso, la actividad de Cre fue valorada según su marcador de auxotrofia (uracilo); los valores de escisión fueron superiores al 90%, similares a los indicados para *S. cerevisiae*, la escisión espontánea no fue evaluada, pero muy probablemente es inferior al 1% debido a que no fue evidenciada durante los análisis a las que fueron sujetas estas mutantes (Richard *et al.*, 2001), característica deseable cuando se generan mutantes de cualquier tipo; esta estabilidad en las mutantes fue obtenida por la combinación de los sitios *Lox* utilizados, el original *LoxP1* y un sitio modificado denominado *LoxR1*, sitios en los cuales se ha demostrado que la frecuencia de recombinación espontánea entre ellos es mínima, pero que permanece el sitio de reconocimiento por parte de la recombinasa (Sternberg *et al.*, 1981 ; Siegel *et al.*, 2004). Por otro lado, y debido a que no existía evidencia experimental de que el sistema *cre-loxP* funcionaría en *Y. lipolytica*, se utilizó en principio un sistema de expresión fuerte y en un plásmido de replicación autónoma, permitiendo que la recombinasa Cre estuviese expresada continuamente por la naturaleza del promotor constitutivo de la exoproteasa alcalina XPR2 (Madzak *et al.*, 2000). Bajo este primer acercamiento, ahora es posible diseñar herramientas moleculares que permitan dirigir la expresión de la proteína Cre bajo situaciones específicas tanto de tiempo y/o de espacio en *Y. lipolytica*, de manera similar a como ha ocurrido actualmente en otros sistemas, como en maíz (Wang *et al.*, 2005), tabaco (Kopertekh *et al.*, 2010) o ratón (Madisen *et al.*, 2010).

Cuando se desea la integración o alteración de

diferentes genes en un organismo, es necesario la incorporación de diferentes marcadores de selección, entre ellos los marcadores de auxotrofia como *URA3*, *LEU2*, *HIS3*, etc., y estos son preferidos sobre los marcadores de resistencia por la eficiencia de transformación (Kaneko *et al.*, 2009); el número de marcadores de selección existentes limitan los análisis, por tanto surge la necesidad de reciclarlos; o también si es el caso, eliminarlos de los organismos, sobre todo en aquellos que participan en procesos industriales, de tal manera de introducir la menor cantidad de DNA exógeno a los sistemas (Ribeiro *et al.*, 2007). La estrategia que aquí se describe, por un lado permite reciclar el marcador de selección y por otro, según el diseño de la estrategia puede eliminar en gran medida el DNA exógeno que se introduce a dicho organismo y de esta manera distorsionar lo menos posible el sistema en cuestión. La metodología es simple pero se presenta como una poderosa herramienta de biología molecular para realizar múltiples manipulaciones en ingeniería genética durante el estudio, manipulación o aplicación de *Y. lipolytica* bajo la selección y utilización de un solo marcador.

Agradecimientos

Se agradece al laboratorio CBAI del INAP-G donde se realizaron los estudios, así también a A. Lepingle y A. Auger, personal que realizó la secuenciación de los segmentos en el mismo departamento. Al Dr. N. Mayek-Pérez por sus valiosas aportaciones. A los revisores anónimos por sus atinadas críticas y sugerencias. R. R. Q. fue becario CONACyT, México y de la C. E. E. programa alfa (grant 5.0118.9).

Literatura citada

Barth, G., C. Gaillardin, 1996. The dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. In:

