

UCH-FC  
Doc-Microb  
L. 883  
C 1



**Identificación y caracterización del gen  
HMGR que codifica a la enzima HMG-CoA  
Reductasa en *Xanthophyllomyces dendrorhous*  
y su rol en la síntesis de carotenoides.**

**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**

**Iris Eleonora Loto Campos**

**Enero, 2015**

**Director de Tesis Dr. Víctor Hugo Cifuentes Guzmán.  
Co-Directora de Tesis Dra. Jennifer Alcaíno G.**

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

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

Iris Eleonora Loto Campos

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 17 Diciembre de 2014.

Director de Tesis:

Dr. Víctor Hugo Cifuentes G. ....

Co-Director de Tesis

Dra. Jennifer Alcaíno G. ....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Rosalba Lagos .....

Dr. Claudio Martínez .....

Dr. Marcelo Baeza .....



A todos mis seres queridos

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mis padres (Mamá y Eduardo) por todo el apoyo incondicional en cada etapa de mi vida. A mis hermanos Germán y Cristián por estar siempre a mi lado apoyandome. A mis bellas sobrinas Martina y Victoria por todo su cariño en una simple sonrisa. Gracias a toda mi familia, por estar siempre conmigo.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio Dony, Oriana, Mária Soledad, Salvador, Carla, Maricela, Mauricio, Andres, Ignacio, Rafael por su amistad, cariño, apoyo y colaboración, y también a todos aquellos que de una u otra forman ayudaron al desarrollo de esta tesis.

Agradezco especialmente al Dr. Víctor Cifuentes por haberme aceptado en su grupo de trabajo y darme siempre su apoyo incondicional, por sus consejos, tirones de orejas y sobre todo por el apoyo incondicional en las buenas y en las malas.

Agradezco a la Dra. Jenny Alcaino y Dra. María Cecilia Rojas por su apoyo incondicional en el desarrollo de esta tesis.

Agradezco a mi comadre Mitzi y toda su familia por su apoyo, cariño y por darme una hermosa ahijada (Rayen).

Agradezco a mis compañeros del Colegio Santa María Goretti (Yasna, Daniel, Mabel y Javier) por su apoyo y gran amistad que me brindaron.

Les doy gracias a toda mi familia, amigos chilenos y argentinos y profesores.

Gracias a los proyectos FONDECYT N° 1140504, FONDECYT N° 11121200 y BECA MECESUP-604 por el financiamiento para desarrollar este trabajo.

**A TODOS MUCHAS GRACIAS.**

## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS .....	I
ÍNDICE GENERAL .....	II
ÍNDICE DE TABLAS .....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ABREVIATURAS.....	VII
RESUMEN .....	9
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUCCIÓN .....	14
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Cepas, condiciones de cultivo y plásmidos.....</b>	<b>30</b>
2.2 Técnicas de Biología molecular.....	34
2.3. Transformación de microorganismos por electroporación. ....	36
2.4 Amplificación de DNA por PCR. ....	39
2.5 Determinación de los niveles relativos de los mensajeros de los diversos genes mediante PCR cuantitativo en tiempo real. ....	42
<b>2.6. Actividad HMG-CoA reductasa .....</b>	<b>42</b>
<b>2.7. Extracción y análisis de carotenoides.....</b>	<b>44</b>
2.8. Extracción y análisis de esteroides.....	46
3. RESULTADOS.....	48
3.1 Identificación y caracterización molecular del gen <i>HMGR</i> de <i>X. dendrorhous</i> involucrado en la biosíntesis de Mevalonato a partir de HMG-CoA y NADPH. ....	49
3.2 Estudios de funcionalidad del gen <i>HMGR</i> de <i>X. dendrorhous</i> .....	60
3.3 Determinación del efecto de la fuente de carbono en la expresión del gen <i>HMGR</i> en la cepa silvestre de <i>X. dendrorhous</i> .....	79
3.4. Estudiar la expresión del gen <i>HMGR</i> y fenotipo productor de carotenoides y esteroides en mutantes <i>CYP61</i> incapaces de producir ergosterol de <i>X. dendrorhous</i> .....	85
4. DISCUSIÓN .....	96
5. CONCLUSION .....	108
6. BIBLIOGRAFIA .....	110

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Cepas utilizadas y construidas en este trabajo. ....	31
<b>Tabla 2.</b> Plásmidos utilizados construidos en este trabajo.....	32
<b>Tabla 3.</b> Partidores utilizados y diseñados en este trabajo.....	40
<b>Tabla 4.</b> Parametro de nivel de transcrito del gen <i>HMGR</i> , actividad HMG-CoA reductasa y producción de carotenoides en la cepa UCD 67-385 de <i>X. dendrorhous</i> .....	62
<b>Tabla 5.</b> Niveles de transcrito del gen <i>HMGR</i> en la cepa UCD 67-385, 385.HMGR.Hyg y 385.HMGR.Zeo cultivadas en medio YM.....	70
<b>Tabla 6.</b> Composición de carotenoides de la cepa silvestre y mutantes <i>HMGR</i> de <i>X. dendrorhous</i> en $\mu\text{g}$ de carotenoides por g de levadura seca a las 120 h de crecimiento..	73
<b>Tabla 7.</b> Composición de la cepa S288c-bcar y S288c-bcar.cHMGR de <i>S. cerevisiae</i> en $\mu\text{g}$ de carotenoides por g de levadura seca al final del crecimiento.....	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Síntesis y clasificación de los terpenos.....	16
<b>Figura 2.</b> Ruta de biosíntesis del IPP por la vía del ácido mevalónico.....	18
<b>Figura 3.</b> Modelo del dominio estructural de HMG CoA reductase.....	19
<b>Figura 4.</b> Modelo de regulación transcripcional del gen <i>HMGR</i> en mamíferos.....	21
<b>Figura 5.</b> Esquema de las vías de síntesis de astaxantina y ergosterol.....	25
<b>Figura 6.</b> Obtención de la colonia PR20-XVIII-5 a partir de la genoteca <i>Bam</i> HI de <i>X. dendrorhous</i> .....	50
<b>Figura 7.</b> Análisis de pPR20-XVIII-5.....	52
<b>Figura 8:</b> Comparación de secuencia del gen <i>HMGR</i> .....	54
<b>Figura 9.</b> Clonado y secuenciación del cDNA del gen <i>HMGR</i> de <i>X. dendrorhous</i> .....	55
<b>Figura 10.</b> Análisis de la región promotora y codificante del gen <i>HMGR</i> .....	57
<b>Figura 11.</b> Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida de <i>HMGR</i> de <i>X. dendrorhous</i> con la de otros organismos.....	59
<b>Figura 12.</b> Cladograma de alineamiento de las secuencias de HMG-CoA reductasa de distintos organismos.....	60
<b>Figura 13.</b> Estrategia para inserción del DNA transformante en el locus <i>HMGR</i> .....	64
<b>Figura 14.</b> Análisis genotípico de las cepa silvestres UCD 67-385 y transformantes 385.HMGR.Hyg y 385.HMGR.Zeo de <i>X. dendrorhous</i> .....	66
<b>Figura 15.</b> Curvas de crecimiento de las cepas UCD 67-385, 385.HMGR.Hgy y 385.HMGR.Zeo en medio YM.....	69

<b>Figura 16.</b> Producción de carotenoides por las cepas UCD 67-385, 385.HMGR.Hyg y 385.HMGR.Zeo de <i>X. dendrorhous</i> .	72
<b>Figura 17.</b> Cultivos de las cepas S288c-bcar y S288c-bcar.cHMGR.4 de <i>S. cerevisiae</i> .	75
<b>Figura 18.</b> Producción de esteroides y carotenoides totales de las cepas S288c.bcar y S288c-bcar.cHMGR.4.	77
<b>Figura 19.</b> Crecimiento de la cepa UCD 67-385 post-inducción.	81
<b>Figura 20.</b> Efecto de la glucosa en los niveles de transcrito del gen <i>HMGR</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	83
<b>Figura 21.</b> Efecto del etanol en los niveles de transcrito del gen <i>HMGR</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	84
<b>Figura 22.</b> El fenotipo de color de las cepas silvestres y mutantes <i>cyp61</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	86
<b>Figura 23.</b> Curva de crecimientos de cepas silvestres y mutantes <i>CYP61</i> de <i>X. dendrorhous</i> en medio completo YM	88
<b>Figura 24.</b> Análisis de esteroides por RP-HPLC de las cepas UCD 67-385 y 385- <i>cyp61<sup>hph</sup>/cyp61<sup>zeo</sup></i>	89
<b>Figura 25.</b> Contenido de esteroides en función de su perfil de RP-HPLC de las cepas silvestres y mutantes <i>cyp61 X. dendrorhous</i> (en mg / g de peso seco de levadura) a los diferentes tiempos analizados	91
<b>Figura 26.</b> Carotenoides totales en las cepas silvestres y mutantes <i>CYP61</i> de <i>X. dendrorhous</i>	92



**Figura 27.** Análisis de los niveles de transcrito del gen *HMGR* por RT-qPCR, a diferentes tiempos de crecimiento en las cepas silvestres y mutantes *cyp61*<sup>-</sup>  
.....94

**ABREVIATURAS**

<b>A</b>	<b>Absorbancia</b>
<b>aa.</b>	<b>Aminoácidos</b>
<b>Amp</b>	<b>Ampicilina</b>
<b>C</b>	<b>Carbono</b>
<b>D.O.</b>	<b>Densidad óptica</b>
<b>Da</b>	<b>Dalton</b>
<b>DMAPP</b>	<b>Dimetilalil pirofosfato</b>
<b>DTT</b>	<b>Ditiotreitol</b>
<b>EDTA</b>	<b>Ácido etilendiaminotetracético</b>
<b>FPP</b>	<b>Farnesil pirofosfato</b>
<b>gDNA</b>	<b>DNA genómico</b>
<b>GGPP</b>	<b>Geranilgeranil pirofosfato</b>
<b>GPP</b>	<b>Geranil pirofosfato</b>
<b>HMG-CoA</b>	<b>3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A</b>
<b>HMGR</b>	<b>3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A reductasa</b>
<b>HMGS</b>	<b>3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A sintasa</b>
<b>HPLC</b>	<b>Cromatografía líquida de alta resolución</b>
<b>Hyg</b>	<b>Higromicina</b>
<b>IPP</b>	<b>Isopentenil pirofosfato</b>
<b>G418</b>	<b>Geneticina</b>
<b>kb</b>	<b>Kilobases</b>
<b>LB</b>	<b>Medio de cultivo Luria-Bertani</b>
<b>MVA</b>	<b>Mevalonato</b>
<b>MVD</b>	<b>Difosfomevalonato descarboxilasa</b>
<b>MVK</b>	<b>Mevalonato quinasa</b>
<b>NA</b>	<b>Número de acceso a la base de datos GenBank</b>
<b>NADPH</b>	<b>Nicotinamida Adenín Dinucleótido Fosforilado reducido</b>
<b>pb</b>	<b>Pares de bases</b>

<b>pBS</b>	<b>Plasmidio pBlueScript SK</b>
<b>PCR</b>	<b>Reacción en cadena de la polimerasa</b>
<b>PMK</b>	<b>Fosfomevalonato quinasa</b>
<b>ppm</b>	<b>Partes por millón (<math>\mu\text{g}</math> de pigmento/g de levadura seca)</b>
<b>rpm</b>	<b>Revoluciones por minuto</b>
<b>RT</b>	<b>Transcripción reversa</b>
<b>SREBP</b>	<b><i>Sterol Regulatory Element Binding Protein</i></b>
<b>TAE</b>	<b>Amortiguador Tris-acetato-EDTA</b>
<b>TE</b>	<b>Amortiguador Tris-EDTA</b>
<b>Tris</b>	<b>Tris-(hidroximetil)-aminometano</b>
<b>UV</b>	<b>Ultra violeta</b>
<b>pI</b>	<b>Punto isoeléctrico</b>
<b>x-gal</b>	<b>5-bromo-4-cloro-3-indolilo-<math>\beta</math>-D-galactopiranosido</b>
<b>YM</b>	<b>Medio de cultivo extracto levadura-malta</b>

## RESUMEN

Los terpenos son una amplia y variada clase de compuestos hidrocarbonados cuya unidad base es una molécula de 5 carbonos denominada isopreno. La biosíntesis de los terpenos comienza en una etapa temprana con la biosíntesis del isopentenil pirofosfato, a partir del *pool* metabólico por la vía del mevalonato en levaduras y hongos filamentosos, seguido de la elongación de la cadena hidrocarbonada hasta el diterpeno geranylgeranyl pirofosfato en la etapa intermedia. La síntesis de carotenoides en tanto corresponde a la etapa tardía de síntesis de terpenos.

La levadura basidiomicete *Xanthophyllomyces dendrorhous* sintetiza astaxantina como principal pigmento carotenóide, siendo utilizada en la industria acuícola como colorante para la carne de los salmones y en la industria farmacéutica como antioxidante. La producción industrial de astaxantina natural a partir de *X. dendrorhous* se ha visto limitada por la baja cantidad de pigmento producido por cepas silvestres. En general, los estudios de la ruta de biosíntesis de la astaxantina en *X. dendrorhous* se han centrado en la etapa tardía de la síntesis de los terpenos, siendo poco conocida la participación de las etapas previas a la síntesis de carotenoides propiamente tal en esta levadura. Sin embargo, en otros organismos se observó que las etapas previas tienen un rol fundamental en la cantidad final de pigmento producido. Por ejemplo, se observó que la adición de mevalonato en cultivos líquidos de *X. dendrorhous*, favorece la biosíntesis de carotenoides totales logrando una mayor producción de astaxantina en comparación con controles. Esto indica que la etapa de producción de mevalonato es un punto clave en la síntesis de pigmentos en *X. dendrorhous*.

En el presente trabajo se estudió, desde un punto de vista genético-molecular, la etapa temprana de biosíntesis de terpenos en *X. dendrorhous*, particularmente el paso que lleva a la producción de mevalonato a partir de hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) y NADPH, paso catalizado por la enzima HMG-CoA reductasa. El análisis de secuencia del genoma de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* permitió identificar el gen *HMGR*, el cual codificaría a la enzima HMG-CoA reductasa de la levadura, siendo posteriormente clonado y secuenciado. Adicionalmente se amplificó por RT-PCR y se clonó un fragmento de 3.276 pb correspondiente al cDNA de dicho gen y, mediante la comparación de sus versiones de cDNA y el gDNA, se determinó la presencia de 10 exones y 9 intrones. Adicionalmente, se obtuvieron cepas mutantes de *X. dendrorhous* heterocigotas de este gen, donde se reemplazó una porción del gen *HMGR* por módulos que confieren resistencia a los antibióticos higromicina B o zeocina. En estos mutantes se observó una disminución de un 30 % de la producción total de pigmentos en la cepa resistente a zeocina, demostrando la importancia de la etapa temprana de la síntesis de terpenos en la producción final de carotenoides. Además, se estableció que una mayor expresión de *HMGR* favorece la producción de carotenoides y de ergosterol en una cepa recombinante *Saccharomyces cerevisiae* productora de carotenoides, portadora de los genes de carotenogénesis de *X. dendrorhous*. Finalmente, se analizó los niveles de transcrito del gen *HMGR*, el contenido de carotenoides y de esteroides en cepas de *X. dendrorhous* incapaces de producir ergosterol que son sobreproductoras de carotenoides. Los resultados demostraron que el contenido total de carotenoides y esteroides se ve incrementado en estas cepas, al igual que los niveles de transcrito del gen *HMGR*. Estos resultados sugieren que

la expresión del gen *HMGR* estaría regulada por ergosterol, modulando la producción de carotenoides y esteroides.

Los resultados y conclusiones de este trabajo contribuyen al conocimiento de cómo la etapa temprana modula la vía de carotenogénesis en *X. dendrorhous*.

## ABSTRACT

Terpenes are a diverse group of hydrocarbonated compounds whose structural base is a five carbon molecule called isoprene. The synthesis of terpenes starts with the production of isopentenyl pyrophosphate that derives from the mevalonate pathway in yeasts and filamentous fungi. The intermediate stage of carotenoid biosynthesis continues with the elongation of the hydrocarbonated chain until the synthesis of the diterpene geranylgeranyl pyrophosphate. Finally, the last stage comprises the synthesis of carotenoids per se, from geranylgeranyl pyrophosphate.

*Xanthophyllomyces dendrorhous*, a basidiomycete yeast, synthesizes astaxanthin as its main carotenoid pigment which is currently used for salmon fish flesh pigmentation and as an antioxidant in the pharmaceutical industry. Nevertheless, the industrial production of astaxanthin from *X. dendrorhous* has not been successful due to the low yield of pigment produced by wild type strains.

In general, most studies in *X. dendrorhous* have focused in the last stage of the synthesis of carotenoids and there is little knowledge regarding the initial steps. However, it has been demonstrated that the initial steps of terpenoids production are crucial for the yield of end products in other species. In this sense, the addition of mevalonate to *X.*

*dendrorhous* cultures, favors carotenoid production increasing the astaxanthin yield. This indicates that the metabolic step that produces mevalonate could be a critical point in the synthesis of pigments in *X. dendrorhous*. For these reasons, this thesis was focused on the initial terpenoids synthesis stage, specifically in the synthesis of mevalonate from hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) and NADPH in *X. dendrorhous*, which is the step catalyzed by the HMG-CoA reductase enzyme.

The genome analysis of the UCD 67-385 strain from *X. dendrorhous*, allowed the identification, isolation and sequencing of the *HMGR* gene, which encodes the HMG-CoA reductase enzyme in this yeast. Additionally, the cDNA version of this gene (of 3,276 bp) was also isolated by its amplification by RT-PCR. The sequence comparison of the *HMGR* cDNA and gDNA versions indicated that this gene contains 10 exons and 9 introns.

Furthermore, *hmgr*<sup>-</sup> heterozygous *X. dendrorhous* mutant strains were obtained by replacing a portion of the gene with an antibiotic (hygromycin B or zeocin) resistance cassette. A 30 % reduction in the pigment production was observed in one of these heterozygous strains (zeocin resistant), indicating the importance of this step in terpene synthesis and in the yield of carotenoids.

In addition, the *X. dendrorhous HMGR* gene expression in a *Saccharomyces cerevisiae* recombinant strain that produces carotenoids, increased the carotenoids and ergosterol production.

Finally, the *HMGR* gene expression was analyzed by RT-qPCR quantifying the production of carotenoids and sterols in overproducing carotenoids strains and in strains incapable of producing ergosterol. The results demonstrated that the total content of carotenoids and sterols was augmented in these strains, as well as the expression of the

*HMGR* gene. This suggests that the expression of the *HMGR* gene is regulated by ergosterol modulating carotenoids and sterols production.

Thus the results and conclusion of this study contribute to the knowledge of how the early phase modulates the carotenogenic pathway in *X. dendrorhous*.





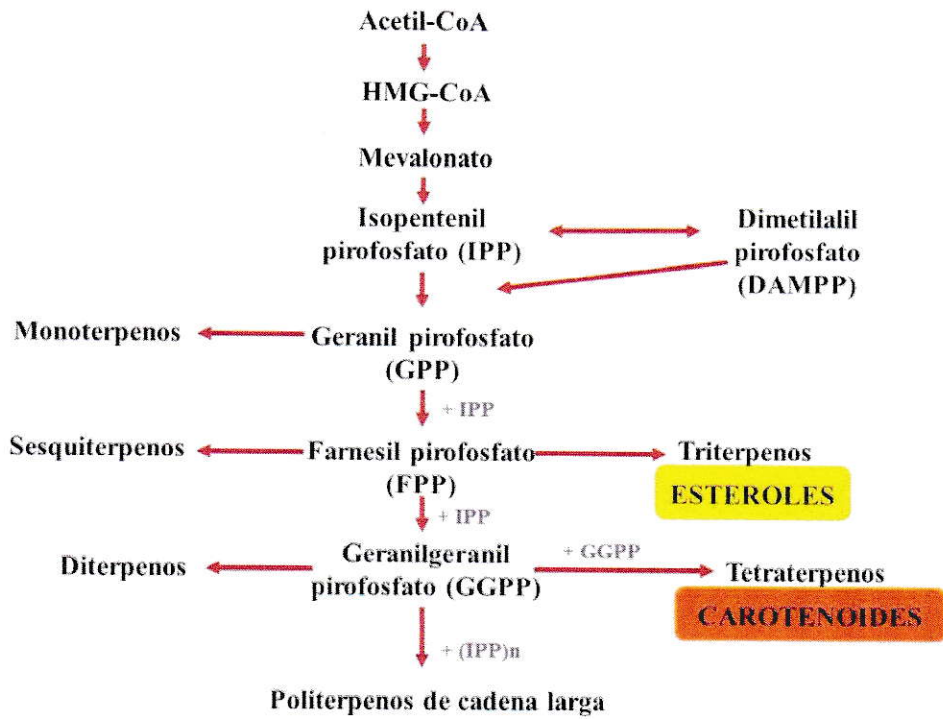
# **1.INTRODUCCIÓN**

Los terpenos o isoprenoides son una amplia y diversa familia de compuestos orgánicos derivados del isopreno, siendo utilizados en la biosíntesis de esteroides, carotenoides y hormonas entre otras moléculas de la célula (McGarvey y Croteau, 1995). Cuando los terpenos son modificados químicamente, por ejemplo por oxidación o reorganización del esqueleto hidrocarbonado, se denominan terpenoides (como la vitamina A o retinol, que contiene un átomo de oxígeno).

Los terpenos, al ser derivados biosintéticos del isopreno, tienen una fórmula molecular general  $(C_5H_8)_n$ , donde  $n$  corresponde al número de unidades de isopreno constituyentes y dependiendo de esa cantidad se clasifican en: hemiterpenos ( $n=1$ ), monoterpenos ( $n=2$ ), sesquiterpenos ( $n=3$ ), diterpenos ( $n=4$ ), triterpenos ( $n=6$ ), tetraterpenos ( $n=8$ ) y politerpenos ( $n>8$ ) (Figura 1).

La biosíntesis de todos los terpenos puede organizarse en tres etapas: Una etapa temprana donde se realiza la síntesis del precursor fundamental, el isopentenil pirofosfato (IPP), una etapa intermedia donde por adiciones repetitivas del IPP se alarga el esqueleto carbonado de los diferentes isoprenoides; y una etapa tardía donde se adicionan o remueven grupos metilos y/o átomos de oxígeno a los diferentes terpenos. En esta última etapa son sintetizados los pigmentos carotenoides que son muy importantes por sus diversas funciones biológicas y su alto potencial biotecnológico (Armstrong, 1994; Britton, 1995).

En las levaduras y hongos filamentosos, la biosíntesis de IPP se realiza a través de la vía del mevalonato (MVA) (Tarshis y cols., 1996). La generación de IPP por esta ruta involucra cinco pasos: primero, la síntesis de 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A



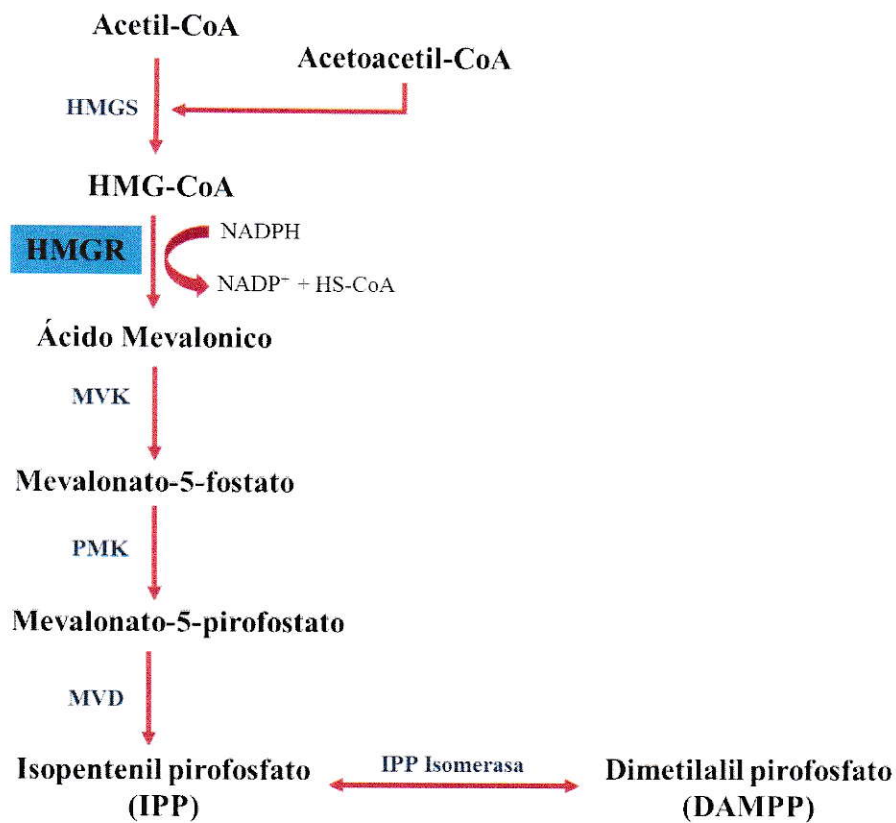
**Figura 1. Síntesis y clasificación de los terpenos.**

Síntesis de terpenos por la adición secuencial de IPP a los diferentes sustratos. Se destacan entre los triterpenos, los esteroides y los carotenoides como el grupo principal dentro de los tetraterpenos.

(HMG-CoA) a partir de los precursores acetoacetil-CoA y el acetyl-CoA, catalizado por la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A sintasa (HMGS) (Tarshis y cols., 1996). Segundo, la formación del mevalonato por la reducción dependiente de NADPH del HMG-CoA. Esta reacción irreversible es catalizada por la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A reductasa (HMGR). En los pasos siguientes, el mevalonato es activado por dos fosforilaciones sucesivas por las enzimas mevalonato quinasa (MVK) y fosfomevalonato quinasa (PMK), generando el 5 pirofosfomevalonato. Finalmente, una descarboxilación dependiente de ATP realizada por la enzima pirofosfomevalonato descarboxilasa (MVD), produce el IPP (Gophna, y cols., 2006) (Figura 2).

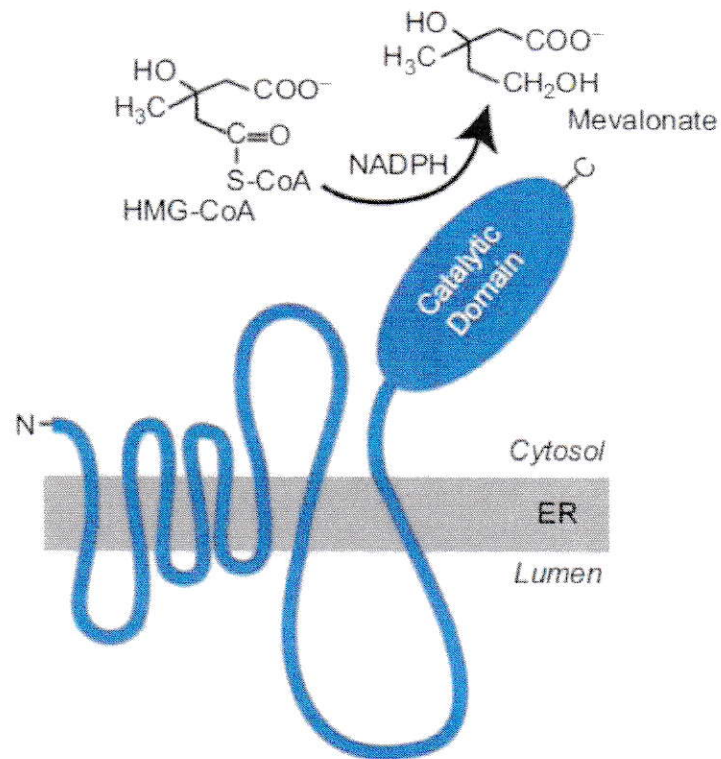
En diversos organismos, se ha demostrado que la etapa limitante en el control del flujo metabólico de la vía del MVA es el paso catalizado por la enzima HMG-CoA reductasa (Britton y cols., 1998). En mamíferos la HMG-CoA reductasa es reconocida por ser la enzima clave en la regulación en la biosíntesis de colesterol (Chappell y cols., 1995) y es el producto de un gen único, *HMGR*. Por otra parte, en *S. cerevisiae* se describieron dos genes, denominados *HMG1* y *HMG2* (Basson y cols., 1986) y en hongos filamentosos, varios genes (Burmester y Czempinski., 1994; Croxen y cols., 1994) que codifican esta enzima.

En eucariontes la enzima HMG-CoA reductasa tiene una región amino terminal hidrofóbica (dominio hidrofóbico) que contiene varios segmentos de transmembrana y un dominio carboxilo terminal hidrofílico (dominio catalítico) que contiene el sitio activo. Si bien el dominio catalítico es altamente conservado, la región hidrofóbica presenta un número variable de fragmentos transmembrana en diferentes organismos (Hampton y cols., 1996; Jo y DeBose-Boyd, 2010) (Figura 3). Esta última región es



**Figura 2. Ruta de biosíntesis del IPP en hongos.**

Se indican los metabolitos intermedios y en azul, el nombre de la enzima que cataliza cada paso. Se destaca el paso catalizado por la enzima HMG-CoA reductasa, ya que es el foco de estudio en esta tesis.

