

UCH-FC
Doc-Microb^o
W 492
C. 1

**ESTUDIO GENÉTICO, FUNCIONAL Y
REGULATORIO DE LA RUTA DEL MEVALONATO
DE
*Xanthophyllomyces dendrorhous***

Tesis

entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con Mención en Microbiología

Facultad de Ciencias

Por

Nicole Andrea Werner Ratto



Octubre, 2016

Directora de Tesis Dra.: Jennifer Alcaíno Gorman
Co-Director de Tesis Dr.: Víctor Cifuentes Guzmán

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

Nicole Andrea Werner Ratto

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 9 de Septiembre de 2016.

Directora de Tesis:

Dra. Jennifer Alcaíno Gorman

Co-Director de Tesis:

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán

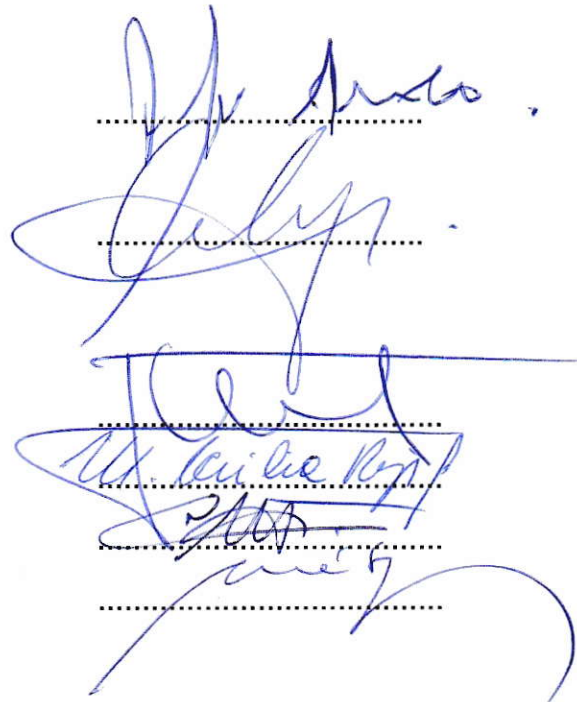
Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Claudio Martínez

Dra. María Cecilia Rojas

Dr. Ricardo Cabrera

Dr. Claudio Vásquez



Dedicado a mi familia

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no sería posible sin el apoyo entregado por el Laboratorio de Genética, especialmente la Dra. Jennifer Alcaíno, quién siempre tuvo la mejor disposición para llevar adelante esta tarea. Agradezco al profesor Dr. Victor Cifuentes por su apoyo y a mis compañeros de laboratorio por todos los momentos que compartimos.

Agradezco a mi comisión evaluadora, un excelentes grupo de profesores que siempre tuvieron la voluntad de aportar con sus críticas y conocimientos.

A mi familia y especialmente a mis padres, Oscar y Alejandra, por el apoyo incondicional que me han entregado durante toda mi vida y en todos mis proyectos.

A César, por compartir una vida llena de ideas y aventuras y darme la posibilidad de tomar las mejores decisiones de mi vida: Malva y Barto.

A mis amigos que siguen ahí, constantes frente a la distancia y al paso de los años.

A FONDECYT por el financiamiento de los proyectos 11121200 y 11160202 y becas CONICYT 21110701 por el apoyo económico.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE DE CONTENIDOS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XV
1. INTRODUCCIÓN	1
1. 1 Antecedentes generales	1
1. 2 Enzimas de la ruta del mevalonato	2
1. 3 Regulación de la ruta MVA	6
1. 4 <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	7
1. 4. 1 La ruta del mevalonato y síntesis de carotenoides en <i>X. dendrorhous</i>	10
1. 4. 2 Regulación metabólica en <i>X. dendrorhous</i>	11
1. 5 Hipótesis y objetivos	14
1. 5. 1 Hipótesis	14
1. 5. 2 Objetivo general	14
1. 5. 3 Objetivos específicos	14
2. MATERIALES Y MÉTODOS	15
2. 1 Cepas y condiciones de cultivo	15
2. 2 Plásmidos, ácidos nucleicos y procedimientos tradicionales de biología molecular	17
2. 3 Obtención de ácidos nucleicos	21
2. 3. 1 Extracción de DNA genómico de levadura	21
2. 3. 2 Extracción de RNA total de <i>X. dendrorhous</i> y síntesis de cDNA	22
2. 3. 3 Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	23
2. 3. 4 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa	23
2. 4 Reacciones de PCR	24
2. 4. 1 PCR estándar	24
2. 4. 2 PCR de elongación (OE-PCR)	24

2. 4. 3 RT-PCR cuantitativo	25
2. 5 Transformación por electroporación	26
2. 5. 1 Electrotransformación de <i>E. coli</i>	26
2. 5. 2 Electrotransformación de <i>S. cerevisiae</i>	26
2. 5. 3 Electrotransformación de <i>X. dendrorhous</i>	27
2. 6 Esporulación de <i>S. cerevisiae</i> y selección de cepas haploides	28
2. 7 Secuenciación y análisis de secuencias	29
2. 8 Extracción de compuestos orgánicos y análisis por RP-HPLC	30
2. 8. 1 Extracción de carotenoides	30
2. 8. 2 Extracción de esteroides	31
2. 8. 3 Análisis de muestras por RP-HPLC	32
3. RESULTADOS	33
<hr/>	
3. 1 Identificación por análisis bioinformático del genoma y transcriptoma de <i>X. dendrorhous</i> de las secuencias codificantes de los homólogos de los genes: <i>ERG10</i>, <i>ERG13</i>, <i>ERG12</i>, <i>ERG8</i> y <i>MVD1</i> de <i>S. cerevisiae</i>, involucrados en la ruta del mevalonato	33
3. 1. 1 Caracterización bioinformática de tiasas	45
3. 1. 2 Análisis de regiones promotoras	47
3. 2 Estudio de la funcionalidad de los genes <i>ERG10</i>, <i>HMGS</i> y <i>MVK</i>, por ensayos de complementación heteróloga en <i>S. cerevisiae</i> y en mutantes heterocigotas de <i>X. dendrorhous</i>	49
3. 2. 1 Complementación heteróloga en <i>S. cerevisiae</i>	49
3. 2. 2 Obtención de mutantes en <i>X. dendrorhous</i>	56
3. 3 Determinación del efecto a nivel transcripcional sobre los genes de la vía del MVA y sobre la producción de esteroides y carotenoides en <i>X. dendrorhous</i> luego de la adición de glucosa o etanol al medio de cultivo, o la falta de ergosterol intracelular	68
3. 3. 1 Diseño y prueba de partidores específicos para RT-qPCR	68
3. 3. 2 Efecto de la adición de glucosa	69
3. 3. 3 Efecto de la adición de etanol	73
3. 3. 4 Efecto de la falta de ergosterol	77
4. DISCUSIÓN	81
<hr/>	
4. 1 Los genes <i>ERG10A</i> y <i>ERG10B</i> codifican enzimas de diferente función en <i>X. dendrorhous</i>	81
4. 2 El gen <i>HMGS</i> codifica una HMG-CoA sintasa y es un punto de activación de la vía MVA	86
4. 3 Las quinasas de la ruta MVA presentan características comunes conservadas	88
4. 4 Efecto de la glucosa y el etanol en la ruta MVA de <i>X. dendrorhous</i>	91

5. CONCLUSIONES	95
6. REFERENCIAS	96
ANEXO: PUBLICACIONES	108

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Cepas utilizadas y obtenidas en este trabajo.	16
Tabla 2.- Plásmidos construidos y utilizados en este trabajo. Todos los fragmentos clonados corresponden a <i>X. dendrorhous</i> .	18
Tabla 3.- Oligonucleótidos usados en este trabajo.	19
Tabla 4.- Oligonucleótidos utilizados para RT-qPCR.	21
Tabla 5.- Características de cada gen en estudio.	34
Tabla 6.- Resultados de BLASTp entre tiolosas (porcentaje de identidad entre proteínas).	45
Tabla 7.- Eficiencia de partidores diseñados en este trabajo y usados para RT-qPCR.	69
Tabla 8.- Producción de esteroides y astaxantina por las cepas UCD 67-385 y 385- <i>cyp61</i> -/-.	78

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Ruta del mevalonato y biosíntesis de ergosterol y astaxantina.	3
Figura 2.- Secuencia codificante del gen <i>ERG10A</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	37
Figura 3.- Secuencia codificante del gen <i>ERG10B</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	38
Figura 4.- Secuencia codificante del gen <i>HMGS</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	39
Figura 5.- Secuencia codificante del gen <i>MVK</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	40
Figura 6.- Secuencia codificante del gen <i>PMK</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	43
Figura 7.- Secuencia codificante del gen <i>MVD</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	44
Figura 8.- Árbol filogenético de las tiolasas codificadas por <i>ERG10A</i> y <i>ERG10B</i> comparadas con otros organismos.	46
Figura 9.- Esquema de zonas promotoras.	48
Figura 10.- Análisis por PCR de cepas haploides mutantes del gen <i>ERG10</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	52
Figura 11.- Crecimiento y producción de esteroides de cepas mutantes del gen <i>ERG10</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	54
Figura 12.- Análisis por PCR de cepas mutantes del gen <i>HMGS</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	55
Figura 13.- Crecimiento y producción de esteroides de cepas mutantes del gen <i>HMGS</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	56
Figura 14.- Crecimiento y producción de esteroides de cepas mutantes del gen <i>MVK</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	58
Figura 15.- Obtención de mutantes de <i>X. dendrorhous</i> .	60
Figura 16.- Caracterización de cepas mutantes del gen <i>ERG10A</i> .	61
Figura 17.- Resultados RT-qPCR de muestras de cepas mutantes del gen <i>ERG10A</i> .	62
Figura 18.- Caracterización de cepa mutante del gen <i>ERG10B</i> .	64
Figura 19.- Caracterización de la cepa mutante del gen <i>MVK</i> .	66

Figura 20.- Resultados RT-qPCR de muestras de cepas mutantes en el gen <i>MVK</i>.	67
Figura 21.- Efecto de la adición de glucosa sobre el crecimiento, síntesis de carotenoides y de esteroides en la cepa UCD 67-385.	71
Figura 22.- Efecto de la adición de glucosa sobre la expresión a nivel de mRNA de genes de la ruta MVA en cepa UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i>.	73
Figura 23.- Efecto de la adición de etanol sobre el crecimiento, síntesis de carotenoides y de esteroides en la cepa UCD 67-385.	75
Figura 24.- Efecto de la adición de etanol sobre la expresión a nivel de mRNA de genes de la ruta MVA en cepa UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i>.	76
Figura 25.- Cambio en la cantidad de transcrito de genes de la ruta MVA en la cepa 385-<i>cyp61</i>(-/-) respecto a la cepa silvestre UCD 67-385.	85
Figura 26.- Esquema que representa el transporte de acetil-CoA entre compartimentos celulares.	85

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
cDNA	DNA complementario
CoA	coenzima A
dNTP	Desoxirribonucleotido trifosfato
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
HMG	Hidroxi-metilglutaril
Hyg	Higromicina B
IGS	Espaciador intergénico
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
MVA	Mevalonato
ORF	Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
qPCR	PCR cuantitativo
rDNA	DNA ribosomal
RP-HPLC	Cromatografía líquida en fase reversa
RT	Transcripción reversa
STM	Sacarosa-Tris-MgCl
TAE	Tris-acetato-EDTA
TCA	Ácido tricarbóxico
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U	Unidades enzimáticas
UV	ultravioleta
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
YM	Medio de cultivo levadura-malta
Zeo	Zeocina

RESUMEN

La biosíntesis de isopreno, compuesto de cinco carbonos, es esencial para la vida de eucariontes ya que se utiliza en múltiples funciones celulares como la prenilación de proteínas, síntesis de ubiquinonas y la formación de esteroides. Esta molécula también es utilizada en la biosíntesis de metabolitos secundarios de interés comercial. En eucariontes, el isopreno se obtiene a partir de la ruta del mevalonato, la que ha sido mayormente estudiada en mamíferos dada su importancia en la síntesis de colesterol. La ruta del mevalonato comprende seis pasos, cada uno catalizado por una enzima diferente.

Xanthophyllomyces dendrorhous es una levadura que sintetiza carotenoides, derivados del isopreno, con astaxantina como principal producto. El interés en el estudio de esta levadura se ha desarrollado principalmente debido a la aplicabilidad de los carotenoides como pigmentos y antioxidantes en las industrias piscícolas y farmacéuticas. Por este motivo, la mayor parte de los estudios desarrollados en *X. dendrorhous* han sido enfocados en conocer y mejorar las vías de síntesis de estos pigmentos; sin embargo, el conocimiento de la síntesis de sus precursores aún es limitado.

En este trabajo, los genes de la ruta del mevalonato *ERG10B*, *HMGS*, *MVK*, *PMK* y *MVD*, fueron identificados en el genoma de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*, observando que las proteínas codificadas por cada uno de ellos mantienen características conservadas en sus respectivas familias a nivel de secuencia. También se identificó el gen *ERG10A*, que estaría relacionado evolutivamente con el gen *ERG10B*, pero formaría parte de la ruta de β -oxidación de ácidos grasos.

Se confirmó la funcionalidad de los genes *ERG10B*, *HMGS* y *MVK* por complementación heteróloga de cepas de *S. cerevisiae* mutantes. Las cepas de *S. cerevisiae* portadoras de cada gen de la ruta del mevalonato de *X. dendrorhous* mostraron un crecimiento similar a las cepas parentales y mantuvieron la producción de esteroides, indicando que los genes codifican proteínas con las funciones esperadas.

Se construyó mutantes heterocigotas de *X. dendrorhous* para evaluar el efecto sobre la síntesis de pigmentos. Para el gen *ERG10A* también se obtuvo una mutante homocigota que presentó un cambio en la proporción de pigmentos producidos, produciendo menos astaxantina que la cepa parental. Se midió la expresión del gen *ERG10B* en esta mutante y se encontró que había 8 veces más transcrito que en el control, además el nivel de transcrito del gen *crtS*, que codifica la enzima que cataliza el último paso en la síntesis de astaxantina, fue 4 veces menor que el control.

La cepa mutante heterocigota del gen *ERG10B* no mostró cambios significativos en la producción de esteroides ni carotenoides en comparación con la cepa parental. En cambio, la cepa mutante heterocigota del gen *MVK* presentó un cambio en la composición de carotenoides, exhibiendo una disminución en el porcentaje de astaxantina. A nivel transcripcional se encontró que la mutación del gen *MVK* produce una disminución de la cantidad de transcrito de 4 veces en comparación con la cepa parental. Además, se observó una disminución de 4 veces en la cantidad de transcrito del gen *crtR* que participa de las rutas de síntesis de carotenoides y esteroides.

Finalmente se analizó el efecto de la adición de glucosa y etanol a nivel transcripcional de los genes de la ruta del mevalonato en cultivos de *X. dendrorhous*. La transcripción del gen *HMGS* mostró un aumento en ambos casos que luego de 24 h recuperó las cantidades control. En el caso del gen *ERG10A* se observó que la cantidad de transcrito disminuye drásticamente por la adición de glucosa a los cultivos, de forma similar a la represión catabólica.

En un mutante de *X. dendrorhous* que no produce ergosterol, se encontró una respuesta común en los genes de la ruta del mevalonato, teniendo un aumento en la cantidad de transcrito en cultivos en fase estacionaria en comparación con una cepa silvestre. Como parte de este resultado destacó el gen *HMGS*, cuyo transcrito aumentó 45 veces en comparación a cultivos de la cepa control.

En resumen se identificó los genes de la ruta del mevalonato de *X. dendrorhous* y se caracterizó funcionalmente los genes *ERG10B*, *HMGS* y *MVK*. En relación a la regulación de sus transcritos destaca el gen *HMGS*, que se vió afectado en todas las condiciones estudiadas, sugiriendo que constituye un punto importante en la regulación de esta ruta que puede ser utilizado en futuros estudios para mejorar la síntesis de isopreno.

ABSTRACT

The biological synthesis of isoprene, a C₅ molecule, is essential for eukaryotes as it is used for multiple cellular functions (e.g. protein prenylation, ubiquinone synthesis and sterol formation). This molecule is also used for producing secondary metabolites of commercial interest. In eukaryotes isoprene is synthesized through the mevalonate pathway, which has been extensively studied because of its importance in cholesterol synthesis in mammals.

Xanthophyllomyces dendrorhous is a carotenoid-synthesizing yeast that produces astaxanthin as main product. The interest in studying this yeast was developed mostly because of the applications of carotenoids in fisheries and pharmaceuticals due to their antioxidant and pigmentation properties. For these reasons, most studies performed with the yeast have focused on gaining knowledge to improve pigment synthesis, whereas information on their precursors production is still limited.

In this work, *ERG10B*, *HMGS*, *MVK*, *PMK* and *MVD* genes, controlling the mevalonate pathway, were identified in the genome of wild-type *X. dendrorhous* strain UCD 67-385. It was noted that sequence features common to their protein families were conserved in proteins encoded by these genes kept conserved. The gene *ERG10A*, evolutionarily related to *ERG10B*, but part of the fatty acids β -oxidation pathway, was also found.

The functionality of genes *ERG10B*, *HMGS* and *MVK* was assessed by heterologous complementation of *S. cerevisiae* mutant strains. The complemented strains showed similar growth and sterol production to the parental strain, providing confirmation that each gene encodes a protein with the expected activity.

X. dendrorhous' heterozygous mutants were constructed to evaluate the effect of mutation on carotenoid synthesis. A homozygous mutant was also obtained for the *ERG10A* gene, which showed changes in the proportion of different carotenoids, mainly a decrease in astaxanthin amounts. Transcript levels were assessed for this mutant, finding a 8-fold increase in the quantity of *ERG10B* transcript compared to the parental strain. Transcripts for *crtS* were also measured finding a 4-fold decrease.

The *erg10B*⁻ heterozygous mutant showed no significant changes in sterol or carotenoid production as compared to the parental strain. However, the *mvk*⁻ heterozygous mutant presented modifications in pigment composition with a decrease of astaxanthin. By measuring transcript levels it was found that the *MVK* transcript decreased 4-fold in relation to the parental strain. Also, a 4-fold decrease for *crtR* gene transcript, which participates in sterols and carotenoids biosynthesis, was found.

Finally, the effect of glucose or ethanol addition to *X. dendrorhous*' cultures on transcript levels of the mevalonate pathway genes was analyzed. *HMGS* showed a common response for both compounds, displaying an increase in transcript levels that went back to basal amounts after 24 h. A decrease in transcripts after glucose addition was found for gene *ERG10A*, behaving similarly to catabolic repression.

Transcript levels were also measured and compared to a wild-type *X. dendrorhous* strain that does not produce ergosterol. The effect of lack of intracellular ergosterol was similar for all the mevalonate pathway genes, with an increase in transcripts in stationary-growing cultures. Among these results, the *HMGS* gene outstands by having a 45-fold increase in the mutant as compared to the control strain.

Summarizing, the mevalonate pathway genes of *X. dendrorhous* were identified and the functionality of genes *ERG10B*, *HMGS* and *MVK* was assessed. Regarding transcriptional regulation, it was found that *HMGS* transcript level was affected in all studied conditions, suggesting that this gene represents an important regulatory step of the mevalonate pathway in *X. dendrorhous*, which could be important in future studies for isoprene synthesis improvement.

1. INTRODUCCIÓN

1. 1 Antecedentes generales

Los isoprenoides o terpenos son un amplio grupo de moléculas orgánicas que tienen diversos roles fisiológicos dentro de la célula. Esta familia de compuestos es sintetizada usando como base la molécula de isopreno (C_5), que en la célula se encuentra en forma activa como isopentenil pirofosfato (IPP, C_5) y su isómero dimetilalilpirofosfato (DMAPP, C_5). La polimerización de estos compuestos origina esqueletos básicos de carbono que permiten clasificar los terpenos según el número de unidades de isopreno que los forman clasificándose así en hemiterpenos (1 unidad, C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}), entre otros. Además, sobre estos esqueletos básicos ocurren modificaciones químicas posteriores, como por ejemplo oxidaciones o ciclaciones que amplían la diversidad de moléculas que comprende esta familia.

La ruta del mevalonato (MVA), a partir de la que se originan los precursores para la formación de isoprenoides, incluye los pasos metabólicos que llevan a la síntesis de IPP y DMAPP desde acetil-CoA. Esta ruta fue descrita por Konrad Bloch hace más de 50 años como parte de la vía de síntesis de colesterol, descubrimiento que le valió el premio Nobel de Medicina o Fisiología junto a Feodor Lynen en el año 1964. Durante cerca de

cuarenta años se pensó que esta ruta era la única que llevaba a la formación de IPP y DMAPP. Sin embargo, en los años noventa se describió una ruta alternativa (vía metileritritol 4-fosfato o MEP) presente en plástidos de plantas y bacterias (Lichtenthaler y col., 1997).

La importancia de esta vía radica en la diversidad de procesos para los que son utilizados sus productos, que no sólo comprende la síntesis de terpenos. El producto principal de la ruta, IPP, tiene diversos fines dentro de la célula, como por ejemplo la modificación de tRNAs, la síntesis de poliprenoles y formación de dolicoles. Otros compuestos que se forman a partir de la condensación de IPP y DMAPP, como los terpenos farnesil pirofosfato (FPP, C₁₅) y geranil-geranil pirofosfato (GGPP, C₂₀), son usados para prenilación de proteínas (Tsay y Robinson, 1991), síntesis de esteroides y formación de otros isoprenoides y metabolitos secundarios (Jiang y col., 2012).

La formación de IPP por la vía MVA se lleva a cabo por la acción de 6 enzimas que han sido estudiadas en diversos organismos entre ellos, la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae*. Las reacciones catalizadas por estas enzimas, su nomenclatura y el gen que las codifica se presenta en la Figura 1.

1. 2 Enzimas de la ruta del mevalonato

El primer paso de la ruta del mevalonato en eucariontes consiste en la condensación de dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA (Fox y col., 2014). Esta reacción es catalizada por una condensación de tipo Claisen no decarboxilativa por una enzima que es parte de la superfamilia tiolasa llamada acetil-CoA acetiltransferasa (ACAT) (Jiang y col., 2008).

La superfamilia tiolasa incluye enzimas que poseen diferentes localizaciones celulares y patrones de expresión dependiendo de la ruta en la que participen. Entre la superfamilia se han definido tres sub-grupos según propiedades funcionales: PKS (policétidos sintasas), KAS (beta-cetoacil-ACP sintasas) y otras tiolasas, que difieren en especificidad de sustrato, secuencia y residuos catalíticos del sitio activo. Dentro del grupo otras tiolasas se encuentran dos subgrupos

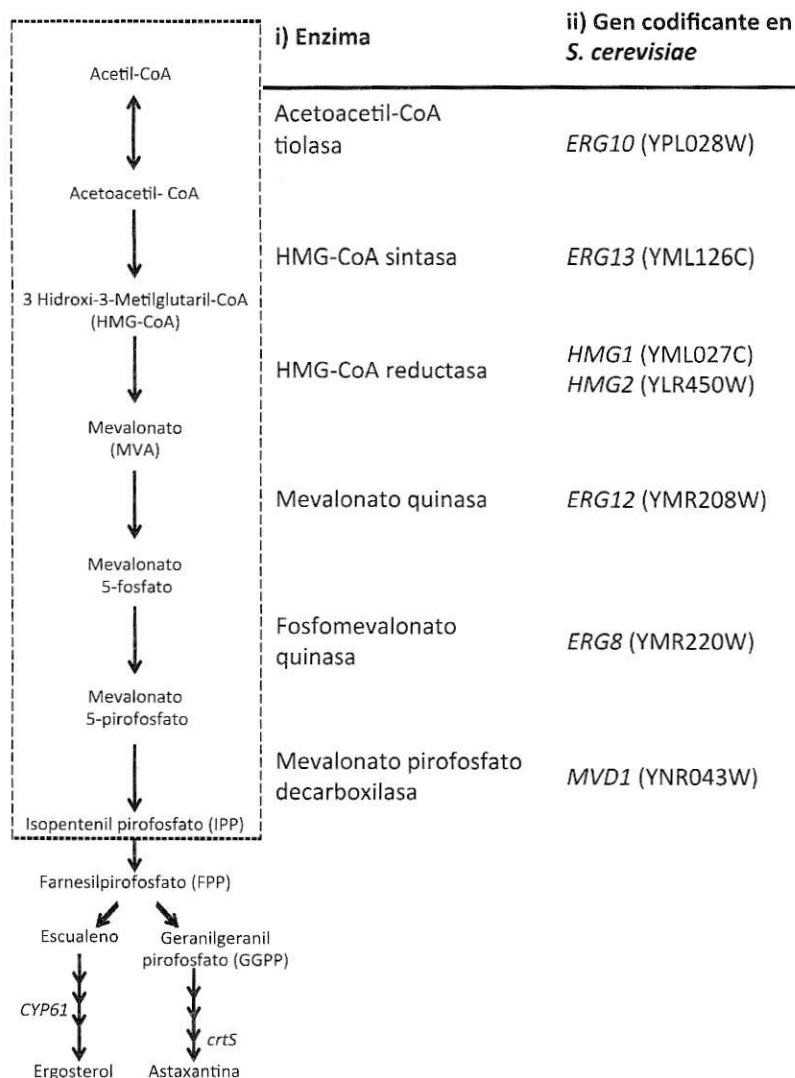


Figura 1.- Ruta del mevalonato y biosíntesis de ergosterol y astaxantina. A la izquierda de la figura se muestran los pasos de la ruta y los metabolitos que se forman, donde cada reacción es representada por una flecha; en el recuadro se señala la ruta del mevalonato. A la derecha de la figura se indica: i) nombre de la enzima que cataliza el paso correspondiente y ii) el nombre del gen que codifica la enzima respectiva en *S. cerevisiae* y en paréntesis, el número de acceso en la base de datos genómica SGD de la levadura. En la parte inferior izquierda se indican los precursores del ergosterol y astaxantina junto con genes clave en este trabajo (*CYP61* y *crtS*) que participan de su síntesis.

principales según su sustrato (Haapalainen y col., 2006):

- **Acetil-CoA acetiltransferasa (ACAT, EC 2.3.1.9)**; también conocida como tiolasa de condensación o tiolasa II. Esta enzima es la que participa en la ruta MVA y es específica para acetil-CoA y acetoacetil-CoA. En *S. cerevisiae* es una enzima esencial para el crecimiento y desarrollo celular, por lo que no ha sido posible obtener mutantes nulas del gen *ERG10* que la codifica (Hiser y col., 1994). En levaduras, esta enzima tiene una localización citoplásmica y también ha sido identificada en peroxisomas, dónde permitiría completar la degradación de ácidos grasos (Peretó y col., 2005).
- **3-cetoacil-CoA tiolasa (ACAA, EC 2.3.1.16)**; también conocida como tiolasa degradativa o tiolasa I. Participa en la beta-oxidación de ácidos grasos y en levaduras tienen una localización exclusivamente peroxisómica (Peretó y col., 2005). Estas enzimas pueden utilizar ácidos grasos de cadena de diferentes largos como sustrato para la reacción. Dentro del conocimiento de los genes que codifican estas enzimas se ha descrito que están sujetos a represión por glucosa, asociada al factor transcripcional UME6 en *S. cerevisiae*, e inducción en presencia de ácidos grasos en el medio de cultivo (Einerhand y col., 1995). Es factible obtener mutantes nulos del gen que codifica esta enzima (*POT1* en *S. cerevisiae*). Sin embargo, éstos pierden la capacidad de crecer con ácidos grasos como fuente de carbono (Iguar y col., 1992a).

En cuanto a estructura y función, ambos tipos de tiolastas presentan características de plegamiento similares, al igual que la conservación de residuos del sitio activo (Iguar y col., 1992b).

El segundo paso de la ruta implica la adición de un tercer acetil-CoA, formando 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) por la enzima HMG-CoA sintasa (HMGS), que también pertenece a la superfamilia tiolasa. Entre las similitudes de HMGS y otras tiolastas se encuentra el tipo de reacción catalizada (condensación de tipo Claisen no decarboxilativa), el tipo de plegamiento de la enzima y el posicionamiento de los residuos del sitio activo (Jiang, 2008). Las diferencias contemplan el cambio en el tipo de residuos del sitio catalítico y diferencias en el sustrato usado

para la condensación. Además, los parámetros energéticos de la reacción hacen que la condensación que lleva a la formación de HMG-CoA sea irreversible, a diferencia de otras tiolasas cuya actividad es reversible (Haapalainen y col., 2006). En *S. cerevisiae* esta enzima se encuentra codificada por el gen *ERG13*, cuya expresión estaría regulada a nivel transcripcional por un mecanismo dependiente de los niveles de esteroides disponibles (Goldstein y Brown, 1990).

El siguiente paso en la ruta consiste en la modificación de HMG-CoA a MVA por actividad de la enzima HMG-CoA reductasa (HMGR), paso que ha sido definido como la etapa limitante en la biosíntesis de esteroides en eucariontes debido a que su expresión es regulada en múltiples niveles (Goldstein y Brown, 1990). Por este motivo la enzima ha sido estudiada como un blanco de tratamientos para reducir el colesterol descubriéndose que es sensible a la acción de fármacos como estatinas (Alberts y col., 1980). En *S. cerevisiae*, se encontraron dos genes codificantes *HMG1* y *HMG2*, donde la enzima codificada por *HMG1* es la que contribuye en mayor grado a la actividad enzimática de la ruta MVA (Basson, 1986).

El MVA formado previamente es fosforilado de manera secuencial. Primero por la enzima mevalonato quinasa (MVK), que es codificada por el gen *ERG12* que es esencial en *S. cerevisiae* (Oulmouden y Karst, 1990). Esta enzima estaría sujeta a inhibición por intermediarios de la síntesis de isoprenoides como geranyl pirofosfato (GPP, C₁₀) y FPP (Dorsey y col., 1968). Pese a ello, éste no sería un paso limitante en la vía, ya que la sobreexpresión de *ERG12 in vivo* no afecta significativamente la producción de ergosterol (Oulmouden y Karst, 1990).

Posteriormente, ocurre una segunda fosforilación por acción de la enzima fosfomevalonato quinasa (PMK) la que en *S. cerevisiae* es codificada por el gen *ERG8* (Tsay y Robinson, 1991). Esta es la única proteína de la ruta del MVA que ha mostrado baja identidad entre secuencias aminoacídicas de mamíferos e invertebrados contra secuencias de plantas, hongos y bacterias, definiendo ambos grupos de proteínas como no ortólogas (Houten y col., 2001; Smit y col., 2000).

Finalmente, la formación de IPP ocurre por la descarboxilación dependiente de ATP del mevalonato 5-difosfato, catalizada por la enzima mevalonato difosfato descarboxilasa, codificada por el gen *MVD1* en *S. cerevisiae* (Toth y Huwlyer, 1996). En *Candida albicans*, se ha visto que la

expresión de este gen es mayor en medios que contienen glucosa como fuente de carbono, por lo que es posible que el gen responda positivamente a la adición de glucosa al medio de cultivo (Dassanayake y col., 2002).

1. 3 Regulación de la ruta MVA

El componente regulatorio más importante de la síntesis de esteroides es el *feedback* negativo por disponibilidad de producto (Goldstein y Brown, 1990). El principal regulador se denomina SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*) y es un factor de transcripción unido a membrana que determina la síntesis y la incorporación de esteroles a la célula (Espenshade y Hughes, 2007). Los principales estudios de caracterización del sistema se han hecho en mamíferos, donde la proteína SREBP se encuentra unida a la membrana del retículo endoplásmico (RE) y consiste de un dominio amino terminal de unión a DNA y activador de la transcripción, y un dominio carboxilo terminal que interactúa con una proteína que une esteroides, Scap (*SREBP cleavage activating protein*) (Goldstein y col., 2006).

Cuando la membrana del RE es rica en esteroides, el complejo SREBP-Scap se mantiene unido al RE, ya que Scap interactúa con la proteína Insig que también está unida al RE (Motamed y col., 2011). Ante una baja en la cantidad de esteroides, se produce un cambio conformacional en Scap liberándose de Insig lo que activa el transporte del complejo hacia el aparato de Golgi donde SREBP es cortado por dos proteasas. Estos cortes permiten la liberación del factor de transcripción funcional que se dirige al núcleo y activa la transcripción de genes relacionados con la síntesis de esteroides y otros lípidos (Raychaudhuri y col., 2012). En la región promotora de genes blanco de SREBP se encuentra una secuencia denominada SRE (*Sterol Regulatory Element*), que constituye la región reconocida para la unión y activación de la transcripción por SREBP (Goldstein y col., 1990). Se ha visto que las funciones de la vía SREBP y algunos genes homólogos se encuentran conservadas en hongos, incluidos basidiomicetes como *Cryptococcus*

neoformans dónde este mecanismo también tendría un rol en la regulación de patogénesis (Chang y col., 2009).

1. 4 *Xanthophyllomyces dendrorhous*

X. dendrorhous [ex *Phaffia rhodozyma* (Golubev, 1995)] es una levadura basidiomicete que fue aislada originalmente de regiones frías del hemisferio norte a partir de exudados de arboles (Miller y col., 1976). Recientemente se han obtenido aislados de esta levadura desde la patagonia argentina (Libkind y col., 2007) y del sur de Chile (Weber y col., 2008), además de muestras de suelo del territorio antártico chileno (Contreras, 2014). La principal característica de esta levadura es su capacidad de producir compuestos carotenoides, entre ellos el pigmento rojo-anaranjado astaxantina, de alto interés biotecnológico y altamente valorado en el mercado, especialmente en acuicultura por su tonalidad (Schmidt y col., 2011) y en la industria farmacéutica por sus propiedades antioxidantes, superiores a otros carotenoides (Dufossé y col., 2005).

La familia de carotenoides comprende un grupo de moléculas químicas que tienen en común una estructura de cadena lineal de carbonos con una serie de dobles enlaces en su porción central. El número de carbonos en esta familia de moléculas varía entre 30 y 50, pero la mayor parte de ellos, con más de 600 estructuras conocidas, presenta cadenas de 40 carbonos (Sandmann, 2001). Asimismo, los carotenoides se clasifican dependiendo si son hidrocarburos puros, denominados carotenos, o bien, si incluyen átomos de oxígeno en su estructura, clasificados bajo el nombre de xantófilas (Britton, 1995).

En plantas estos compuestos cumplen un rol fundamental en la fotosíntesis dependiente de oxígeno, al absorber energía luminica de longitudes de onda entre 400 y 500 nm además de otorgar coloración a flores y frutos (Britton, 1995). Estos compuestos también pueden ser producidos por microorganismos como algas, bacterias, hongos filamentosos y levaduras. En general, en animales estos pigmentos no pueden ser sintetizados *de novo* y deben adquirirse a través de la dieta (Frengova y Beshkova, 2009). Además de sus propiedades como pigmentos

fotosintéticos, los carotenoides tienen funciones de protección contra el daño foto-oxidativo por sus propiedades antioxidantes y son precursores de otros metabolitos como la vitamina A, el ácido retinoico (regulador del crecimiento celular), retinal (cromóforo de pigmentos visuales) y el ácido abscísico (hormona vegetal) (Armstrong y Hearst, 1996, Britton, 1995).

La presencia de carotenoides en *X. dendrorhous*, especialmente astaxantina, estaría asociada como una estrategia de protección contra las especies reactivas de oxígeno (ROS) y compuestos antifúngicos presentes en el ambiente nativo de esta levadura (Sieiro y col., 2003; Blasko y col., 2008). Entre los mecanismos conocidos de defensa celular ante ROS se encuentran enzimas como las superóxido dismutasas (SOD), catalasas y glutatión peroxidasa. Según varios estudios, esta levadura carece de algunos de estos mecanismos tradicionales de defensa a ROS, principalmente de las enzimas SOD citosólicas (Schoereder y Johnson, 1993; Martínez-Moya y col., 2011). Si se ha descrito actividad catalasa intracelular (Liu y Wu, 2006), además de identificar, mediante proteómica, la presencia de una SOD mitocondrial que presenta una mayor abundancia en etapas iniciales de crecimiento, *lag* y exponencial, que en fase estacionaria (Martínez-Moya y col., 2011). Estos hallazgos apoyan la idea que la síntesis de carotenoides tendría un rol importante en la defensa contra estrés oxidativo en *X. dendrorhous*.

En la industria, la mayor parte de la producción de astaxantina es a través de síntesis química, una opción que entrega mayor rendimiento si se compara con la obtención de este compuesto desde fuentes naturales, como *X. dendrorhous* (Schmidt y col., 2011). Entre los esfuerzos que se han hecho por mejorar directamente la producción de pigmentos en la levadura se pueden mencionar trabajos de mutagénesis y selección de cepas sobreproductoras (An y col., 1989, 1991; Ukibe y col., 2008; Baeza y col., 2009) y trabajos de ingeniería genética en la levadura (Misawa y Shimada 1997; Verdoes y col., 2003; Contreras y col., 2015). Además, se han realizado estudios que buscan optimizar las condiciones de cultivo para una mayor producción de pigmentos determinando los efectos del pH (Johnson y Lewis 1979; Hu y col., 2006), diferentes fuentes de carbono y nitrógeno usadas en la fermentación (Johnson y Lewis 1979; Yamane y col., 1997; Flores-Cotera y col., 2001; Hu y col., 2005), aireación y transferencia de oxígeno (Johnson y

Lewis 1979; Yamane y col., 1997; Liu y Wu 2006) y el efecto de la luz (Johnson y Lewis 1979; An y Johnson 1990). Estos estudios han aumentado el conocimiento de cómo ciertas variables afectan la producción de astaxantina; sin embargo, no han permitido mejoras sustanciales en el rendimiento. También se ha intentado mejorar el proceso de fermentación (Vazquez y Martin 1998; Flores-Cotera y col., 2001; de la Fuente y col., 2010), llegando a obtener un máximo de 470 ppm de astaxantina por litro de cultivo (de la Fuente y col., 2010).