- K. Wolf (ed.), Non-conventional yeasts in biotechnology. Springer, Heidelberg. pp. 313-388.
- Barth, G., C. Gaillardin, 1997. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. FEMS Microbiology Reviews 19: 219-37.
- Becker, D.M., L. Guarente, 1991. High-efficiency transformation of yeast by electroporation. Methods in Enzymology 194:182-187.
- Beckerich, J.M., A. Boisramé-Baudevin, C. Gaillardin, 1998. *Yarrowia lipolytica*: a model organism for protein secretion studies. International Microbiology 1: 123-30.
- Boeke, J.D., F. LaCroute, G.R. Fink, 1984. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. Molecular and General Genetics 197: 345-6.
- Carter, Z., D. Delneri, 2010. New generation of loxP-mutated deletion cassettes for the genetic manipulation of yeast natural isolates. Yeast 27:765-75.
- Cervantes-Chávez, J.A., J. Ruiz-Herrera, 2006. STE11 disruption reveals the central role of a MAPK pathway in dimorphism and mating in *Yarrowia lipolytica*. FEMS Yeast Research 6:801-15.
- Cervantes-Chávez, J.A., F. Kronberg, S. Passeron, J. Ruiz-Herrera, 2009. Regulatory role of the PKA pathway in dimorphism and mating in *Yarrowia lipolytica*. Fungal Genetics and Biology 46:390-9.
- Chakraborti, D., A. Sarkar, H.A. Mondal, D. Schuermann, B. Hohn, B.K. Sarmah, S. Das, 2008. Cre/lox system to develop selectable marker free transgenic tobacco plants conferring resistance against sap sucking homopteran insect. Plant Cell Reports 27: 1623-33.
- Dennison, P.M., M. Ramsdale, C.L. Manson, A.J. Brown, 2005. Gene disruption in *Candida albicans* using a synthetic, codon-optimised Cre-loxP system. Fungal Genetics and Biology 42: 737-48.
- Fonzi, W.A., M.Y. Irwin, 1993. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. Genetics 134: 717-28.
- Förster, A., A. Aurich, S. Mauersberger, G. Barth, 2007. Citric acid production from sucrose using a recombinant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica*. Applied Microbiology and Biotechnology 75: 1409-17.
- Fournier, P., A. Abbas, M. Chasles, B. Kudla, D.M. Ogrzydziak, D. Yaver, J.W. Xuan, A. Peito, A.M. Ribet, C. Feynerol, F. He, C. Gaillardin, 1993. Colocalization of centromeric and replicative functions on ARS iso-latex from the yeast *Yarrowia lipolytica*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90:4912-4916.
- Guldener, U., J. Heinisch, G.J. Koehler, D. Voss, J.H. Hegemann, 2002. A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. Nucleic Acids Research 30:1-8.
- Hamilton, D.L., K. Abremski, 1984. Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. Journal of Molecular Biology 178: 481-6.
- Hamsa, P.V., P. Kachroo, B.B. Chattoo, 1998. Production and secretion of biologically active human epidermal growth factor in *Yarrowia lipolytica*. Current Genetics 33: 231-7.
- Hentges, P., B. Van Driessche, L. Tafforeau, J. Vandenhaute, A.M. Carr, 2005. Three novel antibiotic marker cassettes for gene disruption and marker switching in *Schizosaccharomyces pombe*. Yeast 22: 1013-9.
- Hoffman, C.S., F. Winston, 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. Gene 57: 267-72.
- Hurtado, C.A., J.M. Beckerich, C. Gaillardin, R.A. Rachubinski, 2000. A rac homolog is required for induction of hyphal growth in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. Journal of Bacteriology 182: 2376-86.
- Iwaki, T., K. Takegawa, 2004. A set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene disruption in *Schizosaccharomyces pombe*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 68: 545-50.
- Kaneko, S., T. Tanaka, H. Noda, H. Fukuda, R. Akada, A. Kondo, 2009. Marker-disruptive gene integration and URA3 recycling for multiple gene manipulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology Biotechnology 83: 783-9.
- Kilby, N.J., M.R. Snaith, J.A. Murray, 1993. Site-specific recombinases: tools for genome engineering. Trends in Genetics 9: 413-21.
- Kopecný, D., C. Pethe, M. Sebelá, N. Houba-Hérin, C. Madzak, A. Majira, M. Laloue, 2005. High-level expression and characterization of *Zea mays* cytokinin oxidase/dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica*. Biochimie 87: 1011-22.
- Kopertekh, L., K. Schulze, A. Frolov, D. Strack, I. Broer, J. Schiemann, 2010. Cre-mediated seed-specific transgene excision in tobacco. Plant Molecular Biology 72: 597-605.