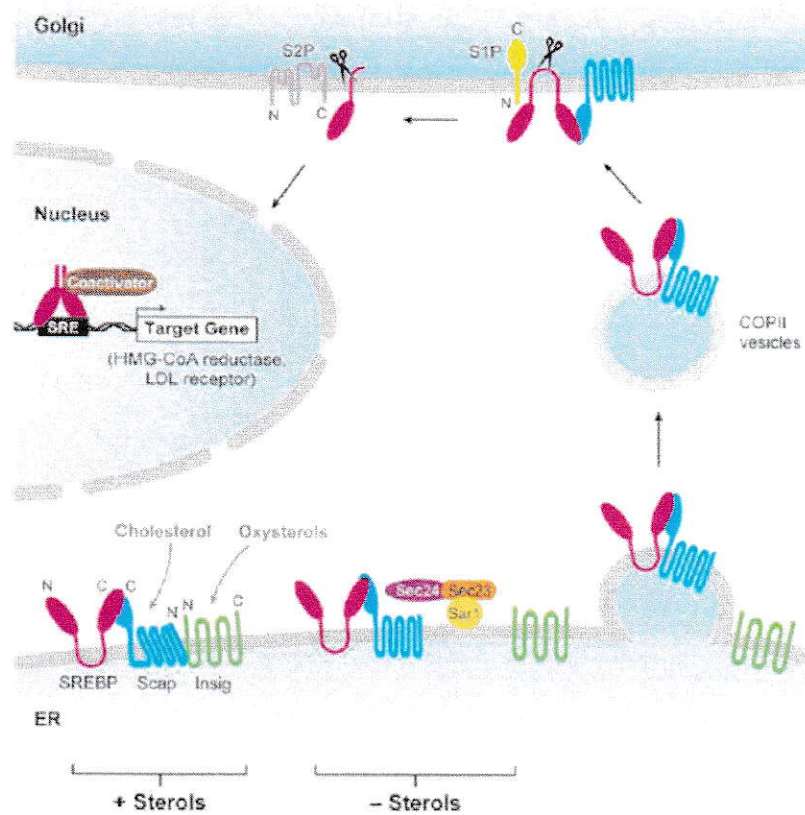


**Figura 3. Modelo del dominio estructural de HMG-CoA reductase.**

La enzima HMG-CoA reductasa contiene dos dominios: un dominio N-terminal hidrófobo con diferentes segmentos de trans-membrana, localizados en el retículo endoplasmático (ER), que desempeña un papel clave en la degradación acelerada de la enzima regulada por esteroles y un dominio C-terminal hidrófilo, situado hacia el citosol de la célula, que dirige la actividad enzimática (Jo y DeBose-Boyd, 2010).

necesaria para la correcta localización de la proteína que se encuentra anclada a la membrana del retículo endoplasmático (Gil y cols., 1985). En mamíferos y en hongos, como las levaduras *Schizosaccharomyces pombe* y *Cryptococcus neoformans*; la expresión del gen *HMGR* a nivel de la transcripción se encuentra regulada por la concentración de esteroides, los cuales modulan la activación proteolítica del activador transcripcional SREBP (por las siglas en inglés de *Sterol Regulatory Element Binding Protein*) (Brown y Goldstein, 1997; Dooley y cols., 1998; Chang y cols., 2007; Hughes y col., 2005). La forma nuclear activa de la proteína SREBP se une a un elemento regulador por esteroide (SRE) ubicado en el promotor de los genes blancos, tal como el gen *HMGR* (Espenshade y Hughes, 2007) (Figura 4). Por lo tanto, el factor SREBP estimula la transcripción del gen *HMGR*, lo que estaría maximizando la síntesis de isoprenoides para la producción de terpenos, como lo son los esteroides.

En levaduras y mamíferos, el mecanismo de degradación de la proteína HMGR es conservado. Los productos tanto de la ruta de ergosterol como de carotenoides, son determinados por el dominio hidrofóbico de la proteína, observándose que a niveles altos de estos productos se gatilla la ubiquitinación y consecuentemente la degradación de la proteína HMGR (Goldstein y Brown, 1990; Garza y cols., 2009). Por otra parte, modificaciones reversibles post-traduccionales también regulan la actividad de la enzima, donde dichas modificaciones están relacionadas con la concentración de AMP intracelular. A niveles altos de AMP en la célula, se activa una proteína quinasa específica que fosforila una serina conservada en el dominio activo de la enzima HMGR, modulando así la actividad de la enzima (Omkumar y col., 1994; Sato y col., 1993; Hardie y col., 2006).



**Figura 4. Modelo de regulación transcripcional del gen *HMGR* en mamíferos.**

En condiciones de altos niveles de esterol, el complejo SREBP-Scap es retenido en la membrana del retículo endoplasmático unido a la proteína INSIG. Cuando los niveles de esterol decrecen, SREBP-Scap es transportado al complejo de golgi, donde es cortado por la acción de las proteasas S1P y S2P, presente en la membrana del complejo de golgi. El dominio N-terminal de SREBP libre, entra en el núcleo y activa la transcripción de los genes que contienen una secuencia SRE en su región promotora (Espenshade y Hughes, 2007).



Por otra parte, diversos estudios determinaron la importancia de la enzima HMG-CoA reductasa en la vía del mevalonato. De hecho, ha sido descrito que la sobreexpresión de solo el dominio catalítico de la enzima HMG1 de *S. cerevisiae*, es suficiente para incrementar la acumulación de isoprenoides en una cepa recombinante de *Candida utilis*, capaz de producir carotenoides (Shimada y cols., 1998). Además, se ha observado que el aumento del número de copias del gen que codifica a la enzima HMG-CoA reductasa en *Neurospora crassa*, aumenta los niveles celulares de IPP conduciendo a un aumento de la cantidad de pigmentos producidos (Wang y Keasling 2002). Adicionalmente, en dos mutantes de *Phycomyces* sobreproductoras de  $\beta$ -caroteno se reportó un aumento de los niveles de mRNA de los genes *HMGS* y *HMGR*, concluyendo que este aumento sería en respuesta a un incremento en la demanda de HMG-CoA por la vía de MVA (Ruiz-Albert y cols., 2002). En el hongo *Ganoderma lucidum* se relacionó los niveles de expresión del gen *HMGR* con el contenido de triterpenos, indicando que una mayor actividad de la HMG-CoA reductasa es suficiente para aumentar el flujo de carbono en la formación de esteroides. Estos resultados indican la importancia que tiene la etapa inicial en la síntesis de terpenos en una serie de procesos metabólicos posteriores (Kim y cols., 2005; Martin y cols., 2003).

Algunos terpenos tienen potencial biotecnológico por ser moléculas biológicamente activas, destacando dentro de este grupo a los pigmentos carotenoides. Estos últimos son sintetizados a partir de la unión de dos moléculas del diterpeno geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) para la formación del fitoeno y la posterior modificación de éste. En los carotenoides, los átomos de carbono se encuentran ordenados

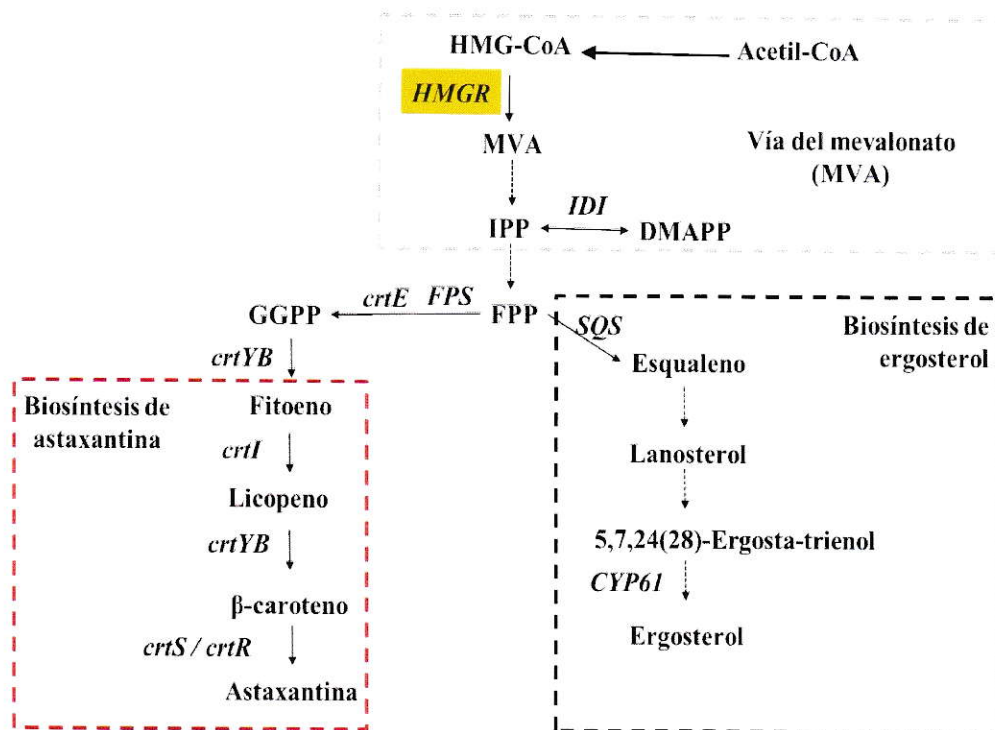
formando cadenas poliénicas conjugadas y en algunas ocasiones presentan anillos de carbono en sus extremos. A los carotenoides que contienen átomos de oxígeno en su estructura se les denomina xantofilas y los que no, constituyen el grupo de los carotenos. Debido a la presencia de enlaces dobles conjugados, los carotenoides son compuestos coloreados, variando su color desde el amarillo pálido, pasando por anaranjado, hasta rojo oscuro (Armstrong, 1994; Britton, 1995).

La levadura basidiomicete *X. dendrorhous* sintetiza la xantofila astaxantina como principal carotenoide (Andrewes y col., 1976), produciendo además el fitoeno, el licopeno y el  $\beta$ -caroteno (Golubev, 1995; Hermosilla y col., 2003; Retamales y col., 2002). La astaxantina constituye entre el 83 – 87 % del contenido total de pigmentos en la célula, generando un alto interés biotecnológico para su utilización en la industria de la acuicultura como colorante de la carne de los salmones (Canizares-Villanu y cols., 1998) y en la industria farmacéutica como antioxidante (Canfield y cols., 1992; Higuera-Ciapara 2006).

La biosíntesis de los pigmentos carotenoides en *X. dendrorhous*, en una etapa inicial también comienza con la producción de IPP por la ruta del MVA y continúa con la unión de dos moléculas de GGPP para formar el primer caroteno, fitoeno (Niklitschek y cols., 2008). Esta etapa es catalizada por la enzima bifuncional denominada fitoeno- $\beta$ -caroteno sintasa, que tiene actividad fitoeno sintasa y licopeno ciclasa, y es codificada por el gen *crtYB* (Alcaíno, 2002; Verdoes y col., 1999; McCarthy y col., 2004). Posteriormente, el fitoeno sufre 4 desaturaciones sucesivas para formar el licopeno, paso catalizado por la enzima fitoeno desaturasa codificada por el gen *crtI* en *X. dendrorhous* (Verdoes y col., 1999). La ruta de biosíntesis continúa con la ciclación de los extremos

del licopeno para dar  $\beta$ -caroteno, reacción catalizada por la actividad licopeno ciclasa de la enzima fitoeno  $\beta$ -caroteno sintasa. Finalmente, al  $\beta$ -caroteno se adicionan grupos ceto en las posiciones 4 y 4', y además es hidroxilado en las posiciones 3 y 3', dando lugar a la astaxantina (Figura 5). Como consecuencia de estas reacciones, se forman 3 intermediarios: equinenona, hidroxiequinenona y fenicoxantina. Todas estas reacciones son catalizadas por la enzima astaxantina sintasa que pertenece a la familia de las enzimas citocromo P450 y es codificada por el gen *crtS* (Ojima y cols., 2006). Este último paso de síntesis, se encuentra acompañado por una enzima citocromo P450 reductasa, codificada por el gen *crtR* (Alcaíno y cols., 2008).

Por otra parte, los esteroides al igual que los carotenoides, derivan del IPP. Los esteroides son componentes estructurales y regulatorios esenciales de las membranas de células eucariotas, modulando su espesor, fluidez y permeabilidad (Zhang y Rao., 2010). El ergosterol es el principal esteroide en levaduras, siendo el escualeno el precursor en su síntesis. El escualeno, se forma por la condensación de dos moléculas de FPP por acción de la enzima escualeno sintasa (SQS) (Merkulov y cols., 2000). Posteriormente, el mismo sufre un proceso de ciclación para dar lugar a lanosterol. La conversión de lanosterol en ergosterol es un proceso complejo de múltiples etapas catalizadas por enzimas de unión a membrana. Entre otras, en este proceso se encuentran involucradas dos enzimas citocromo P450s: CYP51 (lanosterol 14-demetilasa) y CYP61 (C-22 esteroide desaturasa), que en *S. cerevisiae* son codificados por los genes *ERG11* y *ERG5*, respectivamente (Kelly y cols. 1997). Entre ellos, se ha descrito que la cepa mutante *erg5<sup>-</sup>* de *S. cerevisiae* es viable, pero no puede sintetizar ergosterol (Skaggs y cols., 1996). Curiosamente, al igual que otras



**Figura 5: Esquema de las vías de síntesis de astaxantina y ergosterol.**

En cuadro rojo: Vía de síntesis de astaxantina y genes descritos en *X. dendrorhous* y en cuadro negro: Resumen de la vía de síntesis de ergosterol descrita en *S. cerevisiae*. En cuadro gris, se encierra la vía del mevalonato donde se destaca el paso catalizado por la enzima HMG-CoA reductasa (gen *HMGR*). La enzima C-22 esterol desaturasa (gen *CYP61*) indicada en la figura, participa en la penúltima etapa de la biosíntesis de ergosterol en *S. cerevisiae* (Kelly y cols., 1997). Los genes de *X. dendrorhous* representados con su número de acceso GenBank entre corchetes son: *HMGR* [AJ884949], *IDI* [DQ235686], *crtE* [DQ012943], *crtYB* [DQ016503], *crtI* [Y15007], *crtS* [EU713462], *crtR* [EU884133] y *CYP61* de diferentes cepas de la levadura (UCD 67–385 [JX183236], CBS 6938 [JX183240], UCD 67–210 [JX183237], y AVHN2 [JX183239]).

rutas, uno de los principales cuellos de botella en la biosíntesis de ergosterol, también es la reacción catalizada por la HMG-CoA reductasa (Veen y Lang., 2004).

La producción industrial de astaxantina natural por *X. dendrorhous* está limitada por la baja cantidad de pigmento producido por las cepas silvestres, el reducido conocimiento de su ruta de biosíntesis y de los factores que la regulan. Los estudios de la ruta de biosíntesis de astaxantina en esta levadura se han enfocado principalmente en la etapa tardía de la síntesis de terpenos (Figura 5) (Alcaíno, 2002; Verdoes y cols., 1999; Niklitschek y cols., 2008). Sin embargo, la cantidad final de este pigmento depende de los intermediarios producidos en las etapas tempranas e intermedia (Barkovich y Liao., 2001; Dong y cols., 2006). Por ejemplo, investigaciones en *X. dendrorhous* demostraron que la adición de mevalonato al medio de cultivo, aumenta significativamente el contenido celular de astaxantina (Calo y cols., 1995). Si bien la vía del MVA para la biosíntesis de IPP aun no ha sido caracterizada en *X. dendrorhous*, de acuerdo a nuestros resultados del análisis del genoma de la levadura, hemos observado que están presente los cinco genes de dicha ruta, esto es, los genes *HMGS*, *HMGR*, *MVK*, *PMK* y *MVD*.

Por otra parte, en *X. dendrorhous* la producción de carotenoides se induce cuando la glucosa se agota en el medio de cultivo, y comienza a utilizarse el etanol que se produce por fermentación de la glucosa en la fase exponencial de crecimiento (Lodato y cols., 2004, Wozniak y cols., 2011). Además, se ha observado que el efecto inductor de la carotenogénesis mediado por el etanol está estrechamente relacionado a un aumento de la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa en la levadura (Gu y cols., 1997). Teniendo en cuenta que la síntesis de ergosterol y de astaxantina son rutas de ramificación en la síntesis de isoprenoides, Miao y cols. (2011) reportaron una cepa superproductora de

astaxantina de *Phaffia rhodozyma*, que presentó un menor contenido total de ácidos grasos y ergosterol en comparación a la cepa control, concluyendo que la cepa podría estar destinando mayor cantidad de precursores de la vía del mevalonato hacia la biosíntesis de astaxantina que a producción de ergosterol.

En base a los antecedentes expuestos, la posible correlación cuantitativa entre niveles de expresión del gen *HMGR* y la producción de carotenoides, hace de interés estudiar a nivel molecular el paso catalizado por la enzima HMG-CoA reductasa como una primera etapa para comprender el papel de esta enzima en la biosíntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*.

## **Hipótesis**

En la etapa temprana de la ruta de biosíntesis de astaxantina participa el gen *HMGR* que codifica la enzima HMG-CoA reductasa, cuyo producto de reacción afectaría, la producción de carotenoides en *X. dendrorhous*.

## **Objetivo General**

Identificar y caracterizar el gen *HMGR* que codifica la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A reductasa de *X. dendrorhous* y evaluar su participación en la vía de carotenogénesis.

## **Objetivos Específicos**

1. Identificar y caracterizar molecularmente el gen *HMGR* de *X. dendrorhous*.
2. Determinar la funcionalidad del gen *HMGR* de *X. dendrorhous*.
3. Determinar el efecto de la glucosa y del etanol como fuente de carbono en la expresión del gen *HMGR* en la cepa silvestre de *X. dendrorhous*.
4. Estudiar la expresión del gen *HMGR* y fenotipo productor de carotenoides y esteroides en cepas de *X. dendrorhous*, incapaces de producir ergosterol.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 2.1 Cepas, condiciones de cultivo y plásmidos.

En las Tablas 1 y 2 se enuncian las cepas y plásmidos utilizados y construidos en esta tesis, respectivamente. Para las librerías genómicas y la propagación de plásmidos se utilizó la cepa DH-5  $\alpha$  de *Escherichia coli*. Esta bacteria se cultivó a 37°C en medio LB (1 % de bacto triptona, 0,5 % de extracto de levadura y 0,5 % de NaCl) durante 12 a 15 h con agitación constante a 200 rpm. Los placas con medio LB se suplementaron con agar al 1,5 %, ampicilina (100  $\mu\text{g/ml}$ ) y/o X-GAL (32  $\mu\text{g/ml}$ ) para seleccionar transformantes y recombinantes. En esta tesis se utilizó una librería genómica que consiste en el DNA genómico de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* parcialmente digerido con *Bam*HI y clonado en el sitio *Bam*HI del vector YIp5 (Niklitschek y cols., 2008).

En esta tesis, se trabajó con las levaduras *X. dendrorhous* y *S. cerevisiae*. Las cepas de *X. dendrorhous* (Tabla 1) se cultivaron a 22°C con agitación constante en medio YM (glucosa 1 %, extracto de levadura 0,3 %, extracto de malta 0,3 % y peptona 0,5 %) (An y cols., 1989). Los medios de cultivo sólido como YM se suplementaron con agar y el antibiótico adecuado [higromicina B (15  $\mu\text{g/ml}$ ), zeocina (20  $\mu\text{g/ml}$ ) o G-418 (150  $\mu\text{g/ml}$ )], se utilizó para la selección de células transformantes.

El crecimiento celular se evaluó midiendo la densidad óptica del cultivo a 600 nm con un espectrofotómetro ( $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ ), por unidades formadoras de colonias (ufc) y por determinaciones de peso seco. Para determinar el peso seco, se centrifugó 5 ml de cultivo en tubos Eppendorf, y luego las células se secaron a 80°C durante toda la noche. Las mediciones se realizaron por triplicado.

Para evaluar el efecto de la glucosa y el etanol como fuente de carbono a nivel de transcripción del gen *HMGR*, se realizó un cultivo de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* en medio YM sin la suplementación de alguna fuente de carbono hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento ( $DO_{600\text{ nm}}$  entre 2,5 y 4).

**Tabla 1: Cepas utilizadas y construidas en este trabajo.**

Cepas	Genotipo / características relevantes	Referencia
<i>E. coli</i>		
DH-5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\Phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZY-argF</i> )U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) phoA supE44I-thi-1 gyrA96 relA1</i>	Sambrook y Russell, 2001.
<i>X. dendrorhous</i>		
UCD 67-385	ATCC 24230, cepa silvestre. Cepa diploide. Hyg <sup>S</sup> , Zeo <sup>S</sup>	ATCC
385.HMGR.Hyg	Mutante heterocigoto gen <i>HMGR</i> e Hyg <sup>R</sup> ( <i>HMGR/HMGR::hph</i> ), obtenido por transformación de la cepa silvestre con el plásmido p $\Delta$ HMGR:: <i>hph</i> . Pigmentación similar a cepa silvestre.	Esta Tesis
385.HMGR.Zeo	Mutante heterocigoto gen <i>HMGR</i> y Zeo <sup>R</sup> ( <i>HMGR/HMGR::ble</i> ), obtenido por transformación de la cepa silvestre con el plásmido p $\Delta$ HMGR:: <i>ble</i> . Pigmentación más pálida que la cepa silvestre.	Esta Tesis
385-cyp61 <sup>(+/-)</sup>	Mutante heterocigoto gen <i>CYP61</i> (385-CYP61/ <i>cyp61::hph</i> ). Derivada de UCD 67-385 que contiene un alelo del locus <i>CYP61</i> interrumpido con modulo de resistencia a hygromicina B	Loto y cols., 2012
385-cyp61 <sup>(-/-)</sup>	Mutante homocigota (385-cyp61 <sup>hph</sup> / <i>cyp61</i> <sup>zeo</sup> ), obtenida por transformación de 385-cyp61 <sup>(+/-)</sup> con ambos alelos <i>CYP61</i> interrumpidos, uno con cassette de resistencia a higromicina B y el otro con cassette de Resistencia a zeocina.	Loto y cols., 2012
CBS-6938	ATCC 96594, cepa silvestre. Cepa probablemente aneuploide. Hyg <sup>S</sup> , G418 <sup>S</sup>	ATCC
CBS-cyp61 <sup>(-)</sup>	Mutante hemocigoto ( <i>CBS-cyp61::hph</i> ), derivada de CBS 6938. El locus simple <i>CYP61</i> fue interrumpido con el cassette de resistencia a hygromicina B.	Loto y cols., 2012
AVHN2	Cepa silvestre nativa Chilena. Hyg <sup>S</sup> , G418 <sup>S</sup>	Loto y cols., 2012

Av2-cyp61 <sup>(c)</sup>	Mutante hemicígote (Av2-cyp61::ble), derivada de AVHN2. El locus simple de <i>CYP61</i> fue interrumpido con cassette de resistencia a zeocina.	Loto y cols., 2012
<i>S. cerevisiae</i>		
S288c	Cepa silvestre. Hyg <sup>S</sup> , G418 <sup>S</sup>	ATCC
S288c-bcar	Cepa S288c recombinante que expresa los genes <i>crtE</i> , <i>crtI</i> y <i>crtYB</i> de <i>X. dendrorhous</i> . Productora de β-caroteno. Hyg <sup>R</sup>	Colección laboratorio
S288cbcar.cHMGR.4	Cepa derivada de S288c-bcar que porta el plásmido pYES2.cHMGR.G418. Expresa el dominio catalítico de HMG-CoA reductasa de <i>X. dendrorhous</i> . Hyg <sup>R</sup> y G418 <sup>R</sup>	Esta Tesis

**Tabla 2. Plásmidos usados y construidos en este trabajo**

Plásmido	Genotipo o características relevantes	Referencia
pBluescript SK-	ColE1 ori; Amp <sup>R</sup> ; Vector de clonamiento.	Stratagene
YIp5	pMB1 ori; Amp <sup>R</sup> ; TET <sup>R</sup> ; <i>URA3</i> . Vector de clonamiento de <i>S. cerevisiae</i> / <i>E. coli</i> .	ATCC
pPR20-XVIII-5	YIp5 con un inserto de 4,6 kb que contiene 3,9 kb del gen <i>HMGR</i> . Aislado desde genoteca parcial <i>Bam</i> HI.	Esta Tesis
pCH11	pBluescript SK- con un fragmento de DNA de 4,3 kb que contiene al gen <i>HMGR</i> .	Esta Tesis
pCCH5	pBluescript SK- con el cDNA del gen <i>HMGR</i> . El cDNA mide 3.276 pb.	Esta Tesis
pYES2	Vector de expresión de genes en <i>S. cerevisiae</i> . Amp <sup>R</sup> , Ori. Contiene el gen <i>URA3</i> para la selección en levaduras transformantes.	ATCC
pYES2-C-HMGR	pYES2 con un inserto de 1.870 pb que contiene el cDNA del gen <i>HMGR</i> que codifica el dominio con actividad catalítica de HMG-CoA reductasa.	Esta Tesis
pYES2.cHMGR.G418	Derivado del plásmido pYES2-C-HMGR que fue digerido con la enzima <i>Nde</i> I y luego se insertó el módulo que confiere resistencia a G418.	Esta Tesis

pΔHMGR:: <i>hph</i>	Derivado de pCH11. Se escindió 1.417 pb digiriendo con las enzimas <i>StuI</i> y <i>NcoI</i> y se insertó el módulo <i>hph</i> .	Esta Tesis
pΔHMGR:: <i>ble</i>	pBluescript SK- con un inserto de 2,2 kb que posee secuencia genómica que flanquea al gen <i>HMGR</i> de <i>X. dendrorhous</i> interrumpida por el módulo que confiere resistencia a Zeocina.	Esta Tesis

---

Luego, el cultivo se dividió en dos matraces Erlenmeyer: a uno de ellos se le agregó la fuente de carbono glucosa o etanol a una concentración final de 2 % (v/v) y 0,2 % (v/v), respectivamente (medio con tratamiento); y el otro matraz con igual volumen de medio de cultivo se mantuvo sin la adición de fuente de carbono (medio control). Ambos cultivos se incubaron a 22°C con agitación durante 24 h. Luego de 0, 1, 2, 4, 6 y 24 h posteriores al tratamiento, se tomaron muestras de los diferentes cultivos y en cada muestra se evaluó: el crecimiento celular por medidas de DO<sub>600 nm</sub> y se extrajo RNA total para determinar los niveles de transcrito de varios genes por RT-qPCR.

Las cepas *S. cerevisiae* (Tabla 1) se cultivaron en medio de cultivo mínimo sintético (SD) suplementado con sales, elementos traza, vitaminas y una fuente de nitrógeno (Bacto-yeast nitrogen base sin aminoácidos al (0,67 %), glucosa (2 %) y agua). Se reemplazó la glucosa por galactosa (2 %), ya que es el inductor de la expresión del vector episomal pYES2 huésped de la levadura *S. cerevisiae* bajo las condiciones de ensayo antes mencionadas. Las cepas se cultivaron en el medio descrito con agitación constante hasta el final de fase estacionaria de crecimiento (120 h a 22°C). A este tiempo se evaluó en los cultivos derivados de ambas cepas: el crecimiento celular (por DO<sub>600 nm</sub> del cultivo), carotenoides (por DO<sub>465 nm</sub> y RP-HPLC) y esteroides (por DO<sub>280 nm</sub> y RP-HPLC). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.



## 2.2 Técnicas de Biología molecular

La extracción de ácidos nucleicos, las reacciones de PCR, digestiones de DNA con enzimas de restricción, reacciones de ligado de DNA entre otras técnicas, se realizaron de acuerdo a métodos estándares (Sambrook y Russell., 2001), las instrucciones de los proveedores y por protocolos desarrollados en nuestro laboratorio.

**Extracción de gDNA de *X. dendrorhous*:** se realizó mediante el uso de perlas de vidrio según Sambrook y cols. (2001), modificado para la levadura *X. dendrorhous*. El pellet celular proveniente de células colectadas desde placas de cultivo o de 30 ml de cultivo líquido, se suspendió en 500 µl de amortiguador TE (25 mM Tris- HCl, 10 mM EDTA) junto con un volumen de perlas de vidrio (Sigma, 425 - 600 µm) y se agitó en vórtex por 5 min. Luego, se agregó 500 µl de la mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se homogenizó en vórtex por 2 min. A la fase acuosa se le agregó 500 µl de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se homogenizó en vórtex por 2 min. Se extrajo la fase acuosa y el DNA se precipitó con 1 volumen de etanol absoluto frío (-20°C). El pellet se lavó con etanol 70 % (v/v) y luego se secó a 37°C. Posteriormente, el DNA se suspendió en 100 µl de amortiguador TE-RNasa (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 30 µg/ml RNasa A) e incubó a 37°C por 1 h el DNA.

**Extracción de RNA de *X. dendrorhous*:** se realizó utilizando Solución de TRI Reagent de Applied Biosystems, siguiendo las especificaciones del proveedor. La reacción de RT se realizó con 5 µg de RNA total y 200 U de transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del proveedor. Esta metodología fue

estandarizada para *X. dendrorhous* en nuestro laboratorio a partir del método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987).

**Extracción de DNA plasmídico y análisis de secuencias:** se realizó a partir de cultivos de *E. coli* en medio LB con ampicilina (100 µg/ml) incubados durante toda la noche a 37°C según Sambrook y cols. (2001). En el caso del DNA plasmídico utilizado para secuenciación, las extracciones se realizaron con el kit de Axygen “*Plasmid DNA Purification Miniprep Kit*” y para el caso del DNA plasmídico para la transformación de *X. dendrorhous* se utilizó el kit de Axygen “*Plasmid DNA Purification Midiprep Kit*”.

Las secuencias nucleotídicas se determinaron en nuestro laboratorio con el kit de GE Healthcare “*DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit*” en un secuenciador de DNA automático Genetic Analyser (modelo Avant 3100) de Applied Biosystem. Las secuencias nucleotídicas se analizaron con los programas Chromas versión 1.43, Sequencing Analysis V3.7 y Contig Express 2003, y se alinearon con el programa CLUSTAL W, versión 1.8 y AlignX 2003, ajustadas manualmente para incrementar la identidad. Además, todas estas herramientas se complementaron con el uso del paquete de programas Vector NTI 10.3.

