

UCH-FC  
Biotecnología  
G 633  
C. 1



UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE PREGRADO

**“SOBREEXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN A LAS ENZIMAS  
ACETOACETIL-CoA TIOLASA Y HMG-CoA REDUCTASA, PARTICIPANTES  
DE LA RUTA DEL MEVALONATO EN *Xanthophyllomyces dendrorhous*”**

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

**MELISSA KATHERINE GÓMEZ RÍOS**

Directora de Seminario de Título

Dra. Jennifer Alcaíno Gorman

Co-Director de Seminario de Título

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán

Enero, 2016

Santiago – Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título, presentado por la candidata:

**MELISSA KATHERINE GÓMEZ RÍOS**

**“SOBREENPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN A LAS ENZIMAS ACETOACETIL-CoA TIOLASA Y HMG-CoA REDUCTASA, PARTICIPANTES DE LA RUTA DEL MEVALONATO EN *Xanthophyllomyces dendrorhous*”**

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Dra. Jennifer Alcaíno Gorman  
**Directora de Seminario de Título**

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán  
**Co-Director de Seminario de Título**



### **Comisión Revisora y Evaluadora**

Dra. Margarita Carú Marambio  
**Presidenta comisión**

Dra. Claudia Stange Klein  
**Evaluadora**

Santiago de Chile, Enero 2016

**DEDICATORIA**

*A mis padres, Ángel y Gloria*

*y*

*A mis hermanos, Melany y Ángel*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres Ángel y Glorita por apoyarme incondicionalmente en todo lo que he realizado hasta ahora. Me siento afortunada de ser su hija, y he llegado hasta donde estoy gracias a la fuerza y el cariño que me han brindado. También agradezco a mis hermanos, Melany y Angelito por ayudarme, apoyarme y preocuparse por mí en cada momento. Los quiero Mucho!

Agradezco el cariño de mis amigas, Ale y Barby, a quienes conozco desde hace tiempo. Gracias!

Agradezco a todas las personas del Laboratorio de Genética, no sólo por ayudarme en el desarrollo de esta tesis, sino también por acogerme e integrarme en todo. Gracias Pame, Nicole, Carlita, Anita, Salva, Rafa, Mario, Pablo, Evelin, Luis, Yassef y Gabriel. Especialmente agradezco a Dony y a Sole, por su cariño y consejos, Gracias!

Agradezco a los profesores, Marcelo, Víctor y Jennifer por recibirme en el laboratorio. Agradezco a mis Directores de Tesis, Profe Víctor y Profe Jenny, por orientarme en el desarrollo de este seminario. Especialmente agradezco el increíble apoyo que me ha dado la profe Jenny, a quien he llegado a conocer mejor y estimar mucho. Muchas gracias por todos los consejos que me ha dado, tanto laborales como personales!

Finalmente, agradezco al proyecto FONDECYT 11121200 por el financiamiento otorgado.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
Microorganismos y condiciones de cultivo.....	17
Plásmidos, cepas, enzimas y ácidos nucleicos.....	17
Extracción de ácidos nucleicos.....	22
Purificación de DNA a partir de geles de agarosa.....	24
Digestión de DNA plasmídico y reacción de ligado.....	24
PCR, RT-PCR y qPCR.....	25
Transformación de las cepas de <i>E. coli</i> y de <i>X. dendrorhous</i> .....	26
Extracción de carotenoides y esteroides, y análisis por RP-HPLC.....	28
RESULTADOS.....	31
DISCUSIÓN.....	71
CONCLUSIONES.....	82
BIBLIOGRAFIA.....	83