Debido a la capacidad de *X. dendrorhous* de sintetizar carotenoides como metabolitos secundarios, se ha propuesto que esta levadura también podría ser utilizada para la producción heteróloga de otros terpenoides de cadena larga con valor terapéutico como artemisina y taxol (Muntendam y col., 2009; Jiang y col., 2012). Esta posibilidad ha sido explorada al transformar la levadura con el gen que codifica a la enzima pentaleneno sintasa (PSS) de *Streptomyces UCD5319*, interrumpiendo los genes *crtE* o *crtYB* (ambos parte de la ruta de síntesis de carotenoides) o en el rDNA. Las cepas mutantes produjeron el sesquiterpeno pentaleneno, precursor necesario para la síntesis de antibióticos de la familia pentalenolactona (Cane y col., 1994), sin mostrar diferencias en su tasa de crecimiento respecto a la cepa parental, indicando así que *X. dendrorhous* es un organismo adecuado para ensayar la producción de compuestos derivados de terpenos (Melillo y col., 2012). Otra aproximación al uso de *X. dendrorhous* como "factoría celular" corresponde a su transformación con el cDNA del gen *Cop6* de *Coprinus cinereus*, con el fin de obtener α -cupreneno, compuesto base para la formación del compuesto lagopodina A, con propiedades antimicrobianas. En este caso, la producción del compuesto por parte de la levadura destacó en comparación con cepas de *Escherichia coli* y *S. cerevisiae* fabricantes del mismo al producir una mayor cantidad (Melillo y col., 2013). Estos resultados respaldan el potencial de *X. dendrorhous* para la producción heteróloga de terpenos con diversas funciones biológicas.

1. 4. 1 La ruta del mevalonato y síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*

El inicio de los estudios genéticos en esta levadura estuvo enfocado en la caracterización de genes involucrados en la biosíntesis de pigmentos. Es así como actualmente se conoce la ruta completa que lleva a la producción de astaxantina a partir de IPP, la que se inicia por la acción de la enzima IPP isomerasa, producto del gen *idi* descrito en *X. dendrorhous* (Kajiwara y col., 1997), que genera DMAPP, isómero activo del IPP. Ambas moléculas, IPP y DMAPP, se condensan para formar un bloque de 10 carbonos, GPP, por la acción de la enzima farnesil pirofosfato sintasa (FPS), codificada por el gen *FPS*. Por acción de la misma enzima se adiciona una molécula extra de IPP, formando FPP (Alcaino y col., 2014). Luego hay una segunda adición de IPP en una reacción catalizada por la enzima GGPP sintasa, producto del gen *crtE* para formar GGPP (Niklitschek y col., 2008). El primer carotenoide en la ruta de síntesis de astaxantina, fitoeno, es blanco y se forma por la condensación de dos moléculas de GGPP, formando una cadena de 40 carbonos. Esta reacción es catalizada por la enzima bifuncional Fitoeno/ β -caroteno sintasa (PBS, *phytoene β -carotene synthase*), producto del gen *crtYB* (Verdoes y col., 1999a). Posteriormente ocurre la formación de licopeno con la generación de 4 dobles enlaces carbono-carbono por acción de la enzima fitoeno desaturasa, codificada por el gen *crtI* (Verdoes y col., 1999b). La actividad licopeno ciclasa (β -caroteno sintasa) de la enzima bifuncional PBS conduce la formación de β -caroteno. La formación de astaxantina a partir de β -caroteno ocurre por la acción de la enzima astaxantina sintasa (CrtS), codificada por el gen *crtS* (Álvarez y col., 2006), que genera una hidroxilación y la adición de un grupo ceto en ambos anillos del β -caroteno. Cabe destacar que la enzima CrtS pertenece a la familia de proteínas citocromo P450, enzimas que requieren de una enzima auxiliar dadora de electrones para su actividad, la citocromo P450 reductasa. La citocromo P450 reductasa de *X. dendrorhous* se encuentra codificada por el gen *crtR* (Alcaino y col., 2008) y es esencial para la síntesis de astaxantina en *X. dendrorhous*.

Cuando se planteó este trabajo, el conocimiento sobre la ruta del mevalonato en *X. dendrorhous* se encontraba reducido. En relación a secuencias disponibles en base de datos sólo se disponía de parte de la secuencia del gen *HMGR* (GenBank: AJ884949) y la secuencia de la

proteína HMGR codificada por este gen (GenBank: CAI59574.1). Por otra parte, también existían algunas secuencias disponibles asociadas a patentes, protegiéndolos en caso de usarse para producción de isoprenoides, *HMGR* (GenBank: E50998), *HMGS* (GenBank: E50999), *MVK* (GenBank: E51000) y *MVD* (GenBank: E51001). En cuanto a evidencia experimental, no se contaba con estudios funcionales a excepción del gen *HMGR*, del que se contaba con una secuencia parcial que fue usada para hacer partidores y medir sus niveles de transcrito por RT-qPCR en cepas mutantes de la ruta de síntesis de ergosterol (Loto y col., 2012).

En el año 2014 se publicaron las secuencias de los genes codificantes de las enzimas acetoacetil-CoA tiolasa (*acaT*; Genbank; AB919149) y enzima HMGS (*hmgS*; Genbank AB919150) de la cepa UCD 67-210 (ATCC 24202) al probar el efecto de la sobreexpresión de estos genes en la misma cepa y evaluar su efecto sobre la producción de carotenoides (Hara y col., 2014). Además, el genoma completo de la cepa haploide CBS 6938 (ATCC 96594) fue publicado el año 2015, incluyendo anotaciones de los marcos de lectura abiertos (ORF) identificados en el mismo (Sharma y col., 2015). Entre los ORFs identificados se incluyó a los genes de la ruta del mevalonato, sin presentar evidencias adicionales de su funcionalidad. El interés y avance en el conocimiento de la ruta MVA en *X. dendrorhous* se apoyan en la importancia que tendría esta ruta en el contexto biotecnológico dentro del que se encuentra gran parte de la investigación actual.

1. 4. 2 Regulación metabólica en *X. dendrorhous*

Se sabe que en *X. dendrorhous* la carotenogénesis se ve afectada por la fuente de carbono que use la levadura. Se ha visto que la producción de pigmentos es mayor al cultivar la levadura en fuentes de carbono no fermentables, como succinato, que en fuentes fermentables, como glucosa (Wozniak y col., 2010; Marcoleta y col., 2011). Cuando la levadura crece en un medio con glucosa como única fuente de carbono, la producción de pigmentos se inicia una vez que la glucosa del medio ha sido completamente consumida, lo que además coincide con el inicio del consumo de etanol producto de la fermentación de la glucosa (Lodato y col., 2003, 2007). La producción de carotenoides comienza antes y es mayor cuando se utiliza una fuente de carbono

no fermentable ya que se ha visto que en cultivos con succinato como única fuente de carbono, la síntesis de carotenoides coincide con el crecimiento de la levadura y aumenta sostenidamente hasta llegar a fase estacionaria (Wozniak y col., 2011).

Estos antecedentes sugieren que la carotenogénesis en la levadura estaría sujeta a represión catabólica. Además, el nivel de transcrito de los genes carotenogénicos *crtI*, *crtYB* y *crtS* disminuye al agregar glucosa al cultivo (Marcoleta y col., 2011), lo que probablemente se debe a la acción de la proteína Mig1 que corresponde a un represor transcripcional involucrado en el mecanismo de represión catabólica que se une a los promotores de estos genes *in vitro* (Bravo, 2015). Asimismo, se ha probado que en una cepa de *X. dendrorhous* mutante *mig1*- la represión mediada por glucosa sobre la expresión de los genes carotenogénicos se pierde, en conjunto con un aumento en la producción de carotenoides respecto a la cepa silvestre (Bravo, 2015).

En su acción represora, Mig1 recluta el complejo co-represor Cyc8-Tup1, el que también interactúa con otros factores transcripcionales como Rox1, Skn7, Yap6, Crt1, Opi1 o Rgt1, en respuesta a diferentes estímulos. En *S. cerevisiae*, este complejo co-represor está relacionado con la regulación de alrededor de 180 genes diferentes (Smith y Johnson, 2000; Zhang y Reese, 2005). Se ha encontrado que en mutantes *cyc8*⁻ o *tup1*⁻ de *X. dendrorhous* hay un aumento de carotenoides producidos en conjunto con una disminución en la tasa de crecimiento de las cepas con respecto a la cepa silvestre. Interesantemente, en dichos mutantes también se pierde el efecto represor de la glucosa sobre la síntesis de carotenoides (Córdova, 2016). Además se evaluó el efecto de ambas mutaciones sobre el efecto de la glucosa en los niveles de transcrito de genes de la ruta del MVA, específicamente el gen *HMGR*, que pasa de ser levemente reprimido en la cepa silvestre, a ser activado por glucosa en la cepa *cyc8*⁻.

Por otra parte, la adición de etanol a cultivos de *X. dendrorhous* aumenta la producción de carotenoides, lo que probablemente estaría mediado por la vía del MVA, ya que se ha demostrado que el etanol aumenta la actividad de la enzima HMGR (Gu y col., 1997). Además, es posible que al ser metabolizado el etanol conduzca a un aumento del acetato disponible para la generación de acetil-CoA, aumentando así el flujo hacia la vía del MVA (Gu y col., 1997; Marcoleta y col., 2011).

Durante la adición de etanol se observó que los niveles de los transcritos de los genes carotenogénicos *crtYB* y *crtS* aumentan (Marcoleta y col., 2011), lo que favorecería la síntesis de carotenoides. Este fenómeno de inducción por etanol también se ha observado en la producción de ergosterol en *S. cerevisiae*, donde un aumento del 15 % en la concentración de etanol lleva a un incremento del 11 % en la producción de ergosterol y escualeno (intermediario específico de la síntesis de ergosterol), lo que se debería a un intento de la célula para mantener la integridad de sus membranas (Ciesarová y col., 1996). Considerando estos antecedentes, es interesante estudiar cómo varía la expresión de los genes de la ruta del MVA frente a la adición de etanol a cultivos a modo de obtener mayores antecedentes respecto a cómo este alcohol puede estimular la síntesis de isoprenoides derivados de la ruta del MVA.

La expresión de genes de la ruta del mevalonato en *X. dendrorhous* ha sido poco estudiada. En el trabajo de Loto y col. (2012) se observó que la expresión del gen *HMGR* aumenta hasta 73 veces en cepas mutantes del gen *CYP61* respecto a la cepa parental. La mutación de *CYP61* genera cepas incapaces de sintetizar ergosterol, sugiriendo que la vía de regulación SREBP estaría presente en la levadura, lo que a su vez favorecería la síntesis de carotenoides. También se ha medido la expresión de los genes *HMGR*, *HMGS*, *MVK* y *MVD* en cepas de *X. dendrorhous* sobreproductoras de astaxantina obtenidas por mutagénesis al azar que además producen una menor cantidad de ergosterol. En este caso no se observó cambios importantes en los niveles de expresión de estos genes (Miao y col., 2011). Sin embargo, al ser cepas mutantes al azar puede haber mutaciones que podrían localizarse en regiones promotoras o reguladores comunes de los genes que no pueden ser identificados *a priori*.

De acuerdo a los antecedentes expuestos, este trabajo pretendió identificar y describir los genes de la ruta del mevalonato en *X. dendrorhous*, probar su funcionalidad por ensayos de complementación heteróloga en cepas mutantes de *S. cerevisiae* y estudiar su posible regulación transcripcional, específicamente por ergosterol, glucosa y etanol. Este conocimiento puede proyectarse a futuro para complementar la información disponible sobre la síntesis de

carotenoides en esta levadura, además de abrir horizontes hacia la producción de otros isoprenoides de alto interés biotecnológico en la misma.

1. 5 Hipótesis y objetivos

1. 5. 1 Hipótesis

La ruta del mevalonato en *X. dendrorhous* estaría sujeta a mecanismos de regulación a nivel transcripcional por compuestos como etanol, ergosterol y/o glucosa.

1. 5. 2 Objetivo general

Estudiar la organización genómica estructural y funcional de los genes *ERG10*, *HMGS* y *MVK*, responsables de pasos tempranos en la biosíntesis de IPP en *X. dendrorhous*.

1. 5. 3 Objetivos específicos

1. Identificar por análisis bioinformático del genoma y transcriptoma de *X. dendrorhous* las secuencias codificantes de los homólogos de los genes *ERG10*, *ERG13*, *ERG12*, *ERG8* y *MVD1* de *S. cerevisiae*, involucrados en la ruta de síntesis de mevalonato.
2. Estudiar la funcionalidad de los genes *ERG10*, *HMGS* y *MVK* por ensayos de complementación heteróloga en *S. cerevisiae* y en mutantes heterocigotas de *X. dendrorhous* en cada uno de los genes.
3. Determinar el efecto de etanol, glucosa y de la ausencia de ergosterol a nivel transcripcional sobre los genes de la vía del mevalonato y sobre la producción de ergosterol en *X. dendrorhous*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepas y condiciones de cultivo

En este trabajo se utilizó la cepa silvestre de *X. dendrorhous* UCD 67-385 y la cepa mutante homocigota *cyp61⁻*, descrita previamente (Loto y col., 2012). A partir de la cepa silvestre, también se obtuvo los mutantes heterocigotos de genes de la vía del mevalonato (Tabla 1). Las células de esta levadura se cultivaron a 22 °C con agitación constante (160 rpm) en medio líquido YM (0,3 % extracto de levadura, 0,3 % extracto de malta, 0,5 % peptona) suplementado o no con distintas concentraciones de glucosa. Para los cultivos en placa, se suplementó con agar-agar al 1,5 % y para la selección de transformantes se incorporó el antibiótico higromicina B (15 µg/ml) y/o zeocina (20 µg/ml).

La cepa silvestre de *S. cerevisiae* usada en el trabajo correspondió a la cepa S288c. Además, se usó cepas mutantes heterocigotas detalladas en la Tabla 1, las que fueron adquiridas desde la colección ATCC (*American Type Culture Collection*). Para el cultivo de esta levadura se utilizó medio completo YEP (1 % extracto de levadura, 2 % peptona, 2 % glucosa) o medio mínimo YNB (0,67 % *yeast nitrogen base*, 2 % glucosa) suplementado con los aminoácidos uracilo (20 µg/ml), histidina (20 µg/ml), lisina (30 µg/ml), metionina (30 µg/ml) o leucina (100 µg/ml), según corresponda. Los cultivos líquidos se crecieron con agitación constante a 22, 25 o 30 °C. De acuerdo a la resistencia de las cepas, a los cultivos en placas con agar-agar al 1,5 % se agregó geneticina a una concentración final de 200 µg/ml.

Para procedimientos estándar de biología molecular se utilizó la cepa DH5 α de *E. coli*, la que se cultivó en medio completo LB (1 % triptona, 0,5 % extracto de levadura, 0,5 % NaCl) a 37 °C con agitación constante. La selección de transformantes con DNA derivado de pBluescript se hizo usando ampicilina (100 μ g/ml) y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido 80 μ g/ml).

Tabla 1.- Cepas utilizadas y obtenidas en este trabajo.

Cepa	Genotipo/Características principales	Referencia
<i>E. coli</i> DH5 α	Cepa utilizada para experimentos de transformación y replicación de plasmidios.	Sambrook y Russell, 2001
<i>S. cerevisiae</i> S288C	Haploide, MAT α , genoma completo secuenciado.	Mortimer y Johnston, 1986
YPL028W BY4743 (SC Δ erg10)	MAT α /MAT α his3 Δ 1/his3 Δ 1 leu2 Δ 0/leu2 Δ 0 lys2 Δ 0/+ met15 Δ 0/+ ura3 Δ 0/ura3 Δ 0 Δ erg10.	Giaever y col. 2002
YML126C BY4743 (SC Δ hmgs)	MAT α /MAT α his3 Δ 1/his3 Δ 1 leu2 Δ 0/leu2 Δ 0 lys2 Δ 0/+ met15 Δ 0/+ ura3 Δ 0/ura3 Δ 0 Δ hmgs.	Giaever y col. 2002
YMR208W BY4743 (SC Δ mvk)	MAT α /MAT α his3 Δ 1/his3 Δ 1 leu2 Δ 0/leu2 Δ 0 lys2 Δ 0/+ met15 Δ 0/+ ura3 Δ 0/ura3 Δ 0 Δ erg12.	Giaever y col. 2002
SC Δ erg10-cERG10A	Cepa SC Δ erg10 transformada con YEp-c10A.	Este trabajo
SC Δ erg10-cERG10B	Cepa SC Δ erg10 transformada con YEp-c10B.	Este trabajo
SC Δ erg10-ERG10sc	Cepa SC Δ erg10 transformada con YEp-ERG10sc.	Este trabajo
SC Δ hmgs-cHMGS	Cepa SC Δ hmgs transformada con YEp-cHMGS.	Este trabajo
SC Δ mvk-cMVK	Cepa SC Δ mvk transformada con YEp-cMVK.	Este trabajo
SC Δ 10-10B	Segregante haploide de SC Δ erg10-cERG10A, Δ erg10 portadora de YEp-c10B.	Este trabajo
SC Δ 10-sc	Segregante haploide de SC Δ erg10-ERG10sc, Δ erg10 portadora de YEp-ERG10sc.	Este trabajo
SC Δ hmgs-cHMGS	Segregante haploide de SC Δ hmgs-cHMGS, Δ hmgs portadora de YEp-cHMGS.	Este trabajo
SC Δ mvk-cMVK	Segregante haploide de SC Δ mvk-cMVK, Δ mvk portadora de YEp-cMVK.	Este trabajo
<i>X. dendrorhous</i> UCD 67-385	Cepa silvestre diploide, sensible a higromicina B y zeocina.	ATCC 24230
385-cyp61(-/-)	Mutante homocigota del gen CYP61 con un alelo interrumpido por un módulo de resistencia a higromicina B y el otro, por un módulo de resistencia a zeocina, obtenida a partir de la cepa UCD 67-385.	Loto y col. 2012
385-erg10A(+/-)	Mutante heterocigota de la cepa UCD 67-385 con un	Este trabajo

Cepa	Genotipo/Características principales	Referencia
385- <i>erg10A</i> (-/-)	alelo <i>ERG10A</i> reemplazado por un módulo de resistencia a higromicina B. Mutante homocigota de la cepa UCD 67-385 con ambos alelos <i>ERG10A</i> reemplazados por un módulo de resistencia a higromicina B.	Este trabajo
385- <i>erg10B</i> (+/-)	Mutante heterocigota de la cepa UCD 67-385 con un alelo <i>ERG10B</i> reemplazado por un módulo de resistencia a higromicina B.	Este trabajo
385- <i>mvk</i> (+/-)	Mutante heterocigota de la cepa UCD 67-385 con un alelo <i>MVK</i> reemplazado por un módulo de resistencia a higromicina B.	Este trabajo

2. 2 Plásmidos, ácidos nucleicos y procedimientos tradicionales de biología molecular

Los procedimientos de biología molecular se realizaron de acuerdo a lo indicado en el manual de clonamiento molecular (Sambrook y Russell, 2001) o por el fabricante del producto. En reacciones de ligado se usó la enzima T4 DNA ligasa (Fermentas).

Para el clonamiento de genes se utilizó los plásmidos pBluescript SK- y YEp-NP. El detalle de todos los plásmidos construidos en este trabajo se encuentra en la Tabla 2. Por otra parte, los oligonucleótidos utilizados para procedimientos de biología molecular se sintetizaron en *Integrated DNA technologies* (IDT) y se describen en la Tabla 3. Los oligonucleótidos usados para PCR cuantitativo en tiempo real (RT-qPCR) se describen en la Tabla 4.

La visualización y cuantificación de moléculas de DNA cromosómico, plasmídico y productos de PCR se hizo mediante electroforesis en geles de agarosa en *buffer* TAE 1x (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA; pH 8,0) 0,7 - 1 %, teñidos con bromuro de etidio a 0,5 µg/ml y visualizado por luz UV en un transiluminador (Arquimed). Las muestras a analizar se mezclaron con *buffer* de carga BCP 1x (10 mM rojo cresol (Sigma); 30 % glicerol). Como marcador de peso molecular se usó DNA del bacteriófago lambda digerido con la endonucleasa de restricción *HindIII* (Fermentas) o GeneRuler 1 kb Plus DNA *Ladder* (Fermentas). Para la cuantificación se comparó la intensidad de la banda con aquellas de concentración conocida del marcador.

Tabla 2.- Plásmidos construidos y utilizados en este trabajo. Todos los fragmentos clonados corresponden a *X. dendrorhous*.

Plásmido	Descripción	Referencia
pBluescript SK-(pBS)	Origen de replicación ColE1, Amp ^R .	Stratagene
YEep-ACT4	Vector de expresión en <i>S. cerevisiae</i> . Amp ^R , <i>LEU2</i> , origen de replicación pBR322 y 2 μ .	Sanchez-Torres y col. 1998
YEep-NP	Vector de expresión en <i>S. cerevisiae</i> derivado de YEep-ACT4, lleva promotor <i>ACT4</i> y terminador <i>TDH3</i> , ambos de <i>S. cerevisiae</i> .	Bravo, 2014
YEep-c10A	YEep-NP con cDNA de gen <i>ERG10A</i> de <i>X. dendrorhous</i> entre promotor <i>ACT4</i> y terminador <i>TDH3</i> .	Este trabajo
YEep-c10B	YEep-NP con cDNA de gen <i>ERG10B</i> de <i>X. dendrorhous</i> entre promotor <i>ACT4</i> y terminador <i>TDH3</i> .	Este trabajo
YEep-cHMGS	YEep-NP con cDNA de gen <i>HMGS</i> de <i>X. dendrorhous</i> entre promotor <i>ACT4</i> y terminador <i>TDH3</i> .	Este trabajo
YEep-cMVK	YEep-NP con cDNA del gen <i>MVK</i> de <i>X. dendrorhous</i> entre promotor <i>ACT4</i> y terminador <i>TDH3</i> .	Este trabajo
YEep-ERG10sc	YEep-NP con DNA del gen <i>ERG10</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	Este trabajo
pBS-PT-ERG10A	pBS con 620 pb de DNA río arriba del gen <i>ERG10A</i> y 412 pb río abajo del mismo con un sitio de corte <i>SmaI</i> entre ellos.	Este trabajo
pBS-PT-ERG10B	pBS con 559 pb de DNA río arriba del gen <i>ERG10B</i> y 560 pb río abajo del mismo con un sitio de corte <i>SmaI</i> entre ellos.	Este trabajo
pBS-PT-HMGS	pBS con 479 pb de DNA río arriba del gen <i>HMGS</i> y 494 pb río abajo del mismo con un sitio de corte <i>SmaI</i> entre ellos.	Este trabajo
pBS-PT-MVK	pBS con 580 pb de DNA río arriba del gen <i>MVK</i> y 547 pb río abajo del mismo con un sitio de corte <i>SmaI</i> entre ellos.	Este trabajo
pBS-PHT-10A	pBS-PT-ERG10A con módulo de resistencia a higromicina en sitio <i>SmaI</i> .	Este trabajo
pBS-PHT-10B	pBS-PT-ERG10B con módulo de resistencia a higromicina en sitio <i>SmaI</i> .	Este trabajo
pBS-PHT-HMGS	pBS-PT-HMGS con módulo de resistencia a higromicina en sitio <i>SmaI</i> .	Este trabajo
pBS-PHT-MVK	pBS-PT-MVK con módulo de resistencia a higromicina en sitio <i>SmaI</i> .	Este trabajo
pMN- <i>hph</i>	Plásmido que contiene un módulo de resistencia a higromicina B para <i>X. dendrorhous</i> .	Niklitschek y col. 2008

Tabla 3.- Oligonucleótidos usados en este trabajo.

Partidor	Secuencia 5'-3'	Blanco u Objetivo de Uso
M13.Fw.FP	tgtaaacgacggccagt	Región M13 del vector YEpNP.
M13.Rv.PUC-40	ggaaacagctatgaccatg	Región M13 del vector YEpNP.
KanMX4.F2	ttgatgggaagcccgatg	Gen <i>kanMX</i> (módulo de resistencia a G-418).
KanMX4.R2	gatcctggtatcggtctgc	Gen <i>kanMX</i> (módulo de resistencia a G-418).
H.F	atgaaaaagcctgaactcacc	Gen <i>hph</i> (módulo de resistencia a higromicina B).
IntHygR	cgacctcgattgggaatc	Gen <i>hph</i> (módulo de resistencia a higromicina B).
<i>X. dendrorhous</i> :		
pEFrev0	tttgaagctgttcgagatag	Promotor <i>TEF</i> de <i>X. dendrorhous</i> .
gpdTF	acggttctctccaaaccctc	Terminador <i>GPD</i> de <i>X. dendrorhous</i> .
GPDHtRev	atcatgagagatgacggag	Terminador <i>GPD</i> de <i>X. dendrorhous</i> .
PEFForEV	gatatcggctcatcagccgacagtt	Promotor <i>TEF</i> de <i>X. dendrorhous</i> .
Thio_genFW	atgccatctggaaagtccaag	Gen <i>ERG10A</i> de <i>X. dendrorhous</i> .
Thio_genRV	tcaactgctcattcacaacacc	Gen <i>ERG10A</i> de <i>X. dendrorhous</i> .
Thio2_fw	atgtctgccgccttcctgc	Gen <i>ERG10B</i> de <i>X. dendrorhous</i> .
Thio2_rv	ttagagcctctggatgacgac	Gen <i>ERG10B</i> de <i>X. dendrorhous</i> .
HMGS_genFW	atgtacacttactaccg	Gen <i>HMGS</i> de <i>X. dendrorhous</i> .
HMGS_genRV	tcaagcagaagggacctg	Gen <i>HMGS</i> de <i>X. dendrorhous</i> .
MVK_gen_FW	atggcattctgtattgttggtg	Gen <i>MVK</i> de <i>X. dendrorhous</i> .
MVK_gen_RV	tcaagcaaaagaccaacgacc	Gen <i>MVK</i> de <i>X. dendrorhous</i> .
UP_erg10A_Xd	agcagtgttctcaccttccg	Río arriba promotor <i>ERG10A</i> .
DW_erg10A_Xd	ccttcaaagctcatcacaag	Río abajo terminador <i>ERG10A</i> .
UP_erg10B_Xd	ccatagcaaccgctcatctc	Río arriba promotor <i>ERG10B</i> .
DW_erg10B_Xd	ctctggatgttacgaaagg	Río abajo terminador <i>ERG10B</i> .
UP_hmgs_Xd	tcactctcgtctcctgac	Río arriba promotor <i>HMGS</i> .
DW_hmgs_Xd	cttccaaccgaatgatct	Río abajo terminador <i>HMGS</i> .
UP_mvK_Xd	atgtcaccatctcagcggc	Río arriba promotor <i>MVK</i> .
DW_mvK_Xd	caaccttgctattcatcctc	Río abajo terminador <i>MVK</i> .
<i>S. cerevisiae</i> :		
erg10sc_F	tctagatgtcacagaacgtttatattg	Gen <i>ERG10</i> de <i>S. cerevisiae</i> .
erg10sc_R	aagcttttaagcaggtgatgtttgct	Gen <i>ERG10</i> de <i>S. cerevisiae</i> .
HMGS_sc_F	tctagatgaaactctcaactaagctt	Gen <i>HMGS</i> de <i>S. cerevisiae</i> .
	gttg	
HMGS_sc_RV	aagcttacataaattggctgatattc	Gen <i>HMGS</i> de <i>S. cerevisiae</i> .
	cacc	
Erg10upF	gcactgctaagcctactcg	79 pb río arriba gen <i>ERG10</i> de <i>S. cerevisiae</i> .
Erg10dwR	ccgaatgttgaacaggtgct	76 pb río abajo gen <i>ERG10</i> de <i>S. cerevisiae</i> .
HMGSupF	gagtgtgtgaaagtaggctc	74 pb río arriba gen <i>HMGS</i> de <i>S. cerevisiae</i> .
HMGSdwR	ccctcaagaactctcagatg	97 pb río abajo gen <i>HMGS</i> de <i>S. cerevisiae</i> .
MVKupF	cttctcgttagctggtgc	52 pb río arriba gen <i>MVK</i> de <i>S. cerevisiae</i> .
MVKdwR	ggactccatcgaattatcagcc	122 pb río abajo gen <i>MVK</i> de <i>S. cerevisiae</i> .
Construcción de mutantes		
erg10a_PR_Fw	gtggaaaggaaaggacgaacg	Río arriba del gen <i>ERG10A</i> de <i>X. dendrorhous</i> .
erg10a_PR_Rv	tgaccacatcgttcgcttct	Río arriba del gen <i>ERG10A</i> de <i>X. dendrorhous</i> .
erg10a_T_Fw	ctgaagctccgatcttgggc	Río abajo del gen <i>ERG10A</i> de <i>X. dendrorhous</i> .
erg10a_T_Rv	caaagaagcccttctgcccac	Río abajo del gen <i>ERG10A</i> de <i>X. dendrorhous</i> .
erg10b_PR_Fw	gctcactgaccaagcggc	Río arriba del gen <i>ERG10B</i> de <i>X. dendrorhous</i> .
erg10b_PR_Rv	ttattaggccagcagggcggc	Río arriba del gen <i>ERG10B</i> de <i>X. dendrorhous</i> .
erg10b_T_Fw	ctactgctgctcatccag	Río abajo del gen <i>ERG10B</i> de <i>X. dendrorhous</i> .
erg10b_T_Rv	ggtgaggagatagtactgac	Río abajo del gen <i>ERG10B</i> de <i>X. dendrorhous</i> .

Partidor	Secuencia 5'-3'	Blanco u Objetivo de Uso
HMGS_PR_Fw	taggcgagtgaggaagctttg	Río arriba del gen <i>HMGS</i> de <i>X. dendrorhous</i> .
HMGS_PR_Rv	ggtcgctgtcggtagtagaag	Río arriba del gen <i>HMGS</i> de <i>X. dendrorhous</i> .
HMGS_T_Fw	atgtggcgtcgacagtacaag	Río abajo del gen <i>HMGS</i> de <i>X. dendrorhous</i> .
HMGS_T_Rv	gctcagcgcggcatttgct	Río abajo del gen <i>HMGS</i> de <i>X. dendrorhous</i> .
MVK_PR_Fw	gtcgtgcctaaagccattgc	Río arriba del gen <i>MVK</i> de <i>X. dendrorhous</i> .
MVK_PR_Rv	agggtcctcaataccgacac	Río arriba del gen <i>MVK</i> de <i>X. dendrorhous</i> .
MVK_T_Fw	gatgagctagacagatgggc	Río abajo del gen <i>MVK</i> de <i>X. dendrorhous</i> .
MVK_T_Rv	gaggttggttgattgtttactg	Río abajo del gen <i>MVK</i> de <i>X. dendrorhous</i> .
erg10a_Rv_P_Sma_T	<u>ggaagcttcag</u> cccgggtgacca catcgttcgcg	Para construir pBS-PT- <i>ERG10A</i> : 11 bases de terminador <i>ERG10A</i> de <i>X. dendrorhous</i> (subrayado), sitio de restricción <i>SmaI</i> (cursiva) y 17 bases de promotor <i>ERG10A</i> .
erg10a_Fw_T_Sma_P	<u>gaacgatgtggtca</u> ccccgggctg aagcttccgatcttgg	Para construir pBS-PT- <i>ERG10A</i> : 14 bases de promotor <i>ERG10A</i> de <i>X. dendrorhous</i> (subrayado), sitio de restricción <i>SmaI</i> (cursiva) y 19 bases de terminador <i>ERG10A</i> .
erg10b_Rv_P_Sma_T	<u>cgacagcagtag</u> ccccgggttatt aggccagc	Para construir pBS-PT- <i>ERG10B</i> : 12 bases de terminador <i>ERG10B</i> de <i>X. dendrorhous</i> (subrayado), sitio de restricción <i>SmaI</i> (cursiva) y 13 bases de promotor <i>ERG10B</i> .
erg10b_Fw_T_Sma_P	<u>ctggcctaataa</u> ccccgggctactg ctgtcgtcatc	Para construir pBS-PT- <i>ERG10B</i> : 12 bases de promotor <i>ERG10B</i> de <i>X. dendrorhous</i> (subrayado), sitio de restricción <i>SmaI</i> (cursiva) y 17 bases de terminador <i>ERG10B</i> .
MVK_Rv_P_Sma_T	<u>gtctagctcat</u> ccccgggagggtc ctcaataccgac	Para construir pBS-PT- <i>MVK</i> : 12 bases de terminador <i>MVK</i> de <i>X. dendrorhous</i> (subrayado), sitio de restricción <i>SmaI</i> (cursiva) y 18 bases de promotor <i>MVK</i> .
MVK_Fw_T_Sma_P	<u>attgaggaccct</u> ccccgggatga gctagacagatgg	Para construir pBS-PT- <i>MVK</i> : 12 bases de promotor <i>MVK</i> de <i>X. dendrorhous</i> (subrayado), sitio de restricción <i>SmaI</i> (cursiva) y 18 bases de terminador <i>MVK</i> .

Tabla 4.- Oligonucleótidos utilizados para RT-qPCR.

Partidor	Secuencia 5'-3'	Gen Blanco	Referencia
mActF-RT	cgcacctcgtgattgataac	<i>ACT</i>	Marcoleta y col., 2011
mActR-RT	tgaccaaggtaggagtcctt		
RT_erg10a_fw	tccctcactgcgtctttg	<i>ERG10A</i>	Este trabajo
RT_erg10a_rv	tggttgagagcacatcttc		
RT_erg10b_fw	aggcttcgaccgattctact	<i>ERG10B</i>	Este trabajo
RT_erg10b_rv	aggaaaggagcgttgacat		
RT_hs_fw	gttcgcctgaacgctgttt	<i>HMGS</i>	Este trabajo
RT_hs_rv	aaccgtagcaggcattcttg		
RT_mvK_fw	caaatggcgctcttagctg	<i>MVK</i>	Este trabajo
RT_mvK_rv	ggatgtgaagctcttgatcg		
RT_pmK_fw	ttcatcggctgaccctatgt	<i>PMK</i>	Este trabajo
RT_pmK_rv	tcgatcggactgttcacct		
RT_mvd_fw	cggctcggagaaactctcat	<i>MVD</i>	Este trabajo
RT_mvd_rv	ggcagaaccagaacctgtg		
HMGR_Real_2_F	ggccgatcgtatacatccgttt	<i>HMGR</i>	Loto y col., 2012
HMGR_Real_2_R	atccagttgatggcagaaggct		
mcrtSF-RT	atggctctgcagggttga	<i>crtS</i>	Marcoleta y col., 2011
mcrtSR-RT	tgctccataagctcgatcccaa		
mcrtRR-RT-F	ctgggaaacaagacctacga	<i>crtR</i>	Marcoleta y col., 2011
mcrtRR-RT-R	ggaacctcggttacgacaaa		
grg2real FW1	catcaagacctctgtcaccaac	<i>grg2</i>	Marcoleta y col., 2011
grg2real RV1	ttggcgtcagacgaggact		
Inv real FW1	agaccatctggccttctcaaa	<i>INV</i>	Marcoleta y col., 2011
Inv real RV1	aggaccgaaactagtgatgtg		
pdcreal FW1	tcaacactgagctgccact	<i>PDC</i>	Marcoleta y col., 2011
pdcreal RV1	attccgaatcggaagcaca		
ADH_RT Fw A	tgaccagtcggaatcaagt	<i>ADH1</i>	Este trabajo
ADH_RT Rv A	taacgtggcagcgtaaga		

2. 3 Obtención de ácidos nucleicos

2. 3. 1 Extracción de DNA genómico de levadura.

La obtención de DNA genómico de levadura, sea *S. cerevisiae* o *X. dendrorhous*, se realizó por ruptura mecánica en la que se mezcló 100 µl de microesferas de vidrio de 0,5 mm de diámetro (BioSpec) con 600 µl de amortiguador TE (25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0) y una colonia de células que se tomó desde una placa con un asa estéril. La mezcla se puso 3 min en un molidor de células Mini-Beadbeater-16 (BioSpec) y se centrifugó por 5 min a 4.000 x g para luego traspasar el sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. A este tubo se agregó

un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1), se mezcló en vórtex y centrifugó 1 min a 18.500 x g en una microcentrifuga. Se recogió la fase acuosa y se traspasó a un tubo limpio, se agregó un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24: 1) para luego mezclar en vórtex y centrifugar por 1 min a 18.500 x g. Nuevamente, se pasó el sobrenadante a un tubo limpio y se agregó dos volúmenes de etanol absoluto frío. Esta mezcla se dejó a -20 °C por 1 h, se centrifugó por 10 min a 18.500 x g y se eliminó el sobrenadante por inversión. El precipitado se suspendió en tampón TE (10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA).