**Electroforesis de DNA:** Para visualizar el DNA plasmídico, las digestiones de DNA genómico o los productos de PCR, se realizó electroforesis en geles de agarosa (al 1 %) en amortiguador TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8) siendo posteriormente teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y visualizados en un transiluminador con luz UV. Como estándares de peso molecular se utilizaron  $\lambda$  /*Hind*III (Fermentas) y 1 kb DNA Ladder (Fermentas). La cuantificación de los fragmentos de DNA se realizó por comparación de la intensidad de las bandas de DNA de una muestra

a cuantificar y un estándar de peso molecular de concentración conocida con el programa “*Kodak® 1D Image Analysis Software*” permitiendo obtener el tamaño de fragmento y su concentración.

**Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa:** Los fragmentos de DNA analizados y separados por electroforesis, se recuperaron desde geles de agarosa y se purificaron con dióxido de silicio (Sigma S-5631) según el protocolo descrito por Boyle y Lew (1995). Para esto, se cortó con un bisturí el trozo de agarosa que contenía el fragmento de DNA de interés y se transfirió a un tubo Eppendorf. El bloque de agarosa se disolvió a 55°C con 500 µl de KI 6 M y luego se agregó 10 µl de “*glassmilk*” (dióxido de sílice en NaI 6 M). Se incubó a temperatura ambiente por 10 min agitando cada 2 min y se centrifugó para eliminar el sobrenadante. El pellet obtenido se lavó 3 veces con 500 µl de solución de lavado (Tris pH 7,5 10 mM, NaCl 50mM, EDTA pH 7,5 25 mM y etanol 50 %), y luego el pellet se suspendió con 10 µl de agua estéril. Se incubó por 10 min a 55°C y posteriormente se centrifugó y se recuperó el sobrenadante.

### **2.3. Transformación de microorganismos por electroporación.**

***E. coli:*** Para preparar las células electrocompetentes, se inoculó 500 ml de medio LB con 5 ml de un cultivo de 12 h y se incubó a 37°C con agitación hasta alcanzar una  $DO_{560\text{ nm}}$  de entre 0,5 - 0,8 (fase exponencial temprana-media). Todos los procedimientos siguientes se realizaron a 4°C, manteniendo las soluciones y las células en hielo. Las células se colectaron por centrifugación a 4.000 x g durante 10 min. El sobrenadante obtenido se removió y las células se lavaron dos veces con agua destilada estéril y una vez con glicerol estéril al 10 % (v/v). Finalmente, el pellet celular se suspendió en un volumen

final de 2 a 3 ml de glicerol 10 % (v/v). Esta suspensión, con una concentración celular de aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  células/ml, se fraccionó en alícuotas de 60  $\mu$ l las cuales se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

Para transformar, se tomó una suspensión de células electrocompetentes descongelada en hielo, se le agregó de entre 15 a 50 ng de DNA y la mezcla se electroporó bajo las siguientes condiciones (cubetas de 2 mm): 25  $\mu\text{F}$ , 200  $\Omega$  y 2,5 KV. Inmediatamente después, se adicionó 1 ml de medio LB precalentado a  $37^{\circ}\text{C}$  y la suspensión de células se transfirió a un tubo Eppendorf, incubándose a  $37^{\circ}\text{C}$ . Al cabo de 1 h, se sembraron alícuotas de 100  $\mu$ l en placas con medio LB-agar, suplementado con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y X-Gal (24  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Las placas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 16 h y luego se seleccionaron las colonias blancas. A partir de éstas se extrajo el DNA plasmídico para su posterior análisis.

**X. *dendrorhous*:** Para transformar la levadura con los plásmidos  $p\Delta\text{HMGR}::hph$  y  $p\Delta\text{HMGR}::ble$ , éstos se purificaron a partir de los clones CH16 y CZ23, respectivamente. Posteriormente, los plásmidos se digirieron con *Xba*I + *Sma*I y *Pst*I + *Xho*I, respectivamente. Las digestiones enzimáticas obtenidas permiten la liberación del DNA transformante, portador de la mutación del gen *HMGR*. Los plásmidos  $p\Delta\text{HMGR}::hph$  y  $p\Delta\text{HMGR}::ble$  digeridos se utilizaron de manera independiente para transformar la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*.

La transformación de *X. dendrorhous* se basó en el protocolo descrito por Adrio y cols. (1995). Para ello, se inoculó 200 ml de medio YM con 1 - 2 ml de un cultivo de *X. dendrorhous* de 48 h. Se incubó con agitación constante a  $22^{\circ}\text{C}$  hasta alcanzar una  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de entre 4,5 - 5 (fase exponencial temprana-media). Las células se centrifugaron a 5.090



x g durante 5 min, se suspendieron en 25 ml de amortiguador BD (50 mM amortiguador fosfato de potasio, pH 7.0, 25 mM ditioneitol [DTT]) e incubaron a 22°C por 15 min. Las células se lavaron dos veces con 25 ml de amortiguador STM (270 mM sacarosa, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) frío y se suspendieron en 1 ml de amortiguador STM. Esta suspensión, con una concentración celular aproximada de  $1 \times 10^9$  células/ml, se fraccionó en alícuotas de 60  $\mu$ l que se utilizaron inmediatamente.

Para la transformación, a una alícuota de células electrocompetentes se le agregó entre 10 - 20  $\mu$ g de DNA transformante en un volumen máximo de 10  $\mu$ l. Esta mezcla se electroporó con las siguientes condiciones (cubetas de 2 mm): 125  $\mu$ F, 600  $\Omega$ , 0,45 kV. Inmediatamente, se le adicionó 1 ml de medio YM y la suspensión de células se incubó a 22°C por 4 h. Luego, alícuotas de 100  $\mu$ l se sembraron en placas con medio YM-agar suplementadas con el antibiótico adecuado para la selección de células transformantes.

***S. cerevisiae*:** Para obtener células electrocompetentes de la levadura, se inoculó 200 ml de medio YM o YEP con 1 - 2 ml de un cultivo de *S. cerevisiae* de 12 h. Se incubó con agitación constante a 30°C hasta alcanzar una  $DO_{600\text{ nm}}$  de entre 1,3 - 1,5. Las células se centrifugaron a 5.090 x g durante 5 min. El pellet celular se lavó dos veces con 100 ml agua destilada estéril y una vez con 25 ml de solución de Sorbitol 1 M. Finalmente, las células se suspendieron en solución de sorbitol 1 M hasta una concentración celular aproximada de  $1 \times 10^8$  células/ml, se fraccionó en alícuotas de 60  $\mu$ l que se utilizaron inmediatamente.

Para llevar a cabo la transformación, a una alícuota de células electrocompetentes se le agregó entre 10 - 20  $\mu$ g de DNA transformante en un volumen máximo de 10  $\mu$ l. Esta mezcla se electroporó con las siguientes condiciones (cubetas de 2 mm): 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ ,

1,5 kV. Inmediatamente, se le adicionó 1 ml de medio YM o YEP y la suspensión de células se incubó a 30°C por 4 h. Luego, alícuotas de 100 µl se sembraron en placas con medio YM-agar o YEP-agar suplementadas con el antibiótico adecuado para la selección de células transformantes.

#### **2.4 Amplificación de DNA por PCR.**

Los partidores utilizados en este trabajo se diseñaron a partir de las secuencias conocidas depositadas en la base de datos de GenBank (Benson y cols., 2013) de las regiones a amplificar, o de secuencias propias obtenidas de la base de datos de nuestro laboratorio. En la Tabla 3 se muestran los nombres y descripción de los partidores que se utilizaron en este trabajo.

Las reacciones de PCR realizadas para el análisis de clones y partidores, se hicieron con la enzima *Taq* DNA polimerasa. En el caso que los productos de PCR requeridos para su posterior clonamiento, se utilizó la enzima *Pfu* DNA polimerasa. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl, que contenía amortiguador de PCR 1X pH 8,4 (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 µM de cada partidor, entre 10 y 100 ng de DNA molde y 1 unidad de enzima. Para las reacciones de PCR se utilizó un termociclador Applied Biosystem 2720, con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineación de los partidores a 55°C por 30 s y elongación a 72°C por 3 min. Finalmente, se dejó por 10 min a 72°C para una elongación final y la reacción luego se mantuvo a 4°C.

En algunos casos, la temperatura de alineación de los partidores se modificó para aumentar la especificidad de la reacción.

**Tabla 3: Partidores utilizados y diseñados en este trabajo.**

Nombre	Orientación	Secuencia (5' a 3')
HMGR-1	F	ATGTACACCATCAAGCACAGTAA
HMGR-2	F	GCATGGTTCTTGTCTCGTCCT
HMGR-3	F	CAAGGTTGACATTCAGTGGGCC
HMGR-4	F	GATCCGGCATCTCGTCAGGGCCT
HMGR-5	F	CTCGGAGCGTGGGAAATCGTC
HMGR-6	F	GACAAACAAACTGTGCTTGGC
HMGR-7	F	GCATTGCAGAACTGTGAGCG
HMGR-8	F	GATTCGCCAGGTTGCAGAGC
HMGR-9	R	CGTGCAAAGGTTGAGGATATGA
HMGR-10	R	TAGGAGCGAGGATCTGAGACT
HMGR-11	R	GCCCTTCGAATCTTGACCG
HMGR-12	R	GCGGAGGGAGGAAAGTTCTT
HMGR-13	R	GGCCAAAGCACTCATCAAAC
HMGR-14	R	TCAGGCATCCACGTTCACT
cHMGR-Rv1	R	TGATTGGATCTCCGACGATGG
cHMGR-Fw1	F	GACAAACACGACGCTCCATCG
cHMGR-Rv2	R	CCACACTTGATGCTCTGCAAC
cHMGR-Fw2	F	CGAAGGAATGGAGGTTATGGC
HygSecR	R	GTATTGACCGATTCTTGGC
HygSecF	F	TCGCCAACATCTTCTTCTGG
M13R	R	GGAAACAGCTATGACCATG

M13 F	F	TGTAAAACGACGGCCAGT
gpd rev	R	ATGAGAGATGACGGAGATG
Tef fwd	F	GATATCGGCTCATCAGCCGAC
1AHMG1	R	ATAAAACAAGCGTTAACATAAATCGTTTGAAAGATGG
1BHMGI	F	GCTTCAAGGAATGGCAGCATA
2AHMG1	F	CAAACGATTTATGTTAACGCTTGTTTTATGTATTTATCT
2BHMGI	R	AGGAAGGCTAGACACAGCTCT
Fw.A.HMGR	F	GAGAGTCAGTAATGTCCAGCT
RV.A.HMGR	R	GATCCCCAGGTTAACCAACTGAAG
FW.T.HMGR	F	GTCTTTCAGTTGGTTAACCTGGGGA
RV.T.HMGR	R	ACCAATGGATCCTATGGCTGT
Zeo.T.HMGR.RV	R	ACTGAAGATTTCTCGTCGAT
Zeo.Fw	F	TGAACAGGGTCACGTCGT
Zeo RV	R	ACGACGTGACCCTGTTTCATCA
cHMGRpyes2	F	CGGCCACAAGAACCAGAATGT
<b>RT-qPCR:</b>		
mactF-RT	F	CCGCCCTCGTGATTGATAAC
mactR-RT	R	TCACCAACGTAGGAGTCCTT
hmgR.F-RT	F	GGCCGATCGCTATAACATCCGTTT
hmgR.R-RT	R	ATCCAGTTGATGGCAGAAGGCT
grg2real FW1	F	CATCAAGACCTCTGTCACCAAC
grg2real RV1	R	TTGGCGTCAGACGAGGACT
pdcreal FW1	F	TCAAACTGAGCTGCCCACT
pdcreal RV1	R	ATTCCGAATCGGGAAGCACA
mcrtSF-RT	F	ATGGCTCTGCAGGGTTTGA
mcrtSR-RT	R	TGCTCCATAAGCTCGATCCCAA

---

F (directo) y R (reverso) indican la orientación del partidor.

### **2.5 Determinación de los niveles relativos de los mensajeros de los diversos genes mediante PCR cuantitativo en tiempo real.**

La mezcla de reacción de PCR se realizó según las especificaciones del Kit SensiMix SYBR Green I (Quantance), en un volumen final de 20  $\mu$ l en un sistema de PCR cuantitativo Mx 3000 P (Stratagene) de tiempo real. En los análisis se usó 1  $\mu$ l de cDNA molde y se usó 0,25  $\mu$ M de cada partidor específico para cada gen en estudio (Tabla 3). Todas las parejas de partidores utilizadas para la amplificación de cada gen se analizó de tal manera que su eficiencia sea mayor al 90 %, determinada en curvas estándares con un coeficiente de correlación  $R^2 \geq 0,996$ . Los valores de Ct obtenidos se normalizaron por el valor respectivo del gen de actina (*ACT*) [GenBank: X89898.1] (Wery y cols., 1996).

### **2.6. Actividad HMG-CoA reductasa**

La actividad HMG-CoA reductasa está presente en la fracción celular membranosa o microsómica obtenida por ultra centrifugación a 100.000 x g (Gu y cols., 1997). Para obtener esta fracción, se colectó las células a partir de 30 ml de cultivo por centrifugación y se lavaron dos veces con agua destilada fría. Luego se suspendió en 3 ml de buffer de extracción (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 0,3 M Sorbitol; 1 mM DTT; Inhibidor de proteasas Complete<sup>TM</sup> de Boehringer Mannheim) y se adicionó 500  $\mu$ l de perlas de vidrio de 0,5 mm. Las células se rompieron por sonicación (15 ciclos de 20 s con intervalos de 1 min de incubación en hielo). El extracto se centrifugó a 20.000 x g por 20 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se ultracentrifugó a 120.000 x g por 1 h a

4°C. El pellet se suspendió en 90 µl de buffer de lavado (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 0,3 M Sorbitol; 1 mM DTT) y se almacenó a -80°C hasta los ensayos de actividad.

El ensayo de actividad HMG-CoA reductasa, se basa en la ecuación 1:



La actividad enzimática fue evaluada mediante ensayos espectrofotométricos realizados por el método descrito por Kirtley (1967) con algunas modificaciones. Por este método se evalúa el decrecimiento de la absorbancia a 340 nm que representa la oxidación del NADPH por la subunidad catalítica de la enzima HMG-CoA reductasa en presencia del sustrato HMG-CoA. El ensayo se realizó a 22°C, en una mezcla de reacción que contiene el buffer de ensayo (15 % KCL, 0,5 % Serum albumin, 84,5 % agua), 400 µM NADPH, 300 µM HMG-CoA en un volumen final de 200 µl. En la reacción de inhibición se adicionó 500 µM de Pravastatina (análogo del sustrato HMG-CoA).

Se incluyeron los siguientes controles:

**Blanco** (sin enzima): Buffer de ensayo + NADPH + HMG-CoA

**Muestra:** Buffer de ensayo + NADPH + HMG-CoA + Enzima (microsomias).

**Muestra + Inhibidor:** Buffer de ensayo + Pravastatina + NADPH + HMG-CoA + Enzima (microsomias).

La actividad de HMG-CoA reductasa se calculó de acuerdo a la ecuación 2:

$$\text{Unidades /mgP} = \frac{(\Delta A_{340}/\text{min M} - \Delta A_{340}/\text{min I} - \Delta A_{340}/\text{min B}) \times VT}{12,44 \times V \times P \times LP} \quad (2)$$

Dónde:

12,44 =  $\epsilon^{\text{mM}}$  es el coeficiente de extinción del NADPH a 340 nm ( $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). El valor 12,44 representa los 2 NADPH consumidos en la reacción.

VT = Volumen total de la reacción en ml (0,2 ml).

V = Volumen de muestra usado en el ensayo (ml).

P = Concentración de proteína totales de la muestra (mgP)/ml.

LP = Paso de luz en cm (1 para cubetas).

M= Muestra, I= Muestra con Inhibidor y B= Blanco de reacción.

De esta manera, una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que convierte 1.000 nmol de NADPH a NADP<sup>+</sup> por min a 22°C. La unidad de actividad específica está definida como nmol/min/mg de proteína totales (U/mgP). Para determinar la concentración de proteínas se utilizó el método de Bradford con el kit *Coomassie Plus Assay* (Thermo Scientific) según las indicaciones del proveedor. Se realizó una curva estándar por triplicado con un rango de concentraciones de 0 a 750 µg/ml de proteína BSA. Para esto, a 750 µl del reactivo *Coomassie Plus* se le agregó 25 µl de cada muestra de concentración estándar de proteína, se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 10 min y posteriormente se determinó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro UV-630 de JASCO en modo de análisis cuantitativo (según el software del equipo). Posteriormente, la curva estándar se utilizó para determinar la concentración de proteínas de cada una de las muestras microsómicas obtenidas.

## **2.7. Extracción y análisis de carotenoides.**

Para la extracción de los carotenoides se utilizó el método descrito por An y cols. (1989) con algunas modificaciones. El pellet de células proveniente de 30 ml de cultivo se lavó con 1 ml de agua y posteriormente se suspendió en 1 ml de agua. Se le agregó 1/2 volumen de perlas de vidrio (Sigma, 425 - 600 µm) y se realizó la ruptura celular por agitación en molidor de células por 1 min. Se agregó 1 ml de acetona y se homogenizó en vórtex por 2 min. Posteriormente se centrifugó por 5 min a 12.100 x g a temperatura

ambiente. La fase orgánica obtenida se transfirió a un tubo nuevo y al pellet celular resultante se le realizó una nueva extracción de pigmentos con 2 ml de acetona, agitándose en molidor de células por 1 min. Este procedimiento se repitió hasta que los restos celulares quedaron blancos. Los extractos de acetona se juntaron y se les agregó 1/5 volumen de éter de petróleo. Se agitó en vórtex por 2 min, se centrifugó por 5 min a 12.100 x g a temperatura ambiente y se recuperó la fase de éter de petróleo que contiene a los carotenoides.

Para cuantificar los pigmentos, se determinó el volumen de éter de petróleo recuperado y se midió su absorbancia a 450 nm. El contenido de carotenoides totales se determinó de acuerdo a la ecuación 3:

$$\mu\text{g pigmentos /g muestra (ppm)} = \frac{A_{450} \times \text{volumen final (ml)} \times 10^4}{2.592 \times \text{peso muestra (g)}} \quad (3)$$

Donde:

$A_{450}$  = Absorbancia a 450 nm.

$10^4$  = Constante de conversión de unidades  $\mu\text{g/g}$ .

2.592 = Coeficiente de extinción molar de  $\beta$ -caroteno en éter de petróleo en  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

La composición de carotenoides se determinó mediante RP-HPLC. Para ello, los pigmentos disueltos en éter de petróleo se secaron al resguardo de la luz a temperatura ambiente y posteriormente se suspendieron en 100  $\mu\text{l}$  de acetona. Los carotenoides se separaron por HPLC utilizando una columna de fase reversa RP-18 Lichrocart 125-4 (Merck) (RP-HPLC) con la fase móvil de acetonitrilo: metanol: isopropanol (85:10:5, v/v)



con un flujo de 1 ml/min bajo condiciones isocráticas. Los espectros de elución se recuperaron con un detector de arreglo de diodos y los carotenoides se identificaron de acuerdo a su espectro de absorción y tiempos de retención en comparación con estándares.

### 2.8. Extracción y análisis de esteroides.

La extracción de esteroides fue adaptada de Shang y cols., 2006 y Cheng y cols., 2010. Brevemente, 4 g de KOH y 16 ml de etanol/agua al 60 % (v/v) se adicionaron al pellet de células, se mezclaron y se saponificaron a  $80 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 2 h. Los esteroides no saponificables se extrajeron con 10 ml de éter de petróleo y luego secados. Los esteroides se cuantificaron espectrofotométricamente a 280 nm (Lamacka y cols., 1997) de acuerdo a la ecuación 4:

$$\mu\text{g esteroides /g muestra} = \frac{A_{280} \times \text{volumen final (ml)} \times 10^4}{11.900 \times \text{peso muestra (g)}} \quad (4)$$

Donde:

$A_{280}$  = Absorbancia a 280 nm.

$10^4$  = Constante de conversión de unidades  $\mu\text{g/g}$ .

11.900 = Coeficiente de extinción molar de ergosterol en acetona en  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

Los esteroides se separaron por RP-HPLC con una columna C-18, usando metanol/agua (97:3, v/v) como la fase móvil a un flujo de 1 ml/min. Los espectros de elución se recuperaron con un detector de arreglo de diodos y los esteroides se visualizaron en el canal de 280 nm. El estándar de ergosterol se adquirió en Sigma-Aldrich (número de catálogo

57-87-4). La identificación de los esteroides se realizó por un servicio externo (Quality Corthorn; <http://www.corthorn.cl/>) por GC/MS (Agilent 5970N cromatógrafo de gas / Agilent 5890N espectrómetro de masas).

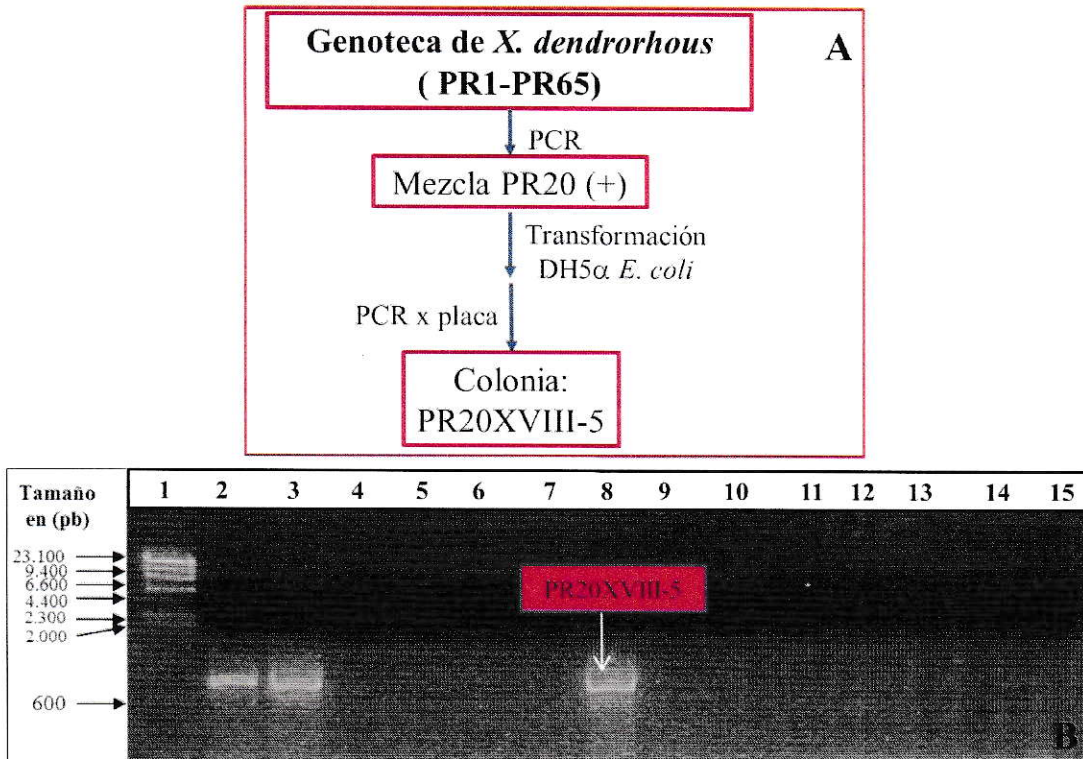
### **3. RESULTADOS**

### **3.1 Identificación y caracterización molecular del gen *HMGR* de *X. dendrorhous* involucrado en la biosíntesis de Mevalonato a partir de HMG-CoA y NADPH.**

Para estudiar el gen *HMGR* de *X. dendrorhous*, en primera instancia se realizó una búsqueda en la base de datos GenBank. A partir de este análisis se encontró, en la sección de patentes, una secuencia nucleotídica de la levadura *P. rhodozyma* (estado imperfecto de *X. dendrorhous*) (Patente: E50998) descrita como “*Improved production of isoprenoid*”. Esta secuencia contiene diez exones y nueve intrones y se deduce una región codificante de 4.316 pb que corresponde a una secuencia peptídica de 1.091 aminoácidos. Para determinar si corresponde al gen *HMGR* de *P. rhodozyma*, se alineó la secuencia aminoacídica deducida con las secuencias peptídicas de la enzima HMG-CoA reductasa de *Homo sapiens* (NP\_000850), *S. cerevisiae* (*HMGI*, CAA86503; *HMG2* NP\_013555), *Ustilago maydis* (XP\_759161), *C. neoformans* (XP\_566774), *Laccaria bicolor* (EDR01917) y *Malasszia globosa* (XP\_001729157), y se determinó que el porcentaje de identidad entre ellas era mayor a un 50 %. Los resultados bioinformáticos sugieren que la secuencia nucleotídica E50998 de *P. rhodozyma* codificaría la enzima HMG-CoA reductasa.

Para la identificación del gen *HMGR* en la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*, se diseñaron partidores que permitieran amplificar fragmentos de dicho gen diseñados a partir de la secuencia obtenida en Genbank (E50998) (Tabla 3). Con ellos se rastreó mediante PCR el gen en una genoteca de la levadura construida en el sitio *Bam*HI del vector YIp5 que se compone de 65 mezclas (PR1-65) de 100 clones cada una (Figura 6).

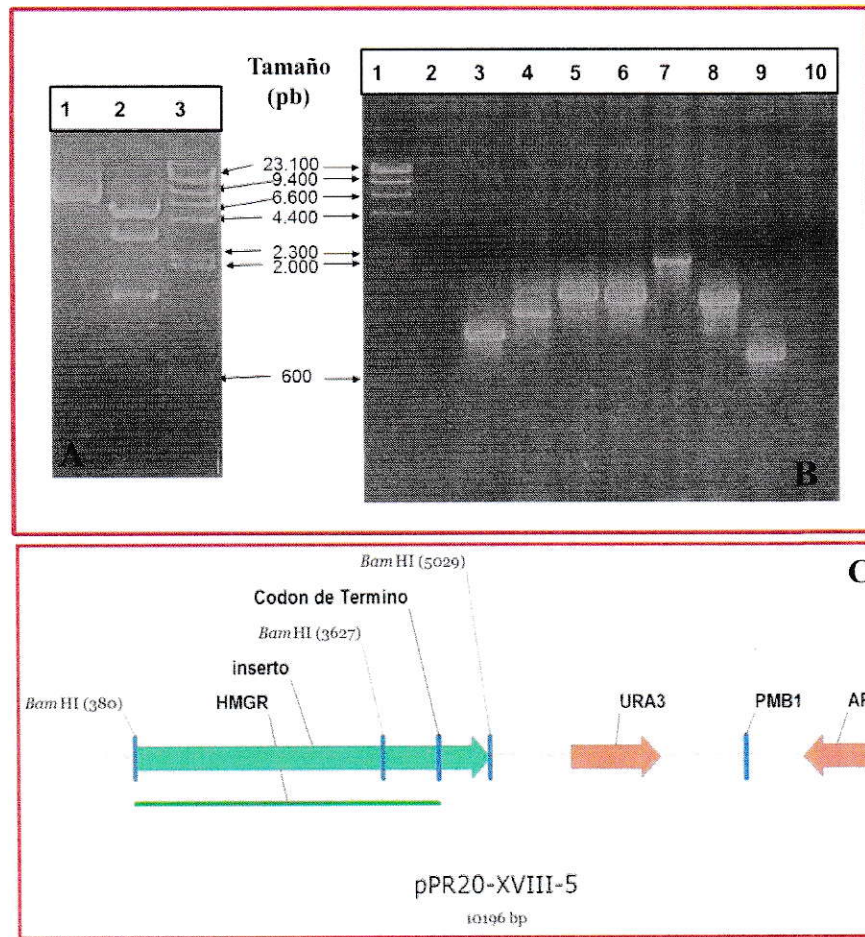
Se utilizó la pareja de partidores HMGR-4/HMGR-10 que amplifican un fragmento de 750 pb y como resultado se identificó la colonia PR20-XVIII-5 que contenía al plásmido pPR20-XVIII-5, el cual se purificó y analizó por mapeo de restricción. Al digerir pPR20-XVIII-5



**Figura 6. Obtención de la colonia PR20-XVIII-5 a partir de la genoteca de *X. dendrorhous*.** **Panel A:** Estrategia utilizada para la búsqueda del gen *HMGR* en la genoteca de YIp5/ *Bam*HI de *X. dendrorhous*, utilizando los partidores HMGR-4/HMGR-10 y como molde, DNA de cada una de las mezclas de la genoteca para la reacción de PCR. Los productos de amplificación adecuada se obtuvieron a partir de la mezcla PR20. Luego el DNA de esta mezcla, se replicó en células DH5  $\alpha$  de *E. coli*. Posteriormente, colonias aisladas de *E. coli* obtenidas anteriormente se utilizaron como molde en una reacción de PCR utilizando los partidores HMGR-4/HMGR-10. Como resultado se obtuvo una colonia positiva que presentó un producto de amplificación para la reacción de PCR, la colonia se denominó PR20XVIII-5. **Panel B:** Gel de Agarosa al 1 % con los productos de PCR al utilizar la pareja de partidores HMGR-4/HMGR-10 y como DNA molde: DNA de UCD 67-385 (Carril 2), DNA plasmídico de las colonias cultivadas en la placa PR20-XVIII (Carril 3), DNA plasmídico de los 10 clones de la placa PR20-XVIII (Carriles 4 al 13, respectivamente), DNA plasmídico de PR20XVIII-5 (Carril 8), control negativo (Carril 14) y DNA de  $\lambda$ /HindIII (Carril 1).

con *Bam*HI, se obtuvo 3 fragmentos de DNA: uno de aproximadamente 5.500 pb, correspondiente al vector YIp5, y otros dos correspondientes a DNA de *X. dendrorhous* de 3.200 pb y 1.400 pb respectivamente (Figura 7 A). Posteriormente, se utilizó el DNA del plásmido pPR20-XVIII-5 como molde para reacciones de PCR utilizando diversos juegos de partidores (Tabla 3). El análisis de los productos de amplificación obtenidos indicó que el plásmido pPR20-XVIII-5 no contiene la secuencia genómica completa del gen *HMGR* (Figura 7 B), ya que no amplifica el fragmento de 1.542 pb que se genera al utilizar la pareja de partidores HMGR-1/HMGR-9 con DNA genómico de *X. dendrorhous* como molde. Posteriormente, el inserto del plásmido pPR20-XVIII-5 se secuenció y analizó determinado que su tamaño era de 4.600 pb (3200 + 1.400 pb) y que solo 3.900 pb corresponden al gen *HMGR*. Efectivamente el gen *HMGR* no está completo y al menos está interrumpido por dos sitios *Bam*HI en su secuencia (Figura 7 C). Este resultado comprobó que el clon identificado en la genoteca de la levadura solo porta una parte del gen *HMGR* de *X. dendrorhous*.