- Krappmann, S., R. Pries, G. Gellissen, M. Hiller, G.H. Braus, 2000. HARO7 encodes chorismate mutase of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* and is derepressed upon methanol utilization. Journal of Bacteriology 182: 4188-4197.
- Madisen, L., T.A. Zwingman, S.M. Sunkin, S.W. Oh, H.A. Zariwala, H. Gu, L.L. Ng, R.D. Palmiter, M.J. Hawrylycz, A.R. Jones, E.S. Lein and H. Zeng, 2010. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. Nature Neuroscience 13: 133-40.
- Madzak, C., C. Gaillardin J.M. Beckerich, 2004. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. Journal of Biotechnology 109: 63-81.
- Madzak, C., B. Tréton, S. Blanchin-Roland, 2000. Strong hybrid promoters and integrative expression/secretion vectors for quasi-constitutive expression of heterologous proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 2: 207-16.
- Mauersberger, S., H.J. Wang, C. Gaillardin, G. Barth, J.M. Nicaud, 2001. Insertional mutagenesis in the n-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*: generation of tagged mutations in genes involved in hydrophobic substrate utilization. Journal of Bacteriology 183: 5102-9.
- Miller, A.J., S.D. Dudley, J.-L. Tsao, D. Shibata, and R.M. Liskay, 2008. Tractable Cre-lox system for stochastic alteration of genes in mice. Nature Methods 5: 227-229.
- Neuvéglise, C., J.M. Nicauda, P. Ross-Macdonald, C. Gaillardin, 1998. A shuttle mutagenesis system for tagging genes in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Gene 213: 37-46.
- Ow, D.W., 2002. Recombinase-directed plant transformation for the post-genomic era. Plant Molecular Biology 48: 183-200.
- Pérez-Campo, F.M., A. Domínguez, 2001. Factors affecting the morphogenetic switch in *Yarrowia lipolytica*. Current Microbiology 43: 429-33.
- Ribeiro, O., A.K. Gombert, J.A. Teixeira, L. Domingues, 2007. Application of the Cre-loxP system for multiple gene disruption in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. Journal of Biotechnology 131: 20-6.
- Richard, M., R. Rosas Quijano, S. Bezzate, F. Bordon-Pallier, C. Gaillardin, 2001. Tagging morphogenetic genes by insertional mutagenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Journal of Bacteriology 183: 3098-3107.
- Ross-Macdonald, P.A., S.G. Sheehan, Roeder M. Snyder, 1997. A multipurpose transposon system for analysis of protein production, localization, and function in *Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America 94: 190-5.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis, 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sauer, B., 1987. Functional expression of the Cre-Lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and Cellular Biology 7: 2087-96.
- Sauer, B., 1994. Site-specific recombination: developments and applications. Current Opinion of Biotechnology 5:521-527.
- Siegel, R.W., N. Velappan, P. Pavlik, L. Chasteen, A. Bradbury, 2004. Recombinatorial cloning using heterologous lox sites. Genome Research 14: 1119-1129.
- Steensma, H.Y., J.J. Ter Linde, 2001. Plasmids with the Cre-recombinase and the dominant nat marker, suitable for use in prototrophic strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. Yeast 18, 469-472.
- Sternberg, N., D. Hamilton, R. Hoess, 1981. Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome. Journal of Molecular Biology 150: 487-507.
- Titorenko, V.I., R.A. Rachubinski, 2009. Spatiotemporal dynamics of the ER-derived peroxisomal endomembrane system. International Review of Cell and Molecular Biology 272: 191-244.
- Wang, H., Le M.T. Dall, Y. Waché, C. Laroche, J. M. Belin, J.M. Nicaud, 1999. Cloning, sequencing, and characterization of five genes coding for acyl-CoA oxidase isozymes in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Cell Biochemistry and Biophysics 31:165-74.
- Wang, F., L. Yue, L. Wang, C. Madzak, J. Li, X. Wang, Z. Chi, 2009. Genetic modification of the marine-derived yeast *Yarrowia lipolytica* with high-protein content using a GPI-anchor-fusion expression system. Biotechnology Progress 25:1297-1303.
- Wang, Y., B. Chen, Y. Hu, J. Li, Z. Lin, 2005. Inducible excision of selectable marker gene from transgenic plants by the Cre/lox site-specific recombination system. Transgenic Research 14: 605-614.
- Weng, L., I. Biswas, D.A. Morrison, 2009. A Self-deleting Cre-lox-ermAM Cassette, CHESHIRE, for markerless gene deletion in *Streptococcus pneumoniae*. Journal of Microbiological Methods 79: 353.