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Plásmidos generados y utilizados en este trabajo .....	19
<b>Tabla 2.</b> Cepas generadas y utilizadas en este trabajo .....	20
<b>Tabla 3.</b> Partidores generados y utilizados en este trabajo. ....	20
<b>Tabla 4.</b> Patrones conservados detectados por <i>ScanProsite</i> en la Tiolasa A y Tiolasa B de <i>X. dendrorhous</i> . ....	41
<b>Tabla 5.</b> Alineamiento múltiple esquematizado en logotipos, donde cada uno representa a uno de los 7 bloques identificados por BLOCKS.....	43
<b>Tabla 6.</b> Composición de carotenoides de las cepas mutantes y silvestre de <i>X. dendrorhous</i> en ppm ( $\mu\text{g/g}$ peso seco de levadura) de acuerdo a su perfil de RP-HPLC. ....	61
<b>Tabla 7.</b> Composición de carotenoides de las cepas mutantes y silvestre de <i>X. dendrorhous</i> en ppm ( $\mu\text{g/g}$ peso seco de levadura) de acuerdo a su perfil de RP-HPLC. ....	62
<b>Tabla 8.</b> Composición de esteroides de las cepas mutantes y silvestre de <i>X. dendrorhous</i> (mg/g peso seco de levadura) de acuerdo a su perfil RP-HPLC. ....	65
<b>Tabla 9.</b> Composición de esteroides de las cepas mutantes y silvestre de <i>X. dendrorhous</i> (mg/g peso seco de levadura) de acuerdo a su perfil RP-HPLC. ....	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Rutas de síntesis de astaxantina y ergosterol.....	3
<b>Figura 2.</b> Ruta del Mevalonato (MVA).....	5
<b>Figura 3.</b> <i>Loop Catalítico</i> .....	9
<b>Figura 4.</b> Vector pXdVexp2 de expresión en <i>X. dendrorhous</i> .....	18
<b>Figura 5.</b> Perfil de hidropatía de las tiolasas A y B de <i>X. dendrorhous</i> en base a la escala de hidropatía de Kyte-Doolittle. ....	33
<b>Figura 6.</b> Alineamiento múltiple de secuencias de tiolasas peroxisomales.....	36
<b>Figura 7.</b> Árbol filogenético de tiolasas seleccionadas. ....	39
<b>Figura 8.</b> Alineamiento de secuencias aminoacídicas.....	44
<b>Figura 9.</b> Predicción de estructura secundaria para las tiolasa A y B por YAPSIN .....	46
<b>Figura 10.</b> Construcción de vector pXdVexp2- <i>cERG10 A</i> y su análisis .....	48
<b>Figura 11.</b> Representación del vector pXdVexp2- <i>cERG10 A</i> y su análisis por restricción .....	50
<b>Figura 12.</b> Verificación de la integración del fragmento en el genoma del mutante de sobreexpresión del gen de la tiolasa B (385- <i>ERG10 B</i> ).....	52
<b>Figura 13.</b> Representación del módulo del gen que otorga resistencia a higromicina B presente en el fragmento integrado en el genoma de <i>X. dendrorhous</i> , y su verificación por PCR en las cepas mutantes. ....	53
<b>Figura 14.</b> Verificación del módulo de expresión del gen de la enzima tiolasa A en el fragmento integrado en el genoma de la cepa mutante 385- <i>ERG10 A</i> .....	54
<b>Figura 15.</b> Integración del fragmento que posee el módulo de expresión de un gen de la ruta del MVA ( <i>ERG10 A</i> , <i>ERG10 B</i> o <i>tHMGR</i> ) y el módulo que confiere resistencia a higromicina B en el <i>locus int</i> del genoma de <i>X. dendrorhous</i> .....	56
<b>Figura 16.</b> Comparación de fenotipos entre las cepas mutantes y silvestre de <i>X. dendrorhous</i> .....	58

<b>Figura 17.</b> Curvas de crecimiento. ....	59
<b>Figura 18.</b> Porcentaje de carotenoides respecto a los carotenoides totales en las cepas mutantes 385- <i>tHMGR</i> y 385-pXdVexp2, y cepa silvestre UCD 67-385.....	64
<b>Figura 19.</b> Análisis de esteroides por RP-HPLC de las cepas UCD 67-385, 385- <i>tHMGR</i> y CBS- <i>cyp61</i> <sup>(+)</sup> .....	67
<b>Figura 20.</b> Análisis de los niveles de transcrito de los genes <i>ERG10 A</i> , <i>ERG10 B</i> y <i>HMGR</i> en los mutantes 385- <i>ERG10 A</i> 385- <i>ERG10 B</i> .....	69
<b>Figura 21.</b> Análisis de los niveles de transcrito de los genes <i>HMGR</i> , carotenogénicos <i>crtR</i> y <i>crtS</i> , <i>ERG10 A</i> y <i>ERG10 B</i> en el mutante 385- <i>tHMGR</i> , luego de 36 h y 120 h de cultivo .....	70