Para elaborar la estrategia que permitiese la amplificación mediante PCR y el clonamiento del gen *HMGR* completo de *X. dendrorhous*, se realizó un análisis bioinformático de la secuencias del genoma de *X. dendrorhous* obtenida en nuestro laboratorio utilizando el programa *CLC Genomic Workbench 5* y la secuencia obtenida a partir del plásmido pPR20-XVIII-5. A partir de la secuencia nucleotídica del gen *HMGR* identificado, se diseñaron partidores para amplificar las 4.316 pb del mismo incluyendo desde el codón inicio (ATG) hasta el codón de término (TGA) de la traducción y posteriormente se clonó en pBluescript SK(-). De esta manera se obtuvo un clon que porta un plásmido, denominado pCH11, de aproximadamente 7.300 pb que lleva el



**Figura 7. Análisis de pPR20-XVIII-5. Panel A:** pPR20-XVIII-5 sin digerir (Carril 1), pPR20-XVIII-5 digerido con *Bam*HI: 3 fragmentos de tamaños aproximados de 5.500 pb, 3.200 pb y 1.400 pb (Carril 2) y DNA de  $\lambda$ *Hind*III (Carril 3). **Panel B:** DNA de  $\lambda$ *Hind*III (Carril 1), Productos de PCR de pPR20-XVIII-5 con las parejas de partidores: HMGR-1/HMGR-9 (1.544 pb); HMGR-2/HMGR-9 (958 pb); HMGR-3/HMGR-10 (1.186 pb); HMGR-2/HMGR-10 (1.451 pb); HMGR-7/HMGR-12 (1.436 pb); HMGR-5/HMGR-13 (2.125 pb); HMGR-8/HMGR-14 (1.342 pb); HMGR-4/HMGR-10 (750 pb), respectivamente (Carriles 2 al 9) y control negativo reacción (agua) de PCR (Carril 10). **Panel C:** Representación gráfica de pPR20-XVIII-5. El inserto de 4.600 pb (flecha verde gruesa) y fragmento de 3.900 pb correspondiente al gen *HMGR* (línea verde fina).

inserto de 4.316 pb. A partir de pCH11 y utilizando los partidores T3 y T7 que hibridan en la región de clonamiento múltiple del vector, se secuenció completamente el inserto en ambas direcciones. El alineamiento de las secuencias nucleotídicas del inserto de pCH11 y del gen *HMGR* (E50998) permitió identificar diferencias nucleotídicas puntuales entre ambas. Sin embargo, el porcentaje de identidad entre ellas es de un 99 %, lo que permitió afirmar que la secuencia clonada correspondería al gen *HMGR* de *X. dendrorhous*.

A partir de la secuencia de cDNA del gen *HMGR* previamente deducida en el laboratorio, se diseñaron oligonucleótidos complementarios para obtener el cDNA del gen *HMGR* mediante RT-PCR (Figura 9A). Para la reacción de RT se utilizó como molde el RNA total extraído desde un cultivo de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*. En una primera instancia se intentó amplificar el cDNA del gen *HMGR* mediante una sola reacción de PCR utilizando la pareja de partidores HMGR-1/HMGR-14 y como molde el cDNA de la levadura sin obtener resultados positivos. Por tal motivo posteriormente se amplificó con los partidores diseñados de tal manera que los productos de PCR complementaran entre sí. Como se esperaba, se obtuvieron tres fragmentos de aproximadamente 1 kb denominados A, B y C (Figura 9 B), los que se purificaron y unieron mediante OE-PCR (*Overlap Extension* PCR) con un ciclo de denaturación, hibridación y elongación. Así se logró un fragmento de DNA de aproximadamente 3 kb que posteriormente se clonó en el sitio *EcoRV* de pBluescript II SK(-). Luego se identificó un clon portador del plásmido denominado pCCH5 (Figura 9 B), cuyo inserto se secuenció y analizó, indicando que su tamaño es de 3.277 pb y porta el cDNA del gen *HMGR*.

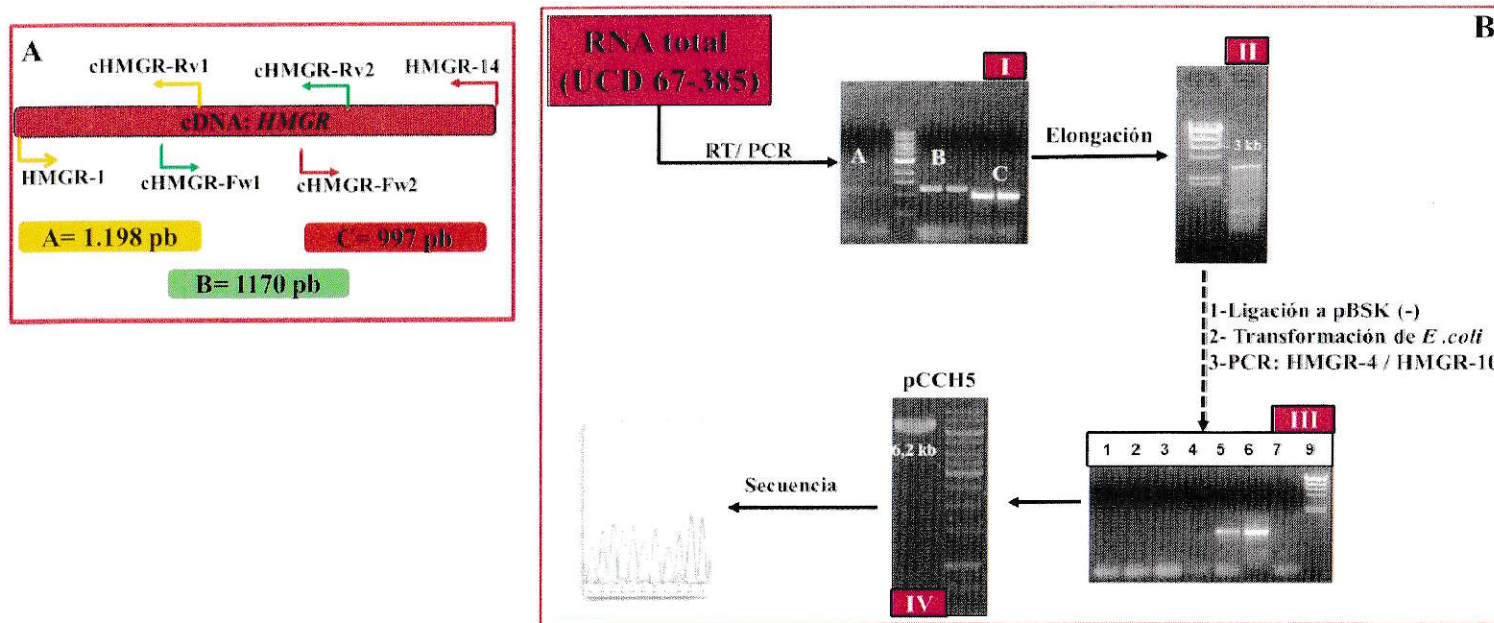
La comparación entre las secuencias genómica y de cDNA de *HMGR*, indicó que el gen está constituido por 10 exones y 9 intrones. La secuencia aminoacídica deducida a



Posición (pb)	105	201	215	216	217	437	534	990	991	1118	1344	1455	1456	2249	2479	2810	3480	3533	3543	4066
<i>X. dendrorhous</i> (UCD67-385)	T	C	-	-	-	G	G	C	G	A	T	T	C	G	C	C	A	T	C	A
<i>P. rhodozyma</i> (E50998)	G	T	A	C	C	C	A	G	C	T	-	-	-	A	T	T	C	C	G	G

**Figura 8: Comparación de secuencia del gen *HMGR*.**

El alineamiento de las secuencias nucleotídicas del inserto de pCH11, que contiene el gen *HMGR* de *X. dendrorhous* y la secuencia nucleotídica de la levadura *P. rhodozyma* (E50998) descrita como “*Improved production of isoprenoid*”. Éste análisis permitió identificar diferencias nucleotídicas puntuales entre ambas secuencias para el gen *HMGR*.

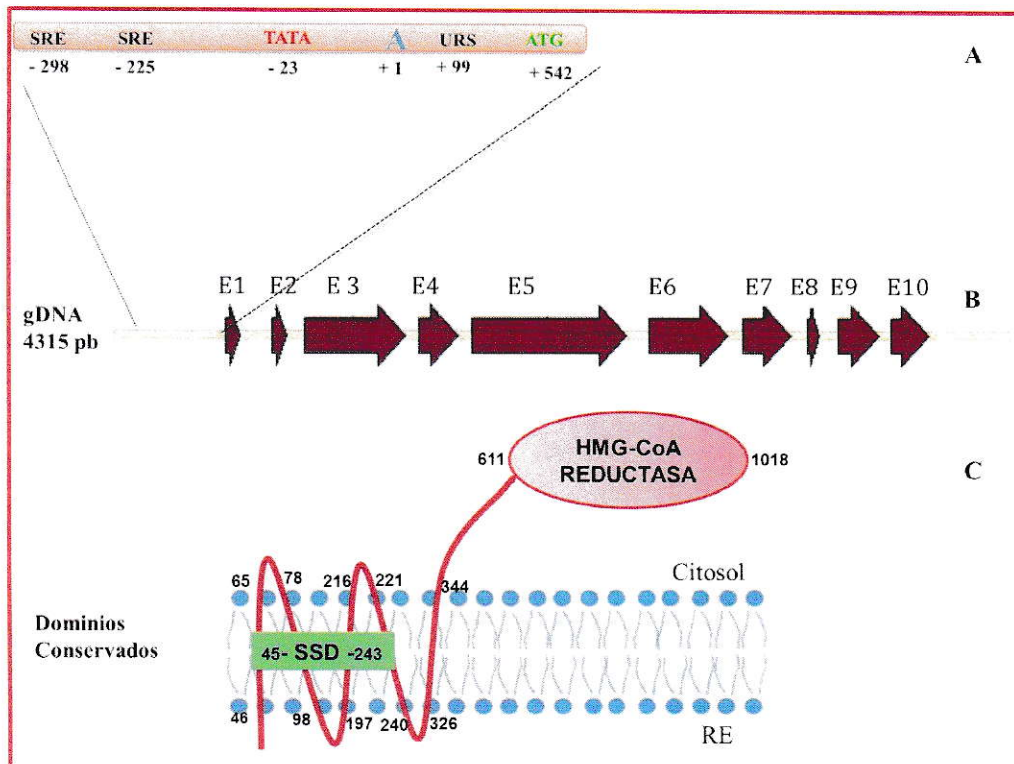


**Figura 9. Clonado y secuenciación del cDNA del gen *HMGR* de *X. dendrorhous*.** Panel A: Esquema de los oligonucleótidos utilizados para amplificar el cDNA del gen *HMGR*. Se indica el tamaño esperado de los productos de PCR A (en amarillo), B (en verde) y C (en rojo). Panel B: Para las reacciones de RT-PCR se utilizó como molde el RNA total extraído desde un cultivo de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* y los partidores indicados en el panel A. Los fragmentos A, B y C obtenidos (I), se purificaron y unieron mediante OE-PCR obteniendo un fragmento de 3 kb (II), usando los partidores HMGR-1/HMGR-14, que luego se clonó en pBluescript II SK(-). Luego se transformó la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* y por reacciones de PCR de colonia (III) con los partidores HMGR-4/HMGR-10, se encontró una colonia positiva (Carril 5, III) y control positivo de reacción (Carril 6, III). El plásmido pCCH5 (IV) que portaba la colonia se secuenció corroborando que porta el cDNA del gen *HMGR*.

partir de la secuencia del cDNA correspondería a una proteína de 1.091 aminoácidos, con un tamaño molecular aproximado de 115,9 kDa y un punto isoeléctrico estimado de 8,51.

Se comparó la secuencia aminoacídica deducida de HMGR con la base de datos de dominios conservados ExPasy, encontrando un dominio de 198 aminoácidos denominado dominio de detección de esteroles (SSD). También se pudo determinar otro dominio de 407 aminoácidos, denominado hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa o dominio catalítico) (Figura 10). La predicción de estructura secundaria de HMG-CoA reductasa de *X. dendrorhous* se realizó con el programa MINNOU (<http://minnou.cchmc.org>) y se pudo identificar 5 regiones transmembra en la región amino terminal de la proteína HMGR, que permitiría el anclaje de la proteína a la membrana del retículo endoplasmático (RE). Los análisis anteriores sugieren fuertemente que el gen aislado efectivamente codifica la enzima HMG-CoA reductasa de *X. dendrorhous*.

Para determinar la existencia de secuencias reguladoras en la región promotora del gen *HMGR* de *X. dendrorhous*, se realizó un análisis bioinformático de 900 pb de la región río arriba del codón de inicio de la traducción de dicho gen. Los resultados del mismo permitieron determinar el promotor central del gen, situando el sitio de inicio de la transcripción (posición +1, a 542 pb río arriba del codón de inicio de la traducción) y la posible caja TATA (5'-TATAATA-3', a 23 pb río arriba del punto de inicio de la transcripción). Además, se identificó dos secuencias SRE a la cual se une el factor SREBP en respuesta a la depleción de esteroides en levaduras (Goldstein y Brown, 1990). Los sitios SRE en el promotor se localizan a 225 y 298 pb río arriba del punto de inicio de la transcripción (Figura 5 A).



**Figura 10. Análisis de la región promotora y codificante del gen *HMGR*.**

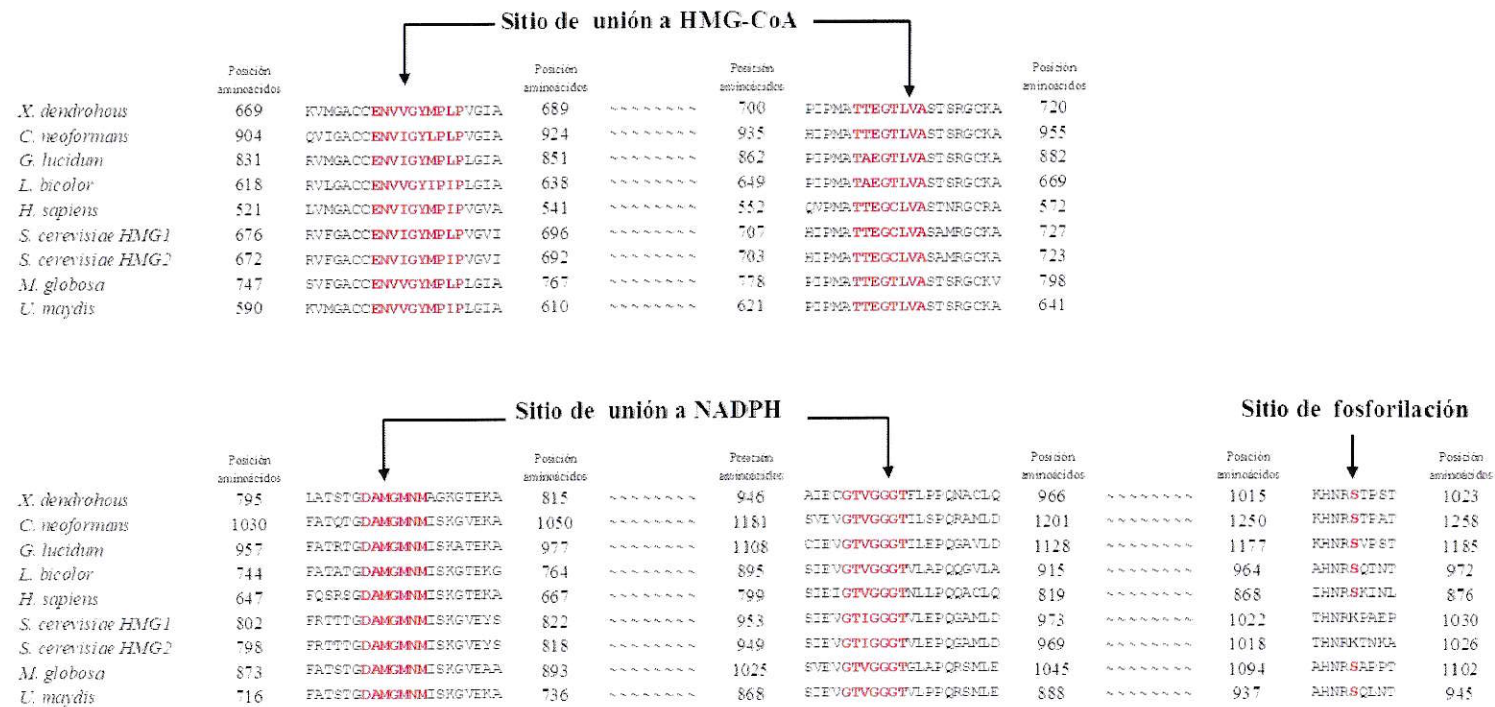
Esquema de los elementos reguladores encontradas con herramientas bioinformáticas en la región promotora del gen *HMGR* de *X. dendrorhous*. **Panel A:** Los números de pares de bases indican la distancia de las secuencias al sitio de inicio de la transcripción (A, en color azul). **Panel B:** Comparación del cDNA del gen *HMGR* con su versión genómica. La región codificante es de 4.316 pb y está interrumpida por 9 intrones generando un ORF de 3.276 pb. **Panel C:** La secuencia aminoacídica deducida correspondiente a HMG-CoA reductasa consta de 1.091 aminoácidos, ubicada en la membrana del retículo endoplasmático (RE). La región amino terminal tiene 5 región transmembrana presentes entre los aminoácidos 46-65, 78-98, 197-216, 221-240 y 326-344. Se indican los dominios SSD, presente entre los aminoácidos 45 al 243, y el HMG-CoA reductasa, presente entre los aminoácidos 611 al 1018, que se encontraron en la proteína deducida utilizando la base de datos de dominios conservados del Expasy (<http://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/ScanView.cgi>).



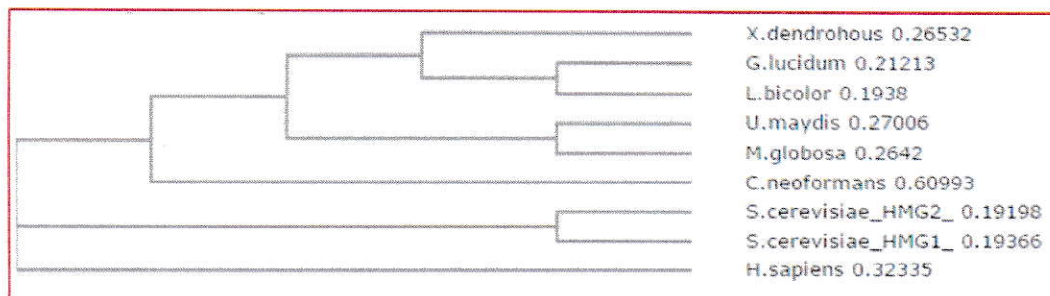
El factor transcripcional Rox1p reprime la transcripción de casi todos los genes hipóxicos en condiciones de aerobiosis. El sitio de unión URS para este factor en el promotor de *HMGR* se encuentra entre +94 y +105 pb respecto al sitio de inicio de la transcripción (Figura 10 A).

Por otra parte, mediante análisis de alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida, se observó que la proteína HMGR de *X. dendrorhous* tiene similitud mayor al 60 % con secuencias peptídicas de otras HMGR, tales como la de *C. neoformans* (79,8 %), *G. lucidum* (62,9 %), *L. bicolor* (62,7 %), *M. globosa* (80,7 %), *U. maydis* (69,3 %;), *HMG1* y *HMG2* de *S. cerevisiae* (70,3 % y 71,8 %, respectivamente) y de *H. sapiens* (69,9 %) (Figura 11).

Además, como se esperaba, la región amino terminal de la proteína HMGR de *X. dendrorhous* presenta una menor conservación que el dominio catalítico (C-terminal) (Figura 11). La secuencia de aminoácidos de HMGR deducida de *X. dendrorhous* posee los sitios de unión a los sustratos HMG-CoA y NADPH, que son muy conservados y funcionalmente importantes (Ruiz-Albert y col. 2002). Además, la enzima HMGR de *X. dendrorhous* mantiene una serina en la posición 1.019 implicada en la modificación postraduccional que regula la actividad de la enzima (Figura 11). También, la comparación de la secuencia aminoacídica de la HMG-CoA reductasa de *X. dendrorhous* con la de otros organismos, permite desarrollar un cladograma como se muestra en la Figura 12. Se puede observar que la proteína de *X. dendrorhous* agrupa con otras proteínas pertenecientes a levaduras basidiomicetes. Estos resultados sugieren fuertemente que efectivamente el gen *HMGR* de *X. dendrorhous* identificado codifica una proteína que pertenece a la superfamilia de las HMG-CoA reductasas.



**Figura 11. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica deducida de la proteína HMGR de *X. dendrohous* con la de otros organismos.** En el análisis se incluyó la proteína HMGR de *C. neoformans* (AAW44143), *G. lucidum* (ABY84849), *L. bicolor* (EDR01917), *M. globosa* (EDP41943), *U. maydis* (EAK84015), *S. cerevisiae* (*HMG1*, CAA86503; *HMG2*, AAB67527). *H. sapiens* (NP\_000850). Los sitios de unión a HMG-CoA (ENVIGxxxIP y TTEGCLVA), a NADPH (DAMGMNM y GTVGGGT) y el residuo de serina conservado se encuentran indicados en las letras rojas. El Software utilizado: European Molecular Biology Open (Rice y col., 2000).



**Figura 12. Cladograma del alineamiento de las secuencias de HMG-CoA reductasa de distintos organismos.** En el análisis se incluyó la proteína HMGR de *C. neoformans* (AAW44143), *G. lucidum* (ABY84849), *L. bicolor* (EDR01917), *M. globosa* (EDP41943), *U. maydis* (EAK84015), *S. cerevisiae* (*HMG1*, CAA86503; *HMG2*, AAB67527) y *H. sapiens* (NP\_000850). El análisis fue realizado con el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

### 3.2 Estudios de funcionalidad del gen *HMGR* de *X. dendrorhous*

Con el objetivo de evaluar la función del gen *HMGR* de *X. dendrorhous* identificado, se realizaron tres estrategias. En primer lugar se determinó la actividad enzimática HMG-CoA reductasa en la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* en distintos puntos de la curva de crecimiento en los cuales también se determinó los niveles de transcrito *HMGR* y contenido de carotenoides. En segundo lugar, se obtuvo mutantes por escisión del gen *HMGR* a partir de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*. En tercer lugar, se expresó el dominio catalítico (*cHMGR*) de HMG-CoA reductasa de *X. dendrorhous* en una cepa de *S. cerevisiae* recombinante productora de carotenoides.

**Actividad enzimática HMG-CoA reductasa.** La determinación de la actividad HMG-CoA reductasa se basa en la medida espectrofotométrica del decrecimiento de la absorbancia a 340 nm que representa la oxidación del NADPH por la subunidad catalítica de la enzima HMG-CoA reductasa en presencia del sustrato HMG-CoA. Para establecer la actividad HMG-CoA reductasa de la enzima codificada por el gen *HMGR* de *X. dendrorhous*, primero se puso a punto el protocolo de obtención de la fracción microsómica a partir de células de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*. Una vez obtenida esta fracción, se determinó la concentración de proteínas presente y la temperatura adecuada para medir la actividad HMG-CoA reductasa.

Para determinar la actividad HMG-CoA reductasa a lo largo de la curva de crecimiento de la levadura y relacionar dicha actividad con la expresión del gen *HMGR* a nivel de sus transcritos y la producción de carotenoides, se cultivó la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* en medio YM y se colectaron muestras luego de 24, 72 y 120 h de cultivo que corresponden a las fases de crecimiento exponencial inicial, exponencial final y estacionaria, respectivamente.

En la Tabla 4, se entregan los valores de los niveles de transcrito del gen *HMGR* que fueron evaluados respecto al gen que codifica  $\beta$ -actina (*ACT*) de *X. dendrorhous*, el cual ha sido usado previamente como gen normalizador en estudios de expresión génica en esta levadura (Lodato y cols., 2004; Lodato y cols., 2007; Miao y cols., 2011; Marcoleta y col., 2011). El análisis de los resultados mostró que los niveles de transcrito (Tabla 4) alcanzaron un máximo al final de la fase exponencial (valor de expresión de 94 moléculas de mRNA de *HMGR* por cada 1.000 moléculas de actina, variación que corresponde a un



aumento de 2 superior a los niveles iniciales); mientras que al final del crecimiento (fase estacionaria) se observó una disminución de 2 veces de los niveles de mRNA con respecto a los niveles iniciales. Adicionalmente, en la Tabla 4 también se indica la actividad HMG-CoA reductasa representada como unidad de actividad específica por proteína totales (U/mgP). El análisis de los resultados, mostró un aumento de 8 veces de la actividad HMG-CoA reductasa al final del crecimiento exponencial con respecto a los niveles determinados al inicio del crecimiento; en tanto que al final del crecimiento los valores de actividad HMG-CoA reductasa retornaron a los niveles de inicio de fase exponencial. En cuanto a la producción de carotenoides, se observó una disminución al final de la fase exponencial de crecimiento en relación con los niveles iniciales. Sin embargo, la máxima producción de carotenoides se obtuvo al final del crecimiento (fase estacionaria) observando un aumento de 2 veces en relación a los niveles iniciales. La producción de carotenoides obtenida coincide con lo observado por Lodato y cols. (2004).

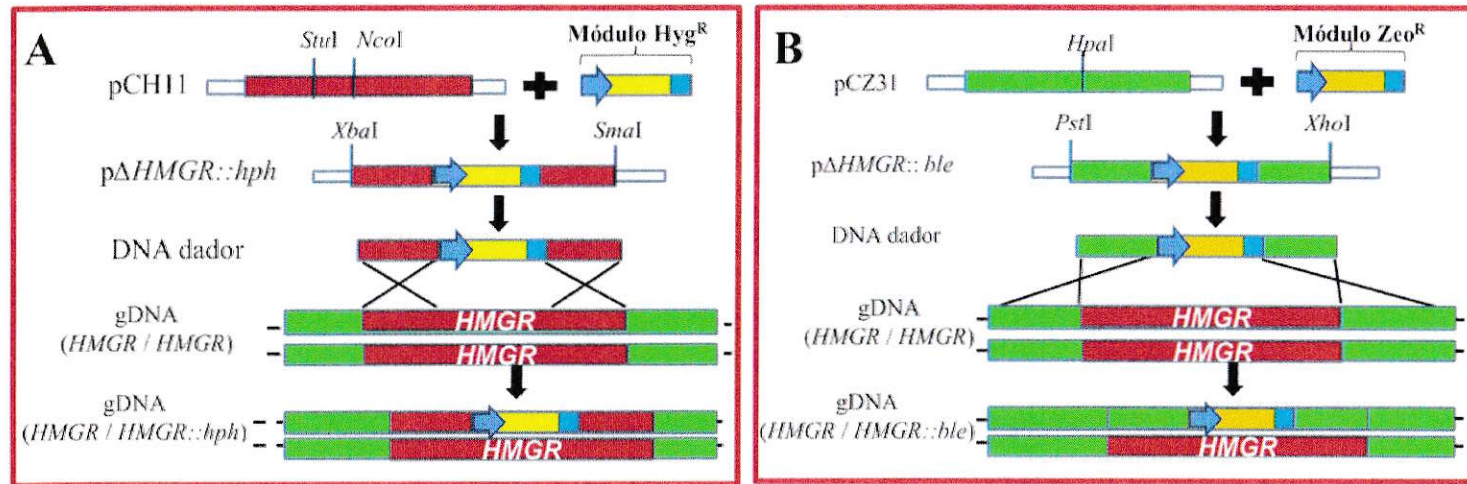
**Tabla 4: Parámetros de niveles de transcrito del gen *HMGR*, actividad HMG-CoA reductasa y producción de carotenoides en la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*.**

<b>Fase de Crecimiento</b>	<b>Niveles de transcrito de <i>HMGR</i> (*)</b>	<b>Actividad HMG-CoA Reductasa (U/mgP.)</b>	<b>Producción de Carotenoides (<math>\mu\text{g}</math> de carotenoides/g de levadura seca)</b>
<b>Inicio de exponencial</b>	44 $\pm$ 3	1,12 $\pm$ 0,32	231,62 $\pm$ 56,05
<b>Final de exponencial</b>	94 $\pm$ 7	8,81 $\pm$ 0,97	91,41 $\pm$ 5,16
<b>Estacionaria</b>	19 $\pm$ 2	1,75 $\pm$ 0,71	499,98 $\pm$ 54,92

$\pm$  corresponden a la desviación estándar entre experimentos independientes (n=3). (\*) Representa niveles de transcrito del gen *HMGR* como veces de cambios de su expresión con respecto a la del gen de actina.

**Obtención de mutantes del gen *HMGR* de *X. dendrorhous*, análisis fenotípico y de niveles de transcrito del gen *HMGR*.** La mutación del *locus HMGR* de la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* se realizó mediante la recombinación y reemplazo de este gen por un módulo portador del gen *hph* o *ble*, que confieren resistencia a higromicina B o zeocina, respectivamente a las cepas de *X. dendrorhous* que lo portan (Niklitschek, 2007; Drocourt y cols., 1990).