2. 3. 2 Extracción de RNA total de *X. dendrorhous* y síntesis de cDNA.

La extracción de RNA de *X. dendrorhous* se llevó cabo por un protocolo modificado de Chomczynski y Sacchi (1987). Para extraer RNA, se colectó 2 a 5 ml de cultivo en un tubo de tapa rosca, se centrifugó a 4.000 x g por 5 min y se descartó el sobrenadante. El precipitado celular se congeló en etanol a -80 °C y se almacenó a esta temperatura hasta su procesamiento. Al momento de extraer el RNA, se descongeló las células, se agregó 200 µl de *buffer* de lisis (0,02 M acetato de Na, pH 5,5, 0,5 % SDS, 1 mM EDTA, en agua 0,1 % DEPC) y 100 µl de microesferas de vidrio de 0,5 mm de diámetro (BioSpec). La mezcla se agitó durante 1 min en un molidor de células, se agregó 800 µl de Trizol y se volvió a dejar durante 1 min en el molidor. Luego se agregó 200 µl de cloroformo, se agitó manualmente por 30 s, se incubó a temperatura ambiente por 6 min y luego se centrifugó por 10 min a 4.000 x g. La fase acuosa se rescató en un tubo limpio al que se agregó 1 volumen de isopropanol frío y 0,5 volumen de *buffer* de precipitación (1,2 M NaCl, 0,8 M citrato de Na, en agua 0,1 % DEPC). Posteriormente se incubó a -20 °C por 45 min y se centrifugó 10 min a 18.000 x g descartando el sobrenadante. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol 75 % que luego se retiró completamente mediante el uso de micropipeta. El pellet se dejó secar por 5 min a temperatura ambiente y luego se suspendió en 30 µl de agua libre de nucleasas.

La muestra de RNA obtenida se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. La calidad del RNA extraído se determinó de acuerdo a la razón $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ y $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{230}$ para estimar la concentración de fenol (Sambrook y Russell , 2001).

La síntesis de cDNA se realizó con $5\text{ }\mu\text{g}$ de RNA total, $1,25\text{ }\mu\text{M}$ de partidador oligo-dT, $0,5\text{ }\mu\text{M}$ de dNTPs y 200 U de transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) en un volumen final de $20\text{ }\mu\text{l}$, de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante.

2. 3. 3 Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*.

Para la extracción y purificación de DNA plasmídico de cultivos de *E. coli* se utilizó los kits comerciales AxyPrepTM Plasmid Miniprep Kit (Axygen) o GeneJETTM Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific), según las instrucciones del fabricante.

2. 3. 4 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.

Para la recuperación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa, se cortó un bloque de agarosa en el que se encontraba el fragmento de interés y se purificó con el kit DNA UltraCleanTM 15 (MO BIO), según las indicaciones del fabricante o se utilizó el método de *glassmilk* (Boyle y Lew, 1995). Brevemente, el bloque de agarosa se disolvió a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ con $600\text{ }\mu\text{l}$ de 6 M KI y luego se agregó $12\text{ }\mu\text{l}$ de *glassmilk* (dióxido de sílice en 6 M KI). La mezcla se incubó en hielo por 10 min y luego se centrifugó para eliminar el sobrenadante. La sílice se lavó 1 vez con $700\text{ }\mu\text{l}$ de solución de lavado ($10\text{ mM Tris pH }7,5$, 50 mM NaCl , $25\text{ mM EDTA pH }7,5$ y $50\text{ }\%$ etanol), y luego de retirar todo el sobrenadante se suspendió en $12\text{ }\mu\text{l}$ de agua. Se incubó por 10 min a temperatura ambiente se centrifugó y se recuperó el sobrenadante.

2. 4 Reacciones de PCR

2. 4. 1 PCR estándar.

Para el análisis de clones y transformantes cada reacción de PCR se realizó con enzima *Taq* DNA polimerasa (GenLab). Para la obtención de fragmentos (promotor, cDNA de gen y terminador) y amplificación de DNA para transformación se usó la enzima *Pfu* DNA polimerasa (Stratagene).

Las reacciones de PCR con *Taq* DNA polimerasa se realizaron en un volumen final de 25 μ l. Esta reacción contenía amortiguador de PCR 1X pH 8,4 (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl), amortiguador BCP (100 mM Rojo cresol, 8,3 % de glicerol), 2 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de cada deoxinucleótido trifosforilado (dNTP), 1 mM de cada partidor, entre 10 y 20 ng de DNA molde y 1 unidad de enzima *Taq* DNA polimerasa. Se utilizó un termociclador 2720 Thermal Cycler de Applied Biosystems y el programa fue: desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento de partidores a 55 °C por 30 s y elongación a 72 °C por 3 min, y por último una elongación final a 72 °C por 10 min. Cuando se hizo PCR de colonias en lugar de agregar DNA a la mezcla de reacción se tomó una pequeña cantidad de células con un mondadientes directamente desde la colonia a analizar.

Las reacciones con *Pfu* DNA polimerasa se realizaron en un volumen final de 75 μ l y se usó entre 30 y 60 ng de DNA molde, 3 unidades de enzima *Pfu* DNA polimerasa, amortiguador de reacción 1x, una concentración final de 1 mM para cada partidor y 0,2 mM de cada dNTP. El protocolo de reacción fue modificado respecto al protocolo para PCR con *Taq* DNA polimerasa reduciendo el tiempo de elongación a 72 °C de 3 min a 1 min.

2. 4. 2 PCR de elongación (OE-PCR).

La reacción de PCR de elongación (*overlap extension* PCR, OE-PCR) (Higuchi y col., 1988) se realizó en un volumen final de 25 μ l e incluyó 20 ng del fragmento más pequeño de DNA y 60 ng del fragmento de DNA más largo a unir, 1 unidad de enzima *Pfu* DNA polimerasa, buffer

de reacción 1x y una concentración final de 0,2 mM de cada dNTP. En esta reacción no se agregó partidores ya que la elongación ocurre desde los extremos de las hebras unidas en la hibridación. El protocolo utilizado fue de 1 min a 95 °C, 10 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 52 °C y 1 min a 72 °C, con una elongación final de 10 min a 72 °C. Luego, la mezcla de reacción se amplificó a través de una reacción de PCR estándar con *Pfu* DNA polimerasa, siguiendo el protocolo indicado anteriormente, utilizando la mezcla de reacción del OE-PCR como molde.

2. 4. 3 RT-PCR cuantitativo.

La determinación de los niveles de expresión relativa a nivel de mRNA se realizó por RT-PCR cuantitativo en un termociclador de tiempo real Mx3000P (Stratagene). La mezcla de reacción se hizo con 1 µl de reacción de transcripción reversa, 0,25 µM de cada primer y 10 µl de kit SensiMix SYBR Green I (Quantace), en un volumen final de 20 µl. Los partidores utilizados para la determinación de los niveles relativos de expresión se encuentran detallados en la Tabla 3. Para cada partidor se hizo tres réplicas técnicas de la muestra. Como normalizador se utilizó el gen actina (Genbank X89898.1) y el gen PDA (no disponible en base de datos). Los datos fueron analizados usando método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001), a excepción del gen MVK donde la eficiencia del partidor es 92 %, por lo que usó la ecuación;

$$\text{Cambio} = \frac{(1 + \text{EFF}_{\text{blanco}})^{\Delta Ct_{\text{blanco}}}}{(1 + \text{EFF}_{\text{control}})^{\Delta Ct_{\text{control}}}}$$

Dónde EFF corresponde a la eficiencia del partidor correspondiente y ΔCt es la diferencia de Ct entre la condición A y la condición B.

2. 5 Transformación por electroporación

2. 5. 1 Electrotransformación de *E. coli*.

Las células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α se obtuvieron según el protocolo descrito por Sambrook y Russell (2001). En resumen, se inoculó 1 l de medio LB con 100 ml de un cultivo bacteriano saturado y se incubó a 37 °C con agitación constante hasta llegar a fase exponencial de crecimiento ($DO_{600nm} \approx 0,4 - 0,8$). Las células se colectaron por centrifugación a 14.000 $\times g$ por 15 min a 4 °C y se lavaron 2 veces con agua destilada fría estéril; el primer lavado se hizo con 1 l de agua y el segundo con 500 ml. Se hizo un lavado final con 20 ml de glicerol 10 %. Las células tratadas se suspendieron en 2 ml de glicerol 10 % frío y se dividieron en alícuotas de 40 μ l que fueron almacenadas a -80 °C hasta el momento de su utilización. Al momento de la transformación, se descongeló una alícuota de células electrocompetentes y se agregó entre 5 y 10 μ l de mezcla de ligado, previamente dializado, o 1 ng de vector puro, según correspondiera. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,2 cm previamente enfriada y la electroporación se llevó a cabo con un electroporador GenePulser Xcell™ (BioRad). Las condiciones del pulso fueron de 25 μ F, 200 Ω y 2,5 KV. Luego del pulso, las células se suspendieron en 1 ml de medio LB e incubaron durante 1 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se sembraron alícuotas $\approx 80 - 100 \mu$ l en medio LB-agar suplementado con el antibiótico ampicilina (100 μ g/ml) y X-gal (80 μ g/ml), y se incubaron durante 16 h a 37 °C.

2. 5. 2 Electrotransformación de *S. cerevisiae*.

Para la preparación de células de levadura electrocompetentes se sembró una colonia en 30 ml de medio YEP líquido y se incubó durante la noche a 22 °C con agitación constante. A la mañana siguiente, se agregó 30 ml de medio YEP fresco al cultivo y se incubó por 3 h más. Las células se recolectaron por centrifugación a 4.000 $\times g$ durante 5 min, se lavaron tres veces con 40 ml de agua destilada estéril fría y una vez con 4 ml de sorbitol 1 M. Finalmente, las células se suspendieron en 0,2 ml de sorbitol 1 M y se dividieron en alícuotas de 40 μ l que se

almacenaron a 4 °C por un máximo de dos días. Para transformar, se agregó 4 µl de DNA plasmídico, previamente dializado, a una alícuota de células electrocompetentes de *S. cerevisiae*. La mezcla se puso en una cubeta de electroporación de 2 mm y se incubó en hielo por 5 min antes de dar el pulso eléctrico (1,5 kV, 25 µF, 200 Ω) con un electroporador GenePulser Xcell™ (BioRad). Posteriormente, las células se suspendieron en medio YEP y se incubaron a 30 °C por 1 h. Las células se centrifugaron y lavaron con sorbitol 1 M a temperatura ambiente y se suspendieron en 1 ml de sorbitol 1 M. Finalmente, las células se sembraron en placas de medio mínimo suplementadas con los aminoácidos correspondientes.

2. 5. 3 Electrotransformación de *X. dendrorhous*.

La obtención de células electrocompetentes de *X. dendrorhous* se llevó a cabo según el protocolo descrito por Adrio y Veiga (1995). Brevemente, se sembró 2 ml de un cultivo de 2 días en 200 ml de medio YM y se dejó crecer a 22 °C con agitación constante hasta una DO_{600nm} de 2-4 (aproximadamente 24 h). Luego de alcanzar la DO_{600nm} deseada, las células se cosecharon por centrifugación a 4 °C a 14.000 x g por 5 min. El sedimento celular se suspendió en 25 ml de *buffer* fosfato de potasio 50 mM (pH 7,0) con 25 mM DTT y se incubó por 15 min a 22 °C. A partir de este paso todos los procedimientos se realizaron a 4 °C con material enfriado en hielo. Las células se lavaron 2 veces con 25 ml de solución STM (270 mM sacarosa, 10 mM Tris-HCl, pH 7,0, 1 mM $MgCl_2$) y el sedimento celular se suspendió en 500 µl de solución STM. Para electroporar se mezcló 60 µl de la suspensión de células electrocompetentes y 10 µl de DNA transformante (a una concentración mínima de 1 µg/µl) y la mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,2 cm enfriada. La electroporación se llevó a cabo con el equipo BioRad Gene Pulser X Cell bajo las condiciones 125 µF, 600 Ω y 450 V. Una vez realizada la electroporación, las células se suspendieron en 1 ml de medio YM y se incubó durante 4 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se sembró alícuotas de 100 µl en medio YM semi-sólido suplementado con higromicina B y/o zeocina, dependiendo del vector utilizado y de la cepa transformada. Las placas se incubaron a 22 °C por al menos 2 días y se evaluó la aparición de

colonias resistentes a los antibióticos de selección. Para confirmar el origen de cada transformante, se secuenció la región IGS con los partidores 5SRNA y LR12R (Tabla 3) y se comparó con la base de datos disponible en el laboratorio la que posee las secuencias IGS características de todas las cepas utilizadas en este trabajo y de la mayoría de las cepas de *X. dendrorhous* disponibles en el laboratorio.

2. 6 Esporulación de *S. cerevisiae* y selección de cepas haploides.

Para la esporulación de las transformantes de *S. cerevisiae* que portaban los plásmidos de interés, éstas se sembraron sobre placas con medio de pre-esporulación (5 % glucosa, 8 % extracto de levadura, 3 % peptona, 2 % agar) y se incubaron a 30 °C por un día. De la placa de pre-esporulación se tomó una colonia y se sembró sobre una placa con medio de esporulación (1 % acetato de potasio, 2 % agar, un cuarto de la concentración recomendada de aminoácidos correspondientes) y se incubó a 22 °C entre 3 y 5 días. La confirmación de la esporulación se hizo tomando una pequeña cantidad de células con un asa estéril desde la placa y suspendiéndolas en una gota de agua sobre un portaobjetos. La suspensión se observó al microscopio buscando la presencia de ascas en la muestra.

La selección de esporas y ruptura de ascas se realizó recogiendo las células desde la placa de esporulación y suspendiéndolas en agua estéril. Posteriormente se agregó un volumen de di-etiléter y se dejó agitando en vórtex por 30 min. Luego la muestra se centrifugó por 2 min a 14.000 x g y se eliminó el sobrenadante siguiendo con un lavado con agua destilada. El pellet celular se suspendió en 10 µl de sorbitol 1 M estéril, se agregó 10 µl de zymoliasa y se incubó a temperatura ambiente por 2 h. Transcurrido el tiempo, se agregó 600 µl de agua estéril y un volumen equivalente a 100 µl de microesferas de vidrio de 0,5 mm de diámetro (BioSpec) para luego agitar en vórtex por 30 min. La muestra se sembró en placas selectivas de medio mínimo suplementado con geneticina a 200 µg/ml y los aminoácidos correspondientes. Las placas se incubaron a 30 °C hasta observar el desarrollo de colonias. Estas colonias se sembraron por

duplicado sobre placas selectivas con o sin aminoácidos a modo de identificar aquellas cepas auxótrofas para los aminoácidos lisina o metionina, las que serían haploides. Se extrajo DNA genómico de estas cepas y se confirmó por PCR la ausencia del gen de interés de *S. cerevisiae* y la presencia de su homólogo de *X. dendrorhous*.

2. 7 Secuenciación y análisis de secuencias.

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). Se utilizó un mínimo de 200 o 50 ng totales de DNA para la secuenciación de plásmidos o de fragmentos de DNA purificados, respectivamente. Para el análisis de secuencias se utilizaron las herramientas *Contig Express* y *AlignX* del paquete de programas Vector NT Advance v.11 (Invitrogen).

La identificación de secuencias desde el genoma y transcriptoma de la cepa UCD 67-385 se hizo con el programa *CLC Genomics Workbench 5*. Los genes identificados se confirmaron mediante comparación con secuencias disponibles en la base de datos de la herramienta BLAST y también mediante la herramienta SMART BLAST disponibles en línea en el sitio del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

El análisis de promotores se hizo utilizando una secuencia de 1.050 pb río arriba del codón de inicio de la traducción de cada ORF con las herramientas TF Search (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) y PROMO 3.0 (http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3), disponibles en línea.

2. 8 Extracción de compuestos orgánicos y análisis por RP-HPLC

2. 8. 1 Extracción de carotenoides.

La extracción de pigmentos carotenoides se hizo a partir de alícuotas de cultivo de 25 o 30 ml, basándose en el protocolo descrito para *X. dendrorhous* por An y colaboradores (1989). Se tomó un volumen de 1 ml por triplicado para determinar el peso seco en un tubo Eppendorf de 1,5 ml previamente masado. Estas muestras se dejaron secando a 80 °C por 24 h y se masaron nuevamente para calcular la diferencia respecto al tubo vacío. La muestra de cultivo para la extracción de pigmentos se centrifugó por 5 min a 4.000 x g en una centrifuga Sorvall de sobremesa. El pellet celular se lavó con 10 ml de agua destilada, se suspendió en 1,5 ml de agua destilada y se agregó 0,5 ml de microesferas de vidrio de 0,5 mm de diámetro (BioSpec). Posteriormente, se agitó en moedor de células Mini-Beadbeater-16 (BioSpec) por 3 min. Para extraer los pigmentos, se agregó 2 ml de acetona y se agitó nuevamente en moedor de células por 3 min, se centrifugó por 5 min a 4.000 x g para recuperar la fase superior en otro tubo. Este procedimiento se repitió hasta que los restos celulares quedaron de color blanco. Se midió el volumen de acetona recuperado y se agregó la quinta parte del volumen de éter de petróleo. La mezcla se agitó en vortex durante 10 min, se separaron las fases por centrifugación por 5 min a 4.000 x g y se recuperó la fase superior con los pigmentos. Se agregó 1 ml de agua destilada, se agitó en vortex y se centrifugó nuevamente por 5 min a 4.000 x g. Luego se recuperó la fase superior a un nuevo tubo de vidrio. Para conocer la concentración de carotenoides totales, se calculó el volumen de éter de petróleo recuperado y se midió la absorbancia a 474 nm.

El cálculo del contenido específico de carotenoides totales (μg de carotenoides / g levadura seca, ppm) en la muestra se realizó según la ecuación 1, donde; E es el volumen de éter de petróleo recuperado en ml, A corresponde a la absorbancia a 474 nm, D es la dilución usada para medir, S es el volumen de cultivo usado para medir peso seco en ml, P es el volumen de cultivo usado para la extracción de pigmentos en ml y W es el peso seco en g. En la

cuantificación se consideró el coeficiente de extinción molar correspondiente a astaxantina, 2100 ($M^{-1}cm^{-1}$).

$$\text{Pigmento específico (ppm)} = \frac{E \times A \times D \times S \times 100}{P \times W \times 21} \quad \text{Ecuación 1}$$

2. 8. 2 Extracción de esteroides.

En la extracción de esteroides totales se usó una muestra de entre 5 y 10 ml de cultivo. A esta muestra se agregó 4 g de KOH y 16 ml de etanol 60 % y se incubó durante 2 h a 80 °C. Una vez que la mezcla se enfrió, los esteroides se extrajeron agregando 10 ml de éter de petróleo al tubo, luego se agitó en vórtex y se centrifugó a 4.000 $\times g$ por 5 min. La fase superior se recuperó a un tubo de vidrio y se calculó el volumen de éter de petróleo recuperado. Para cuantificar la cantidad de esteroides en la muestra se midió la absorbancia a 280 nm.

El cálculo del contenido específico de esteroides en cada muestra se realizó según la ecuación 2, donde: E es el volumen de éter de petróleo recuperado en ml, A corresponde a la absorbancia a 280 nm, D es la dilución usada para medir, S es el volumen de cultivo usado para medir peso seco en ml, P es el volumen de cultivo usado para la extracción de pigmentos en ml, W es el peso seco en g y 30 corresponde al factor obtenido al dividir el peso molecular de ergosterol (396,65 g/mol) por el coeficiente de extinción molar del mismo ($11900 M^{-1}cm^{-1}$) (Shang y col., 2006).

$$\text{Esterol específico (mg esteroles/ g levadura seca)} = \frac{E \times A \times D \times S}{P \times W \times 30} \quad \text{Ecuación 2}$$

2. 8. 3 Análisis de muestras por RP-HPLC

El análisis de la composición de carotenoides y esteroides se realizó por cromatografía líquida en fase reversa en un equipo de HPLC (RP-HPLC) con un detector de arreglo de diodos Shimadzu SPD-M10A. Para ello, se dejó evaporar el éter de petróleo de cada muestra; los carotenoides se suspendieron en 200 µl de acetona y los esteroides se suspendieron en 200 µl de metanol y luego se filtraron con un filtro de nylon de 13 mm (Merck). Para la corrida de HPLC, se utilizó una columna Lichrospher RP18 125-4 (Merck); como fase móvil para la separación de carotenoides se usó una mezcla de acetonitrilo: metanol: isopropanol (85: 10: 5) y para esteroides, la fase móvil fue metanol: agua (93: 7) con un flujo de 1 ml/min en condiciones isocráticas. La identificación de carotenoides y de esteroides se realizó comparando con estándares específicos de acuerdo al tiempo de retención y su espectro de absorción (Mercadante y Egeland, 2004).

3. RESULTADOS

3. 1 Identificación por análisis bioinformático del genoma y transcriptoma de *X. dendrorhous* de las secuencias codificantes de los homólogos de los genes *ERG10*, *ERG13*, *ERG12*, *ERG8* y *MVD1* de *S. cerevisiae*, involucrados en la ruta del mevalonato.

La identificación de cada uno de los genes se logró a partir de la comparación de la secuencia del transcriptoma de *X. dendrorhous* disponible en nuestro laboratorio contra secuencias de genes homólogos a los que comprenden este estudio que se encuentran en la base de datos del NCBI. Como también está disponible el genoma de la levadura, fue posible identificar la secuencia genómica de cada uno de ellos permitiendo conocer su estructura de intrones y exones. La Tabla 5 presenta las características principales de cada uno de los genes identificados e información sobre la proteína que codificarían.

Usando la secuencia del ORF identificado se procedió a corroborar que las secuencias traducidas *in silico* correspondieran a proteínas con la función que cada gen debería codificar. Para esto se usó la aplicación “*Conserved Domain Database Search*” (CDD Search, NCBI, Marchler-Bauer y col., 2015) la que compara la secuencia amino acídica ingresada al programa

Tabla 5.- Características de cada gen en estudio.

Nombre gen	Homólogo en <i>S. cerevisiae</i>	Gen			Proteína		Resultados CDD	
		Tamaño DNA genómico (pb)	Tamaño ORF (pb)	Exones/Intrones	Número aminoácidos	PI - PM (kDa)	Tipo de dominio (código CD)	E-value
<i>ERG10A</i>	<i>ERG10</i>	1727	1212	6/5	403	7,65 - 42	<i>thiolase</i> (cd00751)	3.53e-178
<i>ERG10B</i>	<i>ERG10</i>	2212	1296	8/7	431	7,65 - 44,39	<i>thiolase</i> (cd00751)	1.61e-174
<i>HMGS</i>	<i>HMGS</i>	2430	1404	11/10	467	5,75 - 50,8	<i>initiating condensing enzymes</i> (cd00827)	7.17e-61
<i>MVK</i>	<i>ERG13</i>	1279	948	5/4	315	5,38 - 33,8	<i>mevalonate kinase</i> (PLN02677)	1.28e-46
<i>PMK</i>	<i>ERG8</i>	2227	1491	7/6	496	5,37 - 54	<i>phosphomevalonate kinase, ERG8</i> (TIGR01219)	3.92e-104
<i>MVD</i>	<i>ERG11</i>	1516	1206	3/2	401	5,75 - 43,4	<i>diphosphomevalonate decarboxylase</i> (TIGR01240)	2.21e-108

contra secuencias de dominios proteicos cuya función es conocida. El primer resultado para cada uno de los genes traducidos se presenta en la Tabla 5. Para todos los genes en estudio los resultados obtenidos se corresponden con la función esperada y presentan un *E-value* menor que E^{-40} , lo que indica que este resultado no es al azar.

El análisis en esta base de datos se realiza por alineamiento contra secuencias de función y estructura ya identificados provenientes de diferentes bases de datos. En los casos en que la secuencia se encuentra en la base de datos propia del programa (cuyo código de dominio comienza con "cd"), el programa también arroja un alineamiento que muestra residuos del sitio activo y del dominio de dimerización (si lo hay) que se encuentran conservados. Las Figuras 2, 3 y 4 presentan las secuencias de la región codificante de los genes *ERG10A*, *ERG10B* y *HMGS* de *X. dendrorhous*, respectivamente, y se muestra también el péptido que estaría codificado por esta secuencia junto con los residuos conservados según lo encontrado por CDD Search. Como se puede ver, las proteínas codificadas por estos tres genes mantienen conservados residuos del sitio activo de la proteína, marcados en amarillo, y además muestran conservación en los residuos relacionados con la interfaz del dímero.

En el caso de las proteínas codificadas por *ERG10A* (Figura 2) y *ERG10B* (Figura 3) ambas presentan la triada C-H-C que correspondería a los aminoácidos que interactúan con la molécula de acetil-CoA durante la catálisis, según se ha observado en los cristales obtenidos de la tiolasa biosintética de *Zoogloea ramigera* (código PDB 1DM3, Modis y Wierenga, 2000). En esta familia de enzimas, aquellas de actividad biológica biosintética y de actividad degradativa comparten el mismo mecanismo catalítico, con un sitio activo formado por cuatro *loops*, aportando cada uno de ellos al sitio activo con un residuo catalítico (Haapalainen y col., 2006).

En la tiolasa deducida a partir del gen *ERG10A*, éstos corresponden a Cys-101, Asn-326, His-358 and Cys-388 y en aquella deducida a partir de *ERG10B* a Cys-125, Asn-357, His-389 and Cys-417. Durante la catálisis ocurren dos reacciones principales, primero una cisteína

ERG10A

```

ATGCCATCTGGAAAGTCCAAGATCTTGCAAAAGAACCGGAACGATGTGGTCATCTGTTCCGGCCGTTCGAACGCCCATAAAC < 80
M P S G K S K I L Q K N A N D V V I C S A V R T P I T
      10      20      30      40      50      60      70
CAGGGCACGAAAAGGAGGCTTGAAGGATACGCTTCCGGAAGATCTCCTGGTGGCTGTGTTCAAGGCTACGCTCGAGAGAT < 160
R A R K G G L K D T L P E D L L V A V F K A T L E R S
      90     100    110     120     130     140     150
CCAAGTTGACCCGTCGTTGATTGACGATATCGCTGTGCGAAATGTCTTCCGCTGGAGGAGGTGCGAACGTGGCTCGA < 240
K V D P S L I D D I A V G N V L P P G G G A N V A R
      170     180    190     200     210     220    230
ATGGCTCAGCTTCGAGCAGGGATCCCTCATACTGCGTCTTTGAACACGGTCAACAGACAGTGTTCGCTCCTCTCTCCAAGC < 320
M A Q L R A G I P H T A S L N T V N R Q C S S S L Q A
      250     260     270     280    290    300     310
GATCACTCAGATCGCCAACTCGATTCGATGTGGTCAGATCTCTATTGGTATTGGGGCTGGAGTTCGAGTTCGATGACGACAC < 400
I T Q I A N S I A C G Q I S I G I G A G V E S M T T H
      330     340     350     360     370     380     390
ACTACGGAGCTGGTGTCTTACCTGAGAAGATCTCGGAAGATGTGCTCTCCAACCAGGAAGCCAGGACGTGTGATTCCG < 480
Y G A G V L P E K I S E D V L S N Q E A Q D V L I P
      410     420     430     440     450     460     470
ATGGGGATCACGTCGAGAACGTTGCCAAAGAGTTTGGAGTGACTAGAAAGGAGCAGGACGAGTTTGCAGCAAAGTCTTA < 560
M G I T S E N V A K E F G V T R K E Q D E F A A K S Y
      490     500     510     520     530     540     550
TCAGAAGGCTTTTGTCTGCGAGAAAGGTTGGCCACTTTAAGGAGGAGATCGTTCCCGTCAAGACCGAGATTGTGATCCAA < 640
Q K A F A A R K V G H F K E E I V P V K T E I V D P K
      570     580     590     600     610     620     630
AGTCGGGAGAGACAAAGACGGTGTGGTGGACAGGATGACGGGATCCGAGATGGGATGACGGCCGAGTTCGCTGGCAAAG < 720
S G E T K T V L V D E D D G I R D G M T A E S L A K
      650     660     670     680     690     700     710
TTGAAGCCGGCGTTCTCGAAGGAGGGAAGCAGCATGTGGCAACGCGTCCCAGGTATCTGACGGGGCTGCCGCGGTGTT < 800
L K P A F S K E G S T H A G N A S Q V S D G A A A V L
      730     740     750     760     770     780     790
GCTCGTCCGGCGGGATGTGGCGGAGAAGCTGAAGCTCCGATCTTGGGCAAGTTTGTGACGACCCGGGTACGCTGGTGTGC < 880
L V R R D V A E K L K L P I L G K F V T T G Y A G V P
      810     820     830     840     850     860     870
CTCCAAGGTGATGGGGATCGGGCCGGGTGGCGATCCCGAAGCGTGTGGCGAACGCGGGATCGAGTCTTCGGACGTT < 960
P K V M G I G P A V A I P K A L A N A G I E S S D V
      890     900     910     920     930     940     950
GACTTTTGGGAGATCAACGAGGCGTTTGCCTCCAGGCGGTCTACTCTGTCAAGAAGCTGGGGTTGGACTTTGAGAAGGT < 1040
D F W E I N E A F A S Q A V Y S V K K L G L D F E K V
      970     980     990    1000    1010    1020    1030
CAACCTGGGGGAGGGCGATCGCGCTTGGTTCATCCGTTGGGAGCGACCGGGCGAGACAGTTGCGACTGCGCTTGCCC < 1120
N P G G G A I A L G H P L G A T G A R Q V A T A L A H
      1050    1060    1070    1080    1090    1100    1110
ATGCCAAGCGATCTGGCGAGAAGGTGTTTGTGACGAGTATGTGCATTGGGTCTGGTATGGGTCTTGCCTCGGTGTTTGTG < 1200
A K R S G E K V F V T S M C I G S G M G L A S V F V
      1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190
AATGAGCAGTGA < 1212
N E Q *
      1210

```

Figura 2.- Secuencia codificante del gen *ERG10A* de *X. dendrorhous*. En la parte superior se presenta la secuencia nucleotídica y bajo ella está la secuencia aminoácidica codificada por ella. En la secuencia del péptido se marcan en amarillo los residuos conservados del sitio activo de la proteína tiolasa y subrayados, los que participan de la interfaz del dímero según lo indicado por el programa CDD Search.

ERG10B

ATGCTGCGCCTTCCGCTGACCACCATCAAGATTCACCTTCTCCAGTCTTTTCTATCCGTCATCTCTTGCTCCAT < 80
 M S A A F R L T T I K I H L L P V F S I R P S L A S I
 10 20 30 40 50 60 70

TAGATCGTACTCTAGCATGTCTCTTCTTACTCCCCAGGAAGTCTTCATCGTCTCGGCCGTTCGAACGCCATCGGAATC < 160
 R S Y S S M S S F T P Q E V F I V S A V R T P I G T L
 90 100 110 120 130 140 150

TCAACGGTGCCTCAAGTCCCAGACTGGTGTCAGCTCGAACACCGCCGTCAAGGCCCATCTCTCGAGCTGGTATC < 240
 N G A L K S Q T G V Q L G T T A V K A A I S R A G I
 170 180 190 200 210 220 230

GAGCCAGCGCCGTTGAGGAGCTTTACATGGGACAGGTCAATCAAGCCGGAGCCGGACAGTCTCCCGCTCGACAAGTCGC < 320
 E P S A V E E L Y M G Q V I Q A G A G Q S P A R Q V A
 250 260 270 280 290 300 310

CCTCGCCGCCGGATGCGAGGCTTCGACCGATTCTACTACCATCAACAAGGTCTGCGCTTCTGGTATGAAGGCCATCACCT < 400
 L A A G C E A S T D S T T I N K V C A S G M K A I T L
 330 340 350 360 370 380 390

TGGCCGCTCAGGGCATGATGCTTGGTGGTTTCGAGGTTCCAGAAGAGGGGAGTCTGCTGCTGCGGTGGAATGGAGAGC < 480
 A A Q G M M L G G F G G S Q K R G V V V A G G M E S
 410 420 430 440 450 460 470

ATGTCCAACGCTCTTTCTCGTTCCTCCGAGCTGTCCCTGGCTTTGGAGGTTTCCAGACTAAGGACTCTGTCCAGACCGA < 560
 M S N A P F L V P R A V P G F G G F Q T K D S V Q T D
 490 500 510 520 530 540 550

TGGTCTTTGGGATGTATCCAACAACCTCCCATGGGTAAGTGCGCCGAGCACATTGCTGCCAAGTCTCGATCTCTCGAG < 640
 G L W D V S N N F P M G N C A E H I A A K F S I S R E
 570 580 590 600 610 620 630

AGTCTCAGGACGAGCACGCGCTCGAGTCTTACCGACGAGCAGCCGAGGCTGGTCTACTGGCAAGTTCGAGGCCGAGATC < 720
 S Q D E H A L E S Y R R A A E A W S T G K F E A E I
 650 660 670 680 690 700 710

GCTCCGGTCACCCCTCAAGGCCCAAGGGCGAGACCGTTGTGGCTGAGGATGAGGACTACAAGAAGTTCATCCCTCAAA < 800
 A P V T L K G P K G E T V V A E D E D Y K K V I P S K
 730 740 750 760 770 780 790

GGTTCACCCTTGAAGCCTGTGTTCAGCGAGAGGGTGAACCATCACTCCTGCCAACCCCTCGGGTATCAACGACGGTG < 880
 V P T L K P V F Q R E G G T I T P A N A S G I N D G A
 810 820 830 840 850 860 870

CCAGTGTGCTGTTTTGATGACCGGAGAGAAGGTTTCAGGAGCACGGAGTCAAGCCTATGGCCAAGATCCTTGGGTTTGCC < 960
 S A V V L M T G E K V Q E H G V K P M A K I L G F A
 890 900 910 920 930 940 950

GACGCTGCCATCGCTCCTATCGAGTTCCTCCATCGCCCTACCGTTGCTATCCCATCGCTTTGAAAACGCCGGTGTCTC < 1040
 D A A I A P I E F P I A P T V A I P I A L K N A G V S
 970 980 990 1000 1010 1020 1030

TGCTGACGATGTGCGCTCTACGAGATCAACGAGGCTTTCTCTGTCGTTGCCCGGGCTGCCGAGAAGATCCTCAACATTG < 1120
 A D D V A L Y E I N E A F S V V A R A A E K I L N I D
 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110

ATCCCTCAAGTTGAACGTCAACGGAGGAGGTGTCGCTCTTGGTCAACCGATCGGATCGTCTGGATGCCGAATGTTGTC < 1200
 P S K L N V N G G G V A L G H P I G S S G C R I V V
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190

TCCCTTGTTCATGCTCTTTCAGCCCGACAGATCGGTGTTGCGGTATCTGCAACGGAGGAGGAGCCGCTACTGCTGTCGT < 1280
 S L V H A L Q P G Q I G V A G I C N G G G A A T A V V
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270

CATCCAGAGGCTCTAA < 1296
 I Q R L *
 1290

Figura 3.- Secuencia codificante del gen *ERG10B* de *X. dendrorhous*. En la parte superior se presenta la secuencia nucleotídica y bajo ella, la secuencia aminoacídica. En la secuencia del péptido, se marcó en amarillo los residuos conservados del sitio activo de la proteína tiolasa y subrayados, los que participan de la interfaz del dímero según lo indicado por el programa CDD Search.