## ABREVIATURAS

A	Absorbancia
Amp	Ampicilina
C	Carbono
CoA	Coenzima A
DEPC	Dietilpirocarbonato
DO	Densidad óptica
DMAPP	Dimetilalil-pirofosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FPP	Farnesil-pirofosfato
gDNA	DNA genómico
gDNA No Codif.	DNA genómico no codificante
GGPP	Geranilgeranil-pirofosfato
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A
HMGR	3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A reductasa
HMGS	3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A sintasa
Hyg	Higromicina
IPP	Isopentenil-pirofosfato
kb	kilobases
kDa	kilo Dalton
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
MEP	Metil-eritritol-fosfato

MVA	Mevalonato
MVA-P	Mevalonato-fosfato
MVA-PP	Mevalonato-pirofosfato
MVD	Mevalonato-pirofosfato decarboxilasa
MVK	Mevalonato kinasa
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHB	Polihidroxi butirato
pl	Punto isoelectrico
PMK	Fosfo-mevalonato kinasa
ppm	Partes por millón ( $\mu\text{g}$ carotenoides/g peso seco de levadura)
RT	Transcripción reversa
PTS	Peroxisomal targeting signal
RT-HPLC	Cromatografía líquida en fase reversa
TAE	Buffer Tris-acetato-EDTA
TE	Buffer Tris-EDTA
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
UV	Luz ultravioleta
YM	Medio de cultivo para levadura

## RESUMEN

*Xanthophyllomyces dendrorhous* es una levadura que sintetiza astaxantina, carotenoide de interés biotecnológico por sus características antioxidantes y uso como colorante. La carotenogénesis se abastece de metabolitos derivados de la ruta del mevalonato (MVA), por lo que en este seminario de título se estudió el efecto que tiene en la producción y composición de carotenoides la sobreexpresión de dos genes que codificarían una acetoacetil-CoA tiolasa (*ERG10 A* y *ERG10 B*) y la región catalítica de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (*tHMGR*). Para ello, se construyeron módulos de expresión de dichos genes, se transformó la levadura y se comprobó la integración de éstos en su genoma. La producción de carotenoides y esteroides se analizó espectrofotométricamente, mientras que su composición se determinó mediante RP-HPLC. Además, se estudió la expresión de los genes a nivel de sus mRNAs mediante RT-qPCR, y paralelamente se realizó un análisis bioinformático de las secuencias primaria y secundaria de las proteínas que codifican *ERG10 A* y *ERG10 B*. Los resultados indican que estos genes posiblemente codifican una 3-cetoacil-CoA tiolasa involucrada en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y una acetoacetil-CoA tiolasa involucrada en la ruta del MVA, respectivamente. La sobreexpresión de *ERG10 A* y *ERG10 B* no conduce a cambios significativos en la cantidad/composición de carotenoides y de esteroides. Sin embargo, cuando se sobreexpresó *tHMGR*, la producción de carotenoides y esteroides aumentó 2,02 y 1,4 veces, respectivamente, luego de 120 h de cultivo. Particularmente, se observó que la fracción de astaxantina disminuyó y la de  $\beta$ -caroteno aumentó, mostrando una relación inversa a la observada en la cepa parental silvestre. Curiosamente, este fenotipo se relaciona con una

disminución significativa en los niveles de transcritos de los genes carotenogénicos *crtR* y *crtS*, quienes controlan los pasos de  $\beta$ -caroteno a astaxantina de esta ruta.