Para obtener el módulo requerido para la transformación de *X. dendrorhous*, se digirió el plásmido pCH11 con las enzimas *StuI* y *NcoI* para escindir 1.417 pb del *locus HMGR*. De esta manera, se recuperó un fragmento de DNA de 5.857 pb que contiene al plásmido pBluescript II SK(-) y parte del gen *HMGR*. En paralelo, el plásmido pMN-Hyg, que porta el módulo de confiere resistencia a higromicina B en *X. dendrorhous*, se digirió con la enzima *EcoRV* liberándose un fragmento de 1.912 pb correspondiente a este módulo. Este fragmento se purificó y se ligó al fragmento de 5.857 pb descrito anteriormente y como resultado se obtuvo el clon CH16 portador del plásmido p $\Delta$ *HMGR::hph* (Tabla 2), que se utilizó posteriormente para transformar la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* (Figura 13 A). Por otra parte, para la construcción del plásmido p $\Delta$ *HMGR::ble* (Tabla 2), primero se amplificó dos fragmentos de DNA de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* de 828 pb y de 820 pb, correspondientes a la secuencia genómica río arriba y río abajo del gen *HMGR*, respectivamente. La región río arriba se amplificó con la pareja de partidores FW.A.HMGR/RV.A.HMGR, mientras que la región río abajo con los partidores FW.T.HMGR/RV.T.HMGR. Luego de purificar estos fragmentos desde un gel de agarosa, se unieron mediante OE-PCR ya que de acuerdo al

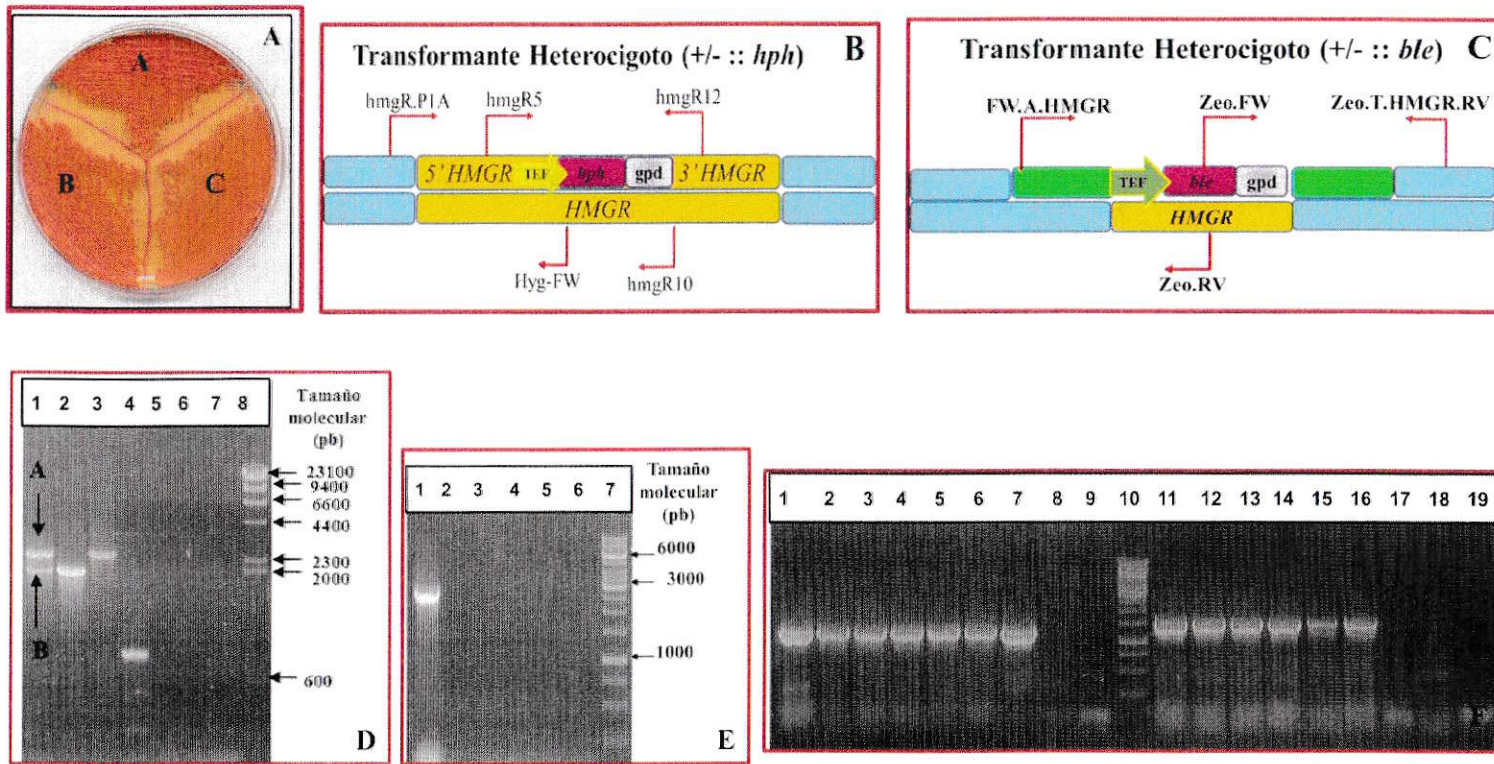


**Figura 13. Estrategia para la inserción del DNA transformante en el locus *HMGR*.**

**Panel A:** El módulo de resistencia a higromicina B de *X. dendrorhous* se insertó entre los sitios *StuI* y *NcoI* del plásmido pCH11. El plásmido pΔHMGR::hph se digirió con *XbaI* y *SmaI* para liberar el DNA transformante. **Panel B:** El módulo de resistencia a zeocina de *X. dendrorhous* se insertó en el sitio *HpaI* del plásmido pCZ31, obteniéndose el plásmido pΔHMGR::ble. Este plásmido se digirió con *PstI* y *XhoI* para liberar el DNA transformante. Los plásmidos pΔHMGR::hph y pΔHMGR::ble digeridos se utilizaron de manera independiente para transformar la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*, que se integra en el locus *HMGR* de *X. dendrorhous* por recombinación homóloga.

diseño de los partidores, éstas presentan regiones complementarias. Posteriormente el producto se amplificó utilizando los partidores FW.A.HMGR/RV.T.HMGR. Adicionalmente, en el diseño de partidores para generar esta construcción se incorporó un sitio de reconocimiento de la endonucleasa de restricción *HpaI* de tal manera que éste quedara entre la región río arriba y río debajo de HMGR y permitirá la introducción de los módulos de resistencia entre ambas. A continuación el fragmento de 1.648 pb finalmente obtenido se clonó en el sitio *EcoRV* de pBluescript II SK(-) con el que se transformó *E. coli*. Luego se identificó y aisló un clon portador del plásmido recombinante (pCZ31) al que posteriormente se le introdujo el módulo de resistencia a zeocina de 1.175 pb en el sitio *HpaI* del plasmidio pCZ31, obteniéndose el clon CZ23 portador del plasmidio p $\Delta$ HMGR::*ble* que se utilizó para transformar *X. dendrorhous* (Figura 13 B).

De manera independiente se transformó la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* con 15  $\mu$ g de DNA transformante obtenido de los plásmidos p $\Delta$ HMGR::*hph* y p $\Delta$ HMGR::*ble* (Figura 13). Luego de cuatro días se observó la aparición de colonias transformantes resistentes a higromicina B o zeocina, respectivamente. Considerando que la cepa UCD 67-385 es diploide (Hermosilla y cols, 2003), se obtuvo transformantes 385.HMGR.Hgy, resistentes a higromicina de fenotipo naranja y 385.HMGR.Zeo, resistentes a zeocina de fenotipo anaranjado pálido, ambos de genotipo heterocigotos (HMGR<sup>(+/-)</sup>) para el gen *HMGR* (Tabla 1 y Figura 14 A). La confirmación del genotipo y la presencia de la mutación en las cepas transformantes, se realizó mediante PCR utilizando como molde el gDNA de las cepas silvestres y de los transformantes con distintas parejas de partidores que permiten analizar el *locus HMGR* (Figura 14 D, E y F).



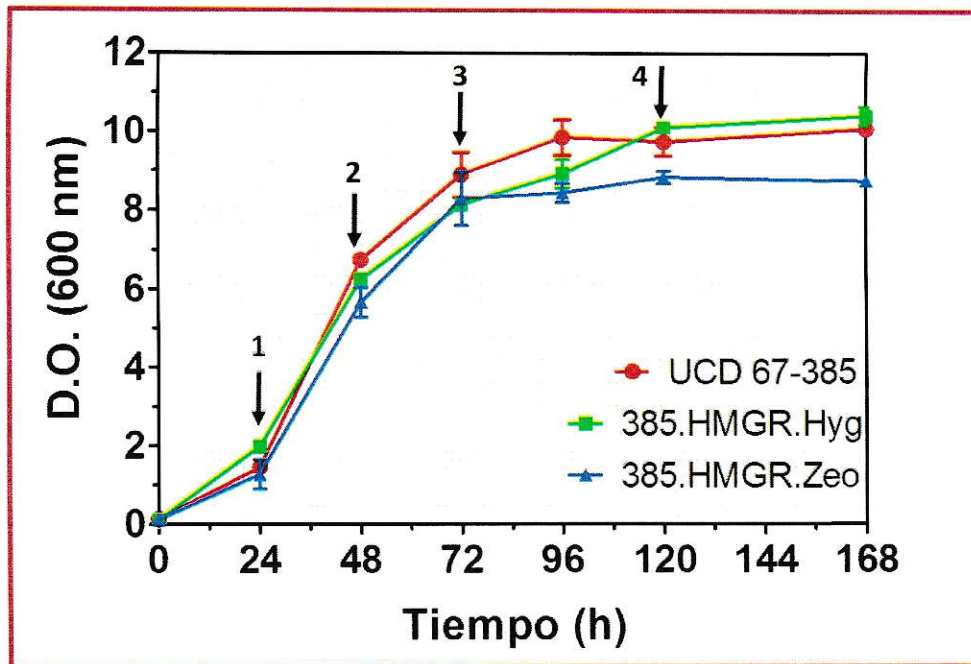
**Figura 14: Análisis genotípico de las cepas transformantes 385.HMGR.Hyg y 385.HMGR.Zeo de *X. dendrorhous*. Panel A: Cultivo en placas YM-agar de las cepas estudiadas: UCD 67-385 (A), 385.HMGR.Hyg (B) y 385.HMGR.Zeo (C). Panel**

**B y C:** Esquema del *locus HMGR* en las cepas 385.HMGR.Hyg y 385.HMGR.Zeo. Se indica la posición de los partidores utilizados en el análisis por técnica de PCR (flechas rojas). **Panel D:** Productos de PCR resueltos en gel de agarosa al 1 % al utilizar los siguientes DNA moldes y partidores entre paréntesis: carril 1: 385.HMGR.Hyg (HMGR5/HMGR12), carril 2: UCD 67-385 (HMGR5/HMGR12), carril 3: plásmido p $\Delta$ HMGR::*hph* (HMGR5/HMGR12), carril 4: UCD 67-385 (HMGR4/HMGR10), carril 5: plásmido p $\Delta$ HMGR::*hph* (HMGR4/HMGR10), carril 6: 385.HMGR.Hyg (HMGR4/HMGR10), carril 7: agua, carril 8: corresponde al DNA de  $\lambda$ HindIII. En el carril 1 las bandas A (2.360 pb) y B (1.900 pb) corresponden a la amplificación del alelo mutante y el alelo silvestre del gen *HMGR*, respectivamente. **Panel E:** Producto de PCR con los partidores HMGRP1A y HygFW en gel de agarosa al 1 %. DNA molde utilizado: carril 1: 385.HMGR.Hyg, carril 2: UCD 67-385, carril 3: plásmido p $\Delta$ HMGR::*hph*, carriles 4-6: controles negativos (Agua) y carril 7: DNA de  $\lambda$ HindIII. El amplificado de 3,2 kb obtenido (carril 1) demostró que la recombinación homóloga tuvo lugar en el *locus HMGR*. **Panel F:** Productos de PCR resueltos en gel de agarosa 1 %. El amplificado de 1.340 pb con los partidores FW.A.HMGR y Zeo.RV se obtuvo a partir de los DNAs: Carriles 1-6: 385.HMGR.Zeo, carril 7: p $\Delta$ HMGR::*ble*, carril 8: UCD 67-385, carril 9: control negativo y carril 10: marcador de tamaño molecular DNA 1 kb. El amplificado de 1,4 kb obtenido con los partidores Zeo.T.HMGR.RV y Zeo.FW demostró que la recombinación homóloga tuvo lugar en el *locus HMGR*. DNA moldes: carriles del 11 al 16: 385.HMGR.Zeo, carril 17: p $\Delta$ HMGR::*ble*, carril 18: UCD 67-385 y carril 19: control negativo.

Las reacciones de PCR confirmaron que los transformantes 385.HMGR.Hyg y 385.HMGR.Zeo son heterocigotos para el gen *HMGR*, donde hay un alelo silvestre y otro mutante.

A continuación se evaluó el efecto fenotípico de la mutación de *HMGR* en *X. dendrorhous*. Para ello, las cepas mutantes obtenidas y la cepa silvestre se cultivaron en medio YM suplementado con 20 g/l glucosa a 22°C con agitación constante. El aumento de la biomasa se siguió midiendo la densidad óptica del cultivo a 600 nm, colectando muestras en 4 tiempos a lo largo del crecimiento celular, correspondientes a la fase exponencial temprana (1), exponencial media (2), exponencial tardía (3) y estacionaria (4) (Figura 15 A). A partir de dichas muestras se extrajo RNA total, carotenoides totales y se determinó el peso seco. Como se observa en la figura 15 A, bajo las condiciones de cultivo utilizada el crecimiento de las cepas UCD 67-385, 385.HMGR.Hyg de *X. dendrorhous* no presentó diferencias significativas. Sin embargo, el crecimiento de la cepa 385.HMGR.Zeo presentó diferencia significativa con respecto a la cepa silvestre.

Con el objetivo de evaluar si efectivamente la mutación en el gen *HMGR* reduce los niveles de su transcrito, se analizaron sus niveles respecto al gen que codifica para  $\beta$ -actina (*ACT*) de *X. dendrorhous* mediante RT-qPCR (Tabla 5). Los resultados indican que los niveles de transcrito del gen *HMGR* son prácticamente constantes a lo largo de todo el crecimiento. Se puede observar que los niveles de mRNA en la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* se encuentran acotados entre 30 y 62 moléculas de mRNA de *HMGR* por cada 1.000 moléculas de mRNA de actina (variación máxima no mayor a 2,5 veces), similar a lo que ocurre en las cepas 385.HMGR.Hyg y 385.HMGR.Zeo donde los niveles



**Figura 15. Curvas de crecimiento de las cepas UCD 67-385, 385.HMGR.Hyg y 385.HMGR.Zeo de *X. dendrorhous* cultivadas en medio YM.** Curvas de crecimiento de las distintas cepas estudiadas cultivadas en medio YM a 22°C con agitación constante. Cada cepa fue cultivada en triplicado, se indica el valor promedio y las barras de error corresponden a la desviación estándar. Las flechas indican los tiempos en que se tomó muestras para análisis posteriores. La cepa 385.HMGR.Zeo alcanzó una menor biomasa respecto a la cepa silvestre al final del experimento (prueba t-Student,  $P < 0,05$ ).



**Tabla 5. Nivel del transcrito *HMGR* en las cepas UCD 67-385, 385.HMGR.Hyg y 385.HMGR.Zeo cultivadas en medio YM.**

Fase de Crecimiento	UCD 67-385	385.HMGR.Hyg	N.S.E. <sup>1</sup>	385.HMGR.Zeo	N.S.E. <sup>1</sup>
<b>Exponencial temprana</b>	44 ± 3,0	32 ± 3,0	NS	19 ± 0,8	***
<b>Exponencial media</b>	52 ± 5,0	48 ± 4,0	NS	20 ± 1,3	***
<b>Exponencial tardia</b>	62 ± 9,0	54 ± 9,0	NS	17 ± 1,7	*
<b>Estacionaria</b>	30 ± 5,0	25 ± 4,0	NS	20 ± 3,5	NS

± corresponden a la desviación estándar entre experimentos independientes (n=3).

<sup>(1)</sup>N.S.E.= niveles de significación estadísticos. Los signos (\*) = P<0,05 y (\*\*\*) = P<0,001 indican que las predicciones son estadísticamente significativo y NS = no significativo.

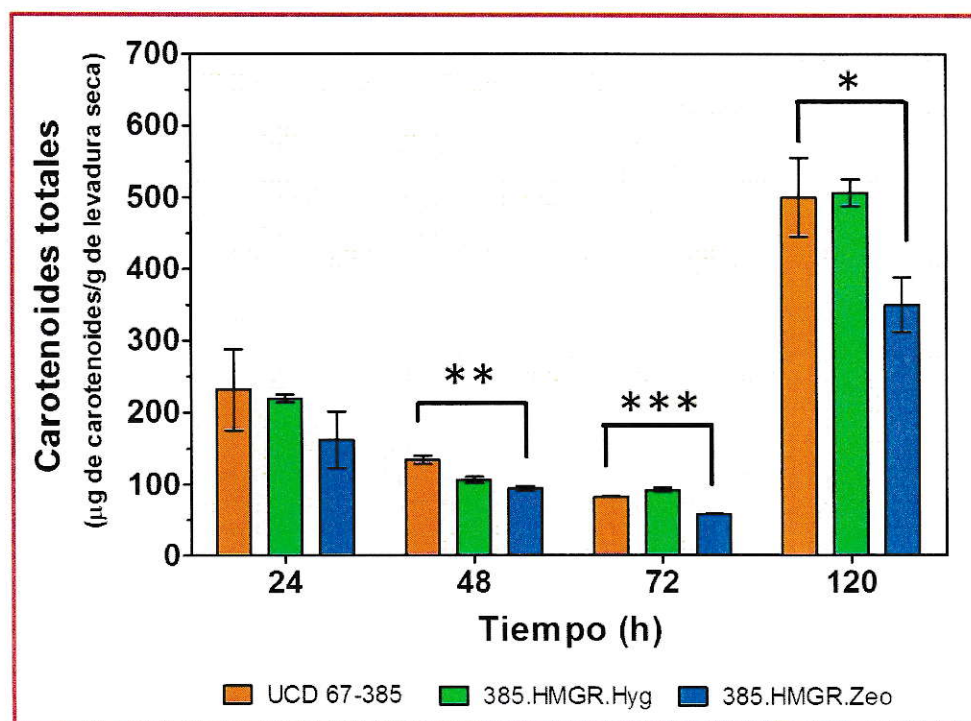
de transcrito se encuentran acotados entre 25 y 54; y 17 y 20 moléculas de mRNA de gen *HMGR* por cada 1.000 moléculas de actina, respectivamente. La expresión constitutiva del gen *HMGR* es esperable considerando que participaría tanto en la generación de moléculas esenciales para el crecimiento y la generación de biomasa, como en la síntesis de precursores de metabolitos secundarios tales como los carotenoides.

El análisis de los niveles de transcrito del gen *HMGR* en la cepa 385.HMGR.Hyg de *X. dendrorhous* no presentó una diferencia significativa en comparación con la cepa silvestre, pero presentó una disminución máxima de un 27 % en la fase exponencial temprana de crecimiento en relación a la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*. Por el contrario, se observó diferencias significativas de los niveles de transcrito del gen *HMGR* de la cepa 385.HMGR.Zeo de *X. dendrorhous* en comparación con la cepa silvestre.

Se encontró que ésta última presenta una disminución en los niveles de mRNA mayor al 30 % en todas fases de crecimiento analizadas, obteniéndose un máximo de un 72 % de los niveles de transcrito en la fase exponencial tardía de crecimiento.

Finalmente para determinar si la diferencia en la pigmentación entre la cepa silvestre y las cepas transformantes se debe efectivamente a diferencias en la cantidad de carotenoides producida y/o a diferencias en la composición de éstos, se extrajo los carotenoides de las diferentes cepas en los 4 tiempos de crecimiento celular analizados los que se cuantificaron espectrofotométricamente (Figura 16) y se analizaron mediante RP-HPLC (Tabla 6).

Los resultados en la Figura 16 muestran la producción de carotenoides totales por las distintas cepas en estudio en función de los 4 tiempos de crecimiento celular analizados. La cepa UCD 67-385 produce entre 100 a 230  $\mu\text{g}$  de carotenoides por g de levadura seca durante la fase crecimiento exponencial (24, 72 y 120 h), mientras que al final del crecimiento celular (120 h) la producción obtenida fue de 499  $\mu\text{g}$  de carotenoides por g de levadura seca. Para la cepa 385.HMGR.Hyg la producción de carotenoides totales no presentó una diferencia significativa respecto a la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*. Sin embargo, la cepa 385.HMGR.Zeo presentó menos carotenoides totales que la cepa silvestre, llegando a producir hasta un 30 % menos de carotenoides por peso seco de levadura luego de 120 h de cultivo. En cuanto a la composición de carotenoides producidos se encontró que la cepa 385.HMGR.Hyg no mostró diferencias significativas en relación a la cepa UCD 67-385; mientras que la cepa 385.HMGR.Zeo si las presentó particularmente en cuanto a la cantidad de astaxantina (Tabla 6).



**Figura 16. Producción de carotenoides por las cepas UCD 67-385, 385.HMGR.Hyg y 385.HMGR.Zeo de *X. dendrorhous*.** Producción de carotenoides por la cepa silvestre (UCD 67-385) y las cepas mutantes del gen *HMGR* expresado como µg de carotenoides/g de levadura seca en función de diferentes fase de crecimiento celular [fase exponencial temprana (24 h), exponencial media (48 h), exponencial tardía (72 h) y estacionaria (120 h)]. Las barras de error corresponden a la desviación estándar entre experimentos independientes (n=3). Prueba t-Student: niveles de significancia estadística, (\*) =  $P < 0,05$ ; (\*\*) =  $P < 0,01$ ; (\*\*\*) =  $P < 0,001$ .

**Table 6: Composición de carotenoides de la cepa silvestre y mutantes *HMGR* de *X. dendrorhous* en  $\mu\text{g}$  de carotenoides/g de levadura seca a las 120 h de cultivo.**

Carotenoides	UCD 67-385	385.HMGR.Hyg N.S.E. <sup>1</sup>	385.HMGR.Zeo N.S.E. <sup>1</sup>
Astaxantina	410,8 $\pm$ 31,4	400,3 $\pm$ 27,2	NS 248,9 $\pm$ 35,8 *
$\beta$ -caroteno	13,1 $\pm$ 1,8	10,5 $\pm$ 3,5	NS 7,9 $\pm$ 13,7
Otros	77,7 $\pm$ 32,8	95,6 $\pm$ 6,5	NS 62,8 $\pm$ 15,5

$\pm$  corresponden a la desviación estándar entre experimentos independientes (n=3).

<sup>(1)</sup>N.S.E.= niveles de significancia estadística: (\*)= P<0,05 indica que los valores presentan diferencias estadísticamente significativas y NS = no diferencia significativa.

**Expresión del dominio catalítico (*cHMGR*) de HMG-CoA reductasa de *X. dendrorhous* en una cepa de *S. cerevisiae* recombinante productora de carotenoides.**

En varios microorganismos, la síntesis biotecnológica de carotenoides, ya sea por producción homóloga o heteróloga, puede llegar a ser más atractivo y más económica que la síntesis química (Misawa y Shimada., 1997). Con este fin, la levadura *S. cerevisiae* es ampliamente utilizada en las industrias de fermentación y cervecera por su fácil manejo y manipulación genética (Ostergaard y cols., 2000).

Teniendo en cuenta que *S. cerevisiae* no produce naturalmente carotenoides, en trabajos previos realizados en el laboratorio, se introdujeron y expresaron los genes carotenogénicos *crtE*, *crtI* y *crtYB* de *X. dendrorhous*, obteniendo una cepa recombinante que produce  $\beta$ -caroteno denominada S288c-bcar (Tabla 1). La biosíntesis de ergosterol y carotenoides de esta cepa se esquematiza en la Figura 5.

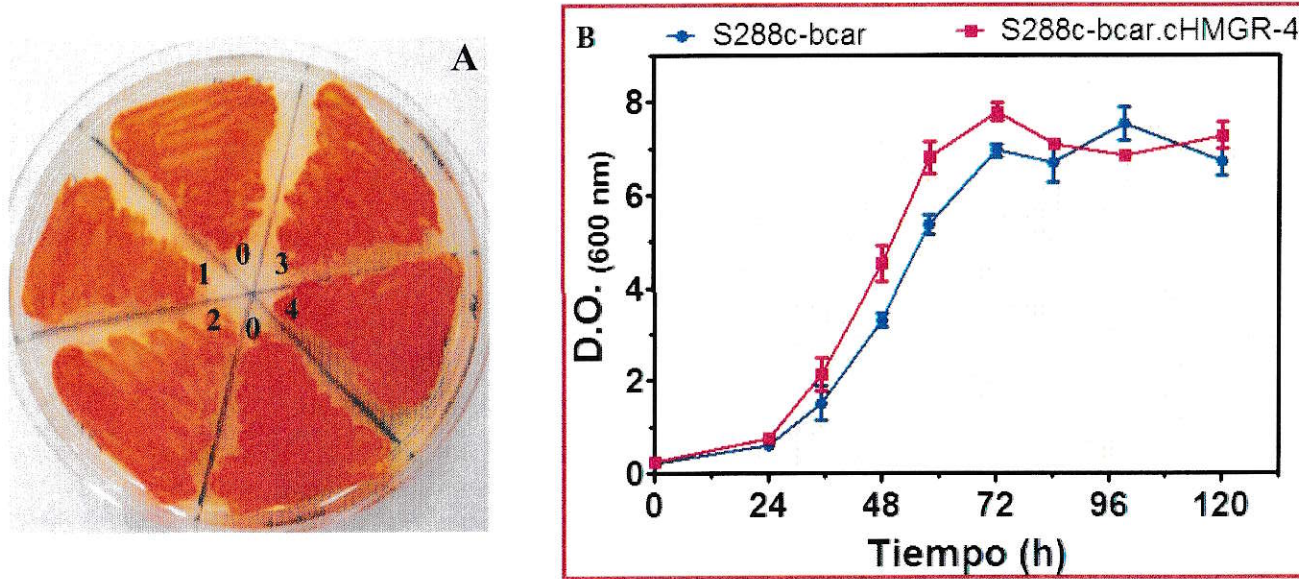
Para evaluar la función del gen *HMGR* de *X. dendrorhous* y su efecto en la síntesis de carotenoides en la cepa S288c-bcar de *S. cerevisiae*, se expresó la región 3' de dicho

gen que codifica el dominio catalítico de la enzima de HMG-CoA reductasa (*cHMGR*) de *X. dendrorhous*.

Para construir el módulo de expresión que contiene el dominio catalítico de HMGR requerido para la transformación de la cepa S288c-bcar de *S. cerevisiae*, primero se amplificó 1.870 pb de la región 3' del gen *HMGR* utilizando los partidores cHMGRpYES2 y HMGR-14 (Tabla 3). Posteriormente, el fragmento obtenido se clonó en el vector de expresión pYES2 quedando bajo el control del promotor *GALI*, inducible por galactosa y reprimido por glucosa en *S. cerevisiae* (Giniger y cols., 1985). Además, al vector recombinante obtenido se le incorporó un módulo que confiere resistencia a G418 en el sitio de restricción *NdeI*, obteniendo finalmente el vector pYES2.cHMGR.G418 (Tabla 2).

La cepa S288c-bcar de *S. cerevisiae* se transformó con 15 µg del plásmido pYES2.cHMGR.G418 y las células se sembraron en medio YM suplementado con G418. Después de 2 días de incubación a 30°C, se observó la aparición de colonias transformantes resistentes a G418. Como resultado se logró aislar cuatro clones denominados S288c-bcar.cHMGR-1 al 4 (Figura 17 A) que presentaron una pigmentación más intensa respecto a la cepa parental. En estas cepas se confirmó la presencia del plásmido pYES2.cHMGR.G418 por PCR y su la resistencia al antibiótico G418 en cultivos con MM + 2 % galactosa, suplementado con G418 (200 µg/ml). Para posteriores análisis, se seleccionó la cepa S288c-bcar.cHMGR-4.