HMGS

ATGTACACTTCTACTACCGAACAGCGACCTAAAGATGTTGGAATTCTCGGTATGGAGATCTACTTTCTCGACGAGCCAT < 80
 M Y T S T T E Q R P K D V G I L G M E I Y F P R R A I
 10 20 30 40 50 60 70

CGCTCACAAAGGATCTCGAGGCTTTTGATGGGGTTCCTTCCGGAAAGTACACCATCGGTCTCGGCAACAACCTTCATGGCCT < 160
 A H K D L E A F D G V P S G K Y T I G L G N N F M A F
 90 100 110 120 130 140 150

TCACCAGCAGACTGAGGACATCAACTCGTTCGCCTTGAACGCTGTTTCCGGTCTTCTATCAAAGTACAACGTTGATCCC < 240
 T D D T E D I N S F A L N A V S G L L S K Y N V D P
 170 180 190 200 210 220 230

AAGTCAATCGGTGCAATTGATGTCGGAAGTGAAGTCCATCATTGACAAGTCCAATCTGTCAAGACAGTCCCTTATGGACTT < 320
 K S I G R I D V G T E S I I D K S K S V K T V L M D L
 250 260 270 280 290 300 310

GTTCGAGTCCACGGCAACACAGATATTGAGGGTATCGACTCCAAGAATGCCTGCTACGGTCTACCGCGGCCCTGTTCA < 400
 F E S H G N T D I E G I D S K N A C Y G S T A A L F N
 330 340 350 360 370 380 390

ATGCCGTCAACTGGATCGAGTCACTCTTGGGACGGAAGAAATGCCATTGTCTTCTCGGGAGACATTGCCATCTACGCC < 480
 A V N W I E S S S W D G R N A I V F C G D I A I Y A
 410 420 430 440 450 460 470

GAGGGTGTGCCCCGACCTGCCGGAGGTGTGCTGCTTGGCCATCTCATCGGACCCGACGCTCCCGTCTTTCGAGCC < 560
 E G A A R P A G G A G A C A I L I G P D A P V V F E P
 490 500 510 520 530 540 550

CGTCCACGAAACTTCATGACCAACGCTTGGGACTTCTACAAGCCTAATCTTCTTGAATACCCCATTTGTCGATGGAC < 640
 V H G N F M T N A W D F Y K P N L S S E Y P I V D G P
 570 580 590 600 610 620 630

CTCTCTCCGTCACTTCCTACGTCAACGCCATTGACAAGCCCTATGAAGCTTACCGAACAAGTATGCCAAGCGATTGGA < 720
 L S V T S Y V N A I D K A Y E A Y R T K Y A K R F G
 650 660 670 680 690 700 710

GGACCAAGACTAACGGTGTACCAACGGACACACCGAGGTTGCCGGTGTCAAGTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT < 800
 G P K T N G V T N G H T E V A G V S A A S F D Y L L F
 730 740 750 760 770 780 790

CCACAGTCTTACGGAAGCAGGTTGTCAAAGGCCATGCCGACTTTTGTACAATGACTTCCGAAACAACCCCAACGACC < 880
 E S P Y G K Q V V K G H A R L L Y N D F R N N P N D P
 810 820 830 840 850 860 870

CGGTTTTTGTGAGGTGCCAGCCGAGCTTGCTACTTTGGACATGAAGAAAAGTCTTTCAGACAAGAATGTCGAGAAATCT < 960
 V F A E V P A E L A T L D M K K S L S D K N V E K S
 890 900 910 920 930 940 950

CTGATTGCTGCTCCAAGTCTTCTTTCAACAAGCAGGTTGAGCCTGGAATGACCACCGTCCGACAGCTCGGAAACTTGTA < 1040
 L I A A S K S S F N K Q V E P G M T T V R Q L G N L Y
 970 980 990 1000 1010 1020 1030

CACCGCTCTCTCTCGGTGCTCTCGCAAGTTTGTCTTAATGTTCTCGGTGACGAGCTCGTCCGCAAGCGCATTTGCTC < 1120
 T A S L F G A L A S L F S N V P G D E L V G K R I A L
 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110

TCTACGCCACGGATCTGGAGCTGCTGCTCTTTCTATGCTCTTAAGTCAAGAGCTCAACCGCTTTCATCTCTGAGAAG < 1200
 Y A Y G S G A A A S F Y A L K V K S S T A F I S E K
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190

CTTGATCTCAACAACCGATTGAGCAACATGAAGATTGTCCTTGTGATGACTTTGTCAAAGCTCTGAAGGTCGGAAGA < 1280
 L D L N N R L S N M K I V P C D D F V K A L K V R E E
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270

GACTCACAACGCCGTGTCATATTCGCCCATCGGTTTCGCTTGACGATCTCTGGCCTGGATCGTACTACTTTGGGAGAGATTG < 1360
 T H N A V S Y S P I G S L D D L W P G S Y Y L G E I D
 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350

(continuación)

Figura 4.- Secuencia codificante del gen *HMGS* de *X. dendrorhous*. En la parte superior se presenta la secuencia nucleotídica y bajo ella, la secuencia de aminoácidos codificada. En la secuencia del péptido se marcan en amarillo los residuos conservados del sitio activo de la proteína HMG-CoA sintasa y subrayados, aquellos que participarían de la interfaz del dímero según lo indicado por el programa *CDD Search*. Además, en verde se marcan otros residuos correspondientes al sitio activo de esta proteína, encontrados manualmente.

conservada altamente reactiva [PDB: 1dm3]) es acetilada, con una segunda cisteína (Cys-378) que dona un protón al Co-A saliente. La segunda reacción lleva a la condensación de dos moléculas de acetil-CoA cuando la cisteína cargada desprotona a un segundo acetil-CoA que recibe el acetilo que se encontraba unido a la cisteína 89 (Jiang y col., 2008).

En el caso de la proteína que sería codificada por el gen *HMGS*, al revisar el alineamiento entregado por *CDD Search*, ésta no mostró la tríada catalítica C-H-E que ha sido descrita para la estructura de *HMGS* de *Staphylococcus aureus* (PDB: 1XPL, Theisen y col., 2004) y de *Homo sapiens* (PDB: 2P8U, Shafqat y col., 2010), si no un motivo C-N-N. Por esta razón se realizó un alineamiento usando el programa *PROMALS3D* (Pei y col., 2008) contra las estructuras disponibles y se buscó manualmente los residuos correspondientes a la tríada catalítica, los que se muestran en la Figura 4.

Como se puede observar en la Tabla 5, solo tres de los seis genes en estudio mostraron similitud con dominios en la base de datos "cd", por lo que para analizar la conservación de aminoácidos importantes para la función de las proteínas codificadas en los genes *MVK*, *PMK* y *MVD* fue necesario apoyarse de la información disponible en la literatura. En las Figuras 5, 6 y 7 se presentan las secuencias codificantes de los genes *MVK*, *PMK* y *MVD* de *X. dendrorhous*, en las que también se muestra la secuencia de la proteína que éstos codificarían. Una característica común en las proteínas codificadas por estos genes, es el uso de ATP en la reacción de catálisis. En todas ellas fue posible identificar la región que participaría de la unión de ATP la que se marcó en verde en cada figura (Tsay y Robinson, 1990).

MVK

```

ATGGCATTCTTGTATTGTTGGTGCATTAGACAAAGGGAAGCCAAAGTGAGCCGTTTCGAGTTGACGGCTCGATCTGCGCT < 80
M A F L Y L L V L L S K G K P S E P F E L T A R S A L
      10      20      30      40      50      60      70

TCCGATGGGAGCTGGTCTGGGTTTCATCCGCCGCTCTATCGACCTCTCTCGCCCTAGTCTTTCTTCTCCACTTTTCTCACC < 160
P M G A G L G S S A A L S T S L A L V F L L H F S H L
      90     100     110     120     130     140     150

TCAGTCCAACGACGACTGGCAGAGAATCAACAATCCCGACGGCCGACACAGAAGTAATTGACAAATGGGCGTTCTTAGCT < 240
S P T T T G R E S T I P T A D T E V I D K W A F L A
      170     180     190     200     210     220     230

GAAAAAGTCATCCATGGAATCCGAGTGGGATTGATAACGCGGTGAGTACGAGAGGAGGCGCTGTGCTTTCAAAGAAA < 320
E K V I H G N P S G I D N A V S T R G G A V A F K R K
      250     260     270     280     290     300     310

GATTGAGGGAAAAACAGGAAGGTGGAATGGAAGCGATCAAGAGCTTACATCCATTTCGATTCCTCATCACAGATTCTCGTA < 400
I E G K Q E G G M E A I K S F T S I R F L I T D S R I
      330     340     350     360     370     380     390

TCGGAAGGGATACAAGATCTCTCGTTGCAGGAGTGAATGCTCGACTGATTTCAGGAGCCAGAGGTGATCGTCCCTTTGTTG < 480
G R D T R S L V A G V N A R L I Q E P E V I V P L L
      410     420     430     440     450     460     470

GAAGCGATTTCAGCAGATTGCCGATGAGGCTATTCGATGCTTGAAGATTTCAGAGATGGAACGTGTGTCATGATCGATCG < 560
E A I Q Q I A D E A I R C L K D S E M E R A V M I D R
      490     500     510     520     530     540     550

ACTTCAAAACTTGGTCTCCGAGAACCACGCACACCTAGCAGCACCTGGCGTGTCCACCCATCCCTCGAAGAGATTATCC < 640
L Q N L V S E N H A H L A A L G V S H P S L E E I I R
      570     580     590     600     610     620     630

GGATCGGTGCTGATAAGCCTTTTCGAGCTTCGAACAAAGTTGACAGGCGCCGGTGGAGGTGGTTGCGCTGTAACCCCTGGTG < 720
I G A D K P F E L R T K L T G A G G G G C A V T L V
      650     660     670     680     690     700     710

CCCGATGACTTCTCGACTGAAACCCCTTCAAGCTCTTATGGAGACGCTCGTTCAATCATCGTTTCGCCCTTATATTGCCCG < 800
P D D F S T E T L Q A L M E T L V Q S S F A P Y I A R
      730     740     750     760     770     780     790

AGTGGGTGGTTTCAGGCGTCGGATTCCCTTTCATCAACTAAGGCCGATCCGGAAGATGGGAGAACAGACTTAAAGATGGGC < 880
V G G S G V G F L S S T K A D P E D G E N R L K D G L
      810     820     830     840     850     860     870

TGGTGGGAACGGAGATTGATGAGCTAGACAGATGGGCTTTGAAAACGGGTGCTTGGTCTTTTGCTTGA < 948
V G T E I D E L D R W A L K T G R W S F A *
      890     900     910     920     930     940

```

Figura 5.- Secuencia codificante del gen *MVK* de *X. dendrorhous*. En la parte superior se presenta la secuencia nucleotídica y bajo ella, la secuencia de aminoácidos. En la secuencia del péptido, se destaca en verde la región que interactúa con el ATP durante la catálisis y en amarillo, los residuos que serían parte del sitio activo de esta proteína (Miziorko, 2011).

PMK

ATGACCGCTATAGCCACCACCCTATATCCTCCCGAGGAAAGTTCTCCTAGCAGGTGGATACCTTGTGCTAGACCCAGT < 80
 M T A I A T T A I S S P G K V L L A G G Y L V L D P V
 10 20 30 40 50 60 70

CCACACAGGTCTCGTGGTTTCGACCTCATCCAGGTTCTACACTGTTATTCGATCTCTTCCGCCTTCTTCCCTCGACAT < 160
 H T G L V V S T S S R F Y T V I R S L P P S S S S T S
 90 100 110 120 130 140 150

CCACGAATACTATAGTTGTTCAATCTCCCGAGTTCGAATCAGCTCAATGGAGATATCAATTCGACCATGTTTCAGGGAGG < 240
 T N T I V V Q S P Q F E S A Q W R Y Q F D H V S G R
 170 180 190 200 210 220 230

ATTACCGAGATGAAAAATGATTTGCACGCTGGAACGGACGAAATAAATTTGTGTTGATCGCGCTTGAGAAGACGATCAG < 320
 I T E M E N D L H A G T G R N K F V L I A L E K T I R
 250 260 270 280 290 300 310

AGTCGCCGGAGAGTTGATAGGTTGGGAAAAGGTCAATGAATCTCTTAAAGATGGATGGGTTCATCGTTATCGTAGGAGACA < 400
 V A G E L I G W E K V N E S L K D G W V I V I V G D N
 330 340 350 360 370 380 390

ATGATTTCTATTACAGCGAAAACAGCTTGAATTCGGTGGCTTCTCTCTCTTTGACTCTCTCGCCCATCTTCCGCCA < 480
 D F Y S Q R K Q L E F R G L P L S F D S L A H L P P
 410 420 430 440 450 460 470

TTCTCGAAAACAAATGAATCACTCGCCAACGTGCATAAAATGGCCCTCGGATCCTCTGCCGCTCTCATCACTTCTCTCTG < 560
 F S K T N E S L A N V H K T G L G S S A A L I T S L C
 490 500 510 520 530 540 550

TGCCGCTCTTCTTCCACCTCGGGGCGGTCTCTCCCTCATCTTCAAACCTTCATCGGCTGACCCTATGTCAGAAGAAA < 640
 A A L L L H L G A V S P L I F K P S S A D P M S E E R
 570 580 590 600 610 620 630

GAAGAGAGATGAGATTGGTACACAACGTCGCTCAGTATGCTCATTGTTGGCCAGGGCAAAGTCGGAAGTGGATTGAC < 720
 R E M R L V H N V A Q Y A H C L A Q G K V G S G F D
 650 660 670 680 690 700 710

GTAAGCAGTGCAGTGGGGAAGTCAGATCTACAGGAAATTTGAAAAGGATGCGTTGGAAGAGCTTATGGAGGATGAACA < 800
 V S S A V W G S Q I Y R K F E K D A L E E L M E D E Q
 730 740 750 760 770 780 790

GTCCGATCGAACATTGGTCCCAACCCTGTGCGCTGAGAACCCGAGATGGACCAACCAGGTCACTCCGTTCTCTTTCCAC < 880
 S D R T L V P T L S P E N P R W T N Q V T P F S F P P
 810 820 830 840 850 860 870

CTCGTTTACAGTTGCTTCTGGCCGACGTCGACGCTGGAAGCGACAGCCTTCCCTTGTGGAAAGTTCTTAAATGGAAA < 960
 R F R L L L A D V D A G S D T P S L V G K V L K W K
 890 900 910 920 930 940 950

AAGACAACCCTTCACAAGATTCTTGGTCGACCATGATGGTTCAATGATGACCTCGCTTCCAGATTAGAGCTTGG < 1040
 K D N P S Q D S W S T I D G F N D D L A S Q I R A L G
 970 980 990 1000 1010 1020 1030

TCGATTAGCCGCTTCTGATCTGTATCGTACGAGACAGCTGTCCAGGACTTCATTCGAAAACCTGCAGAACCTTCATCGA < 1120
 R L A A S D P V S Y E T A V Q D F I R K P A E P S S S
 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110

GCAATCTCAGCCGTTTATCAAGATCTTCCAATCTATTCAAGCCGCAAGCCAATCTATCCGACGATCAATGAAATGATG < 1200
 N S Q P F I K I F Q S I Q A A S Q S I R R S M K L M
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190

GGAGAATCAGCCGCGTACCTATTGAGCCTGATGAGCAAACGGAATTGCTTGACAAATGCCAGACTCTACCTGGTGTCTT < 1280
 G E S A G V P I E P D E Q T E L L D K C Q T L P G V L
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270

GGGTGTGGAGTACCCGGAGCGGGAGGATACGATGCCCTGTGGTCTCATTCTCGATACCCCTCCTCGTGCACAGCAC < 1360
 G C G V P G A G G Y D A L W V L I L D T P S S S T A Q
 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350

AAGTTGTAGAGAAGACATGGACGGAACACACAGGTCTATCTGTTTGTCTCTTCTCGCACATGAGGATCCGATGGGTGGT < 1440
 V V E K T W T E H T G L S V C P L L A H E D P M G G
 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430

(continua)

CTTCAAATTCATGATGTAGATCATGTCACCGGTTTGAGGGAATGTCTGTAG < 1491

L Q I H D V D H V T G L R E C L *
 1450 1460 1470 1480 1490

Figura 6.- Secuencia codificante del gen *PMK* de *X. dendrorhous*. En la parte superior se presenta la secuencia nucleotídica y bajo ella, la secuencia de aminoácidos. En la secuencia del péptido se destacan regiones conservadas entre la proteína *PMK* de *X. dendrorhous* y *pErg8* de *S. cerevisiae* y de *Schizosaccharomyces pombe* según lo estudiado por Houten y Waterham (2001). En amarillo se destacan aquellas regiones conservadas entre diversas proteínas con actividad quinasa y en verde se indica el motivo de interacción con ATP.

MVD

ATGGTTCATATCGCTACTGCCTCGGCTCCCGTTAACATGCGTGTATCAAGTACTGGGGTAAACGGGATACCAAGTTGAT < 80
 M V H I A T A S A P V N I A C I K Y W G K R D T K L I
 10 20 30 40 50 60 70

TCTCCCTACAACTCCTCCTTGTCTGTCACTCTCGACCAGGATCACCTCCGATCGACGACGTCTTCTGCTTGTGACGCCT < 160
 L P T N S S L S V T L D Q D H L R S T T S S A C D A S
 90 100 110 120 130 140 150

CGTTCGAGAAGGATCGACTTTGGCTTAACGGGATCGAGGAGGAGGTC AAGGCTGGTGGTGGTGGATGTCTGCATCAAG < 240
 F E K D R L W L N G I E E E V K A G G R L D V C I K
 170 180 190 200 210 220 230

GAGATGAAGAAGCTTCGAGCGCAAGAGGAAGAGAAGGATGCCGGTCTGGAGAACTCTCATCTTTCAACGTGCACCTTGC < 320
 E M K K L R A Q E E E K D A G L E K L S S F N V H L A
 250 260 270 280 290 300 310

GTCTTACAACAACCTCCCGACTGCCGCTGGACTTGCTTCTCCGCTTCCGGTCTAGCTGCGTGGTTCGCTCGCTCGCCT < 400
 S Y **N N F P T A A G L A S S A S G** L A A L V A S L A S
 330 340 350 360 370 380 390

CGTCTACAACCTCCCAACGAACGCATCCGAACCTCTCGCTCATCGCCCGACAAGTTCTGGTTCGCTGCCGATCGCTC < 480
 L Y N L P T N A S E L S L I A R Q G S G S A C **R** S L
 410 420 430 440 450 460 470

TTCGGCGGGTTCGTTGCTTGGGAACAGGCAAGCTTTCCTCTGGAACCGACTCGTTCGCTGTTTCAGGTCGAGCCAGGGA < 560
 F G G F V A W E Q G K L S S G T D S F A V Q V E P R E
 490 500 510 520 530 540 550

AACTGGCCCTCACTCCACGCGCTGATCTGTGTAGTTTCCGACGAGAAAAGACGACGGCCTCGACGGCAGGCATGCAAA < 640
 H W P S L H A L I C V V S D E K K T T A **S** T A G M Q T
 570 580 590 600 610 620 630

CCACGGTGAACACCTCGCCTTTGCTCCAACACCGAATCGAACACGTCGTTCCAGCCGGATGGAGGCCATCACCCAGGCG < 720
 T V N T S P L L Q H R I E H V V P A R M E A I T Q A
 650 660 670 680 690 700 710

ATCCGGGCAAGGATTTGACTCGTTTCGCAAGATCACCATGAAGACTCCAACAGTTCCACGCCGTCTGCCTCGATTTC < 800
 I R A K D F D S F A K I T M K D S N Q F H A V C L D S
 730 740 750 760 770 780 790

GGAACCCCGATCTTTTACCTGAACGATGTCTCCCGATCGATCATCCATCTCGTCACCGAGCTCAACAGAGTGTCCGTC < 880
 E P P I F Y L N D V S R S I I H L V T E L N R V S V Q
 810 820 830 840 850 860 870

AGGCCGGGGTCCCGTCTTGGCCCTACACGTTTCGACGCCGGGCCGAACGCGGTGATCTACGCCGAGGAATCGTCCATG < 960
 A G G P V L A A Y T F **D** A G P N A V I Y A E E S S M
 890 900 910 920 930 940 950

CCGGAGATCATCAGGTTAATCGAGCGTACTTCCCGTTGGGAACCGCTTTCGAGAACCCTTCGGGGTTAACACCGAAGG < 1040
 P E I I R L I E R Y F P L G T A F E N P F G V N T E G
 970 980 990 1000 1010 1020 1030

CGGTGATGCCCTGAGGGAAGGCTTTAACAGAACGTCGCCCGGTGTTTCAGGAAGGGAAGCGTCGCCCGGTTGATTCACA < 1120
 G D A L R E G F N Q N V A P V F R K G S V A R L I H T
 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110

CCCGGATCGGTGATGGACCCAGGACGTATGGCGAGGAGGAGCCGTGATCGGCGAAGACGGTCTGCCAAAGGTCGTCAAG < 1200
 R I G D G P R T Y G E E E S L I G E D G L P K V V K
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190

GCTTAG < 1206
 A *

Figura 7.- Secuencia codificante del gen MVD de *X. dendrorhous*. En la parte superior se presenta la secuencia nucleotídica y bajo ella, la secuencia de aminoácidos. En amarillo se destacan residuos que serían parte del sitio activo (Krepkiy y Miziorko, 2004) y en verde, la porción que interactúa con el ATP (Cordier y col., 1999).

Entre las estructuras resueltas de la enzima MVK se encontró que los residuos Lys-13, Ser-146, Glu-193 y Asp-204 (numeración según MVK de rata, PDB: 1KVK, Fu y col., 2002) son importantes para la función del sitio activo. Estos residuos se encuentran conservados en las secuencias de las proteínas de *Methanocaldococcus jannaschii* (PDB: 1VIS) y *Methanosarcina mazei* (PDB: 4HAC). Sin embargo, sólo se encontró tres de ellos en la secuencia de *X. dendrorhous*, tal como se puede apreciar en la Figura 5, marcados en amarillo, a excepción de la Ser-146 que es parte de la región de unión a ATP y se encuentra en verde.

Las proteínas con actividad quinasa que tienen fosfomevalonato como sustrato (PMK) han sido clasificadas en dos grupos no ortólogos que debido a la gran diferencia a nivel de secuencia entre ellas. La secuencia del gen *PMK* de *X. dendrorhous* codificaría una proteína homóloga al grupo de proteínas PMK de plantas, hongos y bacterias, con una estructura que las hace pertenecer a la familia de GHMP quinasa (galactoquinasa, homoserina quinasa, mevalonato quinasa, "*phosphomevalonate*" quinasa) (Miziorko, 2011). En la Figura 6 se resaltó regiones mencionadas por Houten y Waterham (2001) como conservadas dentro de este grupo de proteínas, incluyendo la región de unión a ATP marcada en verde. Entre estas regiones conservadas se encuentran las que conformarían el surco del sitio activo de la proteína, observadas en el cristal de la proteína PMK de *S. pneumoniae* (PDB: 1K47, Romanowski y col, 2002).

Para la proteína MVD se han encontrado los residuos del sitio activo por mutagénesis sitio dirigida de la proteína de *S. cerevisiae* (Krepkiy y Miziorko, 2004) y a partir del estudio de las estructura de la proteína humana (PDB: 3D4J, Voynova y col., 2008) y de *S. epidermidis* (PDB: 3QT5, Barta y col., 2011). Estos residuos se marcan en amarillo en la Figura 7. Además, estudios de alineamiento de secuencias entre proteínas con la misma función han descrito regiones conservadas comunes incluyendo el péptido de interacción con ATP marcado en verde (Cordier y col., 1999).

En resumen, los genes que codifican las enzimas de la ruta MVA en *X. dendrorhous* fueron identificados en el genoma de la levadura y se pudo conocer su estructura génica, además de identificar características conservadas importantes para la función a nivel de proteína.

3. 1. 1 Caracterización bioinformática de tiolasa

Las enzimas con actividad tiolasa han sido divididas en dos grupos principales: (i) Tio-lasas de tipo I o 3-cetoacil-CoA tiolasa, involucradas en funciones catabólicas y (ii) Tio-lasas tipo II o acetil-CoA acetiltransferasas, que participan de procesos anabólicos (Peretó y col., 2005). De éstas, solo las tiolasa de tipo II están involucradas en la ruta del mevalonato. Para identificar que tipo de tiolasa codificaría cada uno de los genes *ERG10* identificados, se utilizó la herramienta BLASTp y se evaluó el porcentaje de identidad entre las proteínas posibles de cada gen con los diferentes tipos de tiolasa en la base de datos (Tabla 6).

Tabla 6.- Resultados de BLASTp entre tiolasa (porcentaje de identidad entre proteínas).

Organismo	Proteína codificada	<i>X. dendrorhous</i>	
		Erg10Ap	Erg10Bp
<i>S. cerevisiae</i>	3-cetoacil CoA tiolasa (NP_012106.1)	50%	32%
<i>S. cerevisiae</i>	Acetil-CoA acetiltransferasa (NP_015297.1)	36%	48%
<i>Danio rerio</i>	3-cetoacil-CoA tiolasa, peroxisomal (NP_001002207.1)	55%	33%
<i>D. rerio</i>	Acetil-CoA acetiltransferasa, precursor mitocondrial (NP_001003746.1)	36%	55%
<i>Mus musculus</i>	3-cetoacil-CoA tiolasa B, precursor peroxisomal (NP_666342.1)	57%	34%
<i>M. musculus</i>	Acetil-CoA acetiltransferasa, precursor mitocondrial (NP_659033.1)	34%	53%

El porcentaje mayor en cada fila se destaca en negrita y en paréntesis se muestra el código GenBank de cada proteína.

Para apreciar mejor estos resultados se construyó un árbol filogenético (Figura 8) usando secuencias aminoacídicas de tiolasa con diferentes funciones y localización celular (Gómez, 2016). Los alineamientos se hicieron con el programa ClustalW 2.1 y el árbol filogenético se

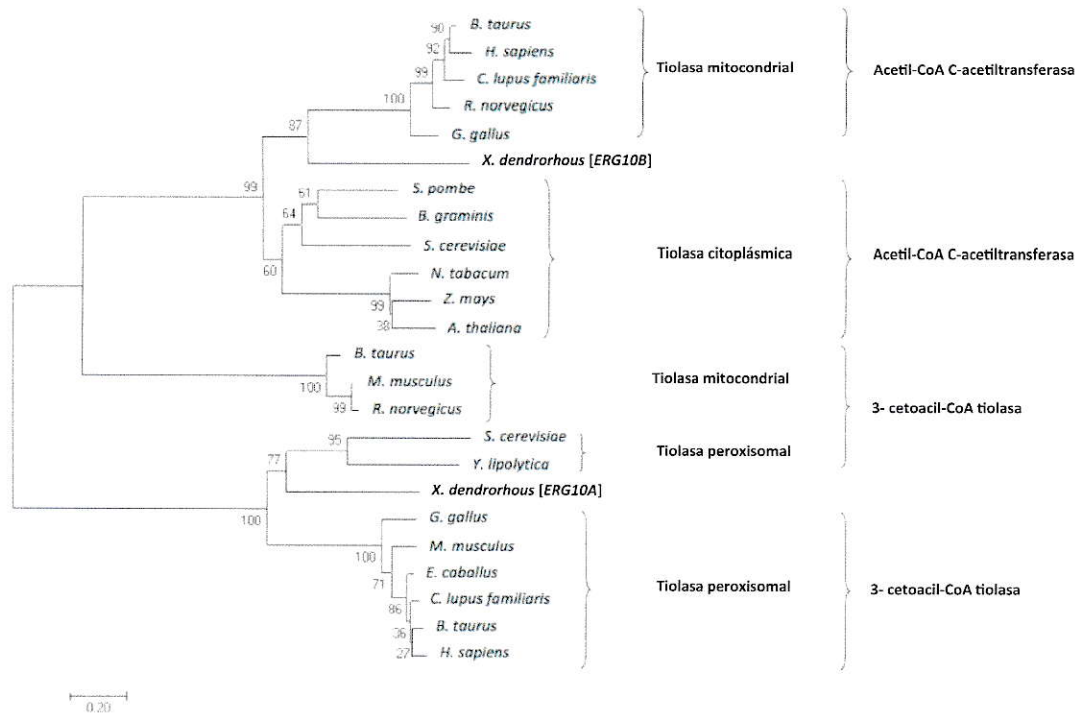


Figura 8.- Árbol filogenético de las tiolasa codificadas por *ERG10A* y *ERG10B* comparadas con otros organismos. El árbol fue construido en MEGA 6.0 usando el método de *neighbor joining* con las siguientes secuencias de aminoácidos: Tiolasa mitocondrial/acetil-CoA c-acetiltransferasa: *B. taurus* [NP_001039540.1], *H. sapiens* [BAA01387.1], *C. lupus familiaris* [XP_546539.2], *R. norvegicus* [NP_058771.2], *G. gallus* [NP_001264708.1]. Tiolasa citoplasmica/ acetil-CoA c-acetiltransferasa: *S. pombe* [Q9UQW6.1], *B. graminis f. sp. tritici* 96224 [EPQ61678.1], *S. cerevisiae* [P41338.3], *N. tabacum* [AAU95618.1], *Z. mays* [NP_001266315.1], *A. thaliana* [Q9FIK7.1]. Tiolasa mitocondrial/ 3-cetoacil-CoA tiolasa: *B. taurus* [NP_001030419.1], *M. musculus* [NP_803421.1], *R. norvegicus* [NP_569117.1]. Tiolasa peroxisomal/3-cetoacil-CoA tiolasa: *S. cerevisiae* [CAA37472.1], *Y. lipolytica* [Q05493.1], *G. gallus* [NP_001184217.1], *M. musculus* [NP_570934.1], *E. caballus* [XP_001488609.1], *C. lupus familiaris* [XP_534222.2], *B. taurus* [NP_001029491.1], *H. sapiens* [NP_001598.1]. *X. dendrorhous [ERG10A]*: tiolasa codificada por el gen *ERG10A*. *X. dendrorhous [ERG10B]*: tiolasa codificada por el gen *ERG10B*. Los números de acceso están indicados en paréntesis. Los números de cada nodo indican el porcentaje de apoyo para el nodo correspondiente luego del análisis de 1.000-*replica bootstrap* (Adaptado de Gómez, 2016).

hizo utilizando el programa MEGA 6.0 con el método de *Neighbor Joining* con 1.000 *replica-bootstrap*. Estos resultados sugieren que el gen *ERG10A* codificaría una tiolasa con actividad 3-cetoacil-CoA tiolasa, de localización peroxisomal, y el gen *ERG10B* una enzima de tipo acetil-CoA C-acetiltransferasa.

3. 1. 2 Análisis de regiones promotoras.

Se hizo una análisis de las zonas promotoras (consideradas arbitrariamente 1.050 pb río arriba del codón de inicio de traducción de la proteína codificada por el gen) que se presenta en la Figura 9. La búsqueda de posibles cajas TATA, las que se indican en color rojo, se hizo manualmente. Como uno de los mecanismos regulatorios más estudiados de la ruta del mevalonato es la vía SREBP, se buscó posibles sitios SRE de unión a SREBP en las regiones promotoras con la herramienta TF *Search* (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>). De esta forma fue posible identificar posibles sitios SRE río arriba de los genes *ERG10A*, *HMGS* y *PMK*.

Según estudios hechos por Marcoleta y col. (2011) y Bravo (2015), la síntesis de carotenoides en la levadura *X. dendrorhous* estaría regulada por represión catabólica mediada por Mig1. Si bien en organismos modelo se ha visto que esta regulación ocurre sobre vías de utilización de fuentes de carbono, en *X. dendrorhous* se describió por primera vez la presencia de regulación por este factor transcripcional sobre vías de síntesis de metabolitos secundarios (Bravo, 2015). Por este motivo se optó por evaluar la presencia de sitios de unión de Mig1 usando el programa PROMO 3.0 (http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3).

El programa identificó sitios de unión de Mig1 en los promotores de los genes *ERG10B*, *MVK*, *PMK* y *MVD*; sin embargo, en los tres primeros estos sitios se encuentran río abajo de las posibles cajas TATA de los genes, sugiriendo que no serían funcionales. Siguiendo este criterio, el único sitio de unión de factores transcripcionales de aquellos que fueron identificados que

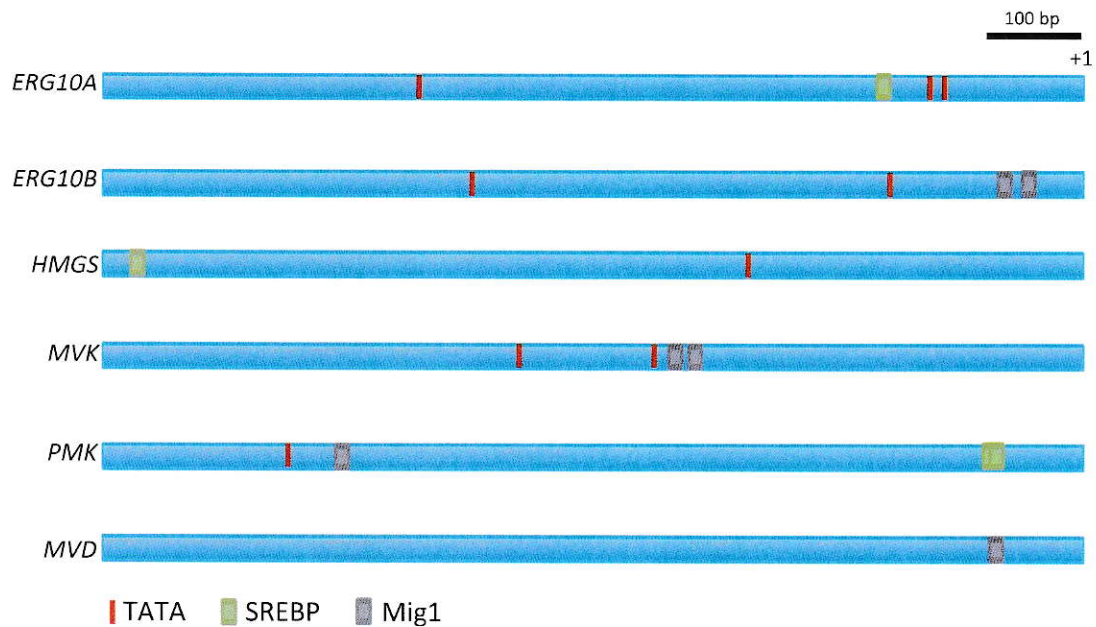


Figura 9.- Esquema de zonas promotoras. En azul se ilustra el DNA genómico de *X. dendrorhous* que comprende 1.050 pb río arriba del codón de inicio de la traducción. En rojo se marcan posibles cajas TATA, en verde posibles sitios de unión SREBP y en violeta los posibles sitios de unión de Mig1. +1 indica el inicio de la traducción (ATG) y la barra en la esquina superior-derecha representa el largo de 100 bp de secuencia.

sería funcional es el sitio SRE que se encuentra río arriba de la posible caja TATA del gen *HMGS*.

3. 2 Estudio de la funcionalidad de los genes *ERG10*, *HMGS* y *MVK*, por ensayos de complementación heteróloga en *S. cerevisiae* y en mutantes heterocigotas de *X. dendrorhous*.

3. 2. 1 Complementación heteróloga en *S. cerevisiae*.

Para realizar la caracterización funcional de los genes *ERG10A*, *ERG10B*, *HMGS* y *MVK* de *X. dendrorhous* se planteó realizar ensayos de complementación heteróloga en *S. cerevisiae* utilizando cepas mutantes heterocigotas de los distintos genes. Estas cepas son diploides y llevan un módulo de resistencia a G418 que reemplaza uno de los alelos de los genes a estudiar. Además, estas cepas son auxótrofas para leucina, uracilo e histidina (*leu2⁻/leu2⁻*, *ura3⁻/ura3⁻* e *his3⁻/his3⁻*) y heterocigotas *lys2⁻/LYS2* y *met15⁻/MET15*, genes involucrados en la síntesis de lisina y metionina, respectivamente. La estrategia experimental para realizar la complementación consistió en transformar la cepa mutante heterocigota de *S. cerevisiae* para el gen de interés con un vector de expresión que porta el gen homólogo de *X. dendrorhous*. Luego, la cepa portadora del vector se hizo esporular con el fin de obtener una cepa haploide, mutante del gen en estudio de *S. cerevisiae* y portadora del vector de expresión con el gen homólogo de *X. dendrorhous*.

Para llevar a cabo esta estrategia, se construyó vectores de expresión portadores del ORF del gen de interés de *X. dendrorhous* utilizando el vector de expresión YEp-NP, que contiene como regiones reguladoras al promotor *ACT4* y el terminador *THD3*, ambos de *S. cerevisiae*. Los vectores construidos fueron secuenciados para confirmar su estructura y se denominaron YEp-c10A, YEp-c10B, YEp-cHMGS y YEp-MVK de acuerdo al ORF que portan. Además, considerando la posibilidad que los genes *ERG10A* y *ERG10B* codifiquen enzimas tiolasas que

participan en rutas metabólicas diferentes, se construyó un vector control adicional para la complementación del gen *ERG10* el cual porta el ORF del gen *ERG10* de *S. cerevisiae* denominado YEp-ERG10sc.

Debido a que los genes de la ruta MVA son esenciales y no es posible obtener mutantes nulas de ellos, fue necesario primero transformar la cepa heterocigota de *S. cerevisiae* con el plásmido para la complementación y de manera posterior a ello, mediante esporulación, obtener las cepas mutantes nulas del gen endógeno de *S. cerevisiae* correspondiente. Esta condición a nivel genético se confirmó por PCR utilizando partidores adecuados para cada gen. La obtención de la cepa haploide mutante del gen correspondiente evidencia que existe complementación funcional, considerando que las cepas nulas no podrían crecer si no existiera complementación funcional del gen de *X. dendrorhous*. Adicionalmente, se realizaron extracciones de esteroides totales con el fin de cuantificar si existían diferencias entre las cepas donde hubo complementación y sus respectivos controles.