## ABSTRACT

*Xanthophyllomyces dendrorhous* is a yeast that synthesizes astaxanthin, a carotenoid of biotechnological interest due to its use as antioxidant and colorant. The carotenogenesis precursors are supplied by the mevalonate pathway, therefore the effect of the overexpression of two genes involved in the MVA pathway that encode an acetoacetyl-CoA thiolase (*ERG10 A* and *ERG10 B*) and the catalytic region of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (*tHMGR*) in production and composition of carotenoids was studied. For this, expression modules of these genes were constructed, the yeast was transformed and their integration into its genome was verified. The production of carotenoids and sterols was analyzed spectrophotometrically while their composition was determined by RP-HPLC. In addition, the expression of genes at the level of their mRNAs was studied by RT-qPCR and bioinformatic analyses of the primary and secondary structures of thiolases A and B was performed. The results indicate that *ERG10 A* and *ERG10 B* may encode a 3-ketoacyl-CoA thiolase involved in  $\beta$ -oxidation of fatty acids and an acetoacetyl-CoA thiolase involved in the MVA pathway, respectively. Overexpression of *ERG10 A* and *ERG10 B* does not lead to significant changes in the amount/composition of carotenoids and sterols. However, when *tHMGR* was overexpressed, the production of carotenoids and sterols increased 2.02 and 1.4 times, respectively, after 120 hours of culture. Particularly, it was found that the astaxanthin fraction decreased and the  $\beta$ -carotene fraction increased, pattern that showed an inverse relation in the wild type strain. Interestingly, this phenotype is associated with a significant decrease in the transcript levels of the carotenogenic genes *crtR* and *crtS*, which control the formation of astaxanthin from  $\beta$ -carotene.

## INTRODUCCIÓN

*Xanthophyllomyces dendrorhous* es una levadura pigmentada perteneciente a la división basidiomicetos del Reino Fungi, aislada originalmente desde exudados de árboles en las regiones montañosas de Japón y Alaska (Visser y col., 2003). *X. dendrorhous* es uno de los pocos organismos conocidos por sintetizar astaxantina como principal carotenoide (Echavarri-Erasun y Johnson., 2004), probablemente como una ventaja adaptativa, ya que se ha propuesto que la propiedad antioxidante de los carotenoides protege a la levadura contra especies reactivas de oxígeno (Schroeder y Johnson., 1993).

Los carotenoides, dependiendo de la longitud de la cadena de enlaces dobles conjugados y sus sustituyentes, son compuestos de colores naranjos, amarillos y rojos (Armstrong., 1994; Klassen., 2010), y se caracterizan por ser potentes antioxidantes (Rodríguez-Sáiz y col., 2010). La astaxantina es una xantófila (carotenoide oxigenado) y representa cerca del 85 % del contenido total de carotenoides de cepas silvestres de *X. dendrorhous* (Visser y col., 2003). Además de las propiedades antioxidantes, las aplicaciones de los carotenoides como colorantes, ha generado un gran interés industrial por esta levadura como una posible fuente de producción de pigmentos alternativa a la síntesis química de carotenos ( $\beta$ -caroteno) y xantófilas (astaxantina y cantaxantina) (Schmidt-Dannert., 2000). Sin embargo, un inconveniente es la baja producción de astaxantina (200-400  $\mu\text{g/g}$ -peso seco) en cepas silvestres de *X. dendrorhous* (Wery y col., 1997; Contreras y col., 2013). Por esta razón, los carotenoides producidos por aproximaciones biotecnológicas no han sido hasta ahora

capaces de convertirse en una real competencia para los carotenoides sintéticos (Schmidt y col., 2011).

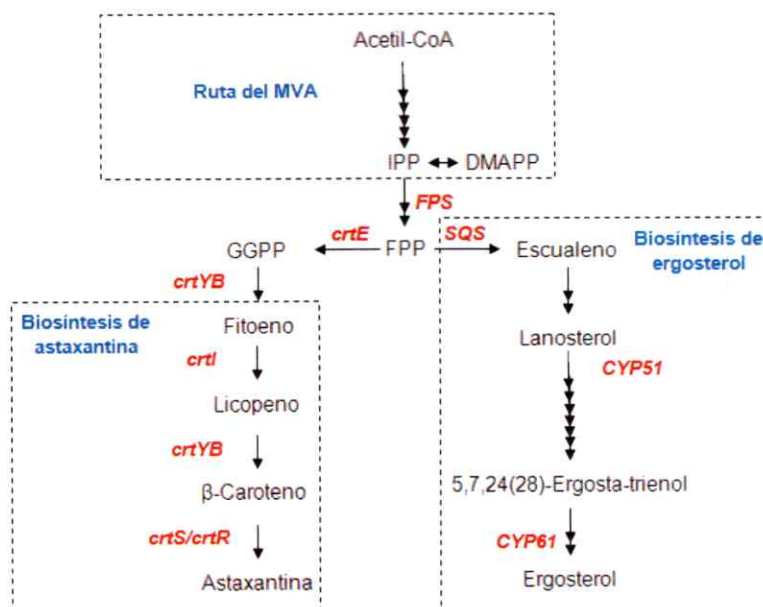
## BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES Y DE ESTEROLES