Finalmente con el objetivo de analizar el impacto de la expresión de *cHMGR* de *X. dendrorhous* en la cepa S288c-bcar de *S. cerevisiae*, se evaluó el crecimiento, la



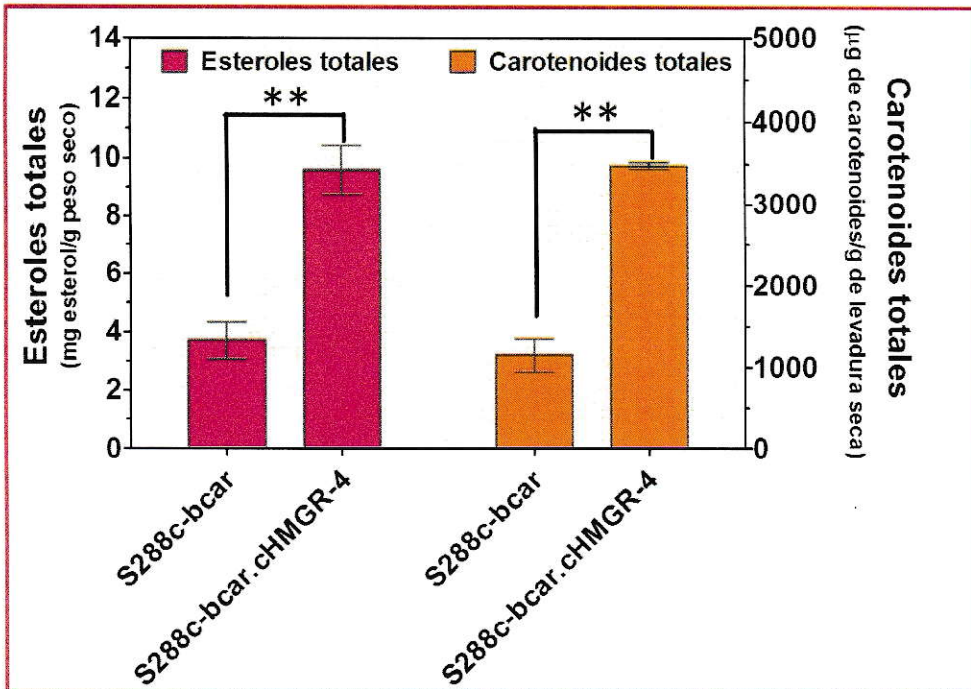
**Figura 17. Cultivo de las cepas S288c-bear y S288c-bear.cHMGR.4 de *S. cerevisiae*.** Panel A: Cultivo en medio completo YM de las cepas S288c-bear (0) y S288c-bear.cHMGR (1 al 4). Panel B: Curvas de crecimiento de las cepas S288c-bear (en azul) y S288c-bear.cHMGR.4 (en rosa) cultivadas en medio mínimo suplementado con galactosa 2 % a 22°C con agitación constante. Las barras de error corresponden a la desviación estándar entre experimentos independientes (n=3). Ambas cepas presentan diferencias significativas en su crecimiento (prueba t-Student,  $P < 0,05$ ).

producción de carotenoides y esteroides, y la expresión de *cHMGR* de *X. dendrorhous* en la cepa S288c-bcar.cHMGR.4. De esta manera, tanto la cepa parental (S288c-bcar) como la cepa que expresa a *cHMGR* (S288c-bcar.cHMGR.4), se cultivaron en medio MM + galactosa al 2 % durante 120 h con agitación constante a 22°C. Al final del crecimiento (120 h) se tomó muestras de los diferentes cultivos para evaluar la biomasa y la producción de carotenoides y de esteroides.

El crecimiento de las cepas S288c-bcar y S288c-bcar.cHMGR.4 se determinó por medidas de DO<sub>600 nm</sub> a lo largo del tiempo de incubación. En la figura 17 B, se muestran las curvas de crecimiento de ambas cepas, las que presentaron diferencias significativas bajo las condiciones de cultivo utilizadas. Las cepas S288c-bcar y S288c-bcar.cHMGR.4 alcanzaron valores de velocidad de crecimiento que varía entre 0,17 y 0,20 DO<sub>600 nm</sub>/h, respectivamente.

Adicionalmente, en ambas cepas se evaluó la producción de esteroides y de carotenoides luego de 120 h de cultivo. En cuanto al contenido de esteroides totales, se observó que la cepa S288c-bcar.cHMGR.4 produce aproximadamente 2 veces más esteroides en relación a la cepa parental S288c-bcar (t-student, P<0,01) (Figura 18). En ambas cepas se observó que predomina un único *peak* en el canal de 280 nm con aproximadamente 18 min de tiempo de retención que posee características espectrales correspondiente a ergosterol. Por otra parte, se confirmó que la diferencia en la pigmentación observada a simple vista se debe a diferencias en la cantidad (Figura 18) y/o composición (Tabla 7) de carotenoides producidos.

Ambas cepas mostraron diferencias significativas (t-student, P<0,01) en cuanto al contenido total de carotenoides donde la cepa S288c-bcar.cHMGR.4 produce 3 veces más



**Figura 18: Producción de esteroides y carotenoides en las cepas S288c-bcar y S288c-bcar.cHMGR.4.** Muestras tomadas luego de 120 h de cultivo en medio YM a 30°C con agitación constante. El contenido de ergosterol (barras rosa) y carotenoides (barras naranjas). Las barras de error corresponden a la desviación estándar entre experimentos independientes (n=3). (\*\*): prueba t-Student,  $P < 0,01$ .



que la cepa parental S288c-bcar luego de 120 h de cultivo (Figura 18). Por otra parte, ambas cepas también mostraron una diferencia significativa en cuanto a la composición de carotenoides, encontrándose una mayor producción de fitoeno y 7,8-dihidro-b-caroteno en S288c-bcar.cHMGR.4 (aproximadamente 8,5 y 7,9 veces mayor, respectivamente) en relación a la cepa parental. Además, la producción de licopeno, 3,4 dihidrolicopeno y toruleno disminuyó aproximadamente un 70 % en la cepa S288c-bcar.cHMGR.4 en relación a la cepa S288c-bcar. Sin embargo, el contenido de  $\beta$ -caroteno no mostró diferencias significativas (Tabla 7).

**Table 7: Composición de carotenoides de las cepas S288c-bcar y S288c-bcar.cHMGR.4 de *S. cerevisiae* en  $\mu\text{g}$  de carotenoides/g de levadura seca al final del crecimiento.**

<b>Carotenoides</b>	<b>S288c-bcar</b>	<b>S288c-bcar.cHMGR.4.</b>	<b>N.S.E.<sup>1</sup></b>
<b>Neurosporeno</b>	32,2 $\pm$ 4,3	11,2 $\pm$ 0,6	*
<b><math>\beta</math>-caroteno</b>	376,2 $\pm$ 15,7	294,3 $\pm$ 22,7	NS
<b>7,8 Dihidro-<math>\beta</math>-caroteno</b>	35,8 $\pm$ 8,5	283,7 $\pm$ 21,3	*
<b>Licopeno</b>	255,4 $\pm$ 24	81,6 $\pm$ 3,7	*
<b>3,4 Dihidro-licopeno</b>	60,3 $\pm$ 1,9	22,0 $\pm$ 5,3	*
<b>Toruleno</b>	57,2 $\pm$ 4,8	8,6 $\pm$ 0,5	*
<b>Fitoeno</b>	323,3 $\pm$ 99,4	2772,3 $\pm$ 56,7	***

$\pm$  corresponden a la desviación estándar entre experimentos independientes (n=3).

<sup>(1)</sup>N.S.E.= niveles de significación estadísticos: (\*)= P<0,05 y (\*\*\*)= P<0,001 indican que los valores presentan diferencias estadísticamente significativa y NS = diferencia no significativa.

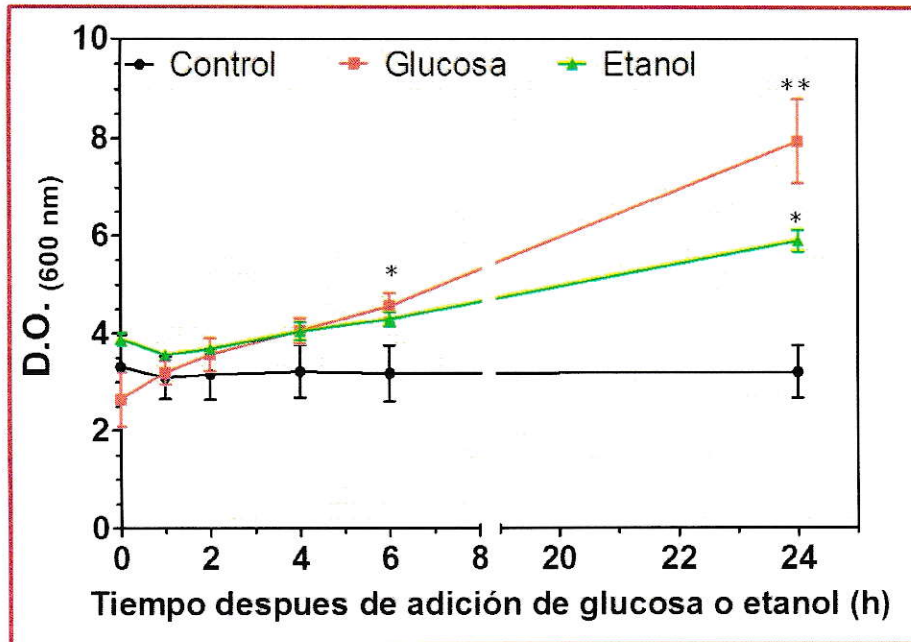
### **3.3 Determinación del efecto de la fuente de carbono en la expresión del gen *HMGR* en la cepa silvestre de *X. dendrorhous***

La glucosa causa una represión transcripcional de algunos genes involucrados en la síntesis de astaxantina en *X. dendrorhous*, mostrando una correlación con la inhibición en la síntesis de pigmentos (Marcoleta y cols., 2011). En el análisis bioinformático de la región promotora del gen *HMGR* de *X. dendrorhous* no se encontró una secuencia reguladora MIG1 modulada por glucosa. Sin embargo, estudios en *S. cerevisiae* demostraron que la presencia de glucosa aumenta 6 veces la actividad HMG-CoA reductasa bajo condiciones aeróbicas (Berndt y cols., 1973). Por otro lado, la adición de etanol a cultivos de *X. dendrorhous* incrementa la cantidad de pigmentos al final del crecimiento de la levadura (Wozniak, 2008 y Gu y cols., 1997). Normalmente, cuando la levadura crece en un medio de cultivo con glucosa como única fuente de carbono, la inducción de la síntesis de carotenoides coincide con la disminución máxima de la glucosa y la concentración máxima de etanol alcanzada (aproximadamente 2 g/l) que se forma por la fermentación de la glucosa (Lodato y cols., 2007). Además, la adición de etanol a cultivos de la levadura induce la expresión de genes carotenogénicos en *X. dendrorhous*, promoviendo además la síntesis *de novo* de carotenoides (Marcoleta y cols., 2011). Debido a que Gu y cols. (1997) observaron que el efecto inductor de la carotenogénesis mediado por el etanol está estrechamente relacionado con un aumento de la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa en la levadura, se esperaba que el etanol podría regular positivamente la expresión del gen *HMGR*, promoviendo así un incremento de precursores en la síntesis de carotenoides.

Para evaluar el efecto de la fuente de carbono en la expresión del gen *HMGR*, se cultivó la cepa UCD 67-395 de *X. dendrorhous* en medio YM sin glucosa hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento (DO<sub>600 nm</sub> entre 2,5 y 4). Luego, el cultivo se dividió en dos matraces Erlenmeyer: a uno de ellos se le suplementó glucosa o etanol a una concentración final de 2 % (v/v) y 0,2 % (v/v), respectivamente (medio inducido); y a el otro se le agregó el mismo volumen de medio YM sin glucosa, pero sin una fuente de carbono adicional (medio control). Ambos cultivos se incubaron a 22°C y se tomaron muestras luego de 0, 1, 2, 4, 6 y 24 h posteriores al tratamiento. A cada muestra se le determinó la DO<sub>600 nm</sub> para evaluar el crecimiento post-inducción (Figura 19). Se observó que la DO<sub>600 nm</sub> mantuvo un valor de 2,8 constante en el control (sin fuente de carbono adicional), mientras que ésta aumento significativamente en los cultivos con tratamiento con glucosa o etanol alcanzando una DO<sub>600 nm</sub> de 8 y 5,9, respectivamente a las 24 h. Esto indica que ambas fuentes de carbono reactivan el crecimiento post-inducción.

Adicionalmente, a cada muestra se le extrajo el RNA total para estudiar la expresión de los niveles de transcrito del gen *HMGR* por RT-qPCR. Adicionalmente, en el estudio se incluyó a los genes: *grg2* ([GenBank: JN043364], control de represión por glucosa), *PDC* ([GenBank: HQ694558], control de inducción por glucosa), *crtS* ([GenBank: EU713462], control de inducción por etanol) y actina (gen constitutivo, GenBank: X89898.1) de *X. dendrorhous* (Marcoleta y cols. 2011).

**Efecto de la glucosa en los niveles de transcrito del gen *HMGR* de *X. dendrorhous*.** La evaluación de los niveles de mRNA de los genes *grg2*, *PDC* y *HMGR* permitió determinar que la adición de glucosa disminuye aproximadamente 160 veces los niveles de los transcritos *grg2* y aumenta aproximadamente 6,4 veces los niveles de los

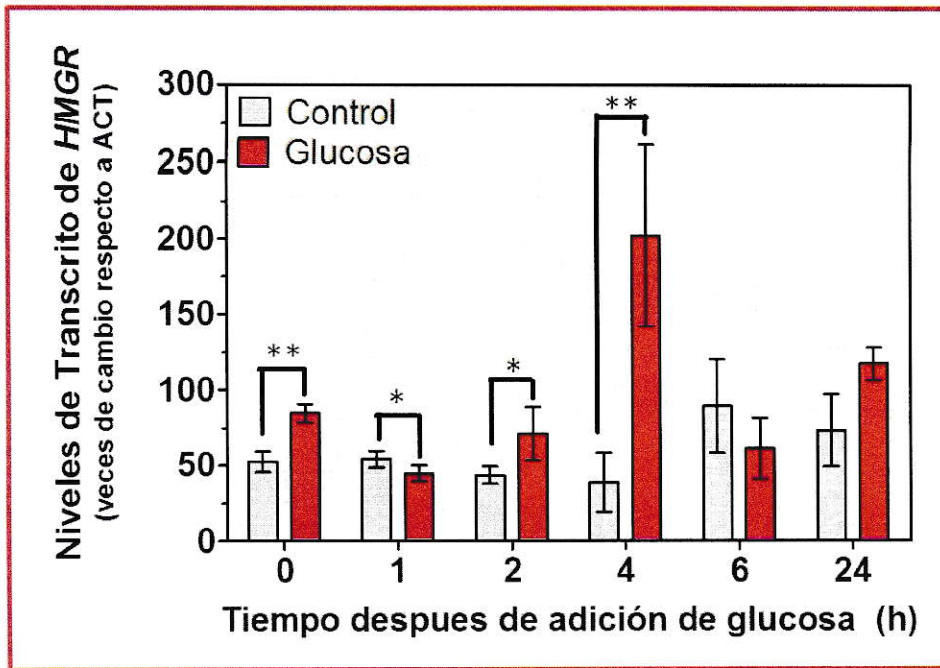


**Figura 19. Crecimiento de la cepa UCD 67-385 post inducción.** Densidad Óptica a 600 nm en el medio control (YM sin glucosa; negro) y en el medio inducido con glucosa (Rojo) o etanol (verde). Las barras de error corresponden a la desviación estándar entre experimentos independientes (n=3). Prueba t-Student, (\*) =  $P < 0,05$  o (\*\*) =  $P < 0,01$ .

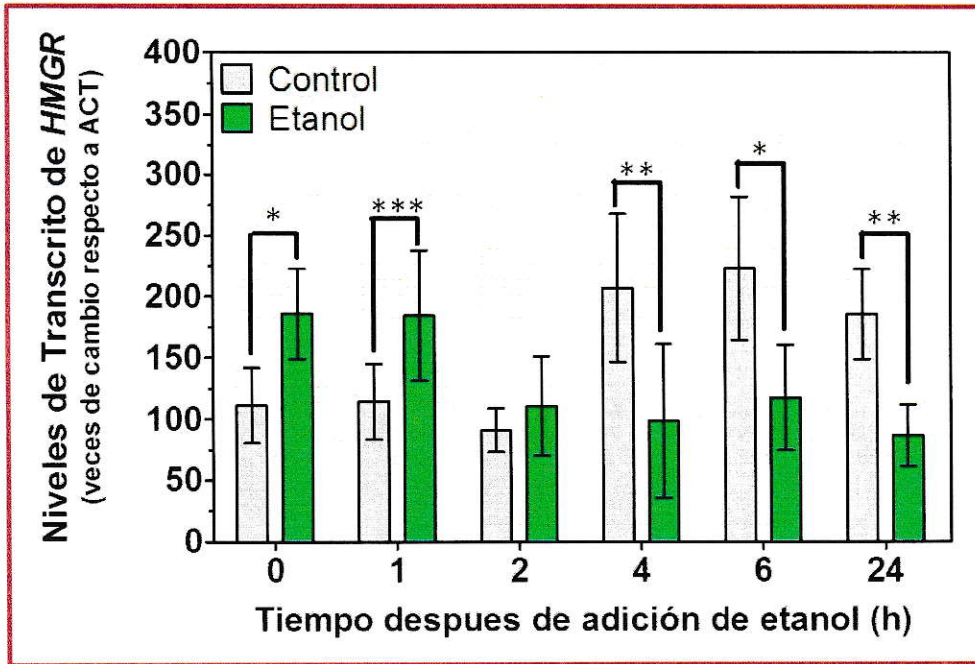
transcritos *PDC*. Ambos efectos alcanzan su máximo luego de 4 h *post*-adición de glucosa, mientras que a las 24 h, ya no se detecta este efecto sobre la expresión de los mismos. El análisis de los niveles de transcrito del gen *HMGR* (Figura 20) da como resultado que sus niveles de mRNA presentan cambios significativos en relación a los niveles de transcritos presentes en el medio control durante la primera h de inducción, incrementando gradualmente desde la segunda y alcanzando un máximo luego de 4 h (incremento aproximado de 4 veces). Entre las 4 y 24 h *post*-inducción, los niveles de transcrito del gen *HMGR* en el medio inducido no presentan diferencias significativas con los niveles reportados en el medio control.

#### **Efecto del etanol los niveles de transcrito del gen *HMGR* de *X. dendrorhous*.**

Los niveles de mRNA del gen *crtS*, utilizado como gen control de inducción por etanol, se mantuvieron relativamente constantes durante las 6 primeras horas *post*-inducción, observándose posteriormente un incremento de la expresión a las 24 h de 12 veces de cambio respecto al tratamiento control. Los niveles de transcrito del gen *HMGR* (Figura 21) presentan un incremento significativo en relación a los niveles de transcrito en el medio control a las 0 y 1 después de la inducción con etanol. Sin embargo, los niveles de mRNA del gen *HMGR* disminuyen significativamente desde la segunda h alcanzando los niveles más bajos a las 4 h (3 veces menos en relación al control).



**Figura 20. Efecto de la glucosa en los niveles de transcrito del gen *HMGR* de *X. dendrorhous*.** La gráfica representa la expresión relativa del gen *HMGR* después de la adición de glucosa. La expresión se determinó como veces de cambio de la expresión del gen *HMGR* (número de moléculas de mRNA de *HMGR* por cada 1000 moléculas de mRNA de actina), en el medio sin inductor (medio control = barra gris) y en medio inducido por glucosa (barra roja), en función de las horas analizadas después de la adición de glucosa. Los niveles de expresión se normalizaron respecto al gen de actina (*ACT*) como referencia. Las barras de error corresponden a la desviación estándar entre experimentos independientes (n=3). Prueba t-Student, (\*) =  $P < 0,05$  o (\*\*) =  $P < 0,01$ .

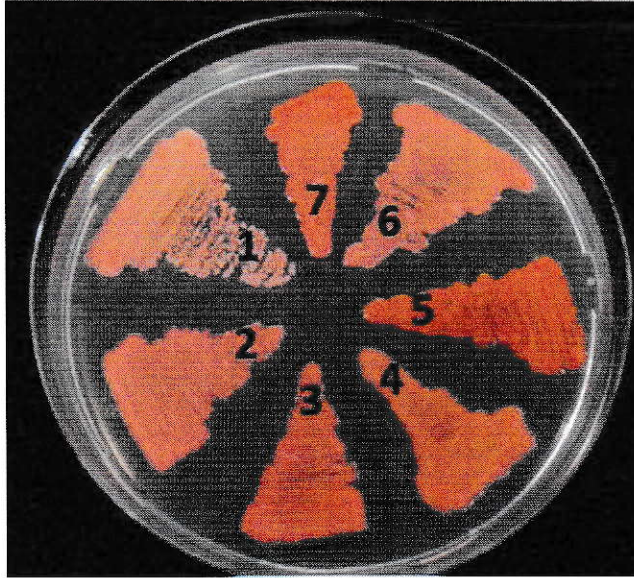


**Figura 21. Efecto del etanol en los niveles de transcrito del gen *HMGR* de *X. dendrorhous*.** La gráfica representa la expresión relativa del gen *HMGR* después de la adición de etanol. La expresión está determinada como veces de cambio de la expresión del gen *HMGR* (número de moléculas de mRNA de *HMGR* por cada 1.000 moléculas de mRNA de actina), en el medio sin inductor (medio control = barra gris) y en medio inducido por etanol (barra verde), en función de las horas analizadas después de la adición de etanol. Los niveles de expresión se normalizaron respecto al gen de actina (*ACT*) como referencia. Las barras de error corresponden a la desviación estándar entre experimentos independientes (n=3). Prueba t-Student, (\*) =  $P < 0,05$ , (\*\*) =  $P < 0,01$  o (\*\*\*) =  $P < 0,001$ .

### **3.4. Estudiar la expresión del gen *HMGR* y fenotipo productor de carotenoides y esteroides en mutantes *CYP61* incapaces de producir ergosterol de *X. dendrorhous*.**

La síntesis de carotenoides al igual que la de esteroides, siendo el ergosterol el principal esteroide en hongos, deriva del isopentenil pirofosfato (IPP) que en eucariotes se sintetiza a través de la vía del mevalonato (MVA) (Miziorko, 2011) (Figura 5). Por lo tanto, la vía del MVA genera precursores comunes para la síntesis de ergosterol y astaxantina en *X. dendrorhous*. Por interrupción del gen *CYP61*, involucrado en la síntesis de ergosterol en *X. dendrorhous*, se obtuvieron mutantes de un color rojo más intenso lo que sugiere que las cepas mutantes producen más carotenoides. Teniendo en cuenta que el paso limitante en el control del flujo metabólico de la vía del MVA es el paso catalizado por la enzima HMG-CoA reductasa (Britton y cols., 1998), y que la transcripción del gen *HMGR* se encuentra regulada por la concentración de esteroides (Brown y Goldstein, 1997), se planteó estudiar el fenotipo de los mutantes *CYP61*, analizando el contenido y composición de carotenoides, contenido de ergosterol y expresión del gen *HMGR*. Los mutantes por interrupción del gen *CYP61* de *X. dendrorhous* utilizadas en este trabajo fueron obtenidas por Loto y cols. (2012). Las cepas analizadas fueron las cepas silvestres parentales: UCD 67-385, CBS 6938 y AVHN2, y las cepas mutantes *cyp61<sup>-</sup>* que derivan de ellas: 385-*cyp61<sup>hph</sup>*, 385-*cyp61<sup>hph</sup>/cyp61<sup>zeo</sup>*, Av2-*cyp61<sup>hph</sup>* y CBS-*cyp61<sup>zeo</sup>* (Loto y cols., 2012) (Figura 22). A partir de la cepa UCD 67-385 se obtuvieron dos mutantes *cyp61<sup>-</sup>*, una heterocigota (385-*cyp61<sup>hph</sup>*) una homocigota (385-*cyp61<sup>hph</sup>/cyp61<sup>zeo</sup>*) debido



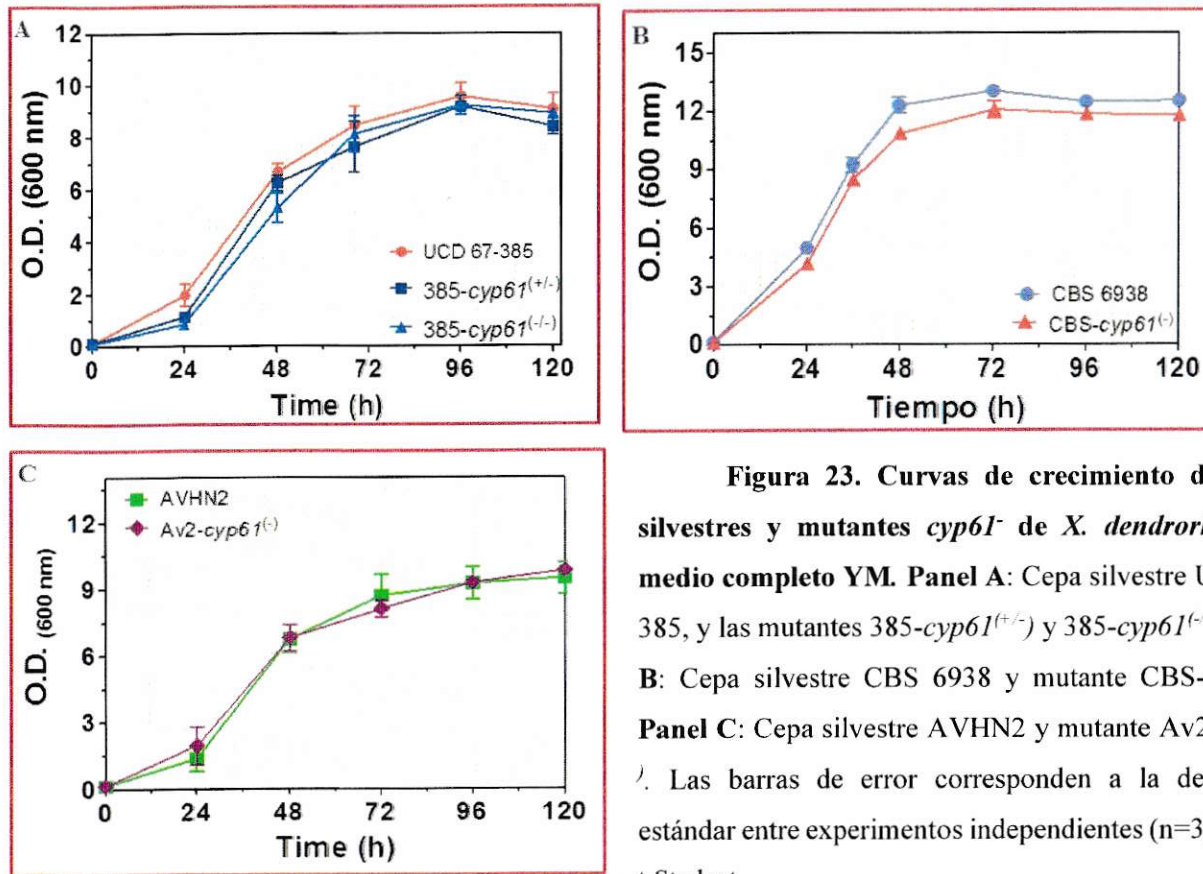


**Figura 22. El fenotipo de color de las cepas silvestres y mutantes *cyp61* de *X. dendrorhous*.** Cultivo en placas de las cepas UCD 67-385(1), 385-CYP61/*cyp61*<sup>hph</sup> (2), 385-*cyp61*<sup>hph</sup>/*cyp61*<sup>zeo</sup> (3), AVHN2 (4), Av2-*cyp61*<sup>zeo</sup> (5), CBS 6938 (6) y CBS-*cyp61*<sup>hph</sup> (7) en medio completo (YM) (Loto y cols., 2012).

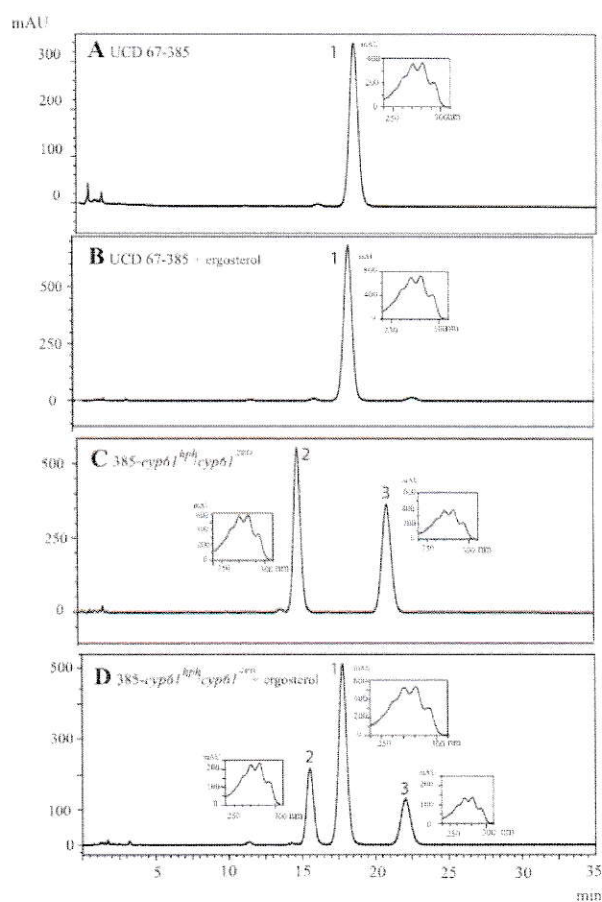
a su condición diploide. A simple vista fue posible distinguir cambios en la pigmentación entre las cepas parentales y sus respectivos mutantes, donde los segundos tienen un fenotipo de color rojo más intenso (Figura 22).

En primer lugar se evaluó el crecimiento de las siete cepas UCD 67–385, 385-*CYP61/cyp61<sup>hph</sup>*, 385-*cyp61<sup>hph</sup>/cyp61<sup>zeo</sup>*, AVHN2, Av2-*cyp61<sup>zeo</sup>*, CBS 6938 y CBS-*cyp61<sup>hph</sup>* cultivadas en medio completo (YM) por 5 días a 22°C con agitación constante. Las cepas no presentaron diferencias significativas en el crecimiento bajo las condiciones de cultivo utilizadas (Figura 23). Además, se tomaron muestras a diferentes tiempos de cultivo: inicio y final de la fase exponencial de crecimiento (24 h y 72, respectivamente), y en la fase estacionaria de crecimiento (120 h) para realizar análisis de peso seco de la levadura, extraer esteroides, carotenoides y RNA total.