En el caso de la cepa mutante del gen *ERG10* (*SCΔerg10*) la transformación con los plásmidos YEp-ERG10sc, YEp-ERG10A y YEp-ERG10B se hizo en paralelo, al igual que la selección de transformantes y la inducción de esporulación. En las tres cepas transformadas se observó la formación de ascas y cada una se trató por separado para su ruptura, sembrado en placas YEP y posterior selección por resistencia a G418 y auxotrofia de metionina y lisina. De las colonias obtenidas se extrajo DNA total al que se hizo PCR para confirmar: la pérdida del gen *ERG10* de *S. cerevisiae*, usando partidores externos a la región codificante del gen; la presencia del gen con el que se complementó y la resistencia a G418, como se muestra en la Figura 10. Cabe destacar que en las complementaciones con los genes *ERG10* de *S. cerevisiae* y *ERG10B* de *X. dendrorhous*, el protocolo de esporulación y selección solo se realizó una vez, obteniendo las cepas *SCΔ10-sc* y *SCΔ10-10B*. En el caso de los ensayos de complementación con el gen *ERG10A* de *X. dendrorhous*, no fue posible encontrar colonias haploides en las que

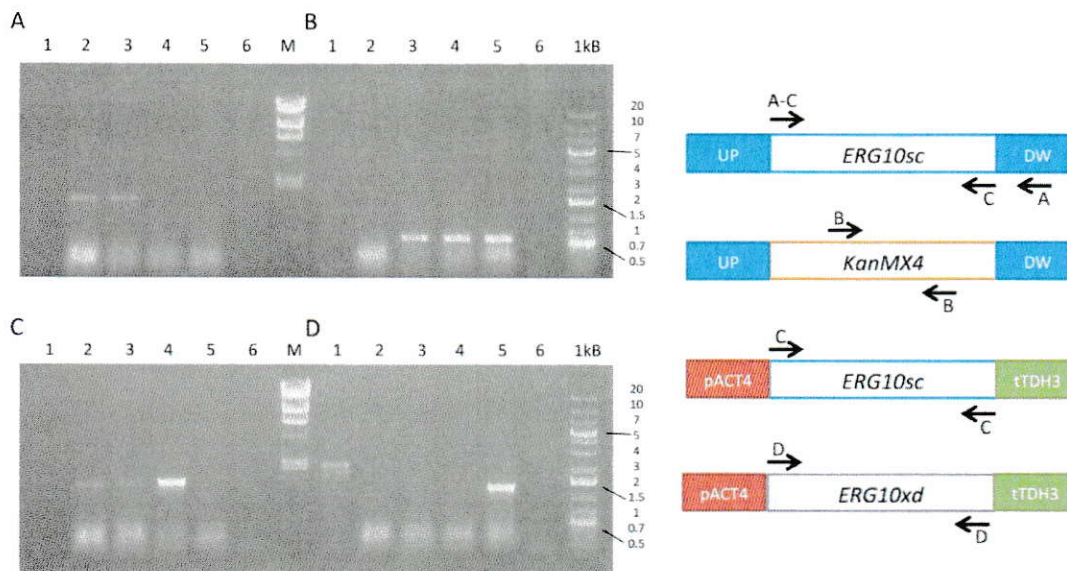


Figura 10.- Análisis por PCR de cepas haploides mutantes del gen *ERG10* de *S. cerevisiae*. Las cepas SC Δ 10-sc y SC Δ 10-10B portadoras del plásmido YEp-*ERG10sc* y YEp-*ERG10B*, respectivamente, fueron analizadas por PCR para confirmar su genotipo. Se incluyó como control DNA de las cepas UCD 67-385 de *X. dendrorhous* (carril 1), S288c (carril 2) y SC Δ erg10 (carril 3) de *S. cerevisiae* además de un control negativo sin DNA molde (carril 6). El DNA de las cepas SC Δ 10-sc (carril 4) y SC Δ 10-10B (carril 5) fue analizado para evaluar: **A)** ausencia de la copia cromosómico del gen *ERG10* de *S. cerevisiae* (partidores *erg10scF* y *erg10scDWR*), **B)** presencia del gen de resistencia a kanamicina, KanMX (partidores KanMXF2 y KanMXR2), **C)** presencia del gen *ERG10* de *S. cerevisiae* (partidores *erg10scF* y *erg10scR*) y **D)** presencia del gen *ERG10* de *X. dendrorhous* (partidores Thio2Fw y Thio2Rv). Se usó los marcadores de peso molecular Lambda DNA/*Hind*III (Carril M; 23,1, 9,4, 6,6, 4,4, 2,3, 2 y 0,6 kb) y GeneRuler 1 kb Plus (Carril 1 kb, se indica el tamaño de la banda en kb). A la derecha se muestra un esquema en el que se indica la ubicación de los partidores, marcados como flechas negras, en los amplificadores correspondientes. La letra sobre el partidor indica el panel al que corresponde. UP y DOWN, en azul, corresponden a las regiones cromosómicas ubicadas alrededor de 300 pb río arriba y río abajo del gen *ERG10* de *S. cerevisiae*; KanMX4 corresponde al módulo de resistencia a geneticina y pACT4, en rojo, y tTDH3, en verde, corresponden a las regiones del promotor y terminador en el vector YEp-NP, respectivamente.

hubiese complementación funcional del gen *ERG10* de *S. cerevisiae*, pese a que los experimentos se repitieron tres veces totalizando 500 esporas sembradas por duplicado en placas SD suplementadas con uracilo-histidina y placas suplementadas con uracilo-histidina-lisina-metionina y 30 colonias analizadas por PCR sin obtener resultados positivos. Esto indica que el gen *ERG10A* no complementa funcionalmente al gen *ERG10* de *S. cerevisiae*.

Para las cepas SC Δ 10-sc y SC Δ 10-10B se analizó la cantidad de esteroides totales producidos luego de 48 h de cultivo a con agitación a 30 °C en medio YEP. En la Figura 11 se presenta la curva de crecimiento correspondiente (Figura 11 A) y la cuantificación de esteroides específicos obtenidos desde el cultivo para las tres cepas en estudio (Figura 11 B). Cabe destacar que es posible observar que las cepas en las que hay complementación funcional producen una mayor cantidad de esteroides totales que la cepa control, probablemente por la expresión desregulada del gen *ERG10* en el plásmido YEp-NP.

Para comprobar la funcionalidad del gen *HMGS* de *X. dendrorhous* se transformó la cepa SC Δ *hmgs* con el plásmido YEp-cHMGS. Se hizo la selección de transformantes, inducción de esporulación y selección de esporas obteniendo la cepa SC Δ *hmgs*-cHMGS. Se extrajo DNA total desde esta cepa y se confirmó el genotipo de la misma por PCR con parejas de partidores adecuados (Figura 12).

Para esta cepa, también se analizó la cantidad de esteroides totales producidos luego de 48 h de cultivo con agitación a 30 °C en medio YEP. En la Figura 13 se presenta la curva de crecimiento correspondiente (Figura 13 A) y la cuantificación de esteroides específicos obtenidos desde el cultivo para las cepas mutantes del gen *HMGS* en estudio (Figura 13 B). En relación a la cantidad de esteroides producidos por las cepas, sólo hay una diferencia significativa entre la cantidad producida por la cepa S288c y la cepa haploide SC Δ *hmgs*-cHMGS. Esto indica que la complementación fue efectiva, confirmado la funcionalidad del gen *HMGS* de *X. dendrorhous*.

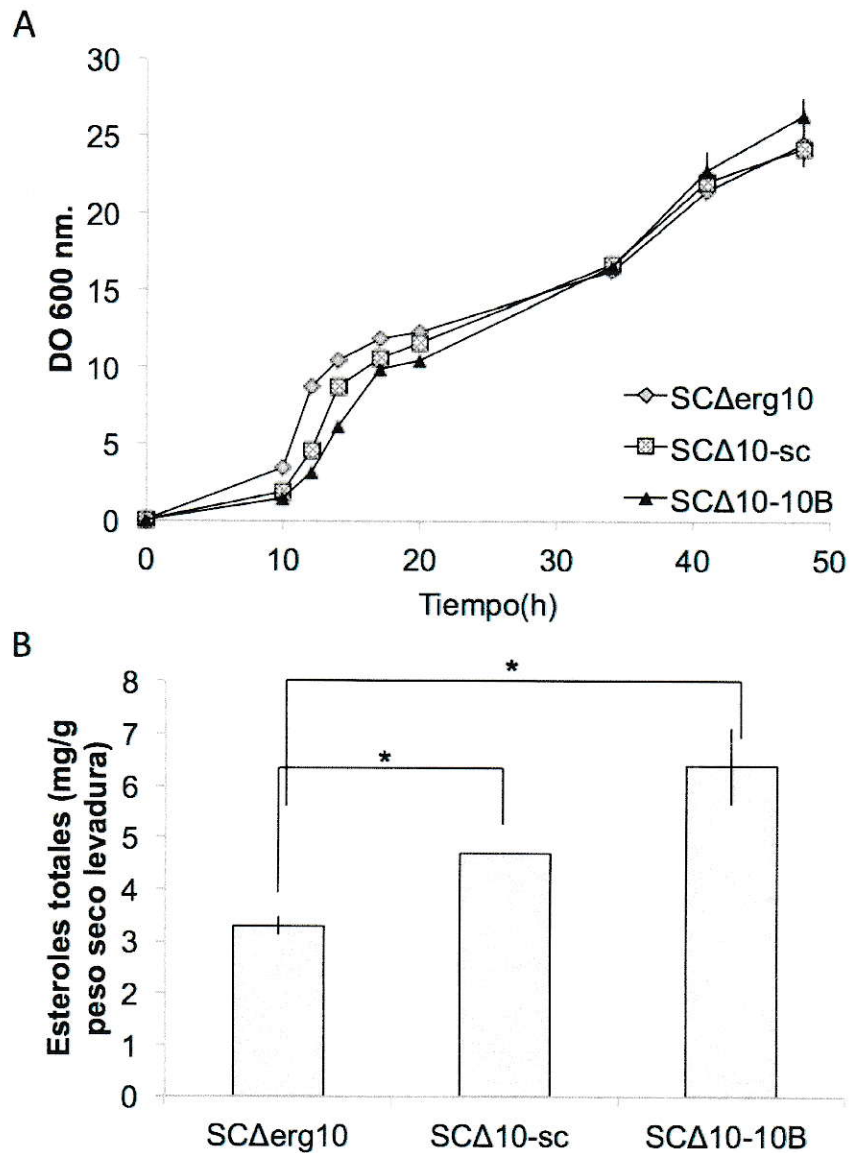


Figura 11.- Crecimiento y producción de esteroides de cepas mutantes del gen *ERG10* de *S. cerevisiae*. **A)** Las cepas usadas en la complementación funcional del gen *ERG10B* y los controles correspondientes se crecieron a 30 °C con agitación constante en medio YEP por 48 h. **B)** Cuantificación de esteroides extraídos y medidos por espectrofotometría a 280 nm, normalizados por g de biomasa seca. Cada punto representa el promedio de tres cultivos independientes junto con la desviación estándar. (prueba T de student: * p<0,01).

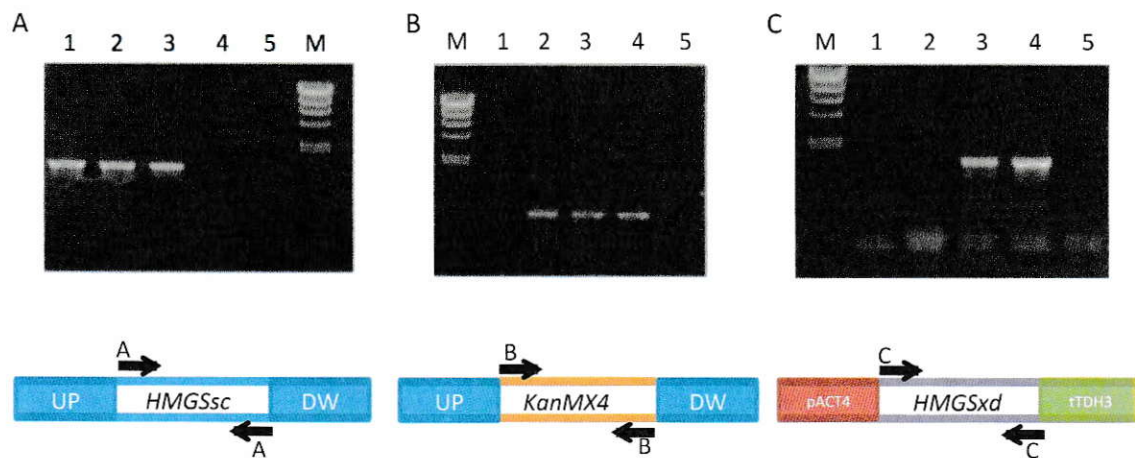


Figura 12.- Análisis por PCR de cepas mutantes del gen *HMGS* de *S. cerevisiae*. Se analizó la cepa haploide *SCΔhmgsc*-cHMGS, portadora del plásmido YEp-cHMGS (carril 4). Como control se incluyó las cepas S288c de *S. cerevisiae* (carril 1), la cepa mutante diploide *SCΔhmgsc* (carril 2) y la cepa diploide *SCΔhmgsc* transformada con el vector YEp-cHMGS (carril 3). Como control negativo no se agregó DNA molde en la reacción de PCR (carril 5). El DNA de las cepas fue analizado para confirmar: A) ausencia del gen *HMGS* de *S. cerevisiae* (partidores *HMGS_sc_F* y *HMGS_sc_RV*), B) presencia del gen de resistencia a kanamicina, *KanMX* (partidores *KanMXF2* y *KanMXR2*), C) presencia del cDNA del gen *HMGS* de *X. dendrorhous* (partidores *HMGS_genFW* y *HMGS_genRV*). El marcador de peso molecular (carril M) usado fue *Lambda DNA/HindIII* (tamaños: 23, 9,4, 6,6, 4,4, 2,3, 2 y 0,6 kb). Bajo cada gel se muestra un esquema en el que se indica la ubicación de los partidores, marcados como flechas negras, en los amplificadores correspondientes. La letra sobre el partidor indica el panel al que corresponde. UP y DOWN, en azul, corresponden a las regiones cromosómicas ubicadas alrededor de 300 pb río arriba y río abajo del gen *HMGS* de *S. cerevisiae*; *KanMX4* corresponde al módulo de resistencia a geneticina y pACT4, en rojo, y tTDH3, en verde, corresponden a las regiones del promotor y terminador en el vector YEp-NP, respectivamente.

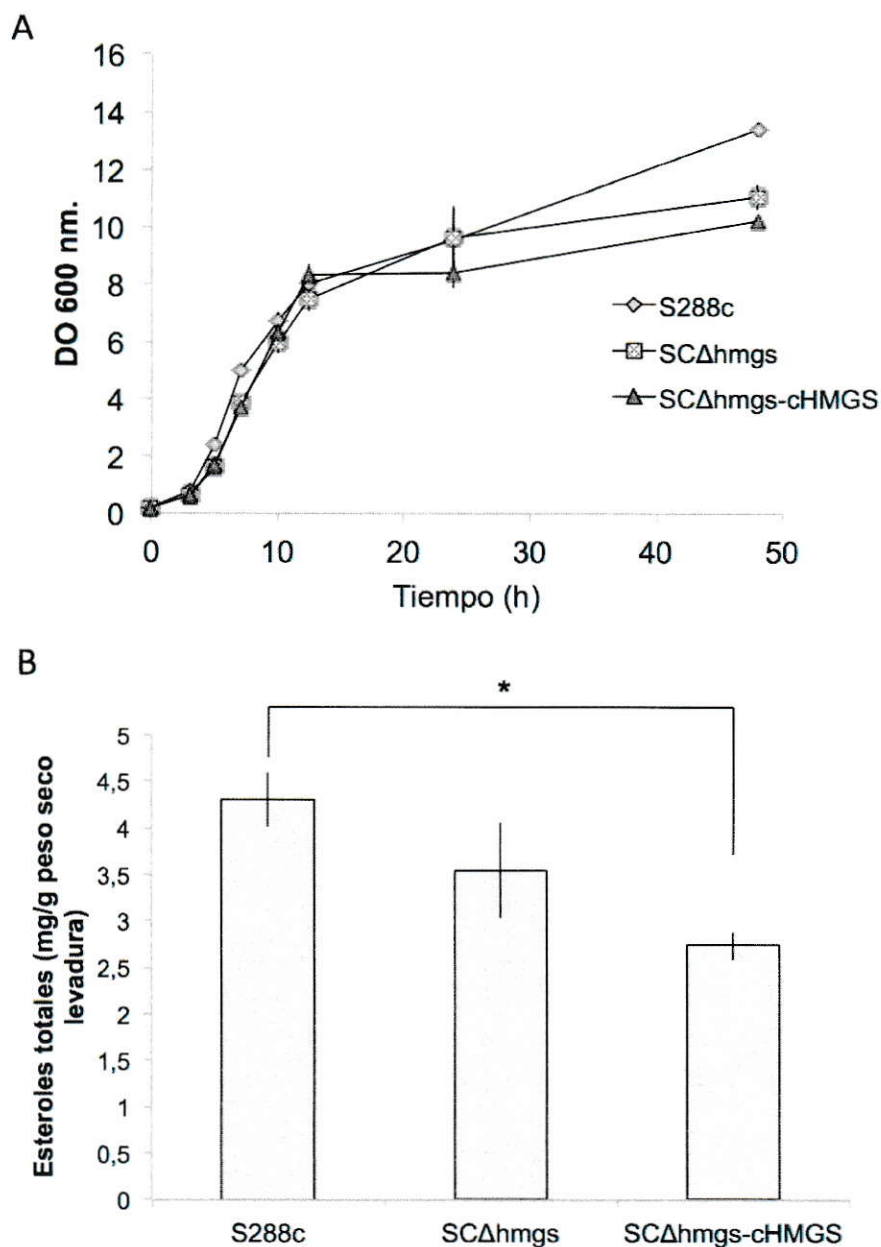


Figura 13.- Crecimiento y producción de esteroides de cepas mutantes del gen *HMGS* de *S. cerevisiae*. A) Las cepas usadas en la complementación funcional del gen *HMGS* y los controles correspondientes se crecieron a 30 °C con agitación constante en medio YEP por 48 h. **B)** Cuantificación de esteroides totales medidos por espectrofotometría a 280 nm, normalizados por g de biomasa seca. Cada punto representa el promedio de tres cultivos independientes y las barras corresponden a la desviación estándar (prueba T de student, * $p < 0,05$).

La complementación funcional del gen *MVK* se hizo en la cepa *SCΔmvk* la que fue transformada con el vector YEp-cMVK. Se procedió de igual manera que en las complementaciones de los genes *ERG10* y *HMGS* y se obtuvo la cepa haploide *SCΔmvk-cMVK*. Se extrajo DNA total desde esta cepa y se confirmó el genotipo de la misma por PCR con parejas de partidores adecuados. Para esta cepa también se analizó la cantidad de esteroides totales producidos luego de 48 h de cultivo a con agitación a 30 °C en medio YEP. En la Figura 14 se presenta la curva de crecimiento correspondiente (Figura 14, A) y la cuantificación de esteroides específicos obtenidos desde el cultivo para las cepas mutantes del gen *MVK* en estudio (Figura 14, B). En relación a la cantidad de esteroides producidos por las cepas no se encontró una diferencia significativa entre la cepa haploide *SCΔmvk-cMVK* y la cepa parental diploide *SCΔmvk*.

En resumen, por medio de estos ensayos de complementación heteróloga se evaluó la funcionalidad de los genes *ERG10B*, *HMGS* y *MVK*, los cuales efectivamente tendrían la función esperada en *X. dendrorhous*. En el caso del gen *ERG10A* no hubo complementación funcional con la cepa de *S. cerevisiae* mutante del gen *ERG10*, lo que sugiere que este gen codificaría una enzima de diferente actividad a la de *S. cerevisiae* analizada.

3. 2. 2 Obtención de mutantes de *X. dendrorhous*.

Para evaluar la funcionalidad de los genes e identificar su efecto sobre la ruta en estudio, se tomó una segunda aproximación mediante la construcción de mutantes de *X. dendrorhous* derivados de la cepa diploide UCD 67-385 (Miller y col., 1976). La obtención de estos mutantes se hizo por recombinación homóloga, por lo que primero se debió construir módulos para reemplazar por recombinación homóloga cada gen en estudio por un módulo que confiere resistencia a antibiótico (Niklitschek y col., 2008). Los módulos de transformación se construyeron de manera que lleven un fragmento de DNA obtenido desde la región río arriba del gen que se quiere reemplazar, luego el módulo de resistencia (en este caso a higromicina B) y

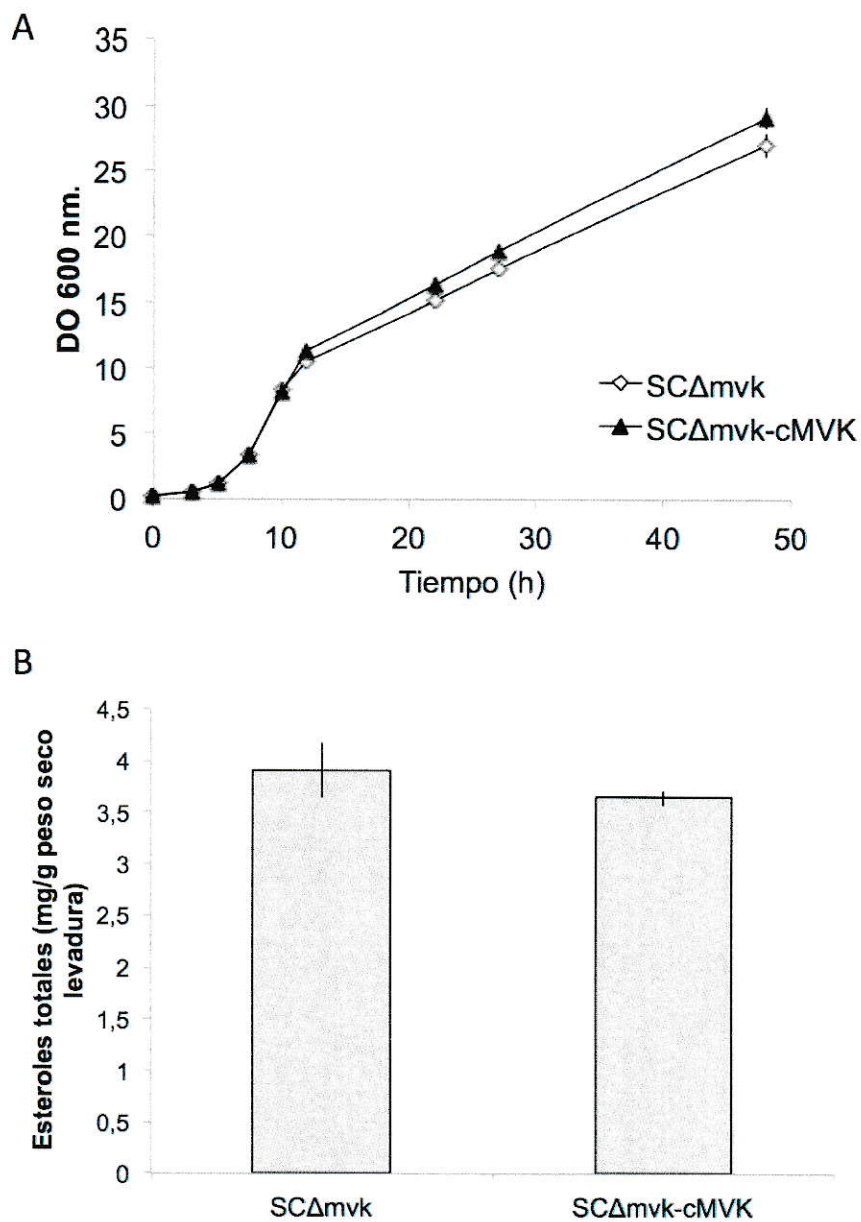


Figura 14.- Crecimiento y producción de esteroides de cepas mutantes del gen *MVK* de *S. cerevisiae*. **A)** Las cepas usadas en la complementación funcional del gen *MVK* se crecieron a 30 °C con agitación constante en medio YEP por 48 h. **B)** Cuantificación de esteroides totales medidos por espectrofotometría a 280 nm, normalizados por g de biomasa seca. Cada punto representa el promedio de tres cultivos independientes y las barras corresponden a la desviación estándar. No se encontró una diferencia significativa en la cantidad de esteroides producidos (prueba T de student, no indicó diferencias significativas).

finalmente otro fragmento de DNA proveniente de la región río abajo del gen blanco a reemplazar.

Se construyó un total de 3 vectores para realizar las transformaciones de los genes *ERG10A*, *ERG10B* y *MVK*. El procedimiento para su construcción fue similar en todos los casos variando principalmente los partidores utilizados según el gen que se quiso mutar. Para la construcción de los vectores se comenzó amplificando por PCR independientes la región río arriba y la región río abajo del gen que se quería mutar utilizando partidores específicos según lo indicado en la sección “Construcción de mutantes” de la Tabla 3. Los fragmentos fueron purificados desde geles de agarosa y re-amplificados con partidores diseñados para permitir la unión de fragmentos y purificados desde gel nuevamente. Los fragmentos de la región río arriba y río abajo del gen de interés se unieron por OE-PCR, cuyo producto se purificó desde un gel de agarosa y se insertó en el sitio *SmaI* del vector pBluescriptSK-. Entre los fragmentos de DNA río arriba y río abajo del gen de interés se agregó un sitio de corte *SmaI*, en el que posteriormente se insertó el módulo de resistencia a higromicina B digerido con la enzima *EcoRV* desde el vector pMN-Hyg. De esta forma se obtuvo finalmente a los vectores pBS-PHT-10A, pBS-PHT-10B, pBS-PHT-MVK (Figura 15 A y B), en los que el módulo de resistencia se encuentra flanqueado por secuencias genómicas que rodean el gen que se quiere reemplazar. El inserto de los vectores se usó para transformar la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* y las transformantes fueron seleccionadas por resistencia a higromicina B. Por este método se obtuvo las mutantes heterocigotas de los genes *ERG10A*, *ERG10B* y *MVK* denominadas 385-*erg10A*(+/-), 385-*erg10B*(+/-) y 385-*mvk*(+/-), respectivamente.

Debido a que los genes de la ruta del mevalonato son esenciales, no se esperaba obtener mutantes homocigotas, a excepción de los genes *ERG10A* y *B*, ya que si codificaran enzimas con la misma función podrían complementar entre ellos. Por este motivo se probó el método del doble recombinante (DRM, Niklitschek y col., 2008) que consiste en aumentar gradualmente la presión selectiva sobre la cepa heterocigota con el fin de favorecer la selección de mutantes homocigotos con una doble dosis génica del módulo de resistencia a antibiótico generado por

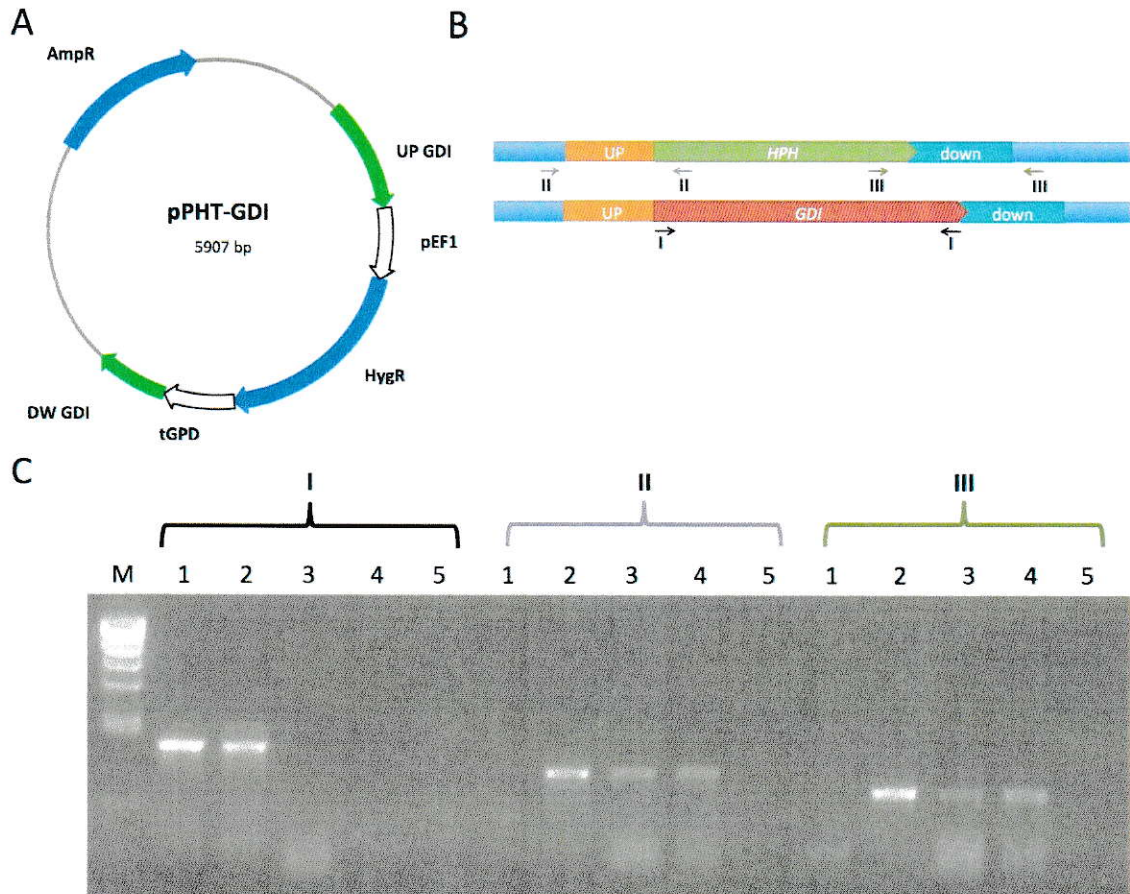


Figura 15.- Obtención de mutantes de *X. dendrorhous*. **A)** Esquema tipo del vector construido para la transformación de la cepa UCD 67-385. En azul se indican resistencias a antibióticos, en blanco promotor y terminador del módulo de resistencia a higromicina B y en verde regiones de recombinación UP y DOWN correspondientes a las regiones río arriba y río abajo al gen de interés (GDI). **B)** Representación de la ubicación del módulo de resistencia a higromicina B en el genoma de *X. dendrorhous* luego de la transformación, las flechas representan los partidores utilizados en el análisis de PCR mostrado en el panel C. **C)** Análisis genómico mediante PCR de los mutantes heterocigotos y homocigotos del gen *ERG10A*. Se usó como control DNA de la cepa parental UCD 67-385 (carril 1) y un control negativo sin DNA molde (carril 5). Se utilizó DNA de la cepa 385-*erg10A*(+/-) (carril 2) y de dos colonias obtenidas mediante DRM de la cepa 385-*erg10A*(-/-) (carril 3 y 4). Las cepas fueron analizadas para identificar; (I) presencia del gen *ERG10A* (partidores ThiogenFW y ThiogenRV), (II) presencia del módulo de resistencia a higromicina B, *HPH*, correctamente integrado (partidores UP_erg10A_Xd e IntHygR) y (III) la región río abajo del gen (partidores tGPDF y DW_erg10A_Xd). El marcador de peso molecular (carril M) usado fue Lambda DNA/*Hind*III (tamaños: 23, 9,4, 6,6, 4,4, 2,3, 2 y 0,6 kb).

recombinación homóloga entre ambos alelos del *locus* en estudio. Así se obtuvo una cepa mutante homocigota del gen *ERG10A*, llamada 385-*erg10A(-/-)*, lo que fue confirmado realizando PCR con DNA extraído de esta cepa (Figura 15 C). Esta cepa presenta diferencias en el fenotipo comparada con la cepa parental, principalmente en relación a la pigmentación de la misma, como se aprecia en la Figura 16, A. El crecimiento en medio completo YM a 22 °C no muestra diferencias comparado con la cepa parental (Figura 16 A). Al extraer esteroides y carotenoides totales desde una muestra de cultivo en fase estacionaria (96 h), se observa que no existen diferencias significativas en cantidad de ambos tipos de metabolitos. Respecto a la composición de carotenoides, esta cepa presenta una coloración más pálida que, de acuerdo a los análisis cuantitativos, se debería a una disminución en la proporción de astaxantina (de 80 a 50 % del total de carotenoides totales producidos) en comparación con la cantidad de beta-caroteno y otros intermediarios (Figura 16). Este cambio en la proporción de pigmentos sugiere que podría existir alguna diferencia en la expresión de genes carotenogénicos en las mutantes, especialmente en los que participan de las etapas finales de síntesis de astaxantina, como los son los genes *crtS* y *crtR* (Figura 1).

Finalmente, se extrajo RNA total desde muestras obtenidas de las tres cepas y se sintetizó cDNA para realizar ensayos de RT-qPCR en que se midió los niveles de transcrito de los genes *ERG10A*, *ERG10B*, *crtS* y *crtR*. El valor Ct (*threshold cycle*) obtenido corresponde al ciclo a partir del cual el blanco de la amplificación alcanza una cantidad definida. Los Ct obtenidos para cada muestra se analizaron usando el método de ddCt (Schmittgen y Livak, 2008) normalizando respecto al Ct del gen actina y luego, respecto a la cepa silvestre UCD 67-385 (Figura 17). Se obtuvo que la cantidad de transcrito del gen *ERG10A* en la cepa 385-*erg10A(+/-)* disminuyó 2,5 veces en relación a la cepa parental, siendo este gen el único que cambia de manera significativa en esta cepa de los 4 analizados. En la mutante homocigota, 385-*erg10A(-/-)* no se detectó transcrito del gen *ERG10A*, como era esperable, y se constató un aumento en la cantidad de transcrito del gen *ERG10B* de más de 8 veces en relación a la cepa parental, posiblemente para compensar la disminución en la cantidad de acetil Co-A disponible por la

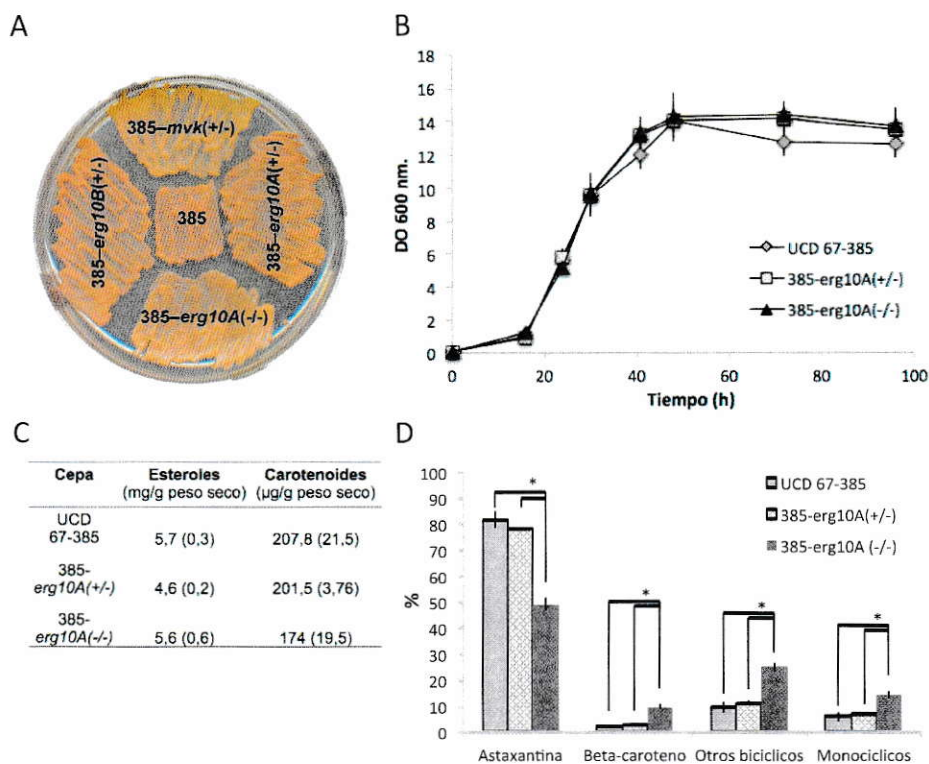


Figura 16.- Caracterización de cepas mutantes del gen *ERG10A*. **A)** Pigmentación de cepas mutantes obtenidas en este trabajo. El gen mutado en cada cepa se indica sobre la misma. **B)** Curva de crecimiento de cepas mutantes del gen *ERG10A* y la cepa parental UCD 67-385 crecidas con agitación constante en medio YM a 22 °C. Cada punto corresponde al promedio de tres muestras independientes. **C)** Cantidad de esteroles y pigmentos carotenoides en muestras obtenidas a las 96 h de cultivo (fase estacionaria); entre paréntesis se indica la desviación estándar del promedio de tres muestras independientes. **D)** Composición de pigmentos obtenidos desde muestras en fase estacionaria (96 h de cultivo). Cada barra representa el promedio de tres muestras independientes, las barras indican desviación estándar (prueba T de student; * $p < 0,01$).

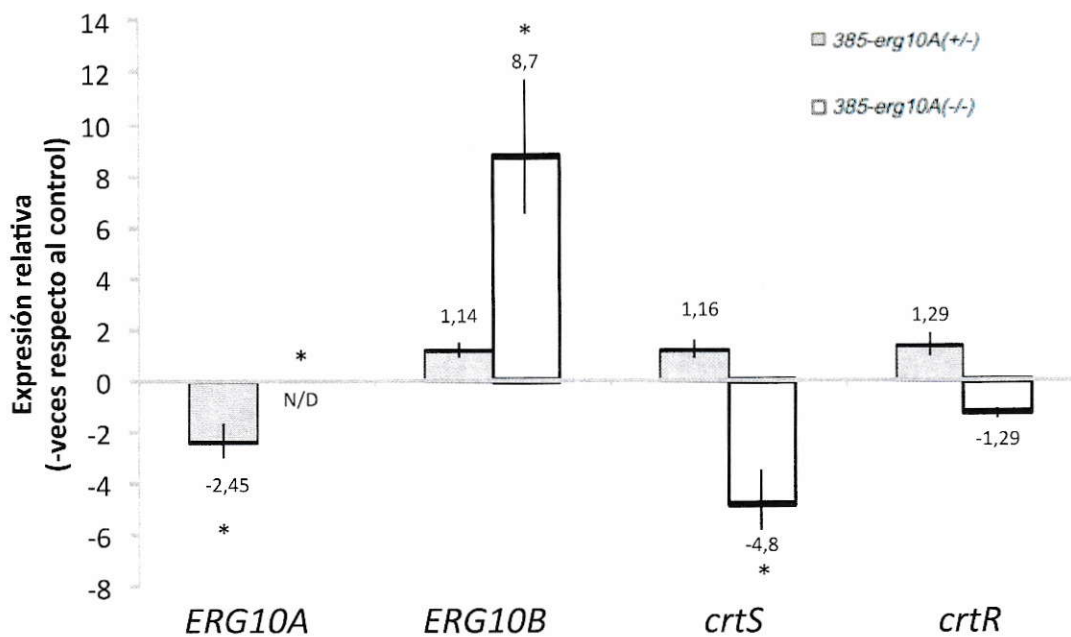


Figura 17.- Resultados RT-qPCR de muestras de cepas mutantes del gen *ERG10A*. El cambio en la cantidad relativa de transcrito de cada gen estudiado, obtenido a partir del Ct de cada reacción, se indica junto a la barra correspondiente, N/D; no detectado. Los resultados se presentan como el cambio en la cantidad de transcrito medido en la cepa estudiada respecto a la cantidad relativa de transcrito del mismo gen en la cepa UCD 67-385. * $p < 0,05$ en prueba T de Student. Cada barra representa el promedio de tres muestras independientes.

interrupción del proceso de beta-oxidación de ácidos grasos. La disminución en la cantidad detectada de transcrito del gen *crtS* (casi 5 veces menos que en la cepa parental) también podría estar asociado a este fenómeno ya que existiría una disminución en la cantidad de IPP para utilizar en la síntesis de pigmentos, metabolitos que no son esenciales para *X. dendrorhous*, que finalmente se ve reflejado como el cambio observado en la composición de carotenoides.

La cepa mutante en el gen *ERG10B*, 385-*erg10B*(+/-) no mostró diferencias fenotípicas de color en comparación con la cepa parental UCD 67-385 que se pudieran observar a simple vista al crecer en placas (Figura 16 A). Al realizar la curva de crecimiento, esta cepa mutante no mostró diferencias de crecimiento en comparación con la cepa parental UCD 67-385 en medio YM al ser crecida a 22 °C con agitación constante (Figura 18 A). A partir de una muestra crecida por 96 h bajo las condiciones descritas se extrajo esteroides y carotenoides totales (Figura 18 B) en los que no se encontró diferencias significativas en relación a las cantidades producidas por cada cepa. En relación a la composición de carotenoides sólo se encontró diferencias significativas en la cantidad de intermediarios monocíclicos acumulados (Figura 18 C), sin mostrar diferencias significativas en la cantidad de astaxantina acumulada por cada cepa.

La cepa mutante en el gen *MVK*, 385-*mvk*(+/-), presentó una diferencia de color en comparación con la cepa parental UCD 67-385, que se observó a simple vista al crecer en placas (Figura 16 A). Esta cepa mutante no mostró diferencias de crecimiento en comparación con la cepa parental UCD 67-385 en medio YM al ser crecida a 22 °C con agitación constante (Figura 19 A). Se tomó muestras de cultivo en fase exponencial de crecimiento (24 h) y en fase estacionaria (72 h) a las que se extrajo carotenoides y esteroides totales. En relación a éstos, no se encontraron cambios significativos en la cantidad producida (Figura 19 B). Cuando se analizó la composición de carotenoides por RP-HPLC, se encontró que existía una diferencia significativa en la proporción de carotenoides e intermediarios producidos en fase estacionaria de crecimiento, observándose una disminución de la proporción de astaxantina y un aumento de los intermediarios (Figura 19 C y D). Al comparar la composición de muestras tomadas en

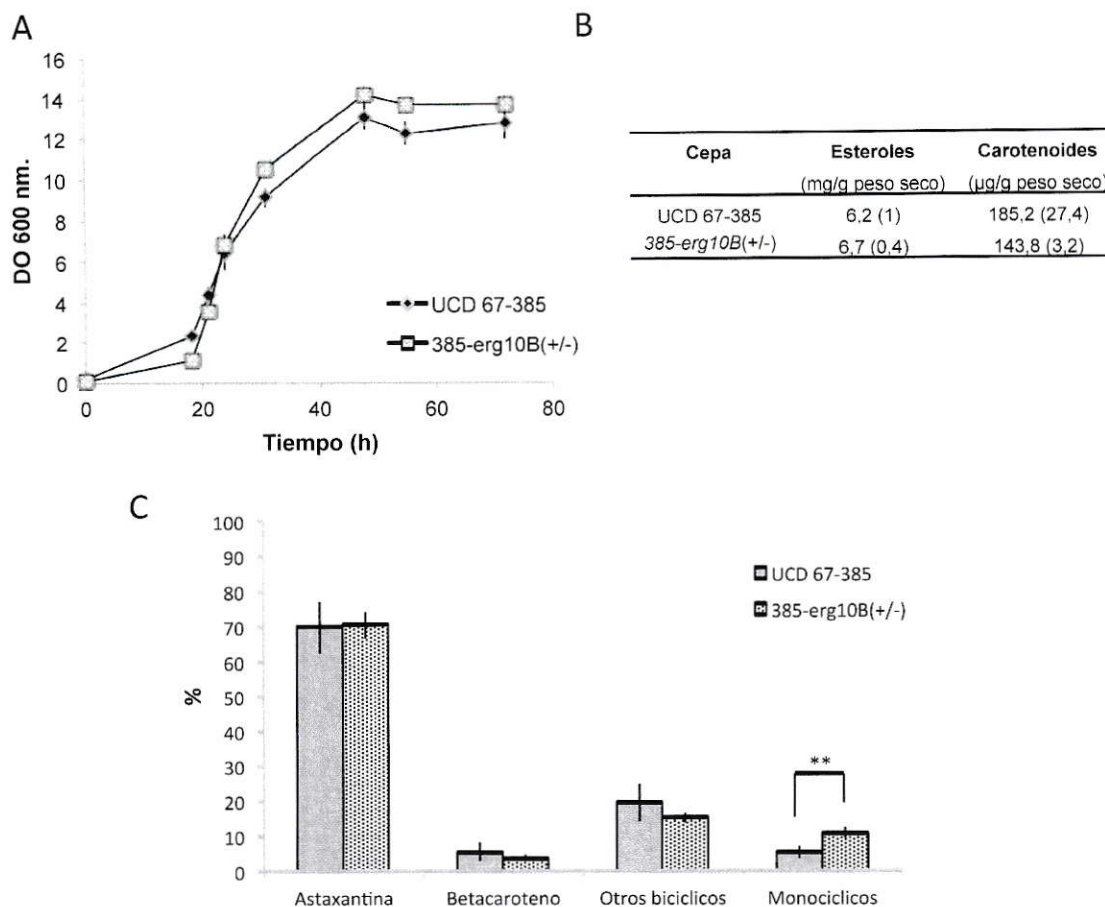


Figura 18.- Caracterización de la cepa mutante en el gen *ERG10B*. **A)** Curva de crecimiento de mutante *ERG10B* y la cepa parental UCD 67-385 crecidas con agitación constante en medio YM a 22 °C. Cada punto corresponde al promedio de tres muestras independientes. **B)** Tabla indicando las cantidades de esteroles y carotenoides totales obtenidas a partir de muestras tomadas a las 96 h de cultivo (fase estacionaria); entre paréntesis se indica la desviación estándar del promedio de tres muestras independientes. **C)** Composición de pigmentos obtenidos desde muestras en fase estacionaria (96 h de cultivo). Otros bicíclicos incluye la suma de; fenicoxantina, cantaxantina, equinenona e hidroxi-equinona. Monocíclicos incluye; toruleno y licopeno. Cada barra representa el promedio de tres muestras independientes, las barras indican desviación estándar (prueba T de student; ** $p < 0,05$).

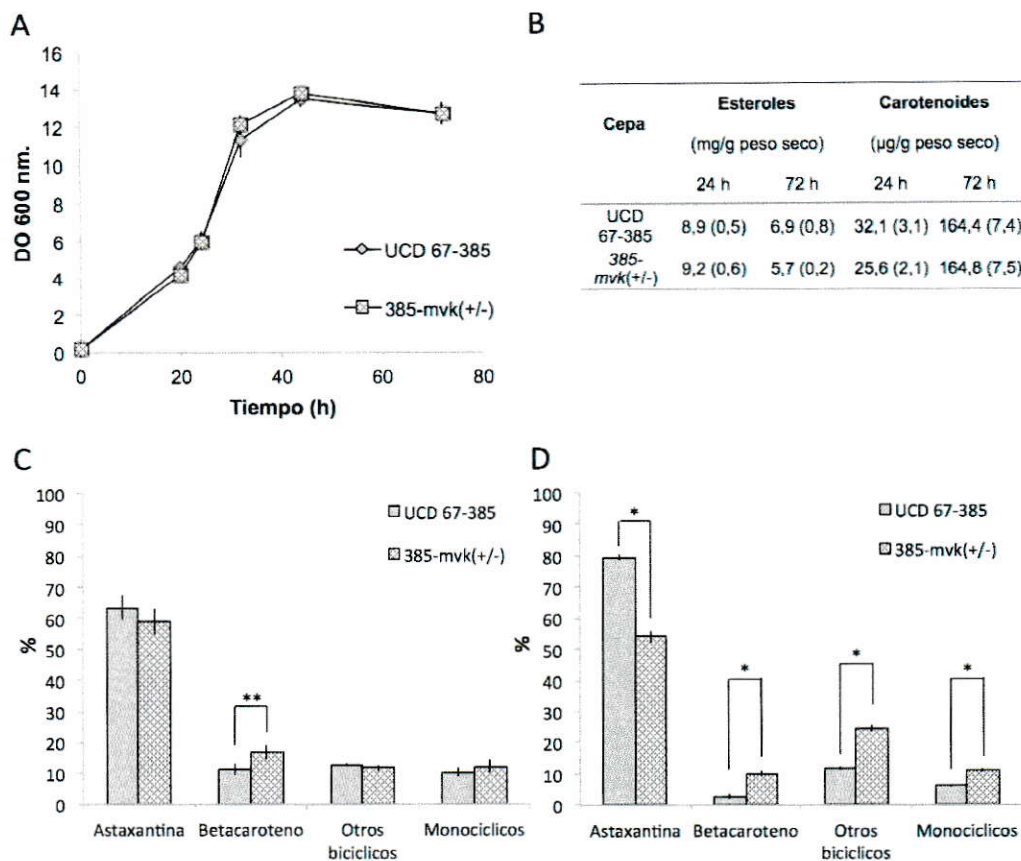


Figura 19.- Caracterización de la cepa mutante en el gen *MVK*. **A)** Curva de crecimiento de cepa mutante del gen *MVK*, 385-*mvk*(+/-), y la cepa parental UCD 67-385 crecidas con agitación constante en medio YM a 22 °C. Cada punto corresponde al promedio de cuatro cultivos independientes y la desviación estándar. **B)** Tabla indicando las cantidades obtenidas de esteroides y carotenoides a partir de muestras obtenidas a las 24 h (fase exponencial) y 72 h de cultivo (fase estacionaria), en paréntesis se indica la desviación estándar del promedio de muestras de cuatro cultivos independientes. **C)** Proporción de carotenoides obtenidos desde muestras en fase exponencial (24 h de cultivo). **D)** Proporción de carotenoides obtenidos desde muestras en fase estacionaria (96 h de cultivo). Cada barra representa el promedio de muestras de cuatro cultivos independientes y las barras de error indican la desviación estándar (prueba T de student: * $p < 0,01$, ** $p < 0,05$).

fase exponencial y estacionaria de las cepas 385 y 385-*mvk*(+/-), presentadas en la Figura 19 C y D, se puede notar que en fase exponencial de crecimiento sólo existe diferencia significativa en la proporción de beta-caroteno presente en las muestras (11,3 % en la cepa parental contra 16,7 % en la mutante). Sin embargo, en fase estacionaria se observan diferencias significativas adicionales: la proporción de astaxantina producida en la mutante se reduce considerablemente respecto a la cepa parental. También hay un aumento de casi 5 veces de la proporción de beta-caroteno en la cepa mutante. Por lo tanto, las diferencias de color entre las cepas, se deben a un cambio en la composición debido a la acumulación de intermediarios de la síntesis de astaxantina.

Para identificar si la cepa con la mutación de un alelo del gen *MVK* presentaba una menor cantidad de transcrito se extrajo RNA total desde muestras en fase estacionaria de esta cepa y de la cepa parental UCD 67-385 para sintetizar cDNA. Se realizó un ensayo de RT-qPCR en que se midió los niveles de transcrito de los genes *MVK*, *crtS* y *crtR*. Los Ct obtenidos se analizaron usando el método de ddCt (Schmittgen y Livak, 2008), normalizando respecto al Ct del gen actina y luego, respecto a la cepa silvestre UCD 67-385 (Figura 20). Se observó que en la cepa mutante 385-*mvk*(+/-) hubo una disminución en la cantidad de transcrito del gen *MVK* de 4 veces en relación a la cepa parental. Además, se observó una disminución en la cantidad de transcrito del gen *crtR* de 4 veces en relación a la cepa parental, lo que podría explicar los cambios en la composición de pigmentos producidos. En relación a la cantidad de transcrito que se midió para el gen *crtS*, no se encontró una diferencia significativa entre las muestras.

En resumen, las mutantes de *X. dendrorhous* obtenidas muestran diferencias en relación a su cepa parental. Las principales diferencias se encuentran relacionadas con cambios en la pigmentación de las cepas debido a un cambio en la composición de carotenoides, mostrando un aumento en los intermediarios de la biosíntesis de astaxantina.

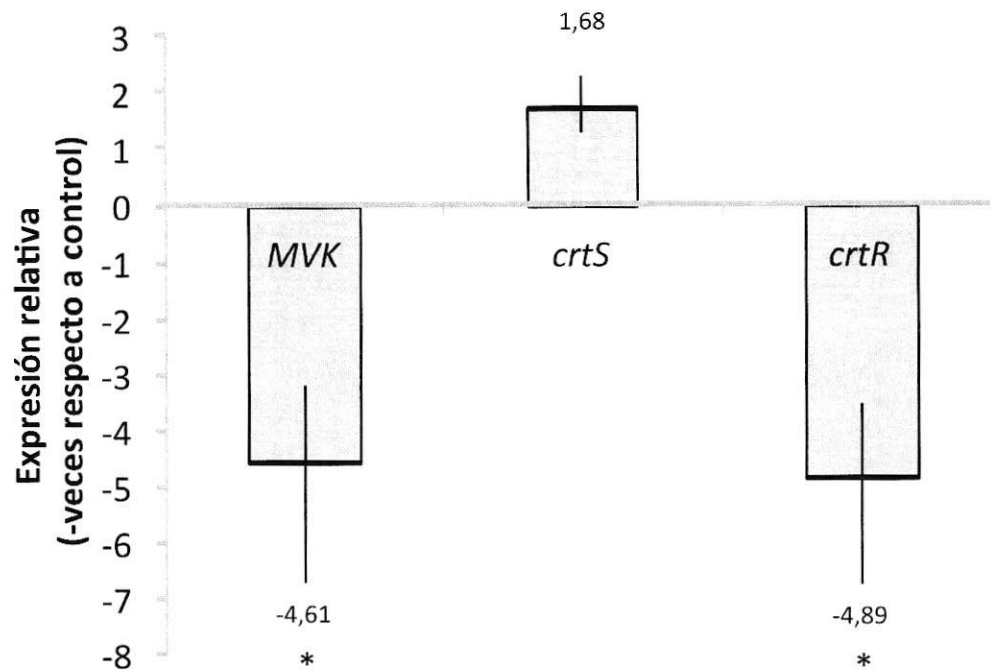


Figura 20.- Resultados de RT-qPCR de muestras de cepas mutantes en el gen *MVK*. El cambio en la cantidad relativa de transcrito de cada gen estudiado, obtenido a partir del Ct de cada reacción, se indica junto a la barra correspondiente. Los resultados se presentan como el cambio en la cantidad de transcrito medido en la cepa estudiada respecto a la cantidad relativa de transcrito del mismo gen en la cepa UCD 67-385. * $p < 0,05$ en prueba T de Student. Cada barra representa el promedio de tres muestras independientes.

3. 3 Determinación del efecto a nivel transcripcional sobre los genes de la vía del MVA y sobre la producción de esteroides y carotenoides en *X. dendrorhous*, luego de la adición de glucosa o etanol al medio de cultivo, o la falta de ergosterol intracelular.

3. 3. 1 Diseño y prueba de partidores específicos para RT-qPCR.

Cuando se comenzó el presente trabajo no existían antecedentes sobre los genes estudiados, por lo que fue necesario diseñar partidores específicos para los genes *ERG10A*, *ERG10B*, *HMGs*, *MVK*, *PMK*, *MVD* y *ADH1* (utilizado como control de inducción por etanol). Para esto se utilizó el software AmplifX (Jullien, 2007) el que considera una serie de parámetros como la longitud de los partidores, tamaño deseado del amplicón (entre 150 y 200 pb en este caso), contenido GC de los mismos y la posibilidad de formación de dímeros de partidores. Con estos parámetros, el software analiza la secuencia de DNA entregada por el usuario y entrega posibles parejas de partidores que cumplan con los requisitos. Además de esto, se definió que la secuencia amplificada debía encontrarse como máximo 1.000 pb río arriba del codón de término de la traducción para evitar posibles errores debido a la diferencia en la eficiencia de amplificación del cDNA entre distintos genes. Similarmente, para evitar la amplificación de DNA genómico contaminante se consideró que al menos un partidador estuviera sobre una unión exón-exón o bien, que al menos existiera un intrón dentro del amplificado para así detectar una diferencia de tamaño en el amplificado en caso de contaminación con DNA al extraer RNA. Los partidores diseñados se encuentran en la Tabla 4.

En primer lugar se evaluó la eficiencia de amplificación de cada pareja de partidores para lo que se llevó a cabo una primera reacción de RT-qPCR en RNA total de la cepa UCD 67-385 y la pareja de partidores a probar. El producto de esta reacción se usó para hacer diluciones seriadas (1/10) que fueron usadas como blanco en una segunda ronda de amplificación. Los

valores de Ct obtenidos de esta amplificación se graficaron en el software del equipo (MxPro Mx300P v3.20) bajo los parámetros de *Standard Curve* lo que considera el ciclo en el que se alcanzó el umbral de amplificación (Ct) contra el logaritmo del factor de dilución inicial de DNA.

Para calcular la eficiencia de amplificación (E) se hizo una regresión lineal y se calculó la pendiente (p) y el coeficiente de correlación (R^2) en las gráficas mencionadas previamente. Luego, de acuerdo a la ecuación $E = (10^{-1/p}/2*100)$ (Livak y Schmittgen 2001), se obtuvo el valor de la eficiencia como porcentaje (Tabla 7). Se consideraron adecuados los partidores que presentaron una diferencia de eficiencia máxima de un 5 % (eficiencia de entre 95 % y 105 %). En el caso particular de los partidores para el gen *MVK*, cuya eficiencia es menor a la considerada adecuada, los cálculos de resultados se hicieron considerando la eficiencia de los partidores.

Tabla 7.- Eficiencia de partidores diseñados en este trabajo y usados para RT-qPCR.

Gen	E (%)	R²
<i>ERG10A</i>	98	0,999
<i>ERG10B</i>	101	0,999
<i>HMGS</i>	103	1
<i>MVK</i>	92	0,999
<i>PMK</i>	99	0,998
<i>MVD</i>	99	1
<i>ADH1</i>	98	1

3. 3. 2 Efecto de la adición de glucosa.

En el trabajo realizado por Marcoleta y col. (2011) se encontró que la transcripción de genes de la ruta de síntesis de carotenoides disminuía ante la adición de glucosa al cultivo, lo que estaría relacionado con el fenómeno de represión catabólica mediado por el represor transcripcional Mig1 (Bravo, 2015). Dado que la ruta del MVA produce los precursores necesarios para la biosíntesis de astaxantina en *X. dendrorhous*, se quiso conocer si existía

represión catabólica sobre ésta. En el análisis del efecto de glucosa, los genes mostraron diferentes comportamientos. De acuerdo a los antecedentes, existen cambios en los niveles de expresión de genes carotenogénicos en *X. dendrorhous* en presencia o ausencia de glucosa. Estos cambios ocurren dentro de las primeras 6 h luego de la adición del azúcar, luego hay un pérdida del efecto regulatorio y a las 24 h post-tratamiento ya no se observa diferencias entre los niveles de expresión de los genes (Marcoleta y col., 2011).

Para determinar si hay algún efecto relacionado con la inducción por glucosa sobre la transcripción de los genes de la ruta MVA, se realizó el experimento con la cepa silvestre UCD 67-385. Para ello se creció cultivos de *X. dendrorhous* en medio líquido YM sin glucosa. Luego de 72 h de cultivo (fase exponencial de crecimiento), el cultivo se separó en dos matraces: a uno de ellos se agregó glucosa a una concentración final de 20 g/l (cultivo tratado) y al otro se mantuvo sin tratamiento (cultivo control). Ambos cultivos se dejaron crecer por 24 h más a 22 °C y se tomaron muestras a distintos tiempos post-tratamiento (0, 1, 2, 4, 6, 10 y 24 h, donde la muestra del tiempo 0 se obtuvo desde el cultivo inicial) las que se congelaron a -80 °C. Para cuantificar glucosa residual en el medio, se separó el sobrenadante del precipitado de células y se congeló a -20 °C. De las muestras que fueron congeladas se extrajo RNA total que se usó en ensayos de RT-qPCR para determinar los niveles de transcrito de los genes de la ruta del MVA. El consumo de la glucosa adicionada al cultivo produjo un aumento en la biomasa como se puede apreciar en la Figura 21, A. En relación a la producción de carotenoides se pudo ver que la cantidad de carotenoides totales en el cultivo no cambió al agregar glucosa (Figura 21 B) y al normalizar por la biomasa seca se pudo notar que hay una disminución en la cantidad de carotenoides específicos (Figura 21 C). El mismo fenómeno se encontró para la producción de esteroides, donde no hubo un cambio significativo en la cantidad de esteroides totales extraídos desde los cultivos (Figura 21 D), pero sí una disminución en la cantidad específica debido al aumento en la biomasa (Figura 21 E).

Los resultados del ensayo de RT-qPCR se muestran en la Figura 22. Los controles utilizados mostraron cambios de acuerdo a lo esperado; un aumento en la cantidad de transcrito detectado

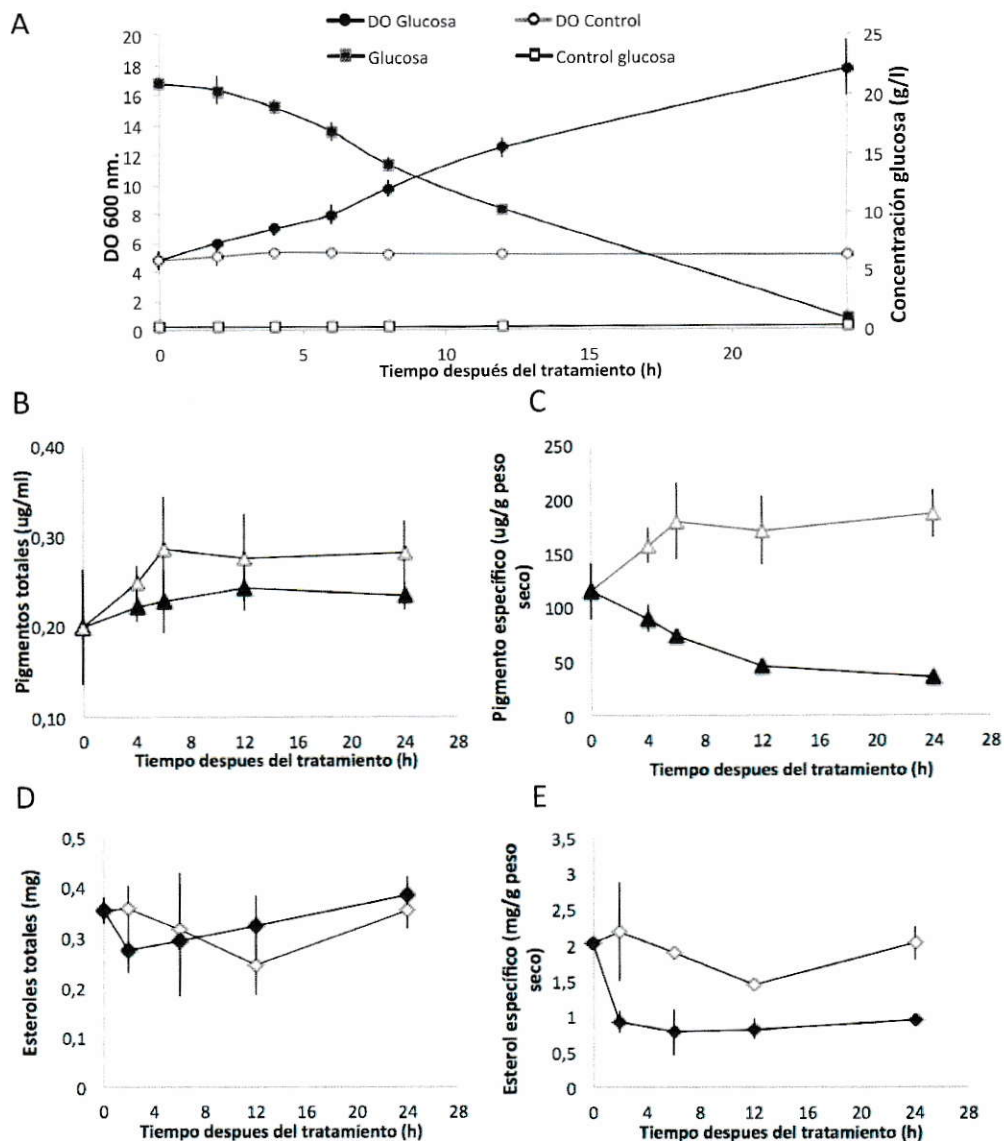


Figura 21.- Efecto de la adición de glucosa sobre el crecimiento, síntesis de carotenoides y de esteroides en la cepa UCD 67-385. En todos los paneles, los símbolos negros representan los resultados luego del tratamiento con glucosa y los símbolos blanco, la condición control. **A)** Crecimiento de cultivos (círculos, DO₆₀₀) y glucosa residual (cuadrados, g/l). Carotenoides (triángulos): **B)** totales (µg de carotenoides/ml de cultivo) y **C)** específicos (µg de carotenoides/g de levadura seca). Esteroides (rombos): **D)** totales (mg de esteroides/ml de cultivo) y **E)** específicos (mg de esteroides/g de levadura seca). Cada punto corresponde al promedio de muestras de tres cultivos independientes y las barras indican la desviación estándar respectiva.

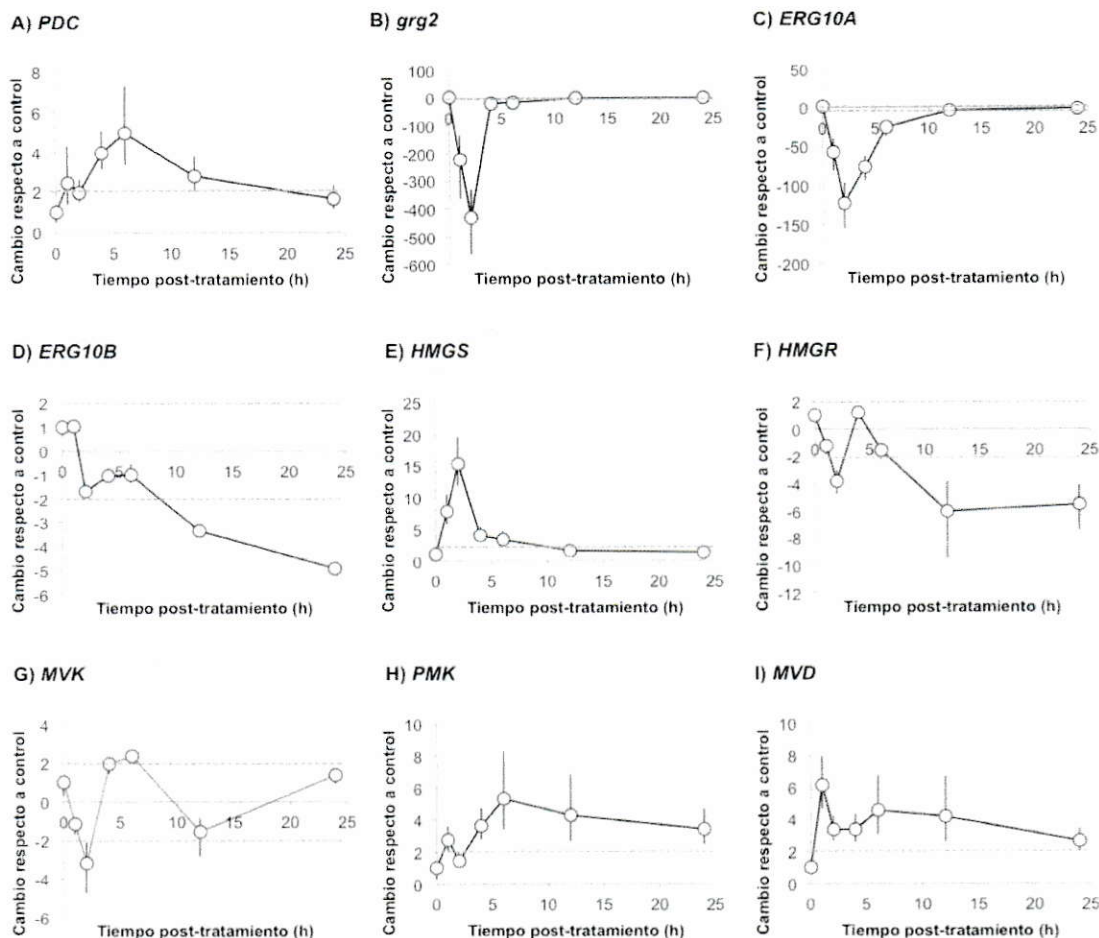


Figura 22.- Efecto de la adición de glucosa sobre la expresión a nivel de mRNA de genes de la ruta MVA en cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*. Se presenta la cinética de los niveles de transcrito medidos mediante RT-qPCR y normalizados primero según la cantidad de transcrito detectado para los genes control actina y *PDA* y luego en relación con el cambio en la cantidad de transcrito detectado en el cultivo sin inducir en muestras tomadas a diferentes tiempos después de la adición de glucosa (concentración final 20 g/l). Los genes usados como control corresponden a **A) PDC** (control de inducción) y **B) grg2** (control represión). Los genes de la ruta MVA corresponden a **C) ERG10A**, **D) ERG10B**, **E) HMGS**, **F) HMGR**, **G) MVK**, **H) PMK** e **I) MVD**. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes y las barras representan el error estándar asociado. Los valores dentro del área entre las líneas punteadas representan cambios no significativos en los niveles de transcrito.

en el tiempo del gen *PDC* (Figura 22 A) que se debería al tratamiento con glucosa y la disminución en la cantidad de transcrito detectada del gen *grg2* (Figura 22 B). Para los genes en estudio en este trabajo, el gen *ERG10A* presenta una represión importante al agregar glucosa, disminuyendo su expresión hasta 120 veces respecto a la condición sin glucosa en el medio (Figura 22 C). El gen *ERG10B* no muestra cambios significativos entre el control y el cultivo tratado con glucosa en las primeras horas post-tratamiento, y sólo se observa una disminución significativa en la cantidad de transcrito detectado en la muestra a la que se agregó glucosa luego de 12 h, que se mantiene hasta 24 h después del tratamiento (Figura 22 D). La expresión del gen *HMGS* se ve mayormente inducida por la adición de glucosa al medio de cultivo, el cual aumenta la cantidad de transcrito hasta 15 veces luego de 4 h (Figura 22 E). Para el gen *HMGR* se observó una pequeña disminución en la cantidad de transcrito 2 h después del tratamiento con glucosa; sin embargo, esta se encuentra más marcada a las 12 h y 24 h post-tratamiento (Figura 22 F).

Para el gen *MVK* no se observó cambios que puedan considerarse significativos, ya que son menores a 2 veces de cambio, sea en disminución o aumento de la cantidad de transcrito (Figura 22 G). Los genes *PMK* y *MVD* (Figura 22 H e I, respectivamente) muestran un aumento que se mantiene incluso después de las 12 h.

En los genes *ERG10B*, *HMGR*, *PMK* y *MVD* los cambios se dan o se mantienen después de más de transcurridas 12 h desde el tratamiento, por lo que no se pueden considerar como un efecto directo de la adición de glucosa al cultivo.

3. 3. 3 Efecto de la adición de etanol.

En trabajos previos se había estudiado el efecto de etanol sobre la síntesis de carotenoides encontrando que en *X. dendrorhous* la síntesis de estos pigmentos va a la par con la producción de etanol cuando la levadura crece en un medio con glucosa como fuente de carbono (Wozniak y col., 2010). Además, se había observado que la adición de etanol a un cultivo produce un aumento en la transcripción de genes de la ruta de carotenogénesis (Marcoleta y col., 2011).

Para determinar si además existe algún efecto activador del etanol sobre la transcripción de genes de la ruta MVA, se realizó un diseño experimental similar al de inducción por glucosa. Brevemente, un cultivo de la cepa UCD 67-385 en fase estacionaria de crecimiento se dividió en dos partes iguales: una se dejó como control y a la segunda se agregó etanol a una concentración final de 2 g/l, replicando las concentraciones de etanol que la levadura produce por la fermentación de la glucosa (Lozano, 2011). De ambos cultivos se tomó muestras a diferentes tiempos para extraer carotenoides, esteroides y RNA.

El crecimiento de los cultivos se siguió midiendo la DO del cultivo a 600 nm y se observó que la adición de etanol causa un aumento en la cantidad de células, posiblemente debido a su uso como fuente de carbono (Figura 23 A). La cantidad de carotenoides totales en el cultivo aumenta cuando se ha agregado etanol al cultivo en relación al control sin tratar (Figura 23 B). Este aumento en los carotenoides acompañaría el crecimiento celular ya que al comparar la cantidad de carotenoides producido por biomasa a las 24 h del tratamiento no hay diferencias significativas entre el cultivo tratado y el control (Figura 23 C). En relación a la cantidad de ergosterol producido en el cultivo no se observa gran diferencia entre el control y la muestra inducida con etanol (Figura 23 D); sin embargo, cuando se consideran los esteroides específicos (normalizados por peso seco de levadura) se tiene que hay una disminución en la cantidad de esteroides en relación al control (Figura 23 E).