La producción y composición de esteroides en las mutantes *cyp61<sup>-</sup>* se evaluó por espectrometría y RP-HPLC. La figura 24 muestra los cromatogramas representativos obtenidos a partir de los esteroides extraídos de las cepas UCD 67-385 y 385-*cyp61<sup>hph</sup>/cyp61<sup>zeo</sup>*, que representan la cepa parental y mutante *cyp61<sup>-</sup>*, respectivamente. En la cepa silvestre, se observó un pico predominante (pico 1) a 280 nm a los 18 min aproximadamente con un espectro característico del ergosterol (Figura 24 A), cuya identidad se confirmó por co-inyección de cada muestra con ergosterol estándar (Figura 24 B). Por otro lado, en el análisis de los esteroides a partir de mutantes *cyp61<sup>-</sup>* homocigotas y hemicigotas, se observaron dos picos con tiempos de retención cerca de 15 (pico 2) y 21 min (pico 3) (Figura 24 C). Estos dos picos presentaron también espectros característicos de esteroides, pero sus tiempos de retención son diferentes al del ergosterol.



**Figura 23. Curvas de crecimiento de cepas silvestres y mutantes *cyp61* de *X. dendrorhous* en medio completo YM. Panel A:** Cepa silvestre UCD 67-385, y las mutantes 385-*cyp61*<sup>(+/-)</sup> y 385-*cyp61*<sup>(-/-)</sup>. **Panel B:** Cepa silvestre CBS 6938 y mutante CBS-*cyp61*<sup>(-/-)</sup>. **Panel C:** Cepa silvestre AVHN2 y mutante Av2-*cyp61*<sup>(-/-)</sup>. Las barras de error corresponden a la desviación estándar entre experimentos independientes (n=3). Prueba t-Student.



**Figura 24. Análisis de esteroides por RP-HPLC de las cepas UCD 67–385 y 385-*cyp61*<sup>hph</sup>/*cyp61*<sup>zeo</sup>.** Los cromatogramas a 280 nm corresponden a los esteroides extraídos de las cepas como se describe en la sección Materiales y Métodos. Al lado de cada pico se presentan los espectros correspondientes. Se analizaron los esteroides de la cepa silvestre UCD 67-385 (A), co-inyectados con ergosterol estándar (B) y de la mutante 385-*cyp61*<sup>hph</sup>/*cyp61*<sup>zeo</sup> (C) y co-inyectados con ergosterol estándar. El pico N°1 corresponde a ergosterol (Loto y cols., 2012).

Esta última observación también se confirmó por co-inyección de los esteroides extraídos con ergosterol estándar lo que resultó en tres picos a 15, 18 y 22 min, aproximadamente (Figura 24 D). Por otra parte, se determinó la identidad de los esteroides por GC-MS, lo que confirmó que las cepas silvestres producen principalmente ergosterol y que las mutantes en su lugar acumulan ergosta-5,8,22-trien-3-ol y ergosta-5,8-dien-3-ol. Teniendo en cuenta la abundancia relativa de cada esteroide obtenido por GC-MS y RP-HPLC, los picos 2 y 3 en el cromatograma de RP-HPLC de la cepa mutante *cyp61<sup>-</sup>* (Figura 24 C) deben corresponder a ergosta-5, 8-dien-3-ol y ergosta-5,8,22-trien-3-ol, respectivamente (Loto y cols., 2012). En la figura 25 se puede observar el contenido de esteroides en las cepas en los diferentes tiempos analizados. Se determinó un mayor contenido de esteroides en las mutantes *cyp61<sup>-</sup>* y ausencia de producción de ergosterol.

Por otra parte, el color rojo más intenso evidente de las cepas mutantes *cyp61<sup>-</sup>* en relación con su cepa parental correspondiente sugiere que las cepas mutantes producen más carotenoides. Esta observación se confirmó por cuantificación y análisis de la composición de carotenoides en las siete cepas luego de 24, 72 y 120 h de cultivo (Figura 26). Efectivamente las mutantes *cyp61<sup>-</sup>* producen más carotenoides que sus correspondientes cepas parentales sin presentar alteraciones importantes en su composición. En todos los casos, el máximo contenido de carotenoides se alcanzó después de las 120 h de cultivo, tiempo que coincide con la fase estacionaria de crecimiento (Figura 23) y donde se observaron las mayores diferencias en el contenido de carotenoides totales entre las cepas analizadas. El contenido total de carotenoides de cepa mutante respecto a la cepa parental en general presentó cambios significativos a diferentes tiempos de análisis. Para la cepa 385-*CYP61/cyp61<sup>hph</sup>* se observó un incremento en la producción de

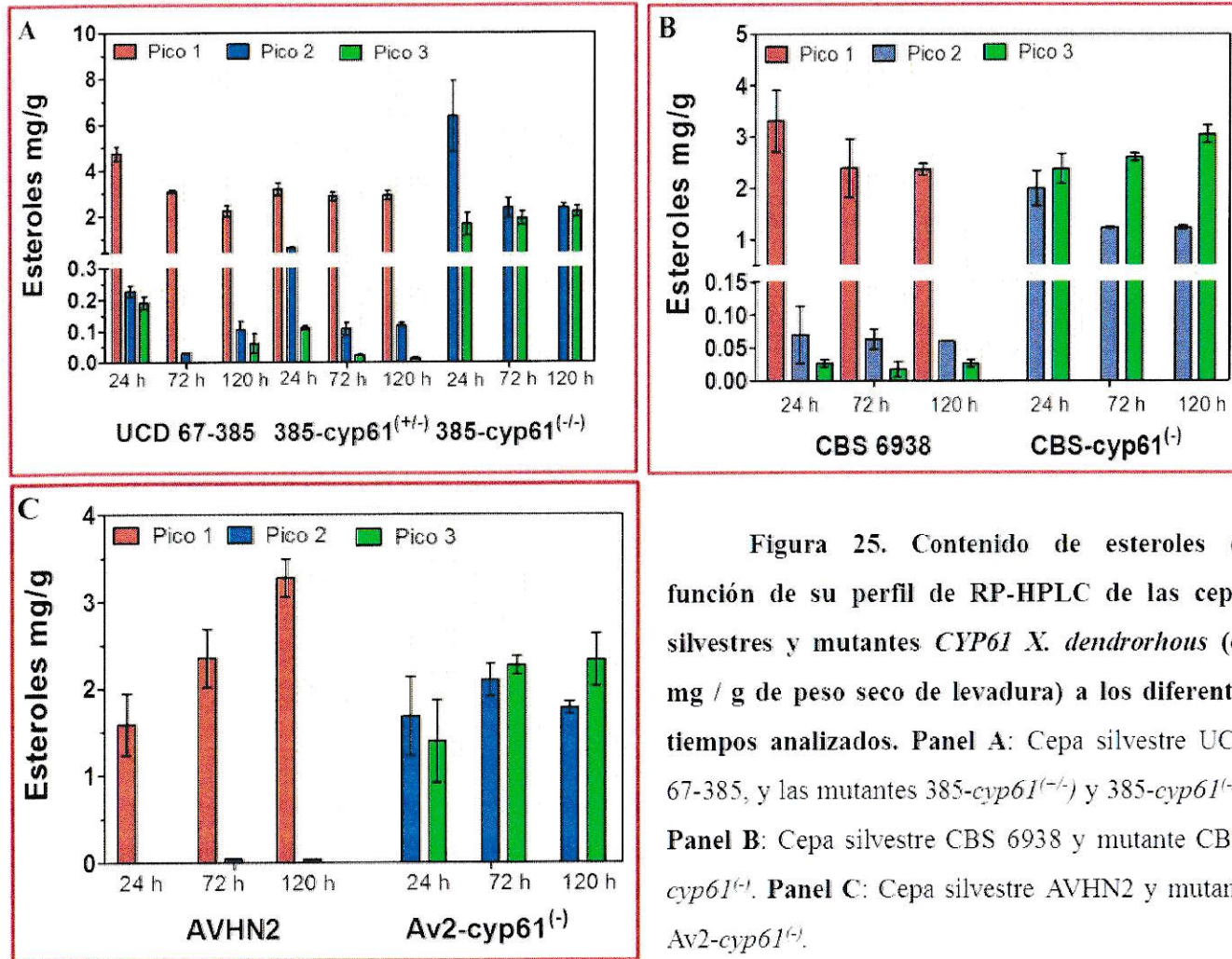
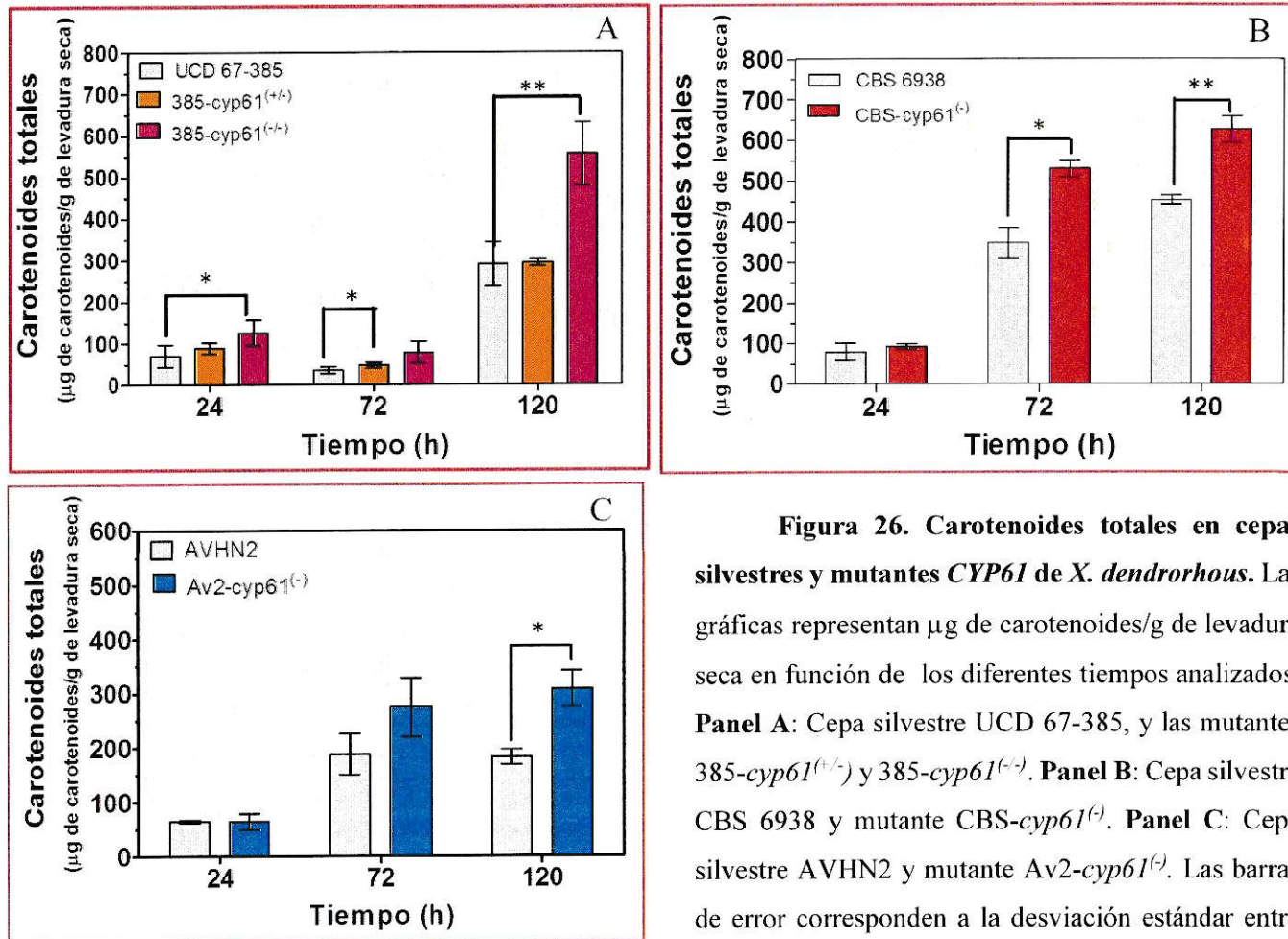


Figura 25. Contenido de esteroides en función de su perfil de RP-HPLC de las cepas silvestres y mutantes *CYP61 X. dendrorhous* (en mg / g de peso seco de levadura) a los diferentes tiempos analizados. **Panel A:** Cepa silvestre UCD 67-385, y las mutantes 385-cyp61<sup>(+/-)</sup> y 385-cyp61<sup>(-/-)</sup>. **Panel B:** Cepa silvestre CBS 6938 y mutante CBS-cyp61<sup>(-)</sup>. **Panel C:** Cepa silvestre AVHN2 y mutante Av2-cyp61<sup>(-)</sup>.



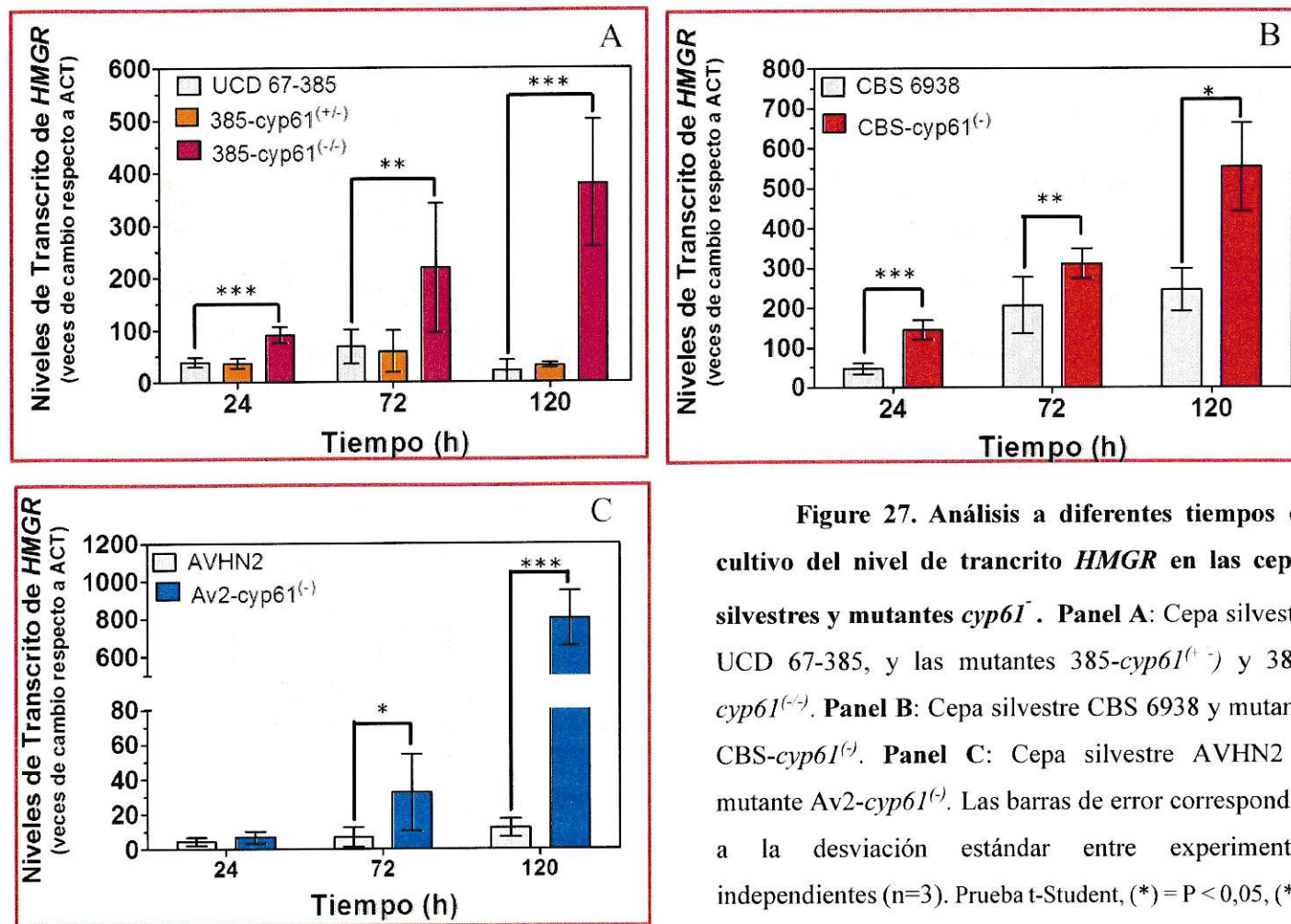
**Figura 26. Carotenoides totales en cepas silvestres y mutantes *CYP61* de *X. dendrorhous*.** Las gráficas representan  $\mu\text{g}$  de carotenoides/g de levadura seca en función de los diferentes tiempos analizados. **Panel A:** Cepa silvestre UCD 67-385, y las mutantes 385-cyp61<sup>(+/-)</sup> y 385-cyp61<sup>(-/-)</sup>. **Panel B:** Cepa silvestre CBS 6938 y mutante CBS-cyp61<sup>(-)</sup>. **Panel C:** Cepa silvestre AVHN2 y mutante Av2-cyp61<sup>(-)</sup>. Las barras de error corresponden a la desviación estándar entre experimentos independientes (n=3). Prueba t-Student (\*) = P<0,05, (\*\*) = P<0,01

carotenoides de un 32 % a las 72 h en relación a la cepa parental, manteniendo su producción de pigmentos sin cambios significativos al final del crecimiento celular. La producción de carotenoides en la cepa 385-*cyp61<sup>hph</sup>/cyp61<sup>zeo</sup>* mostró cambios significativos en relación a la cepa silvestre a las 24 y 120 h de cultivo, mostrando un incremento de un 79 y 91 %, respectivamente. En cuanto a la cepa CBS-*cyp61<sup>hph</sup>* se observó un incremento de un 53 y 38 % a las 72 y 120 h de cultivo, respectivamente en relación a la cepa parental. Mientras que la cepa Av2-*cyp61<sup>zeo</sup>* presentó un incremento de un 35 % en relación a la cepa silvestre de la cual deriva a las 120 h de cultivo.

Debido a que en *S. pombe*, *C. neoformans* y células de mamífero la expresión del gen *HMGR* es regulada por esteroides (Goldstein y Brown, 1990; Chang y cols., 2007; Hughes y cols., 2005), es posible que la ausencia de ergosterol en las mutantes *cyp61<sup>-</sup>* de *X. dendrorhous* afecte los niveles de los transcritos del gen *HMGR*. Por lo tanto, se evaluó la expresión del gen *HMGR* por RT-qPCR a diferentes tiempos en la curva de crecimiento en las siete cepas analizadas.

La figura 27 muestra la expresión relativa de este gen normalizada con el gen de  $\beta$ -actina (*ACT*). Efectivamente, el patrón de los niveles de transcrito del gen *HMGR* fue diferente entre las mutantes *cyp61<sup>-</sup>* y sus cepas parentales generalmente observándose mayores niveles en las primeras. Para la cepa heterocigota 385-*CYP61/cyp61<sup>hph</sup>* no se observa cambios significativos en los niveles de transcrito en relación con la cepa parental. Los niveles de transcrito en la cepa 385-*cyp61<sup>hph</sup>/cyp61<sup>zeo</sup>* aumentaron significativamente en 2,3, 3 y 17 veces en relación a la cepa silvestre a las 24, 72 y 120 h de cultivo, respectivamente. Resultados similares se observaron para la cepa CBS-*cyp61<sup>hph</sup>*,





**Figure 27. Análisis a diferentes tiempos de cultivo del nivel de transcrito *HMGR* en las cepas silvestres y mutantes *cyp61*<sup>-</sup>.** Panel A: Cepa silvestre UCD 67-385, y las mutantes 385-*cyp61*<sup>(+/-)</sup> y 385-*cyp61*<sup>(-/-)</sup>. Panel B: Cepa silvestre CBS 6938 y mutante CBS-*cyp61*<sup>(-/-)</sup>. Panel C: Cepa silvestre AVHN2 y mutante Av2-*cyp61*<sup>(-/-)</sup>. Las barras de error corresponden a la desviación estándar entre experimentos independientes (n=3). Prueba t-Student, (\*) = P < 0,05, (\*\*) = P < 0,01 y (\*\*\*) = P < 0,001.

presentando un aumento de los niveles de transcrito de 3, 1,5 y 2,5 veces en relación a la cepa parental a las 24, 72 y 120 h de cultivo, respectivamente. Mientras que la cepa Av2-*cyp61<sup>zeo</sup>* presentó un aumento de niveles de transcrito de 4,6 y 66 veces en relación a la cepa silvestre a las 72 y 120 h de cultivo.

## **4. DISCUSIÓN**

En levaduras, el gen *HMGR* codifica a la enzima HMG-CoA reductasa que cataliza la etapa de producción de mevalonato a partir de HMG-CoA y NADPH, el cual es un intermediario de la ruta de biosíntesis de IPP, conocida como la ruta del mevalonato. La mayoría de estos organismos poseen un solo gen que controla a esta enzima con la excepción de *S. cerevisiae* que contiene dos, los genes *HMG1* y *HMG2* (Basson y cols., 1986). Hasta la actualidad, la funcionalidad del gen *HMGR* de *X. dendrorhous* no había sido descrita. En este trabajo, a partir del análisis bioinformático de la secuencias del genoma de *X. dendrorhous* obtenida en nuestro laboratorio utilizando el programa *CLC Genomic Workbench 5* y la secuencia obtenida a partir del plásmido pPR20-XVIII-5, se elaboró la estrategia que permitió la amplificación mediante PCR y el clonado del gen *HMGR* completo de *X. dendrorhous*.

La comparación de secuencias del cDNA del gen *HMGR* y su versión genómica indicó que la región codificante de 4.316 pb posee un ORF de 3.276 pb. De esta última se dedujo una proteína formada por 1.091 aminoácidos (115,9 kDa) en la que se identificaron los dominios conservados SSD y HMG-CoA reductasa. El dominio SSD confiere sensibilidad a la regulación por ergosterol (Kuwabara y Labouesse., 2002), mientras que el dominio HMG-CoA reductasa correspondería al dominio catalítico de la proteína. Éste sería responsable de la síntesis de mevalonato dependiente de NADPH a partir de HMG-CoA (Basson y col., 1988; Beach y Rodwell., 1989). El análisis de alineamiento múltiple de secuencia reveló que la secuencia aminoacídica de *HMGR* de *X. dendrorhous* tiene una identidad de secuencia peptídicas mayor al 60 % con otras *HMGR*. Además, se identificó regiones hidrofóbicas amino terminal en la secuencia secundaria de la proteína

lo que ha sido ampliamente descrito en las HMGR de levaduras y que permitirían el anclaje de la proteína a la membrana del retículo endoplasmático (Hampton y cols., 1996; Jo y DeBose-Boyd, 2010). Si bien la región amino terminal de HMGRs es diversa en longitud y composición, la región carboxilo terminal es muy conservada. En la región carboxilo terminal se identificaron los sitios conservados de unión al HMG-CoA y a NADPH (Ruiz-Albert y col. 2002) y una serina en una posición aminoacídica conservada implicada en la regulación de la actividad de la enzima. Se ha reportado que cuando en la célula la relación AMP:ATP incrementa, una proteína quinasa activada por AMP (AMPK) fosforila a una serina conservada en el sitio activo de la enzima (Omkumar y col., 1994), lo que inhibe reversiblemente a la enzima HMGR probablemente para limitar el gasto de ATP en respuesta al estrés metabólico (Hardie y col., 2006). Los análisis anteriores sugieren fuertemente que el gen clonado efectivamente codifica para la enzima HMG-CoA reductasa de *X. dendrorhous*.

Con la intención de evaluar la funcionalidad del gen *HMGR* de *X. dendrorhous* identificado se realizaron tres estrategias. Debido a que en eucariotas, el paso catalizado por esta enzima es el principal punto de regulación en la vía del mevalonato, precursor del IPP que a su vez es el precursor de los isoprenoides incluyendo a los esteroides y carotenoides, en primer lugar se evaluó la actividad HMG-CoA reductasa en la cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* en tres puntos de la curva de crecimiento (al inicio y final de fase exponencial, y final de fase estacionaria) y ésta se relacionó con los niveles de transcrito del gen *HMGR* y la producción de carotenoides. En segundo lugar, se obtuvo mutantes por escisión del gen *HMGR* a partir de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* para evaluar su efecto en el fenotipo de la levadura particularmente en la

producción de carotenoides. En tercer lugar, se expresó el dominio catalítico (*cHMGR*) de HMG-CoA reductasa de *X. dendrorhous* en una cepa de *S. cerevisiae* recombinante productora de carotenoides.

En primer lugar: los resultados sugieren que el máximo nivel de transcrito del gen *HMGR* en la cepa silvestre y la mayor actividad específica HMG-CoA reductasa estarían relacionados con el inicio de la producción de carotenoides que ocurre en la fase estacionaria de crecimiento de *X. dendrorhous*. Estos resultados concuerdan con lo postulado por Panda y Devi (2004), en el que afirman que cuando los niveles de producto derivados de la vía del mevalonato son bajos, la actividad HMG-CoA reductasa es alta; y cuando los productos de la vía son abundantes, la actividad HMG-CoA reductasa es baja, lo que sugiere que la cantidad de la enzima es regulada por un mecanismo de retroalimentación negativo mediada por productos derivados de la vía del mevalonato.

En segundo lugar: el mecanismo de transformación de *X. dendrorhous* por recombinación y reemplazo del gen blanco genera cepas mutante del gen cuando éste se encuentra en copia única en el genoma de la levadura en condición haploide. Sin embargo, las evidencias genéticas proponen que la cepa parental de *X. dendrorhous* utilizada en este trabajo (UCD 67- 385), se encuentra en una condición diploide por lo que mediante esta vía de mutagenesis se obtienen mutantes heterocigotos que pueden mostrar cambios fenotípicos respecto a homocigotos (Alcaíno, 2002; Niklitschek y cols., 2008). Para el caso del gen *HMGR*, análisis posteriores de las cepas transformantes indicaron que efectivamente éstas serían heterocigotas, portadoras de un alelo silvestre y una alelo mutado (*HMGR/HMGR::hph* ó *HMGR/HMGR::ble*). En *S. cerevisiae* se ha observado que

la mutación de los genes *HMG1* y *HMG2* lleva a la obtención de una cepa auxótrofa para mevalonato (Basson y cols., 1986). Esta evidencia, junto a la imposibilidad de obtener cepas mutantes homocigotas para el gen *HMGR* en varios intentos por diferentes métodos, sugiere que este gen sería esencial en la levadura *X. dendrorhous*.

Pese a esta situación, el análisis de las cepas mutantes heterocigotas permitió estudiar de igual manera la funcionalidad del gen *HMGR*. Investigaciones en la mutación de otros genes involucrados en la ruta de biosíntesis de astaxantina en *X. dendrorhous*, dan como resultado cepas heterocigotas y homocigotas que además de presentar una disminución en la cantidad de pigmentos producidos, presentan diferencias en la composición de estos con respecto a la cepa silvestre (Niklitschek y cols., 2008, Alcaíno y cols., 2014). En este trabajo se observó, que la cepa 385.HMGR.Hyg de *X. dendrorhous* heterocigota para el gen *HMGR* produce una cantidad de pigmento similar a la cepa parental, sin afectar la composición de los mismos. Sin embargo, la producción de carotenoides observada en la cepa 385.HMGR.Zeo de *X. dendrorhous* es menor comparadora con la cepa silvestre. La disminución en la cantidad de pigmentos producidos por esta última cepa heterocigota para el gen *HMGR*, podría deberse al menor flujo hacia GGPP a la ruta de biosíntesis de astaxantina.

Con el fin de comprender mejor la producción de carotenoides en la cepa silvestre y mutantes *hmgr*, se analizó de los niveles transcrito del gen *HMGR*. En la cepa UCD 67-385 se observó que los niveles de los mensajeros son máximos durante el período de inducción de la síntesis de carotenoides, pero éste aumento es transitorio puesto que sus niveles disminuyen posteriormente. A partir de la fase exponencial tardía (72 h de cultivo,

Figura 15), la concentración celular de carotenoides aumenta aunque los niveles de los mRNA del gen *HMGR* disminuyen. Con respecto a la cepa 385.HMGR.Hyg, los niveles de mensajero del gen *HMGR* son similares a los niveles determinados en la cepa silvestre a lo largo del ciclo de crecimiento. Sin embargo, los niveles de mensajero determinados en la cepa 385.HMGR.Zeo fueron un 30 % menor a lo determinado en la cepa parental en las distintas fases de crecimiento de la levadura. Los niveles bajos de transcrito del gen *HMGR* y la menor producción de carotenoides por la cepa 385.HMGR.Zeo podrían estar relacionadas ya que un menor número de transcrito del gen afectaría a la cantidad de HMG-CoA producida por la cepa, y consecuentemente variar la cantidad de intermediarios disponible para la síntesis de carotenoides. Una posible explicación de la diferencia existente entre las mutantes 385.HMGR.Hyg y 385.HMGR.Zeo, podría deberse a cambios a nivel alélico en la región promotora y codificante del gen *HMGR*. No obstante, el análisis de secuencias y bioinformático no revela cambios a nivel alélico en estas regiones del gen *HMGR* de *X. dendrorhous*.