Para tener un gen control al evaluar los cambios en los niveles de transcrito de cada gen blanco, se identificó en la base de datos del transcriptoma de *X. dendrorhous* la posible secuencia del gen codificante de la enzima alcohol deshidrogenasa (*ADH*) y se diseñó primarios para medir sus niveles de transcrito por RT-qPCR. Como se puede apreciar en la Figura 24, A, ante la adición de etanol la cantidad de transcrito aumenta hasta un máximo de 16 veces más que el control y transcurridas 24 h, los niveles de transcrito vuelven a condiciones "normales". Los transcritos de los genes *ERG10A* y *ERG10B* (Figura 24 B y C, respectivamente), muestran una tendencia similar: inicialmente, hay una leve disminución que

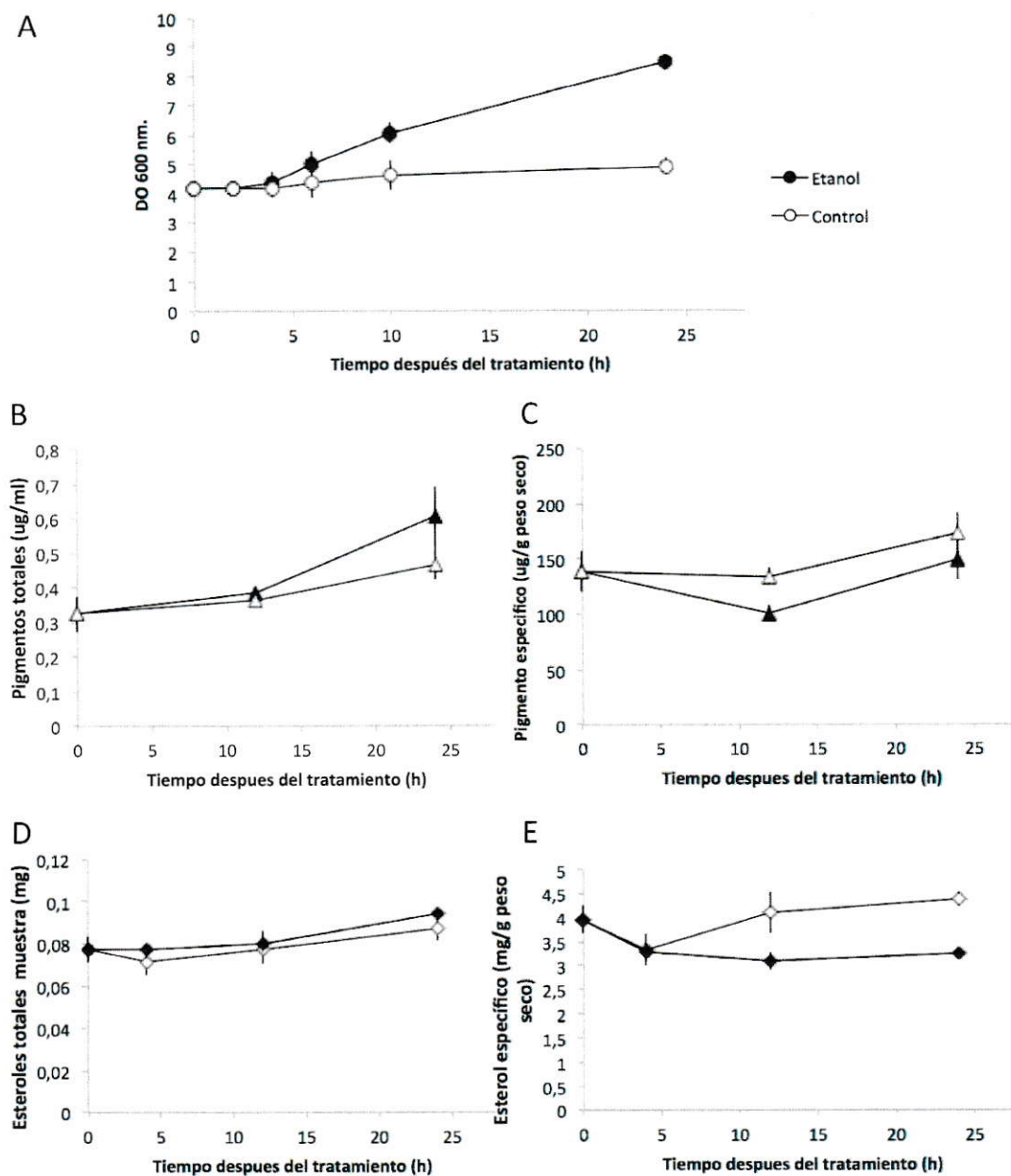


Figura 23.- Efecto de la adición de etanol sobre el crecimiento, síntesis de carotenoides y de esteroides en la cepa UCD 67-385. En todos los paneles, los símbolos negros representan los resultados luego del tratamiento con etanol y los símbolos blanco, la condición control. **A)** Crecimiento del cultivo luego de agregar etanol a una concentración final de 2 g/l al medio (círculos, DO₆₀₀). Carotenoides (triángulos): **B)** totales (µg de carotenoides/ml de cultivo) y **C)** específicos (µg de carotenoides/g de levadura seca). Esteroides (rombos): **D)** totales (mg de esteroides/ml de cultivo) y **E)** específicos (mg de esteroides/g de levadura seca). Cada punto corresponde al promedio de muestras de tres cultivos independientes y las barras indican la desviación estándar respectiva.

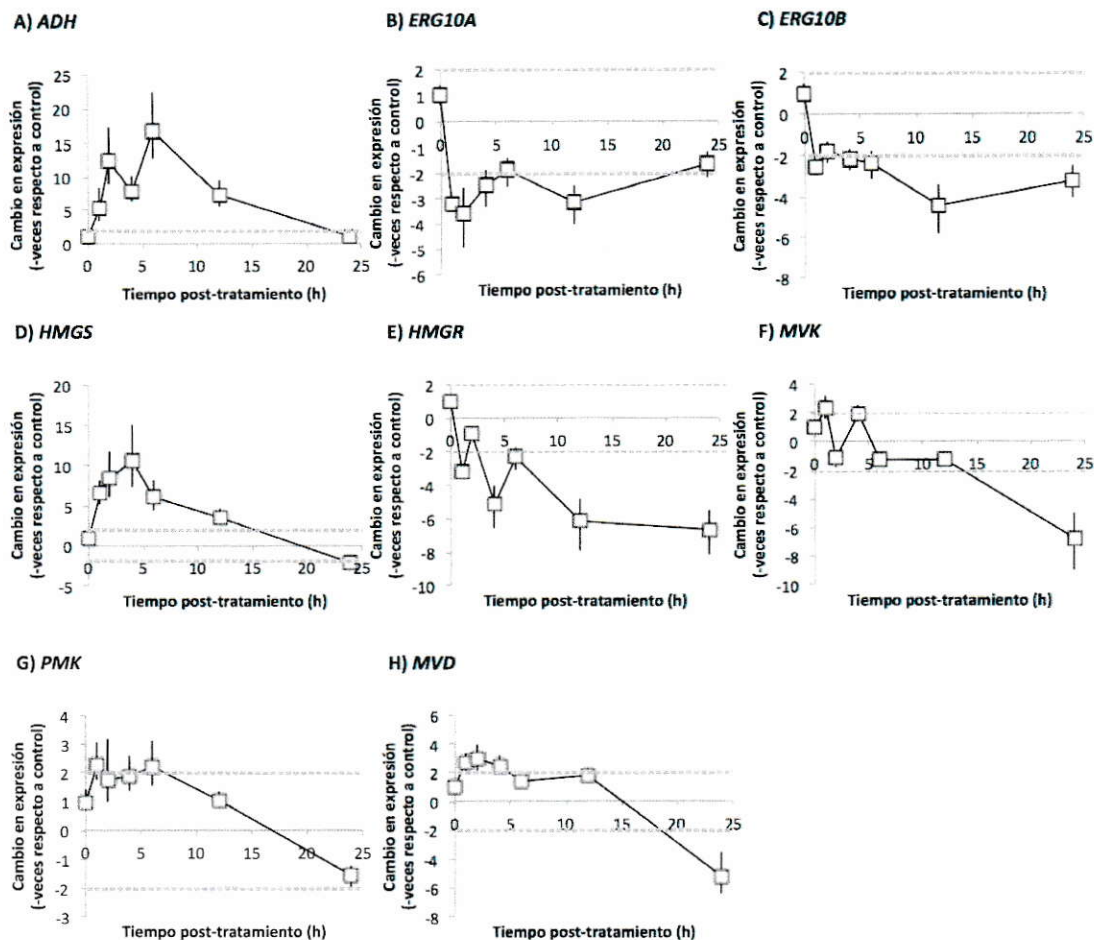


Figura 24.- Efecto de la adición de etanol sobre la expresión a nivel de mRNA de genes de la ruta MVA en cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*. Se presenta la cinética de los niveles de transcrito medidos mediante RT-qPCR en muestras tomadas a diferentes tiempos después de la adición de etanol (concentración final 2 g/l). Como control se usó el gen **A)** *ADH* (control de inducción). Los genes de la ruta MVA corresponden a **B)** *ERG10A*, **C)** *ERG10B*, **D)** *HMGS*, **E)** *HMGR*, **F)** *MVK*, **G)** *PMK* y **H)** *MVD*. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes y las barras representan el error estándar asociado. Los valores dentro del área entre las líneas punteadas representan cambios no significativos en los niveles de transcrito.

persiste hasta las 12 h, momento en el que se tiene la mayor disminución de transcrito (3 veces menos que el control para *ERG10A* y 4 veces menos, para *ERG10B*). Para el gen *HMGS* se observa que el nivel de transcrito aumenta alrededor de 10 veces a las 4 h y a las 24 h vuelve a mostrar cantidades similares al control (Figura 24 D). En la Figura 24 E, se puede observar que el gen *HMGR* presenta un decaimiento gradual en la cantidad de transcrito que probablemente no tenga relación con el efecto directo del etanol ya que se mantiene entre 12 y 24 h post inducción. En el caso de *MVK*, no hay cambios importantes al inicio del experimento, pero se observa una disminución significativa (7 veces menos transcrito) entre las 12 y las 24 h (Figura 24 F). Para el gen *PMK* no se observó cambios que sean significativos durante el transcurso del experimento, teniendo un aumento en los niveles de transcrito de 2 veces en relación al control, durante las primeras 6 h del experimento (Figura 24 G). Para los transcritos del gen *MVD*, se observa que presentan un leve aumento en el inicio del experimento (cerca de 3 veces), pero disminuye 5 veces luego de 24 h (Figura 24 H).

Los cambios en tiempos finales del experimento (12 y 24 h) que se ven para los transcritos de los genes *HMGS*, *MVK* y *MVD* pueden ser consecuencia del metabolismo del etanol y no de una acción directa del compuesto a nivel transcripcional.

3. 3. 4 Efecto de la falta de ergosterol.

Para estudiar el efecto de la falta de ergosterol en la célula sobre la expresión de los genes de la ruta MVA se usó las cepas de *X. dendrorhous* UCD 67-385 y la cepa mutante que no produce ergosterol *385-cyp61(-/-)* (Loto y col., 2012). Se construyeron curvas de crecimiento en paralelo para ambas cepas bajo las mismas condiciones; medio completo YM y agitación constante a 22 °C. De estos cultivos se tomaron muestras a dos tiempos de cultivo diferentes (24 y 120 h) para extracción de RNA total, esteroides y carotenoides.

En la Tabla 8 se presentan las cantidades de esteroides y carotenoides totales producidos por las cepas a diferentes tiempos. Como era esperable, la cepa *385-cyp61(-/-)* produce una mayor cantidad de ambos (Loto y col., 2012). Para el análisis de cambios en los niveles de transcritos,

medidos por RT-qPCR, primero se normalizó la expresión de cada gen respecto a la expresión del gen de actina y luego respecto a la cantidad de transcrito del mismo en la cepa silvestre UCD 67-385, dando como resultado el valor que corresponde al ddCt (Schmittgen y Livak, 2008). Este valor indica el número de veces que cambia la cantidad de transcrito del gen en estudio entre dos condiciones, en este caso se comparan las condiciones en que la levadura no produce ergosterol (cepa 385-*cyp61*(-/-)) respecto a cuando sí lo hace (parental silvestre UCD 67-385).

Tabla 8.- Producción de esteroides y astaxantina por las cepas UCD 67-385 y 385-*cyp61*(-/-).

	Tiempo (h)	UCD 67-385	385- <i>cyp61</i> (-/-)
Esteroides (mg/g peso seco)	24*	9,9 (1,6)	22,7 (4,1)
	120*	5,16 (0,01)	7,6 (0,45)
Carotenoides (µg/g peso seco)	24*	5,5 (0,7)	48,5 (13,7)
	120*	136,6 (29,2)	352,6 (3,7)

En paréntesis se indica la desviación estándar de los datos obtenidas a partir de dos muestras para la cepa UCD 67-385 y de tres, para la cepa *cyp61*(-/-). (prueba T de student: * $p < 0,05$. El asterisco marca los tiempos en que se encontró diferencias significativas en la producción de ambos tipos de metabolitos).

Se encontró que a las 24 h de cultivo hay un aumento estadísticamente significativo en la cantidad de transcrito de los genes *ERG10A*, *ERG10B*, *HMGS*, *HMGR* y *MVD* (Figura 25 A). De éstos, solo el aumento de los cuatro últimos genes mencionados es mayor a dos veces respecto al control, lo que se considera un aumento mayor que los márgenes de error y permite concluir que hay un aumento en la cantidad de transcrito para estos genes en condiciones en las que no se produce ergosterol. A las 120 h de cultivo (Figura 25 B), se observó una mayor diferencia en los cambios de expresión entre ambas cepas para todos los genes estudiados exceptuando *ERG10A*, que no muestra diferencias significativas. Cabe destacar especialmente el aumento en la expresión del gen *HMGS*, que incrementa ≈ 45 veces la cantidad de transcrito respecto a la cepa control.

Estos resultados indican que el aumento en la cantidad de esteroides y pigmentos que presenta la cepa 385-*cyp61*(-/-) en comparación con la cepa parental se debería a un aumento

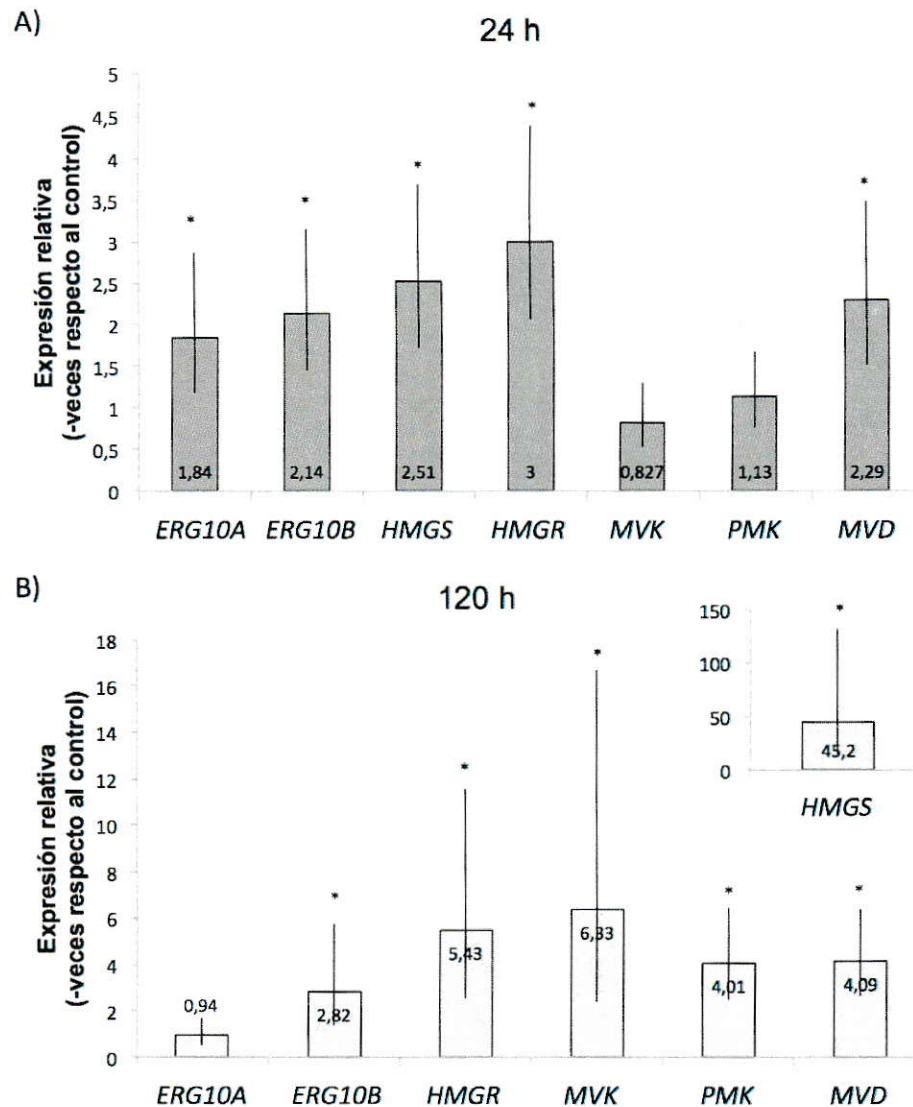


Figura 25.- Cambio en la cantidad de transcrito de genes de la ruta MVA en la cepa 385-cyp61(-/-) respecto a la cepa silvestre UCD 67-385. Niveles relativos de transcritos de genes de la ruta del MVA en **A)** Muestras tomadas a las 24 h de cultivo, fase exponencial. **B)** Muestras obtenidas a las 120 h de cultivo, fase estacionaria. Los resultados del gen *HMGS* se muestran en la esquina superior con una escala diferente. El cambio en la cantidad relativa de transcrito de cada gen estudiado, obtenido a partir del Ct de cada reacción, se indica junto a la barra correspondiente. Los resultados se presentan como el cambio en la cantidad de transcrito medido en la cepa estudiada respecto a la cantidad relativa de transcrito del mismo gen en la cepa UCD 67-385. Los resultados fueron obtenidos a partir del promedio de tres muestras independientes y las barras representan la desviación estándar (prueba T de student: * $p < 0,05$).

general en los niveles de transcrito de los genes de la ruta MVA, que llevaría a tener una mayor cantidad de precursores disponibles para la síntesis de esteroides y carotenoides.

En resumen la adición de fuentes de carbono como glucosa o etanol a los cultivos generan cambios no heterogéneos en la transcripción de los genes de la ruta MVA. Un caso particular es el del gen *HMGS*, cuyos transcritos aumentan de manera significativa como respuesta a la adición de ambos compuestos. En el caso de la cepa que no produce ergosterol, se puede notar que los transcritos de los genes aumentan en diferentes cantidades, nuevamente destacando el gen *HMGS* que presenta un aumento mayor en sus niveles de transcrito que los otros genes de la ruta respecto a la cepa silvestre.

Finalmente, los resultados presentados en este trabajo describen la secuencia y estructura de los genes de la ruta MVA de *X. dendrorhous* y presentan evidencia de la funcionalidad de los genes *ERG10*, *HMGS* y *MVK* de esta levadura. Además de ello, se muestra que en las condiciones estudiadas, la expresión de los genes de la ruta MVA es afectada principalmente por la ausencia de ergosterol en la célula.

4. DISCUSIÓN

En este trabajo se caracterizó los genes de la ruta MVA que no habían sido descritos previo al inicio de esta Tesis, obteniendo las secuencias de los genes *ERG10A*, *ERG10B*, *HMGS*, *MVK*, *PMK* y *MVD*. De estos genes se caracterizó funcionalmente, mediante complementación heteróloga en *S. cerevisiae*, los genes *ERG10B*, *HMGS* y *MVK*, confirmando que su funcionalidad se encuentra conservada entre levaduras. Además, la funcionalidad del gen *ERG10A* fue caracterizado en *X. dendrorhous* por la obtención de una mutante nula.

4. 1 Los genes *ERG10A* y *ERG10B* codifican enzimas de diferente función en *X. dendrorhous*

En el análisis bioinformático del genoma de la levadura se identificó dos posibles genes de enzimas de tipo tiolasa (Tabla 5). Dado que la superfamilia tiolasa incorpora enzimas que participan en múltiples rutas metabólicas (Haapalainen y col., 2006), fue necesario profundizar en el análisis con el fin de determinar cuál de las enzimas participaría directamente de la ruta del MVA.

Las posibles proteínas codificadas por cada gen: Erg10Ap y Erg10Bp, presentan los mismos residuos catalíticos conservados del sitio activo, por lo que se analizó la relación entre ambas posibles proteínas y otras tiolasas de función y localización celular conocidas, por porcentajes de identidad (Tabla 6) y un árbol filogenético (Figura 8) incluyendo acetil-CoA C-

acetiltransferasas que participan de la ruta MVA y 3-cetoacil-CoA tiolasas que catalizan el último paso en la β -oxidación de ácidos grasos en el peroxisoma. De este análisis se encontró que Erg10Ap presenta una mayor similitud con 3-cetoacil-CoA tiolasas y Erg10Bp con acetil-CoA acetiltransferasas, sugiriendo que *ERG10B* codificaría la tiolasa que participa de la ruta MVA. Además, un trabajo publicado durante el desarrollo de esta Tesis mencionó el gen que codificaría una acetil-CoA acetiltransferasa en *X. dendrorhous* denominado *acaT* (GenBank: AB919149, Hara y col., 2014), el que presenta un 98 % de identidad de secuencia con un 91 % de cobertura comparado con el gen *ERG10B* identificado en nuestro trabajo.

En la complementación funcional en *S. cerevisiae* sólo se obtuvo resultados en la complementación del gen *ERG10B*, pese a que los experimentos para intentar obtener una cepa en la que complementara el gen *ERG10A* se repitieron varias veces, incluso en paralelo con la realización de un control hecho con el gen *ERG10* de *S. cerevisiae*. En estos intentos se sembraron por duplicado alrededor de 500 colonias y de éstas, 30 colonias fueron analizadas también por PCR buscando alguna cepa haploide de *S. cerevisiae* que no tuviera el gen *ERG10* endógeno, sin resultados positivos. Las cepas en las que se observó complementación funcional, SCD10-sc y SCD10-10B, produjeron mayor cantidad de esteroides totales que la cepa parental diploide SCD Δ erg10. Esto último puede deberse a que el gen en estudio se encuentra en un plásmido episómico, de alto número de copias, regulado por un promotor distinto que el gen homólogo en el cromosoma, lo que podría llevar a mayores cantidades de transcrito disponibles. Los resultados de complementación heteróloga en *S. cerevisiae* indican que el gen *ERG10B* codifica una acetil-CoA acetiltransferasa, por lo que la secuencia correspondiente se subió a GenBank con el código KX267759. En el caso del gen *ERG10A*, éste no codificaría una enzima con actividad acetil-CoA acetiltransferasa si no, probablemente, una 3-cetoacil-CoA tiolasa.

En relación a las mutantes de *X. dendrorhous*, se obtuvo cepas heterocigotas para la mutación de ambos genes que no mostraban diferencias fenotípicas de pigmentación a simple vista. Pese a que se ha descrito que los genes de la ruta MVA son esenciales para la viabilidad

celular, si ambos genes *ERG10* codificaran enzimas con la misma función complementarían entre ellos y sería posible obtener mutantes nulas de uno de ellos, tal como se hizo para los genes codificantes de HMGR, *HMG1* y *HMG2*, de *S. cerevisiae* (Basson y col., 1986). Por este motivo se hizo un ensayo de DRM (Niklitschek y col., 2008) para cada una de las mutantes heterocigotas. Se seleccionó algunas colonias en la máxima concentración de antibiótico en el que hubo crecimiento que fueron analizadas por PCR para definir si se había perdido el alelo del gen luego del tratamiento. No se encontró mutantes homocigotos a partir de la cepa 385-*erg10B*(+/-), además que no creció a concentraciones superiores a 200 µg/ml de higromicina B. En el caso de la cepa 385-*erg10A*(+/-), los cultivos en medio líquido resistieron hasta 400 µg/ml de antibiótico, la concentración máxima que se probó. De estos cultivos, se obtuvo colonias con un fenotipo pálido y más brillantes que la cepa parental (Figura 16 A) y se confirmó la pérdida de ambos alelos del gen *ERG10A* por PCR.

Se tomó una segunda aproximación para obtener mutantes homocigotas del gen *ERG10B* transformando la cepa 385-*erg10B*(+/-) con un segundo módulo de transformación que contenía resistencia a zeocina. La selección de transformantes se hizo usando placas suplementadas con higromicina B y zeocina a modo de seleccionar dobles mutantes, pero no se encontró colonias resistentes a ambos antibióticos luego de varios intentos. Esto sugiere que una mutante homocigota del gen *ERG10B* no sería viable, lo que se espera si *ERG10B* codificase la única enzima con actividad acetil-CoA acetiltransferasa en *X. dendrorhous*.

Las cepas mutantes de los genes *ERG10* no presentaron diferencias significativas en la cantidad de esteroides totales ni pigmentos totales producidos por cada cepa. En el caso de la mutante homocigota 385-*erg10A*(-/-), la cepa mostró un cambio significativo en la composición de pigmentos al presentar una disminución en la proporción de astaxantina producida.

Dado el fenotipo pálido de la cepa 385-*erg10A*(-/-), se hizo un análisis por RT-qPCR comparando la cantidad de transcrito de los genes *ERG10A*, *ERG10B*, *crtS* y *crtR*, ya que estos dos últimos controlan las etapas finales en la biosíntesis de astaxantina donde justamente se encontró diferencias en la proporción de carotenoides (Figura 1). En la cepa heterocigota, el

transcrito del gen *ERG10A* es el único que cambia de forma significativa disminuyendo a la mitad en comparación con la cepa parental UCD 67-385. En la mutante nula no se detectó transcrito del gen *ERG10A*, demostrando que la cepa no tiene copias de este gen que sean transcritas. En la misma cepa, los niveles de transcrito del gen *ERG10B* aumentan alrededor de 8 veces en comparación con la cepa parental, sugiriendo que habría alguna forma de compensación por la pérdida de *ERG10A*. Tal como se indicó anteriormente, *ERG10A* no codificaría una enzima de la ruta del MVA, si no una 3-cetoacil-CoA tiolasa involucrada en la β -oxidación de ácidos grasos. De esta manera, Erg10Ap podría influir sobre la disponibilidad de sustrato para la ruta MVA, ya que incide sobre la cantidad de acetil-CoA producido dentro del peroxisoma que luego es transportado a la mitocondria para producir energía mediante el ciclo del ácido tricarbóxico (Tang y col., 2015). Para mantener la disponibilidad de acetil-CoA a nivel mitocondrial sería necesario aumentar el transporte de acetil-CoA desde el citoplasma, reduciendo la cantidad disponible a ser utilizada en la ruta MVA. Entonces, un mayor nivel de transcrito del gen *ERG10B* conllevaría a mayor cantidad de Erg10Bp y permitiría captar mayor cantidad de sustrato para mantener el flujo de acetil-CoA citoplásmico hacia la ruta MVA. De esta manera se evitaría una reducción del flujo de acetil-CoA hacia la ruta, manteniendo la síntesis de esteroides necesarios para la replicación celular (Figura 26).

Los cambios en la composición de pigmentos entre la mutante nula del gen *ERG10A* y la cepa parental se debería a una disminución de 5 veces en la cantidad de transcrito del gen *crtS*, que codifica una enzima citocromo P450 (Álvarez y col., 2006). Estas enzimas requieren de una enzima dadora de electrones, citocromo P450 reductasa, que en *X. dendrorhous* esta codificada por el gen *crtR* y que es esencial para la síntesis de astaxantina (Alcaíno y col., 2008). No se observó cambios en la cantidad de transcrito del gen *crtR*, probablemente porque la citocromo P450 reductasa también está involucrada en la biosíntesis de ergosterol, vía en la que participan dos citocromos P450 (Loto 2012, Leiva 2015). Así, la disminución de los transcritos de *crtS* reducirían la actividad carotenogénica, pero se mantendría el flujo hacia la síntesis de ergosterol.

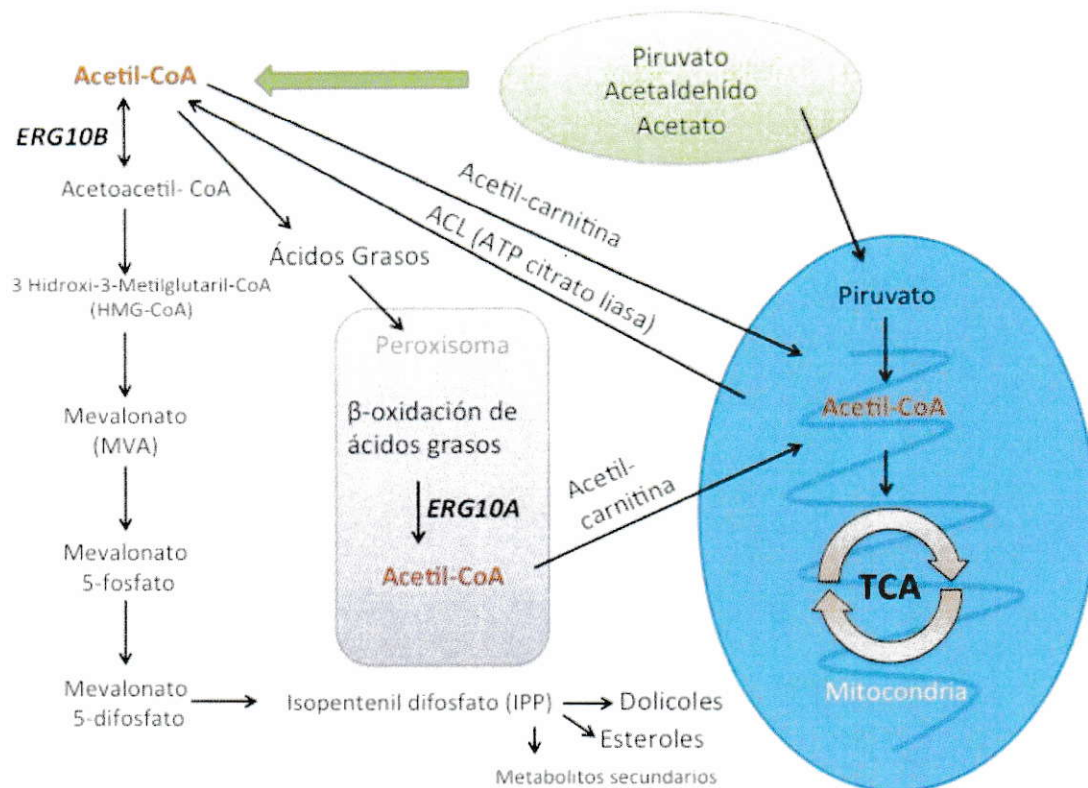


Figura 26.- Esquema que representa el transporte de acetil-CoA entre compartimentos celulares. En color rojo se indica el acetil-CoA que puede ser movilizado desde el citoplasma a la mitocondria (en azul) o al peroxisoma (en violeta) o utilizado en la ruta del mevalonato al ser sustrato de la enzima codificada por el gen *ERG10B*. En el recuadro verde se indican los sustratos a partir de los que se obtiene acetil-CoA citoplásmico. El último paso de la β-oxidación de ácidos grasos, del que participaría la enzima codificada por el gen *ERG10A* se encuentra representado.

Por otra parte, se ha descrito que los genes que codifican 3-cetoacil-CoA tiolasas se encuentran sujetos a represión catabólica (Einerhand y col., 1995). En el experimento de inducción por glucosa, el gen *ERG10A* mostró una fuerte represión debido a la adición de glucosa al cultivo al disminuir cerca de 120 veces la cantidad de transcrito detectado en comparación con el control (Figura 22 C). La forma mostrada en la curva es similar a la del control de represión por glucosa *grg2*, recuperando la cantidad de transcrito una vez que la

glucosa en el medio se agota. Si bien no se encontró sitios de unión de Mig1 en el análisis del promotor de este gen, en otras especies de levadura se ha descrito que la represión por glucosa estaría asociada a otros factores transcripcionales como UME6, ABF1 y RP-A (Einerhand y col., 1995).

En resumen, la evidencia experimental indica que el gen que codifica la enzima acetil-CoA acetiltransferasa en *X. dendrorhous* corresponde a *ERG10B* y que este gen estaría regulado a nivel transcripcional por la cantidad de ergosterol disponible en la célula. Por otra parte, el gen *ERG10A* codificaría la enzima 3-cetoacil-CoA tiolasa que participa de la degradación de ácidos grasos en el peroxisoma, cuya expresión es regulada por glucosa.

4. 2 El gen *HMGS* codifica una HMG-CoA sintasa y es un punto de activación de la vía MVA.

El gen *HMGS* de *X. dendrorhous* fue identificado en el genoma y transcriptoma de la cepa UCD 67-385 de la levadura. Está compuesto de 11 exones y 10 intrones; su ORF es de 1.404 b y codificaría una proteína de 467 aminoácidos (Tabla 5). Para identificar los aminoácidos conservados del sitio activo se realizó un alineamiento con otras secuencias de enzimas *HMGS* y se identificó los residuos pertenecientes a la tríada catalítica; Glu-92, Cys-126, His-271 en *X. dendrorhous* que se corresponden con los residuos Glu-95, Cys-129 e His-264 en la estructura de la proteína *HMGS* citosólica de *H. sapiens* (2P8U, Shafqat y col., 2010).

Para evaluar la funcionalidad de dicho gen, se realizó un ensayo de complementación heteróloga en una cepa mutante del gen homólogo de *S. cerevisiae*. Como la mutación *hmgS*⁻ en *S. cerevisiae* no es viable, fue necesario primero transformar con el plásmido que portaba el gen de *X. dendrorhous* y luego obtener la cepa mutante *hmgS*⁻ de *S. cerevisiae* a partir de una cepa diploide portadora del plásmido. La cepa obtenida en la complementación, no presenta mayores diferencias en el crecimiento al ser comparada con la cepa parental o con la cepa tipo S288c, pero sí produce una cantidad de esteroides totales significativamente menor que la segunda (Figura 13).

Entre los antecedentes de regulación de la expresión de este gen se había descrito que en animales es regulada a nivel transcripcional por los niveles de esteroides por el mecanismo SREBP (Goldstein y Brown, 1990). En el análisis bioinformático de promotores (Figura 9) se encontró un sitio SRE alrededor de 1 kb río arriba del codón de inicio de la traducción del gen. Los resultados obtenidos al medir el cambio en los niveles de transcrito de los genes en ausencia de ergosterol sugieren que este sitio sería funcional, ya que la cantidad de transcrito *HMGS* aumenta alrededor de 45 veces en la cepa *cyp61⁻* que no produce ergosterol en comparación con la cepa parental. En general, la mayor parte de los estudios sobre regulación en la ruta MVA se encuentran enfocados en el gen *HMGR* ya que está regulado a múltiples niveles (Goldstein y Brown, 1990); sin embargo, en el caso de la regulación por ergosterol a nivel transcripcional en *X. dendrorhous*, el gen *HMGR* no sería tan importante como *HMGS* considerando que muestra un aumento de sólo 5 veces en comparación con la cepa parental en las condiciones estudiadas.

La importancia del gen *HMGS* a nivel transcripcional para la regulación de la ruta también fue observada en los ensayos de inducción por glucosa (Figura 22 E) y etanol (Figura 24 D). En la inducción por glucosa los niveles de transcrito de este gen mostraron un comportamiento similar a los del gen control de inducción por glucosa, *PDC* (Figura 22 A). La cantidad de transcrito del gen *HMGS* aumentó 15 veces respecto al control sin glucosa y este aumento se atenuó en el tiempo a medida que la glucosa fue consumida. En la inducción por etanol se observó un fenómeno similar con un aumento en la cantidad de transcrito de 10 veces comparado con el control (Figura 24). Es importante destacar que de los genes estudiados, *HMGS* es el único que presenta este comportamiento. En el hongo carotenogénico *Phycomyces blakesleeianus* se ha visto que factores que afectan síntesis de pigmentos a nivel transcripcional de sus genes como la luz azul y la interacción sexual, no modifican los niveles de transcrito del gen *HMGS* respectivo (Almeida y Cerdá-Olmedo, 2008), lo que sería una diferencia con lo que se observa en *X. dendrorhous*, donde factores que afectan la expresión de genes

carotenogénicos como etanol y glucosa (Marcoleta y col., 2011) también tienen un efecto sobre la transcripción de este gen.

En otros estudios se ha visto que el gen *HMGS* de *X. dendrorhous* podría ser un paso limitante en la ruta, ya que al evaluar el efecto de la sobreexpresión de este gen sobre la producción de pigmentos se encontró que producía un aumento en la cantidad de pigmentos y además el cultivo alcanzaba una mayor DO que la cepa control (Hara y col., 2014). Los cambios significativos a los que está sujeta la transcripción del gen *HMGS* ante el efecto de estímulos en *X. dendrorhous* indican la posibilidad que sea un punto de regulación importante de la ruta del MVA de esta levadura.

4. 3 Las quinasas de la ruta MVA presentan características comunes conservadas.

El grupo de proteínas conformado por MVK, PMK y MVD pertenecen a la familia de proteínas GHMP quinasas (galactoquinasas, homoserina quinasa, mevalonato quinasa, “*phosphomevalonate*” quinasa), compartiendo una serie de caracteres comunes que permiten su funcionalidad (Bork y col., 1993). Los genes correspondientes a estas quinasas de la ruta MVA de *X. dendrorhous* fueron identificados.

En primer lugar se encontró el gen *MVK* de *X. dendrorhous* el que indicó que el ORF del gen es de 948 b y la proteína codificada por el mismo estaría formada por 315 aminoácidos. Dentro de esta proteína se identificó los residuos Glu-82 y Asp-93 que corresponderían al sitio catalítico en el homólogo de *R. norvegicus* (PDB: 1KVK) además de el sitio de unión de ATP que comprende los residuos entre Gly-32 y Ala-37 (Fu y col., 2002).

La segunda quinasa de la ruta MVA corresponde a *PMK*. En *X. dendrorhous* el gen que codifica la proteína tiene un ORF de 1.491 b codificando una proteína de 496 aminoácidos. En esta secuencia también fue posible encontrar los residuos conservados en varias regiones, siguiendo lo indicado por Houten y Waterdam (2001), incluyendo el péptido de interacción con

ATP mencionado previamente por Tsay y Robinson (1991) que se encuentra entre Gly-177 y Ala-183.

Por último, el gen que codifica la enzima MVD también fue identificado en *X. dendrorhous* con un ORF de 1.206 b y una proteína de 401 aminoácidos. En esta proteína se encontró los residuos Asp-309 y Arg-160, que serían muy importantes para la catálisis ya que en mutantes de *S. cerevisiae* en que se afectan estos residuos no se logró medir las constantes cinéticas, a diferencia de la proteína silvestre (Krepkiy y Mizirko, 2004). También se encontró en la proteína de *X. dendrorhous* el *loop* de interacción con ATP, entre los residuos Gly-118 y Gly-125.