En tercer lugar, la concentración de mevalonato depende en gran medida de la actividad de la HMG-CoA reductasa, cuya expresión es regulada en varios niveles. Por ejemplo, hay un aumento a nivel de la transcripción y traducción de HMG-CoA reductasa cuando las concentraciones de productos de la vía del mevalonato son bajas. La cantidad de HMG-CoA reductasa también está regulada por su degradación, donde las secuencias del dominio de transmembrana (SSD) de la enzima desempeñan un papel importante (Hampton y col., 1996). Por lo tanto, aumentando el número de copias del gen nativo *HMGR*, que codifica la enzima HMG-CoA reductasa, en la célula podría ser contrarrestado por otro nivel de regulación, de tal manera que el conjunto del flujo a través



de la vía no sería cambiado significativamente (Shimada y col., 1998). Con la intención de evaluar la funcionalidad de gen *HMGR* de *X. dendrorhous*, se expresó la región que codifica el dominio catalítico de la HMG-CoA reductasa, *cHMGR*, en una cepa de *S. cerevisiae* recombinante que produce  $\beta$ -caroteno (cepa S288c-bcar). Considerando que la esta cepa posee los genes *HMG1* y *HMG2* funcionales, la expresión de *cHMGR* de *X. dendrorhous* conduciría a un incremento del número de dominios catalíticos funcionales de la enzima HMG-CoA reductasa en la células transformante, permitiendo una mayor producción de carotenoides. De esta manera se logró un incrementó de 3 y 2 veces en la producción de carotenoides y ergosterol, respectivamente. Además, se observó que la producción de fitoeno y 7,8-dihidro-b-caroteno aumentó, mientras que la producción de licopeno, 3,4 dihidrolicopeno y toruleno disminuyó, en la cepa que expresa el *cHMGR* de *X. dendrorhous* en relación a la cepa S288c-bcar. La ausencia de la región 5' en el gen *HMGR*, implicada en la regulación enzimática, gatilla una expresión desregulada del *cHMGR* de *X. dendrorhous* en *S. cerevisiae*. De acuerdo a esto, es razonable inferir que el incremento en el contenido de carotenoides y ergosterol es por el resultado de la sobreexpresión de *cHMGR* de *X. dendrorhous*. Lo anterior es consistente con los resultados obtenidos de la sobreexpresión del dominio catalítico de *HMG1* de *S. cerevisiae* y su homólogo de *C. utilis* que incrementó la acumulación de isoprenoides en las dos levaduras (Polakowski y col., 1998; Shimada y cols., 1998).

Por otro lado, la carotenogénesis en *X. dendrorhous* es un proceso complejo con mecanismos de regulación que no han sido totalmente explicados. Varios estudios han informado que la cantidad y la composición de carotenoides pueden ser en gran medida

modificada dependiendo de la fuente de carbono utilizada (Johnson y Lewis., 1979; Gu y cols., 1997; Johnson, 2003). Marcoleta y cols., (2011) encontraron que la adición de glucosa a los medios de cultivos causa una disminución de los niveles de mRNA de todos los genes de carotenogénesis implicados en la síntesis de astaxantina a partir GGPP en *X. dendrorhous* demostrando que la glucosa tiene un efecto regulador en la expresión de varios genes en *X. dendrorhous*, como también lo observado en otras levaduras. Por otro lado, la utilización de una fuente de carbono no fermentable, como el etanol, generalmente favorecen la síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous* (Johnson y Lewis., 1979; Vazquez y cols., 1997; Gu y cols., 1997). Marcoleta y cols. (2011) demostraron que la adición etanol induce la síntesis *de novo* de pigmentos, lo que se evidencia por un aumento de la cantidades carotenoides intermediarios en la vía. El efecto del etanol sobre la carotenogénesis podría explicarse en parte por los efectos biológicos directos que tiene el etanol sobre las vías metabólicas donde éstos serían más bien una consecuencia del metabolismo del etanol que del etanol en sí (Wozniak y cols., 2011; Jones, 1989). La utilización oxidativa del etanol produce en primera instancia elevados niveles de acetaldehído y acetato. Además, la reacción consume  $\text{NAD}^+$  y produce NADH, el cual favorece el flujo de electrones en la cadena respiratoria formando así especies reactivas de oxígeno (ROS) (Bailey y Cunningham., 2002). Por otra parte, la formación de acetato favorece un aumento de acetil-CoA que en conjunto con el aumento de ROS, llevan a condiciones propicias para el aumento de de producción de carotenoides. La producción de astaxantina en estas condiciones no sólo consumiría el exceso de acetil-CoA, sino que además ayudaría en la destoxificación de las ROS. Por otra parte, el trabajo de Marcoleta y cols. (2011) sugiere que el aumento en la producción de pigmentos causado por la

adición de etanol, también estaría mediado por el aumento observado en la expresión de los genes *ertYB* y *crtS*. Por estas razones, en este trabajo se analizó el efecto de la glucosa y del etanol en los niveles de mRNA del gen *HMGR*, implicado en la etapa temprana en la síntesis de carotenoides.

Los niveles de mRNA del gen *HMGR* de *X. dendrorhous* se incrementaron en presencia de glucosa, alcanzando su máximo luego de 2 y 4 horas después de agregar el azúcar. A las 24 h después de la adición de glucosa, los niveles de mRNA recuperaron los niveles basales, probablemente por un incremento en el contenido final de esteroides, los cuales tienen un efecto regulador transcripcional sobre el gen *HMGR*. El efecto global de la glucosa generalmente se relaciona con la presencia de sitios de unión para el represor catabólico Mig1 en la región promotora de dicho gen (Alvarez y cols., 2006). Sin embargo, también se ha demostrado que la glucosa tiene un efecto inductor en los niveles de mRNA del gen *PDC*, que codifica para la Piruvato descaboxilasa que es la enzima clave en todos los procesos de fermentación alcohólica, en varios hongos y levaduras, a pesar de la ausencia de sitios de unión al regulador transcripcional Mig1 en la región promotora. (Fredlund y cols., 2006; Pronk y cols., 1996). Estos resultados son similares a los obtenidos del análisis bioinformático de la región promotora del gen *HMGR* de *X. dendrorhous*, ya que no se encontraron sitios de unión del regulador Mig1, como también lo es para otros organismos reportados (Goldstein y Brown., 1990). Por otra parte el efecto inductor de la glucosa en los niveles de mRNA del gen *HMGR* podría ser explicado por un posible efecto inductor de los niveles de mRNA del regulador SREBP que activa la expresión del gen *HMGR* de *X. dendrorhous*, ya que en su región promotora se encontró

una secuencia SRE, reconocida por este regulador. Un fenómeno similar se describió en células de ratones diabéticos tratadas con glucosa en ausencia de insulina (Kaplan y cols., 2008). Sin embargo, se requieren mayores estudios para afirmar esta situación, ya que aún no se ha descrito en profundidad el gen de SREBP en *X. dendrorhous*, del cual se ha identificado un posible gen candidato en el genoma de la levadura.

Por otra parte, la adición de etanol provocó un pequeño aumento en la biomasa. A pesar de esto, los niveles de mRNA del gen *HMGR* disminuyeron en presencia de etanol a diferencia a lo observado para los genes *crtS* y *crtYB* (Marcoleta y cols., 2011). En esta tesis, la expresión del gen *crtS* se utilizó como control de inducción por etanol y efectivamente se observó un aumento en los niveles de mRNA de dicho gen post adición de etanol. La disminución de los niveles de mRNA del gen *HMGR*, obtenidos en este trabajo, concuerda lo observado por Oha y cols. (2009), cuando estudiaron el efecto hipercolesterolemico del extracto de etanol presente en la dieta de ratones obesos. Ellos observaron una disminución de 5 veces de los niveles de transcrito del gen *HMGR* en células hepáticas por la presencia de etanol. Wong y cols. (2014), observaron un mayor efecto inhibitorio de la actividad HMG-CoA reductasa en presencia de etanol que en la de inhibidores específicos de la enzima como pravastatina, en investigaciones realizadas en plantas de *Pithecellobium ellipticum*, utilizadas en tratamientos de hipercolesterolemia para suprimir la progresión de la aterosclerosis. Sin embargo, el etanol disminuye los niveles de transcrito del gen *HMGR* mientras que favorece los niveles de transcrito de los genes *crtS* y *crtYB* y la síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*.

Por otro lado, el análisis bioinformático de la región promotora del gen *HMGR* permitió determinar algunas regiones reguladoras y la posición del promotor central. Las regiones reguladoras SRE identificadas son blancos de unión del factor de transcripción SREBP. Este factor juega un rol principal en la regulación y expresión de los genes vinculados con el metabolismo de esteroides. Goldstein y Brown (1990) reportaron que la región SRE es activada en genes *HMGR* por la unión del factor SREBP, en respuesta a la depleción de esteroides en levaduras. En *S. cerevisiae*, la HMG-CoA reductasa está codificada por dos isógenos, *HMG1* y *HMG2*, y la expresión de *HMG1* se regula a nivel transcripcional por el ergosterol (Veen y Lang., 2004). La sobreexpresión de *HMG1* en combinación con el tratamiento con ketoconazol (un inhibidor de la síntesis de ergosterol) en una cepa recombinante de *S. cerevisiae*, resultó en un aumento en la producción de  $\beta$ -caroteno (Yan y cols., 2012).

En este trabajo se estudió los niveles de transcrito del gen *HMGR* y fenotipo productor de carotenoides y esteroides en mutantes de *X. dendrorhous cyp61<sup>-</sup>* incapaces de producir ergosterol y que acumulan esteroides intermediarios incluyendo ergosta-5,8-dien-3-ol y ergosta-5,8,22-trien-3-ol (Loto y cols., 2012). Interesantemente, a pesar de que las cepas mutantes *cyp61<sup>-</sup>* no producen ergosterol, su contenido de esteroides totales fue mayor en comparación con las correspondientes cepas parentales, lo que sugiere un mecanismo de regulación de retroalimentación mediado por ergosterol en la ruta de biosíntesis de esteroides en *X. dendrorhous*. Además de las alteraciones en el contenido de esteroles y la composición, las cepas mutantes *cyp61<sup>-</sup>* de *X. dendrorhous* presentaron fenotipos de color distintos a sus cepas parentales, ya que producen más carotenoides. Muchos de los

aspectos de regulación de la biosíntesis de isoprenoides implican elementos de la vía del MVA, siendo la expresión del gen *HMGR* un paso regulatorio fundamental (Parks y Casey., 1995). Por esta razón se cuantificó los niveles de transcritos del gen *HMGR* y en todas las fases de crecimiento analizadas, su nivel fue mayor que en las cepas parentales correspondientes. Resultados similares a éstos, han demostrado un aumento en la producción de astaxantina en *P. rhodozyma* cuando los niveles de ergosterol disminuyeron por un tratamiento con fluconazol que inhibe la síntesis de ergosterol (Miao y cols., 2011). Una posible explicación para el aumento de los carotenoides en las mutantes *cyp61<sup>-</sup>* podría ser la mayor disponibilidad de precursores carotenoides en ausencia de la regulación negativa del ergosterol por un mecanismo de retroalimentación. Este razonamiento también es apoyado por el hecho de que en las mutantes *cyp61<sup>-</sup>*, también se incrementó el contenido total de esteroides. Por ejemplo, la administración de MVA como suplemento a medios de cultivos de *P. rhodozyma* resultó en un aumento en la producción de carotenoides (Calo y cols., 1995). Del mismo modo, la escisión del gen que codifica la escualeno sintasa (*ERG9*) en combinación con la sobreexpresión del *cHMGR*, que codifica para el dominio catalítico de la HMGR en una cepa recombinante de *C. utilis* que produce carotenoides, provocó un aumento en la biosíntesis de licopeno (Shimada y cols., 1998). Por último, los resultados de éste trabajo son similares a los reportados en cepas de *X. dendrorhous* sobreproductoras de astaxantina con bajo contenido de ergosterol y un nivel transcripción de *HMGR* elevado en comparación con la cepa parental después de las 72 h de cultivo (Miao y cols., 2011). Sin embargo, las cepas sobreproductoras se obtuvieron mediante mutagénesis química aleatoria, mientras que en este trabajo se analizó cepas con una interrupción específica en un paso determinado en la biosíntesis de ergosterol.

## **5. CONCLUSION**

- Se aisló y caracterizó el gen *HMGR* que codifica la enzima HMG-CoA reductasa de *X. dendrorhous*, el cual está involucrado en la producción de carotenoide y ergosterol.
- El gen *HMGR* de *X. dendrorhous* sería un gen funcional, ya que puede mediar la biosíntesis de intermediarios para la producción de carotenoides en una cepa productora de carotenoides de *S. cerevisiae*.
- Investigaciones en mutantes *CYP61* de *X. dendrorhous* sugieren que la expresión del gen *HMGR* estaría regulada por ergosterol, modulando la producción de carotenoides y esteroides. De esta manera, con la desregulación de la expresión del gen *HMGR* es posible modular la producción de carotenoides y esteroides en *X. dendrorhous*.
- Los resultados de este trabajo contribuyen al conocimiento estructural y funcional del gen *HMGR* que codifica a la enzima HMG-CoA reductasa, considerada clave en la vía del mevalonato en la levadura *X. dendrorhous*.
- Los resultados de esta tesis sientan las bases de conocimiento de cómo la etapa temprana en la vía de carotenogénesis modula la cantidad de producto final en la biosíntesis de astaxantina a partir de fuentes naturales como *X. dendrorhous*.



## **6. BIBLIOGRAFIA**

- Adrio, J y Veiga, M. 1995. Transformation of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *Biotech. Techniques* 9:509-512.
- Alcaíno, J. 2002. Organización estructural del gen de la fitoeno sintasa en el genoma de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (ex *Phaffia rhodozyma*). Tesis para optar al grado de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile.
- Alcaíno, J. Barahona, S. Carmona, M. Lozano, C. Marcoleta, A. Niklitschek, M. Sepúlveda, D. Baeza, M. y Cifuentes, V. 2008. Cloning of the cytochrome p450 reductase (*crtR*) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiol.* 8:169.
- Alcaíno J, Romero, I. Niklitschek, M. Sepúlveda, D. Rojas, M.C. Baeza, M. y 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.
- Alvarez, V. Rodriguez-Saiz, M. de la Fuente, J.L. Gudina, E.J. Godio, R.P. Martin, J.F. y Barredo, J.L. 2006. The *crtS* gene of *Xanthophyllomyces dendrorhous* encodes a novel cytochrome-P450 hydroxylase involved in the conversion of betacarotene into astaxanthin and other xanthophylls. *Fungal Genet. Biol.* 43:261-272.
- An, G-H. Schuman, D.B. y Johnson, E. 1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:116-124.
- Andrewes, A. Phaff, J. y Starr, M. 1976. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*. A redpigmented fermenting yeast. *Phytochemistry* 15: 1003-1007.
- Armstrong, G. A. 1994. Eubacteria show their true colors: genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *J. Bacteriol.* 176:4795-4802.
- Bailey, S.M. y Cunningham, C.C. 2001. Contribution of mitochondria to oxidative stress associated with alcoholic liver disease. *Free Radic. Biol. Med.* 32:11-16.
- Barkovich, R. y Liao, J.C. 2001. Metabolic engineering of isoprenoids. *Metab. Eng.* 3:27-39.
- Basson, M.E. Thorsness, M. Finer-Moore, J. Stroud, R.M. y Rine, J. 1988. Structural and functional conservation between yeast and human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductases, the rate-limiting enzyme of sterol biosynthesis. *Mol. Cell. Biol.* 8:3797-3808.
- Basson, M.E. Thorsness, M. y Rine, J. 1986. *Saccharomyces cerevisiae* contains two functional genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5563-5567.

- Beach, M.J. y Rodwell, V.W. 1989. Cloning, sequencing, and overexpression of *mvaA*, which encodes *Pseudomonas mevalonii* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J. Bacteriol.*, 171:2994-3001.
- Benson, D.A. Cavanaugh, M. Clark, K. Karsch-Mizrachi, I. Lipman, D.J. Ostell, J. y Sayers, E.W. 2013. GenBank. *Nucleic. Acids. Res.* 41(Database issue):D36-42.
- Berndt, J. Boll, M. Löwel, M. y Gaumert, R. 1973. Regulation of sterol biosynthesis in yeast: Induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase by glucose. *Original Research Article Biochemical and Biophysical Research Communications.* 51: 843-848.
- Boyle, J.S. y Lew, A.M. 1995. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends Genet.* 11:8.
- Britton, G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* 9:1551- 1558.
- Britton, G. Liaaen-Jensen, S. y Pfander, H. 1998. "Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism." Birkhauser Verlag, Basel.
- Brown, M.S. y Goldstein, J.L. 1997. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.* 89:331-40.
- Burmester, A. y Czempinski, K. 1994. Sequence comparison of a segment of the gene for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in *Zygomycetes*. *Eur. J. Biochem.* 220:403-408.
- Calo, P. de Miguel, T. Velázquez, J.B. y Villa, T.G. 1995. Mevalonic acid increases trans-astaxanthin and carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Lett.* 17:575-578.
- Canfield, L.M. Forage, J. W. y Valenzuela, J. G. 1992. Carotenoids as cellular antioxidants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 200:260-265.
- Canizares-Villanu, R.O. Rios-Leal, E. Olvera Ramirez, R. Ponce Noyola, T. y Marquez Rocha, F. 1998. Microbial sources of pigments. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 40:87-107.
- Croxen, R. Goosey, M.W. Keon, J.P. y Hargreaves, J.A. 1994. Isolation of an *Ustilago maydis* gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and expression of a C-terminal-truncated form in *Escherichia coli*. *Microbiol.* 140:2363-2370.
- Chang, Y.C. Bien, C.M. Lee, H. Espenshade, P.J. y Kwong-Chung, K.J. 2007. *Sre1p*, A regulator of oxygen sensing and sterol homeostasis, is required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Molec. Microbiol.* 64:614-629.

- Chappell, J. Wolf, F. Proulx, J. Cuellar, R. y Saunders, C. 1995. Is the reaction catalyzed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase a rate-limiting step for isoprenoid biosynthesis in plants? *Plant. Physiol.* 109:1337–1343.
- Cheng, B. Yuan, Q. Sun, X. y Li, W. 2010. Enhanced production of coenzyme Q10 by overexpressing HMG-CoA reductase and induction with arachidonic acid in *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl Biochem Biotechnol*, 160:523–531.
- Chomczynski, P. y Sacchi, Y.N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Dong, Q. L. Zhao, X.M. Ma, H.W. Xing, X.Y. y Sun, N.X. 2006. Metabolic flux analysis of the two astaxanthin-producing microorganisms *Haematococcus pluvialis* and *Phaffia rhodozyma* in the pure and mixed cultures. *Biotechnol. J.* 1:1283-1292.
- Dooley, K.A. Millinder, S. y Osborne, T.F. 1998. Sterol regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase gene through a direct interaction between sterol regulatory element binding protein and the trimeric CCAAT-binding factor/nuclear factor. *Y.J. Biol. Chem.* 273:1349-1356.
- Drocourt, D. Calmels, T. Reynes, J.P. Baron, M. y Tiraby, G. 1990. Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus ble* gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance. *Nucleic. Acids. Res.* 18:4009-4009.
- Espenshade, P. J. y Hughes, A. L. 2007. Regulation of Sterol Synthesis in Eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 41:401–27.
- Fredlund, E. Beerlage, C. Melin, P. Schnurer, J. y Passoth, V. 2006. Oxygen and carbon source regulated expression of PDC and ADH genes in the respiratory yeast *Pichia anomala*. *Yeast.* 23:1137-1149.
- Garza, R.M. Tran, P.N. y Hampton, R.Y. 2009. Geranylgeranyl pyrophosphate is a potent regulator of HRD-dependent 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase degradation in yeast. *J. Biol. Chem.* 284:35368-35380.
- Gil, G. Faust, J.R. chin, D.J. Goldstein, J.L. y brown, M.S. 1985. Membrane-bound domain of HMG CoA reductase is required for sterol-enhanced degradation of the enzyme. *Cell* 41:249-258.
- Giniger, E., Varnum, S. M. y Ptashne, M. 1985. Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* 40:767-774.
- Goldstein, J.L. y Brown, M.S. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* 343:425–430.
- Golubev, W.I. 1995. Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Yeast.* 11:101-110.

- Gophna, U. Thompson, J.R. Boucher, Y. y Ford Doolittle, W. 2006. Complex histories of genes encoding 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoenzymeA Reductase. *Mol. Biol. Evol.* 23:168-176.
- Gu, W.L. An, G.H. y Johnson, E.A. 1997. Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 19:114-117.
- Hampton, R. Dimster-Denk, D. y Rine, J. 1996. The biology of HMG-CoA reductase: the pros of contra-regulation. *Trends Biochem. Sci.* 21:140-145.
- Hardie, D.G., Hawley, S.A., y Scott, J.W. 2006. AMP-activated protein kinase development of the energy sensor concept. *J Physiol.* 574:7-15.
- Hermosilla, G. Martínez, C. Retamales, P. León, R. y Cifuentes, V. 2003. Genetic determination of ploidy level in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 84:279-287.
- Higuera-Ciapara, I. Felix-Valenzuela, L. y Goycoolea, F.M. 2006. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 46:185-196.
- Hughes, A.L. Todd, B.L. y Espenshade, P.J. 2005. SREBP pathway responds to sterols and functions as an oxygen sensor in fission yeast. *Cell.* 120:831-842.
- Jo, Y. y DeBose-Boyd, R.A. 2010. Control of cholesterol synthesis through regulated ER-associated degradation of HMG CoA reductase. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 45(3):185-198
- Johnson, E.A. 2003. *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. *Int Microbiol.* 6:169-174.
- Johnson, E.A. y Lewis, M.J. 1979. Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* 115:173-183.
- Jones, R.P. 1989. Biological principles for the effects of ethanol. *Enzyme Microb. Technol.* 11: 130-153.
- Kaplan, M. Kerry, R. Aviram, M. y Hayek, T. 2008. High glucose concentration increases macrophage cholesterol biosynthesis in diabetes through activation of the sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP1): inhibitory effect of insulin. *J Cardiovasc. Pharmacol.* 52:324-332.
- Kelly, S.L. Lamb, D.C. y Kelly, D.E. 1997. Sterol 22-desaturase, cytochrome P45061, possesses activity in xenobiotic metabolism. *FEBS Lett.* 412:233-5.
- Kim, J.H. Kang, S.W. Kim, S.W. y Chang, H.I. 2005. High-level production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant JH1 using statistical experimental designs. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69:1743-1748.

- Kirtley, M.E. y Rudney, H. 1967. Some properties and mechanism of action of the  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl coenzyme A reductase of yeast. *Biochemistry* 6:2
- Kuwabara, P.E. y Labouesse, M. 2002. The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role? *Trends. Genet.* 18:193-201.
- Lamacka, M. y Sajbidor, J. 1997. Ergosterol determination in *Saccharomyces cerevisiae* comparison of different methods. *Biotechnol. Tech.* 11:723-725.
- Lodato, P. Alcaíno, J. Barahona, S. Niklitschek, M. Carmona, M. Wozniak, A. Baeza, M. Jimenez, A. y Cifuentes, V. 2007. Expression of the carotenoid biosynthesis genes in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biol. Res.* 40:73-84.
- Lodato, P. Alcaíno, J. Barahona, S. Retamales, P. Jiménez, A. y Cifuentes, V. 2004. Study of the expresión of carotenoid biosintesis genes in wild type and deregulated strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Ex.: *Phaffia rhodozyma*). *Biol. Res.* 37:83-93.
- Loto, I. Gutiérrez, M.S. Barahona, S. Sepúlveda, D. Martínez-Moya, P. Baeza, M. Cifuentes, V. y Alcaíno, J. 2012. Enhancement of carotenoid production by disrupting the C22-sterol desaturase gene (*CYP61*) in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiol.* 12:235.
- Marcoleta, A. Niklitschek, M. Wozniak, A. Lozano, C. Alcaíno, J. Baeza, M. y Cifuentes, V. 2011. "Glucose and ethanol-dependent transcriptional regulation of the astaxanthin biosynthesis pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous*". *BMC Microbiol* 11:190.
- Martin, V.J. Pitera, D.J. Withers, S.T. Newman, J.D. y Keasling, J.D. 2003. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat. Biotechnol.* 21:796-802.
- McCarthy, S.S. Kobayashi, M.C. y Niyogi, K.K. 2004. White Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* Are Defective in Phytoene Synthase. *Genetics.* 168:1249-1257.
- McGarvey, D.J. y Croteau, R. 1995. Terpenoid Metabolism. *Plant Cell.* 7:1015-1026.
- Merkulov, S. van Assema, F. Springer, J. Fernandez del Carmen, A. y Mooibroek, H. 2000. Cloning and characterization of the *Yarrowia lipolytica* squalene synthase (*SQS1*) gene and functional complementation of the *Saccharomyces cerevisiae erg9* mutation. *Yeast*, 16:197-206.
- Miao, L. Chi, S. Tang, Y. Su, Z. Yin, T. Guan, G. y 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 Res.* 11:192-201.

- Miao, L. Chi, S. Tang, Y. Su, Z. Yin, T. Guan, G. y 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 Res.* 11:192–201.
- Misawa, N. y Shimada, H. 1997. Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. *J. Biotechnol.* 59:169–181.
- Miziorko, H.M. 2011. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Arch Biochem Biophys.* 505:131–143.
- Niklitschek, M. 2007. Desarrollo de un casete de resistencia a antibiótico en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Seminario de Título para optar al grado de Ingeniería en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile.
- Niklitschek, M. Alcaíno, J. Barahona, S. Sepúlveda, D. Lozano, C. Carmona, M. Marcoleta, A. Martínez, C. Lodato, P. Baeza, M. y Cifuentes, V. 2008. Genomic organization of the structural genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biol. Res.* 41:93–108.
- Oha, H.T. Chung, M.J. Kim S.H. Choi H.J. y Ham S.S. 2009. Masou salmon (*Oncorhynchus masou*) ethanol extract decreases 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase expression in diet-induced obese mice. *Nutr. Res.* 29:123-129.
- Ojima, K. Breitenbach, J. Visser, H. Setoguchi, Y. Tabata, K. Hoshino, T. van den Berg, J. y Sandmann, G. 2006. Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a beta-carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. *Mol. Genet. Genomics.* 275:148-158.
- Omkumar, R.V. Darnay, y B.G. Rodwell, V.W. 1994. Modulation of Syrian hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity by phosphorylation. Role of serine 871. *J. Biol. Chem.* 269:6810-4.
- Ostergaard, S. Olsson, L. y Nielsen, J. 2000. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:34–50.
- Panda, T.V. y Devi, A. 2004. Regulation and degradation of HMGCo-A reductase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66:143-152.
- Parks, L.W. y Casey, W.M. 1995. Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annu Rev Microbiol.* 49:95–116.
- Polakowski, T. Stahl, U. y Lang, C. 1998. Overexpression of a cytosolic hydroxymethylglutaryl-CoA reductase leads to squalene accumulation in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49:66–71.
- Pronk, J.T. Steensma, H. y Van Dijken, J.P. 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 12:1607-1633.

- Rice, P. Longden, I. Bleasby, A. 2000. EMBOSS: The European Molecular Biology Open. Software Suite. Trends. Genet. 16:276–277.
- Ruiz-Albert, J. Cedá-Olmedo, E. y Corrochano, L.M. 2002. Genes for mevalonate biosynthesis in *Phycomyces*. Mol. Genet. Genomics. 266:768-777.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. 2001. Molecular cloning. A laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sato, R. Goldstein, J.L. y Brown, M.S. 1993. Replacement of serine-871 of hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase prevents phosphorylation by AMP-activated kinase and blocks inhibition of sterol synthesis induced by ATP depletion. Proc Natl Acad Sci U S A. 90:9261–9265.
- Shang, F. Wen, S. Wang, X. y Tan, T. 2006. Effect of nitrogen limitation on the ergosterol production by fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biotechnol, 122:285–292.
- Shimada, H. Kondo, K. Fraser, P.D. Miura, Y. Saito, T. y Misawa, N. 1998. Increased Carotenoid Production by the Food Yeast *Candida utilis* through Metabolic Engineering of Isoprenoid Pathway. Appl Environ Microbiol. 64: 2676-2680.
- Skaggs, B.A. Alexander, J.F. Pierson, C.A. Schweitzer, K.S. Chun, K.T. Koegel, C. Barbuch, R. y Bard, M. 1996. Cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* C-22 sterol desaturase gene, encoding a second cytochrome P-450 involved in ergosterol biosynthesis. Gene 169:105–109.
- Tarshis, L.C. Proteau, P. Kellogg, J. Brenda, A. Sacchettini, J.C. y Poulter, C.D. 1996. Regulation of product chain length by isoprenyl diphosphate synthases. Proc. Natl. Acad. Sci. 93:15018-15023.
- Vazquez, M. Santos, V. y Parajo, J.C. 1997. Effect of the carbon source on the carotenoid profiles of *Phaffia rhodozyma* strains. J Ind Microbiol Biot. 19:263-268.
- Veen, M. y Lang, C. 2004. Production of lipid compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. 63:635–646.
- Verdoes, J.C. Krubasik, P. Sandmann, G. y van Ooyen, A.J.J. 1999. Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Mol. Gen. Genet. 262: 453-461.
- Wang, G-Y. y Keasling, J.D. 2002. Amplification of HMG-CoA reductase production enhances carotenoid accumulation in *Neurospora crassa*. Metab. Eng. 4:193-201.
- Wery, J. Dalderup, M.J.M. Ter Linde, J. Boekhout, T. y Van Ooyen, A.J.J. 1996. Structural and phylogenetic analysis of the actin gene from the yeast *Phaffia rhodozyma*. Yeast. 12:641–651.



Wong, J. P.C. Wijaya, S. Ting, K. Wiart, C. Mustafa, K. Shipton, F. y Khoo, T.J. 2014. Crude Ethanol Extract of *Pithecellobium ellipticum* as a Potential Lipid-Lowering Treatment for Hypercholesterolaemia. Research Article. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 9.

Wozniak, A. Lozano, C. Barahona, S. Niklitschek, M. Marcoleta, A. Alcaíno, J. Sepulveda, D. Baeza, M. y Cifuentes, V. 2011. Differential carotenoid production and gene expression in *Xanthophyllomyces dendrorhous* grown in a non-fermentable carbon source carbon source. FEMS Yeast Res.1-11.

Yan, G. Wen, K. y Duan, C. 2012. Enhancement of  $\beta$ -carotene production by overexpression of HMG-CoA reductase coupled with addition of ergosterol biosynthesis inhibitors in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. Curr Microbiol. 64:1-5.

Zhang, Y.Q. y Rao, R. 2010. Beyond ergosterol: linking pH to antifungal mechanisms. Virulence. 1:551-554.