En relación a su funcionalidad sólo se hizo experimentos con el gen *MVK*, el que se usó en ensayos de complementación heteróloga en una cepa mutante del mismo gen de *S. cerevisiae*. Tal como en el caso de otros genes de la ruta del MVA, la mutación *mvk*⁻ en *S. cerevisiae* no es viable. Por ello, primero se transformó una cepa mutante diploide y heterocigota con el plásmido que portaba el gen de *X. dendrorhous* y luego se obtuvo la cepa mutante haploide *mvk*⁻ de *S. cerevisiae*, portadora del plásmido con el gen *MVK* de *X. dendrorhous*. La cepa obtenida en la complementación no presentó diferencias en el crecimiento al ser comparada con la cepa parental, ni tampoco presentó diferencias significativas en la cantidad de esteroides totales que produce (Figura 14).

Por otra parte, también se construyó una cepa mutante de una copia del gen *MVK* de *X. dendrorhous* derivada de la cepa UCD 67-385, la cual es diploide. Esto se hizo mediante reemplazo por recombinación usando un módulo de resistencia a higromicina B flanqueado por secuencias amplificadas desde el genoma de *X. dendrorhous* correspondientes a las regiones río arriba y río abajo del gen *MVK*. La cepa mutante obtenida 385-*mvk*(+/-) mostró diferencias fenotípicas en cuanto a pigmentación, presentando un color más amarillo que la cepa parental (Figura 16 A). Al comparar la composición de pigmentos en la cepa mutante se encontró que efectivamente producía una menor proporción de astaxantina que la cepa parental, acompañado con una mayor proporción de intermediarios de la ruta carotenogénica (Figura 19 C y D). Pese a ello, la cepa no presentó diferencias en su crecimiento al compararla con la cepa

parental, ni en la cantidad total de carotenoides y esteroides producidos. A nivel de transcritos, medidos por RT-qPCR, la cantidad de transcrito del gen *MVK* efectivamente disminuye como consecuencia de la mutación de uno de sus alelos. Además hay una disminución en la cantidad de transcrito del gen *crtR*, necesario para la síntesis de astaxantina a partir de beta-caroteno, siendo posiblemente la causa del cambio en la composición de carotenoides de la levadura. Estas características se han observado en otros mutantes de genes que participan de la producción de precursores de pigmentos, como es el caso de los genes *crtE* y *FPS*, cuyas mutantes heterocigotas también tienen una menor proporción de astaxantina y una disminución en la cantidad de transcrito detectada para el gen *crtR* en la cepa mutante (Alcaíno y col., 2014). Por otra parte el efecto fenotípico sobre la levadura debido a la disminución en la dosis génica de *MVK* sugiere que puede ser un punto de regulación importante de la vía del MVA. Se ha descrito que la enzima estaría regulada negativamente por intermediarios de isoprenoides como geranyl pirofosfato (GPP), FPP y GGPP, y que esta inhibición ocurriría exclusivamente sobre la enzima *MVK* y no sobre las otras quinasas de la ruta (Hinson y col., 1997).

En atención a la regulación transcripcional de estos genes hay diferencias entre *MVK*, *PMK* y *MVD*. Ante la falta de ergosterol intracelular, a las 24 h de crecimiento no hay cambios significativos en la cantidad de transcritos de los genes *MVK* y *PMK*; en cuanto al transcrito de *MVD*, la cantidad de transcrito detectada es el doble en comparación con la cepa parental. En fase estacionaria de crecimiento hay un aumento en la cantidad de transcrito detectado para los tres genes dándose un incremento de 6 veces para *MVK* y de 4 veces para *PMK* y *MVD*. Si bien no hay estudios particulares sobre la regulación de estos transcritos por esteroides en levaduras, se ha visto que en hígado de ratón estos genes están regulados por SREBP-2, ya que sus transcritos aumentan en ratones *knockout* del gen de dicho regulador (Horton y col., 2003). Por otra parte, se vió que en *S. pombe*, la regulación por SREBP actúa como un sensor de oxígeno permitiendo la adaptación a cambios en su concentración y que en condiciones de anaerobiosis habría un aumento significativo en la cantidad de transcrito del homólogo del gen *MVK* (Todd y

col., 2006). En esta condición también se encontró un aumento en la cantidad de transcrito de *PMK* y *MVD* en microarreglos; sin embargo, estos no fueron significativos.

En los experimentos de inducción por glucosa y etanol la cantidad de transcrito de los genes *PMK* y *MVD* presentó cinéticas similares para ambos. En la inducción por glucosa se encontró un aumento en la cantidad de estos transcritos de alrededor de 5 veces respecto al control que no disminuye al reducirse la cantidad de glucosa en el medio, lo que sugiere que no se debe a un efecto directo de la glucosa sobre la transcripción de estos genes. Para el transcrito del gen *MVK*, los cambios identificados no fueron significativos.

Al agregar etanol al cultivo se encontró que los niveles de transcritos de los genes codificantes de quinasas de la ruta MVA no presentaban cambios significativos en las primeras 12 h luego de la inducción. Sin embargo, se encontró una disminución de más de 5 veces luego de 24 h desde la inducción en la cantidad de transcrito de los genes *MVK* y *PMK*. Debido a la diferencia en tiempo entre la adición de etanol al cultivo y el cambio observado, es improbable que el cambio se deba a un efecto directo del etanol, más bien es posible que este dado por algún subproducto del metabolismo del compuesto.

4. 4 Efecto de la glucosa y el etanol en la ruta MVA de *X. dendrorhous*.

El metabolismo en *X. dendrorhous* es un proceso complejo que ha sido caracterizado principalmente en función de los procesos asociados a la biosíntesis de carotenoides. El conocimiento actual sobre el efecto de la fuente de carbono indica que en *X. dendrorhous* la síntesis de pigmentos disminuye en presencia de glucosa, lo que se debería a la represión transcripcional de los genes asociados a la carotenogénesis mediado por Mig1 (Bravo, 2015). La excepción a ello es el gen *crtE*, el cual experimenta una disminución en la cantidad de transcrito debido a la adición de glucosa que se mantiene aún en mutantes de Mig1 (Bravo, 2015). Pese a ello, existen antecedentes que indican que genes relacionados con la síntesis de precursores de carotenoides, específicamente *idi* y *FPS* son inducidos ante la adición de

glucosa al medio (Marcoleta, 2011). En general, los genes de la ruta del MVA analizados en este trabajo no muestran una tendencia común en el cambio en los niveles de transcritos. Sí se observó un aumento relacionado con la adición de glucosa de los transcritos del gen *HMGS*, el cual posiblemente es un paso limitante dentro de la ruta, considerando que cataliza el primer paso irreversible dentro de ésta (Jiang y col., 2008). Si bien no se encontró un aumento en la cantidad de transcrito del gen *HMGR* como respuesta a la adición de glucosa, existen antecedentes que indican que hay regulación a nivel de proteína en este paso. En *S. pombe*, la adición de glucosa suprime la fosforilación de la proteína lo que evitaría una disminución en su actividad (Burg y Espenshade, 2011).

A nivel general, la adición de glucosa a los cultivos induciría la ruta del MVA para la producción de IPP y DMAPP. Sin embargo, estos precursores serían usados preferencialmente en procesos celulares esenciales en lugar de la síntesis de carotenoides, ya que esta sería sujeta a represión catabólica (Marcoleta y col., 2011).

El efecto del etanol sobre la célula se debe principalmente a un efecto indirecto sobre rutas metabólicas debido a la necesidad de metabolizar el etanol (Jones, 1989). También existiría un efecto físico sobre la membrana celular, debido a la capacidad del etanol de interactuar con los lípidos de membrana, que puede verse reflejado como cambios fisiológicos de la misma. En general, la capacidad de la levadura para tolerar el etanol dependería de su capacidad de producir ergosterol, considerando que la viabilidad de mutantes de levaduras que no producen ergosterol, pero sí otros intermediarios, se reduce durante la fermentación y además producen cantidades menores de etanol que aquellas cepas que producen ergosterol (Grunwald-Raij y Margalith, 1990).

En *X. dendrorhous* se ha observado que la producción de etanol depende de la cantidad de glucosa adicionada al medio de cultivo, llegando a producir 2 g/l de etanol al crecer en medio mínimo suplementado con glucosa al 2 %, sin que esto afecte el crecimiento de la célula (Lozano, 2011). En levaduras que son tolerantes a etanol no se observa inhibición del

crecimiento en concentraciones de etanol bajo los 10 a 20 g/l (Jones, 1989), por lo que la concentración de etanol utilizada en este trabajo no afectaría el crecimiento de *X. dendrorhous*.

En este trabajo se observó que ante la adición de etanol a cultivos de *X. dendrorhous* se produjo un aumento en la cantidad de transcrito del gen *HMGS* en las primeras horas luego de la adición. Luego se observó una disminución en la cantidad de transcrito en forma similar a lo que ocurrió con el control *ADH*, que se debería al agotamiento del etanol en el medio. Este fenómeno no se observó para los otros genes estudiados.

A diferencia de lo que ocurre cuando se agrega glucosa a los cultivos, la adición de etanol estimularía la síntesis de pigmentos al aumentar los niveles de transcrito de los genes *crtYB* y *crtS*, ambos necesarios para la biosíntesis de astaxantina (Marcoleta, 2011). En este caso, el crecimiento de la levadura estaría acompañado por la producción de carotenoides, manteniendo la cantidad específica de pigmentos similar a la condición control luego de 24 h del tratamiento. Esto no ocurre con los esteroides producidos por la levadura, cuya cantidad total en el cultivo se mantiene, pero al normalizar por peso seco se tiene una disminución en comparación con el control (Figura 23). Esto podría explicarse porque la incorporación de etanol y su uso como fuente de carbono llevan a una mayor producción de acetil-CoA en el citoplasma, que estaría disponible para el uso en la vía del MVA; sin embargo, en este trabajo no se encontró que existiera un aumento general en los transcritos de la vía del MVA como respuesta a la adición de etanol. Esto sugiere que la síntesis *de novo* de carotenoides observada en el trabajo de Marcoleta (2011) estaría mayormente relacionada con las diferencias en los niveles de transcrito de genes carotenogénicos, más que con un cambio en la disponibilidad de precursores.

En síntesis, este trabajo identificó los genes de la ruta del MVA en *X. dendrorhous* y además se obtuvo evidencia de la funcionalidad de los genes *ERG10B*, *HMGS* y *MVK*, que catalizan las primeras etapas de esta ruta junto con *HMGR*. Además, se describió funcionalmente el gen *ERG10A* que si bien no participa en la ruta del MVA, su mutación afecta la síntesis de

carotenoides en *X. dendrorhous*. Finalmente, se encontró que a nivel transcripcional el gen *HMGS* sería un punto importante en la regulación de la vía ante la adición de glucosa o etanol, además de presentar un gran aumento en la cantidad de transcritos en condiciones donde la célula no produce ergosterol.

5. CONCLUSIONES

- Se identificó las secuencias de los genes *ERG10B*, *HMGS*, *MVK*, *PMK* y *MVD* de la ruta del mevalonato de *X. dendrorhous* en el genoma de la levadura, además se obtuvo las secuencias de los ORFs correspondientes. También se identificó el gen *ERG10A* que sería homólogo a *POT1* de *S. cerevisiae* y participaría de la β -oxidación de ácidos grasos.
- Los genes *ERG10B*, *HMGS* y *MVK* de *X. dendrorhous* identificados son funcionales, lo que fue probado mediante complementación heteróloga en cepas mutantes de *S. cerevisiae*. El gen *ERG10B* codifica una acetil-CoA acetiltransferasa, el gen *HMGS*, la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa y el gen *MVK* codifica una mevalonato kinasa.
- Ante la falta de ergosterol intracelular, los transcritos de los genes de la ruta del MVA de *X. dendrorhous* aumentan. Este aumento es especialmente fuerte para el transcrito del gen *HMGS*.
- La adición de glucosa y etanol a cultivos de *X. dendrorhous* no tiene un efecto global a nivel transcripcional sobre los genes de la ruta del MVA. Sólo el transcrito del gen *HMGS* muestra una respuesta común en ambos casos que corresponde a un aumento en la cantidad de transcrito detectado. El efecto que estos compuestos tienen sobre la síntesis de pigmentos en la levadura se debe a los cambios que producen en la transcripción de genes carotenogénicos y no en un efecto sobre los precursores de su síntesis.

6. REFERENCIAS

- Adrio, J. L., & Veiga, M. (1995). Transformation of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnology Techniques*, 9(7), 509-512.
- Alberts, A. W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V., Huff, J., Hoffman, C., Rothrock, J., Lopez, M., Joshua, H., Harris, E., Patchett, A., Monaghan, R., Currie, S., Stapley, E., Albers-Schonberg, G., Hensens, O., Hirshfield, J., Hoogsteen, K., Liesch, J. & Springer, J. (1980). Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 77(7), 3957-3961.
- Alcaíno, J., Barahona, S., Carmona, M., Lozano, C., Marcoleta, A., Niklitschek, M., Sepúlveda, D., Baeza, M., & Cifuentes, V. (2008). Cloning of the cytochrome p450 reductase (*crtR*) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiology*, 8(1), 169.
- Alcaíno, J., Romero, I., Niklitschek, M., Sepúlveda, D., Rojas, M. C., Baeza, M., & Cifuentes, V. (2014). Functional characterization of the *Xanthophyllomyces dendrorhous* farnesyl pyrophosphate synthase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase encoding genes that are involved in the synthesis of isoprenoid precursors. *PLoS ONE*, 9(5), e96626.
- Almeida, E. R., & Cerdá-Olmedo, E. (2008). Gene expression in the regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Current Genetics*, 53(3), 129-137.
- Alvarez, V., Rodríguez-Sáiz, M., de la Fuente, J.L., Gudiña, E.J., Godio, R.P., Martín, J.F., & 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, E. A. (1989). Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 116-124.

- An, G. H., Bielich, J., Auerbach, R., & Johnson, E. A. (1991). Isolation and characterization of carotenoid hyperproducing mutants of yeast by flow cytometry and cell sorting. *Nature Biotechnology*, 9(1), 70-73.
- An, G. H. & Johnson, E. A. 1990. Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 57, 191- 203.
- Armstrong, G. A., & Hearst, J. E. (1996). Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *The FASEB Journal*, 10(2), 228-237.
- Baeza, M., Retamales, P., Sepúlveda, D., Lodato, P., Jiménez, A., & Cifuentes, V. (2009). Isolation, characterization and long term preservation of mutant strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of Basic Microbiology*, 49(2), 135-141.
- Barta, M. L., McWhorter, W. J., Mizioro, H. M., & Geisbrecht, B. V. (2012). Structural basis for nucleotide binding and reaction catalysis in mevalonate diphosphate decarboxylase. *Biochemistry*, 51(28), 5611-5621.
- Basson, M. E., Thorsness, M., & Rine, J. (1986). *Saccharomyces cerevisiae* contains two functional genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 83(15), 5563-5567.
- Bien, C. M., & Espenshade, P. J. (2010). Sterol regulatory element binding proteins in fungi: hypoxic transcription factors linked to pathogenesis. *Eukaryotic Cell*, 9(3), 352-359.
- Blasko, A., Belagyi, J., Dergez, T., Deli, J., Papp, G., Papp, T., Vagvolgyi, C., Pesti, M. (2008). Effect of polar and non-polar carotenoids on *Xanthophyllomyces dendrorhous* membranes by EPR. *European Biophysics Journal*, 37(7), 1097-1104.
- Bloch, K. (1964). Nobel Lecture: "The Biological Synthesis of Cholesterol. Nobel Lectures Physiology or Medicine 1963-1970, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1972.
- Bloch, K. (1965). The biological synthesis of cholesterol. *Science* 150:19-28.
- Bork, P., Sander, C., & Valencia, A. (1993). Convergent evolution of similar enzymatic function on different protein folds: the hexokinase, ribokinase, and galactokinase families of sugar kinases. *Protein Science*, 2(1), 31-40.
- Boyle, J. S., & Lew, A. M. (1995). An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends in Genetics*, 11(1), 8.
- Bravo, N. (2015). Participación de la proteína Mig1 en la represión por glucosa de los genes carotenogénicos de *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis de Doctorado en ciencias mención Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB Journal*, 9: 1551–1558.
- Cane, D. E., Sohng, J. K., Lamberson, C. R., Rudnicki, S. M., Wu, Z., Lloyd, M. D., Oliver, J. S. & Hubbard, B. R. (1994). Pentalenene synthase. Purification, molecular cloning, sequencing, and high-level expression in *Escherichia coli* of a terpenoid cyclase from *Streptomyces UC5319*. *Biochemistry*, 33(19), 5846-5857.
- Chang, Y. C., Ingavale, S. S., Bien, C., Espenshade, P., & Kwon-Chung, K. J. (2009). Conservation of the sterol regulatory element-binding protein pathway and its pathobiological importance in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 8(11), 1770-1779.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159.
- Ciesarová, Z., Sajbidor, J., Smogrovicova, D., & Bafrcnova, P. (1996). Effect of ethanol on fermentation and lipid composition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Biotechnology*, 10, 1–12
- Cifuentes, V., Hermosilla, G., Martínez, C., Leon, 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.
- Contreras, G. (2014). Caracterización molecular de probables cepas de *Xanthophyllomyces dendrorhous* aisladas desde la antártica chilena y análisis de la producción de metabolitos con potencial biotecnológico. Tesis de Magister en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile
- Contreras, G., Barahona, S., Sepúlveda, D., Baeza, M., Cifuentes, V. & Alcaíno, J. (2015). Identification and analysis of metabolite production with biotechnological potential in *Xanthophyllomyces dendrorhous* isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31, 517-526.
- Cordier, H., Lacombe, C., Karst, F., & Bergès, T. (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* mevalonate diphosphate decarboxylase (erg19p) forms homodimers *in vivo*, and a single substitution in a structurally conserved region impairs dimerization. *Current Microbiology*, 38(5), 290-294.
- Córdova, P. (2016). Estudio de los genes *CYC8* y *TUP1* de *X. dendrorhous* y su participación en represión catabólica y regulación de la carotenogénesis. Tesis de Doctorado en ciencias mención Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile

- Dassanayake, R., Cao, L., Samaranayake, L., & Berges, T. (2002). Characterization, heterologous expression and functional analysis of mevalonate diphosphate decarboxylase gene (*MVD*) of *Candida albicans*. *Molecular Genetics and Genomics*, 267(3), 281-290.
- de la Fuente, J. L., Rodríguez-Sáiz, M., Schleissner, C., Díez, B., Peiro, E., & Barredo, J. L. (2010). High-titer production of astaxanthin by the semi-industrial fermentation of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of Biotechnology*, 148(2), 144-146.
- Dorsey, J. K., & Porter, J. W. (1968). The inhibition of mevalonic kinase by geranyl and farnesyl pyrophosphates. *Journal of Biological Chemistry*, 243(18), 4667-4670.
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S. M., Blanc, P., Murthy, K. N. C., & Ravishankar, G. A. (2005). Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?. *Trends in Food Science & Technology*, 16(9), 389-406.
- Einerhand, A. W., Kos, W., Smart, W. C., Kal, A. J., Tabak, H. F., & Cooper, T. G. (1995). The upstream region of the *FOX3* gene encoding peroxisomal 3-oxoacyl-coenzyme A thiolase in *Saccharomyces cerevisiae* contains ABF1-and replication protein A-binding sites that participate in its regulation by glucose repression. *Molecular and Cellular Biology*, 15(6), 3405-3414.
- Espenshade, P. J., & Hughes, A. L. (2007). Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Genetics*, 41.
- Flores-Cotera, L., Martin, R., & 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(3), 341-347.
- Fox, A. R., Soto, G., Mozzicafreddo, M., Garcia, A. N., Cuccioloni, M., Angeletti, M., Salerno, J.C., & Ayub, N. D. (2014). Understanding the function of bacterial and eukaryotic thiolases II by integrating evolutionary and functional approaches. *Gene*, 533(1), 5-10.
- Frengova, G. I. & Beshkova, D. M. (2009). Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 163-180.
- Fu, Z., Wang, M., Potter, D., Miziorko, H. M., & Kim, J. J. P. (2002). The structure of a binary complex between a mammalian mevalonate kinase and ATP insights into the reaction mechanism and human inherited disease. *Journal of Biological Chemistry*, 277(20), 18134-18142.

- Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., André, B. *et al.* (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 418(6896), 387-391.
- Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 343(6257), 425.
- Goldstein, J. L., DeBose-Boyd, R. A., & Brown, M. S. (2006). Protein sensors for membrane sterols. *Cell*, 124(1), 35-46.
- Golubev, W. I. (1995). Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Yeast*, 11(2), 101-110.
- Gómez, M. (2016). Sobreexpresión de los genes que codifican a las enzimas acetoacetyl-CoA tiolasa y HMG-CoA reductasa, participantes de la ruta del mevalonato en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Seminario de Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile
- Grunwald-raij, H., & Margalith, P. (1990). Ethanol fermentation by nystatin-resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Bacteriology*, 68(3), 247-252.
- Gu, W. L., An, G. H., & Johnson, E. A. (1997). Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19(2), 114-117.
- Haapalainen, A. M., Meriläinen, G., & Wierenga, R. K. (2006). The thiolase superfamily: condensing enzymes with diverse reaction specificities. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(1), 64-71.
- Hara, K. Y., Morita, T., Mochizuki, M., Yamamoto, K., Ogino, C., Araki, M., & Kondo, A. (2014). Development of a multi-gene expression system in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Microbial Cell Factories*, 13, 175.
- Higuchi, R., Krummel, B., & Saiki, R. (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Research*, 16(15), 7351-7367.
- Hinson, D. D., Chambliss, K. L., Toth, M. J., Tanaka, R. D., & Gibson, K. M. (1997). Post-translational regulation of mevalonate kinase by intermediates of the cholesterol and nonsterol isoprene biosynthetic pathways. *Journal of Lipid Research*, 38(11), 2216-2223.
- Hiser, L., Basson, M. E., & Rine, J. (1994). *ERG10* from *Saccharomyces cerevisiae* encodes acetoacetyl-CoA thiolase. *Journal of Biological Chemistry*, 269(50), 31383-31389.

- Horton, J. D., Shah, N. A., Warrington, J. A., Anderson, N. N., Park, S. W., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2003). Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100(21), 12027-12032.
- Houten, S. M., & Waterham, H. R. (2001). Nonorthologous gene displacement of phosphomevalonate kinase. *Molecular Genetics and Metabolism*, 72(3), 273-276.
- Hu, Z. C., Zheng, Y. G., Wang, Z., & Shen, Y. C. (2006). pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), 586-590.
- Igual, J. C., González-Bosch, C., Franco, L., & Pérez-Ortín, J. E. (1992a). The *POT1* gene for yeast peroxisomal thiolase is subject to three different mechanisms of regulation. *Molecular Microbiology*, 6(14), 1867-1875.
- Igual, J. C., Gonzalez-Bosch, C., Dopazo, J., & Perez-Ortín, J. E. (1992b). Phylogenetic analysis of the thiolase family. Implications for the evolutionary origin of peroxisomes. *Journal of Molecular Evolution*, 35(2), 147-155.
- Jiang, C., Kim, S. Y., & Suh, D. Y. (2008). Divergent evolution of the thiolase superfamily and chalcone synthase family. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(3), 691-701.
- Jiang, M., Stephanopoulos, G., & Pfeifer, B. A. (2012). Toward biosynthetic design and implementation of *Escherichia coli*-derived paclitaxel and other heterologous polyisoprene compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2497-2504.
- Johnson, E. A., & Lewis, M. J. (1979). Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Microbiology*, 115(1), 173-183.
- Jones, R. P. (1989). Biological principles for the effects of ethanol. *Enzyme and Microbial Technology*, 11(3), 130-153.
- Jullien, N. (2007). AmplifX versión 1.44 <http://cm2m.univ-mrs.fr/pub/amplifx-dist>. Visitado en Junio de 2013.
- Kajiwara, S., Fraser, P. D., Kondo, K. & Misawa, N. (1997). Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*, 426, 421-426.
- Krepkiy, D., & Mizioro, H. M. (2004). Identification of active site residues in mevalonate diphosphate decarboxylase: implications for a family of phosphotransferases. *Protein Science*, 13(7), 1875-1881.

- Leiva, K., Werner, N., Sepúlveda, D., Barahona, S., Baeza, M., Cifuentes, V., & Alcaíno, J. (2015). Identification and functional characterization of the *CYP51* gene from the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* that is involved in ergosterol biosynthesis. *BMC Microbiology*, *15*(1), 1.
- Lichtenthaler, H. K., Rohmer, M., & Schwender, J. (1997). Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum*, *101*(3), 643-652.
- Liu, Y. S., & Wu, J. Y. (2007). Perfusion culture process plus H₂O₂ stimulation for efficient astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnology and Bioengineering*, *97*(3), 568-573.
- Livak, K.J., & Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(-\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods*, *25*, 402-408.
- Libkind, D., Ruffini, A., van Broock, M., Alves, L., & Sampaio, J. P. (2007). Biogeography, host specificity, and molecular phylogeny of the basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma* and its sexual form, *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(4), 1120-1125.
- Lodato, P., Alcaíno, J., Barahona, S., Retamales, P., & Cifuentes, V. (2003). Alternative splicing of transcripts from *crtI* and *crtYB* genes of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(8), 4676-4682.
- Lodato, P., Alcaíno, J., Barahona, S., Niklitschek, M., Carmona, M., Wozniak, A., Baeza, M., Jimenez, A., & Cifuentes, V. (2007). Expression of the carotenoid biosynthesis genes in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biological Research*, *40*(1), 73-84.
- Loto, I., Gutiérrez, M. S., Barahona, S., Sepúlveda, D., Martínez-Moya, P., Baeza, M., Cifuentes, V., & Alcaíno, J. (2012). Enhancement of carotenoid production by disrupting the C22-sterol desaturase gene (*CYP61*) in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiology*, *12*(1), 1.
- Lozano, C. (2011). Estudio de la organización funcional de los genes de carotenogénesis de cepas sobreproductoras de carotenoides de *X. dendrorhous*. Tesis de Doctorado en ciencias mención Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Martinez-Moya, P., Watt, S. A., Niehaus, K., Alcaíno, J., Baeza, M., & Cifuentes, V. (2011). Proteomic analysis of the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiology*, *11*(1), 1.

- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L. Y. & Bryant, S. H. (2015). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research*, 43: 222-226.
- Marcoleta, A. (2011). Regulación transcripcional de la ruta de biosíntesis de astaxantina de *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis de Doctorado en ciencias mención Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Marcoleta, A., Niklitschek, M., Wozniak, A., Lozano, C., Alcaino, J., Baeza, M., & Cifuentes, V. (2011). Glucose and ethanol-dependent transcriptional regulation of the astaxanthin biosynthesis pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiology*, 11(1), 1.
- Melillo, E., Muntendam, R., Quax, W. J., & Kayser, O. (2012). Heterologous expression of pentalenene synthase (PSS) from *Streptomyces* UC5319 in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of Biotechnology*, 161(3), 302-307.
- Melillo, E., Setroikromo, R., Quax, W. J., & Kayser, O. (2013). Production of α -cuprenene in *Xanthophyllomyces dendrorhous*: a step closer to a potent terpene biofactory. *Microbial Cell Factories*, 12, 13.
- Mercadante, A.Z. & Egeland, E.S. (2004). Carotenoids. Handbook. Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. Birkhäuser Verlag Basel-Boston-Berlin.
- Miao, L., Chi, S., Tang, Y., Su, Z., Yin, T., Guan, G., & Li, Y. (2011). Astaxanthin biosynthesis is enhanced by high carotenogenic gene expression and decrease of fatty acids and ergosterol in a *Phaffia rhodozyma* mutant strain. *FEMS Yeast Research*, 11(2), 192-201.
- Miller, M. W., Yoneyama, M., & Soneda, M. (1976). *Phaffia*, a new yeast genus in the Deuteromycotina (Blastomycetes). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 26(2), 286-291.
- Misawa, N., & Shimada, H. (1998). Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. *Journal of Biotechnology*, 59(3), 169-181.
- Miziorko, H. M. (2011). Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 505(2), 131-143.
- Modis, Y., & Wierenga, R. K. (2000). Crystallographic analysis of the reaction pathway of *Zoogloea ramigera* biosynthetic thiolase. *Journal of Molecular Biology*, 297(5), 1171-1182.
- Motamed, M., Zhang, Y., Wang, M. L., Seemann, J., Kwon, H. J., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2011). Identification of luminal Loop 1 of Scap protein as the sterol

- sensor that maintains cholesterol homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 286(20), 18002-18012.
- Muntendam, R., Melillo, E., Ryden, A., & Kayser, O. (2009). Perspectives and limits of engineering the isoprenoid metabolism in heterologous hosts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(6), 1003-1019.
- Niklitschek, M. (2007). Desarrollo de un casete de resistencia a antibiótico en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Seminario de Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencias, 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*. *Biological Research*, 41(1), 93-108.
- Oulmouden A, & Karst F. (1990). Isolation of the *ERG12* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding mevalonate kinase. *Gene*, 88, 253-257
- Pei, J., Kim, B. H., & Grishin, N. V. (2008). PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Research*, 36(7), 2295-2300.
- Pereto, J., López-García, P., & Moreira, D. (2005). Phylogenetic analysis of eukaryotic thiolases suggests multiple proteobacterial origins. *Journal of Molecular Evolution*, 61(1), 65-74.
- Phaff, H. J., Miller, M. W., Yoneyama, M., & Soneda, M. (1972). A comparative study of the yeast flora associated with trees on the Japanese islands and on the west coast of North America. In *Proceedings of the 4th IFS: Fermentation Technology Today Meeting. Society of Fermentation Technology, Osaka, Japan* (Vol. 15, pp. 759-774).
- Raychaudhuri, S., Young, B. P., Espenshade, P. J., & Loewen, C. J. (2012). Regulation of lipid metabolism: a tale of two yeasts. *Current Opinion in Cell Biology*, 24(4), 502-508.
- Romanowski, M. J., Bonanno, J. B., & Burley, S. K. (2002). Crystal structure of the *Streptococcus pneumoniae* phosphomevalonate kinase, a member of the GHMP kinase superfamily. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 47(4), 568-571.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (2001). *Molecular cloning*. New York: Cold spring harbor laboratory press.
- Sánchez-Torres, P., González-Candelas, L., & Ramón, D. (1998). Heterologous expression of a *Candida molischiana* anthocyanin- β -glucosidase in a wine yeast strain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 354-360.

- 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., Hübelin, M., Sandmann, G., & Schrader, J. (2011). Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(3), 555-571.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101-1108.
- Schroeder, A. & Johnson, E. A. (1993). Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia Rhodozyma*. *Food Microbiology*, 139, 907-912.
- Shafqat, N., Turnbull, A., Zschocke, J., Oppermann, U., & Yue, W. W. (2010). Crystal structures of human HMG-CoA synthase isoforms provide insights into inherited ketogenesis disorders and inhibitor design. *Journal of Molecular Biology*, 398(4), 497-506.
- Sharma, R., Gassel, S., Steiger, S., Xia, X., Bauer, R., Sandmann, G., & Thines, M. (2015). The genome of the basal agaricomycete *Xanthophyllomyces dendrorhous* provides insights into the organization of its acetyl-CoA derived pathways and the evolution of Agaricomycotina. *BMC Genomics*, 16(1), 1.
- Sieiro, C., Poza, M., De Miguel, T., & Villa, T. G. (2003). Genetic basis of microbial carotenogenesis. *International Microbiology*, 6(1), 11-16.
- Smit, A., & Mushegian, A. (2000). Biosynthesis of isoprenoids via mevalonate in Archaea: the lost pathway. *Genome Research*, 10, 1468–1484
- Smith, R. L. & Johnson, A. D. (2000). Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*, 25, 325-330.
- Tang, X., Lee, J., & Chen, W. N. (2015). Engineering the fatty acid metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for advanced biofuel production. *Metabolic Engineering Communications*, 2, 58-66.
- Theisen, M. J., Misra, I., Saadat, D., Campobasso, N., Miziorko, H. M., & Harrison, D. H. (2004). 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase intermediate complex observed in "real-time". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101(47), 16442-16447.
- Tsay, Y. H., & Robinson, G. W. (1991). Cloning and characterization of *ERG8*, an essential gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes phosphomevalonate kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 11(2), 620-631.

- Todd, B. L., Stewart, E. V., Burg, J. S., Hughes, A. L., & Espenshade, P. J. (2006). Sterol regulatory element binding protein is a principal regulator of anaerobic gene expression in fission yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 26(7), 2817-2831.
- Toth, M. J., & Huwyler, L. (1996). Molecular cloning and expression of the cDNAs encoding human and yeast mevalonate pyrophosphate decarboxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 271(14), 7895-7898.
- Ukibe, K., Katsuragi, T., Tani, Y., & Takagi, H. (2008). Efficient screening for astaxanthin-overproducing mutants of the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* by flow cytometry. *FEMS Microbiology Letters*, 286(2), 241-248.
- Vazquez, M., & Martin, A. M. (1998). Optimization of *Phaffia rhodozyma* continuous culture through response surface methodology. *Biotechnology and Bioengineering*, 57(3), 314-320.
- Verdoes, J. C., Krubasik, K. P., Sandmann, G., & Van Ooyen, A. J. (1999a). Isolation and functional characterization of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Molecular General Genetics*, 262, 453-461.
- Verdoes, J. C., Misawa, N. & van Ooyen, a J. (1999b). Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnology and Bioengineering*, 63, 750-755.
- Verdoes, J. C., Sandmann, G., Visser, H., Diaz, M., van Mossel, M., & van Ooyen, A. J. (2003). Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 3728-3738.
- Voynova, N. E., Fu, Z., Battaile, K. P., Herdendorf, T. J., Kim, J. J. P., & Mizioro, H. M. (2008). Human mevalonate diphosphate decarboxylase: characterization, investigation of the mevalonate diphosphate binding site, and crystal structure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 480(1), 58-67.
- Weber, R. W., Becerra, J., Silva, M. J., & Davoli, P. (2008). An unusual *Xanthophyllomyces* strain from leaves of *Eucalyptus globulus* in Chile. *Mycological Research*, 112(7), 861-867.
- Winzeler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., *et al.* (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, 285(5429), 901-906.
- Wong, K. H., & Struhl, K. (2011). The Cyc8–Tup1 complex inhibits transcription primarily by masking the activation domain of the recruiting protein. *Genes & Development*, 25(23), 2525-2539.

- Wozniak, A., Lozano, C., Barahona, S., Niklitschek, M., Marcoleta, A., Alcaíno, J., Sepulveda, D., Baeza, M., & Cifuentes, V. (2011). Differential carotenoid production and gene expression in *Xanthophyllomyces dendrorhous* grown in a nonfermentable carbon source. *FEMS Yeast Research*, 11(3), 252-262.
- Yamane, Y., Higashida, K., Nakashimada, Y., Kakizono, T., & 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(11), 4471-4478.
- Zhang, Z., & Reese, J. C. (2005). Molecular genetic analysis of the yeast repressor Rfx1/Crt1 reveals a novel two-step regulatory mechanism. *Molecular and Cellular Biology*, 25(17), 7399-7411.

ANEXO: PUBLICACIONES

BMC Microbiology

Functional characterization of thiolase-encoding genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous* and their effects on carotenoid synthesis.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	MCRO-D-16-00288
Full Title:	Functional characterization of thiolase-encoding genes from <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> and their effects on carotenoid synthesis.
Article Type:	Research article
Section/Category:	Microbial genetics, genomics and proteomics
Funding Information:	FONDECYT (1160202) Not applicable FONDECYT (11121200) Not applicable CONICYT fellowship (21110701) Mrs Nicole Werner
Abstract:	<p>Abstract</p> <p>Background: The basidiomycetous yeast <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> has been described as a potential biofactory for terpenoid-derived compounds due to its ability to synthesize astaxanthin. Functional knowledge of the genes involved in terpenoid synthesis would create opportunities to enhance carotenoid production. A thiolase enzyme catalyzes the first step in terpenoid synthesis.</p> <p>Results: Two potential thiolase-encoding genes were found in the yeast genome; bioinformatically, one was identified as an acetyl-CoA C-acetyltransferase (ERG10), and the other was identified as a 3-ketoacyl Co-A thiolase (POT1). Heterologous complementation assays in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> showed that the ERG10 gene from <i>X. dendrorhous</i> could complement the lack of the endogenous ERG10 gene in <i>S. cerevisiae</i>, thereby allowing cellular growth and sterol synthesis. <i>X. dendrorhous</i> heterozygous mutants for each gene were created, and a homozygous POT1 mutant was also obtained. This mutant exhibited changes in pigment composition and higher ERG10 transcript levels than the wild type strain.</p> <p>Conclusions: The results support the notion that the ERG10 gene in <i>X. dendrorhous</i> is a functional acetyl-CoA C-acetyltransferase essential for the synthesis of mevalonate in yeast. The POT1 gene would encode a functional 3-ketoacyl Co-A thiolase that is non-essential for cell growth, but its mutation indirectly affects pigment production.</p> <p>Keywords: Thiolase, mevalonate, astaxanthin, sterols, carotenoids, functional complementation.</p>
Corresponding Author:	Jennifer Alcaino, Ph.D Universidad de Chile CHILE
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidad de Chile
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Nicole Werner
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Nicole Werner Melissa Gomez Marcelo Baeza Victor Cifuentes Jennifer Alcaino, Ph.D