### CAROTENOIDES

En *X. dendrorhous*, la ruta de biosíntesis de carotenoides ha sido descrita (Figura 1) y se inicia cuando dos moléculas de geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) forman fitoeno, el primer carotenoide que se produce, por acción de la enzima bifuncional fitoeno- $\beta$ -caroteno sintasa codificada por el gen *crtYB* (Verdoes y col., 1999a). Luego, la enzima fitoeno desaturasa codificada por el gen *crtl*, forma licopeno a partir de fitoeno (Verdoes y col., 1999b). La ciclación de los extremos del licopeno genera  $\beta$ -caroteno por acción de la enzima fitoeno- $\beta$ -caroteno sintasa, y posteriormente la adición de grupos ceto en las posiciones 4 y 4', y de grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 3' de los anillos  $\beta$ -ionona del  $\beta$ -caroteno, da lugar a astaxantina. Este paso involucra la formación de intermediarios y la catálisis de un sistema citocromo P450 formado por la enzima citocromo P450 denominada astaxantina sintasa y una citocromo P450 reductasa, codificadas por los genes *crtS* y *crtR*, respectivamente (Alcaño y col., 2008).

En cuanto a la regulación de la síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*, el conocimiento es más escaso, pero se ha observado que la fuente de carbono cumpliría un rol importante. En *X. dendrorhous*, la glucosa y otros azúcares fermentables son asimilados a través de la glicólisis seguida de la fermentación alcohólica para producir etanol, incluso en presencia de oxígeno (Reynders y col., 1997). Mientras que las fuentes de carbono no fermentables, como el etanol, son transformados a acetil-CoA y

procesados a través del ciclo de Krebs. Cuando la fuente de carbono es glucosa, la síntesis de carotenoides es baja (Vazquez y col., 1997), y en fuentes de carbono no fermentables, la síntesis de carotenoides es mayor (Gu y col., 1997). Se ha informado que la glucosa causa represión transcripcional de tres genes (*crtYB*, *crtI* y *crtS*) involucrados en la síntesis de astaxantina desde GGPP, lo cual se relaciona con la inhibición de la síntesis de carotenoides (Marcoleta y col., 2011). Por lo tanto, la inducción de la carotenogénesis coincide con el agotamiento del azúcar y el comienzo del metabolismo del etanol (Lodato y col., 2007).



**Figura 1. Rutas de síntesis de astaxantina y ergosterol.** En letras azules, la ruta del MVA, astaxantina y ergosterol. Cada ruta se encuentra encerrada en un recuadro, donde se presentan los genes descritos que controlan la ruta de biosíntesis de astaxantina en *X. dendrorhous*: *crtYB* (enzima bifuncional fitoeno-β-caroteno sintasa), *crtI* (enzima fitoeno desaturasa), *crtS/crtR* (sistema citocromo P450) (Alcaíno y col., 2008). En la ruta de biosíntesis de ergosterol se presenta el gen *CYP61*, codificante de una citocromo P450: C-22 esteroles desaturasa (Loto y col., 2012), y el gen *SQS* (enzima escualeno sintasa). También en esta ruta se ha descrito el gen *CYP51* codificante de una citocromo P450: C-14 esteroles demetilasa, que cataliza la demetilación de lanosterol (Leiva y col., 2015). Genes fuera de los recuadros: *crtE* (GGPP sintasa) y *FPS* (enzima farnesil-PP sintasa) (Alcaíno y col., 2014).

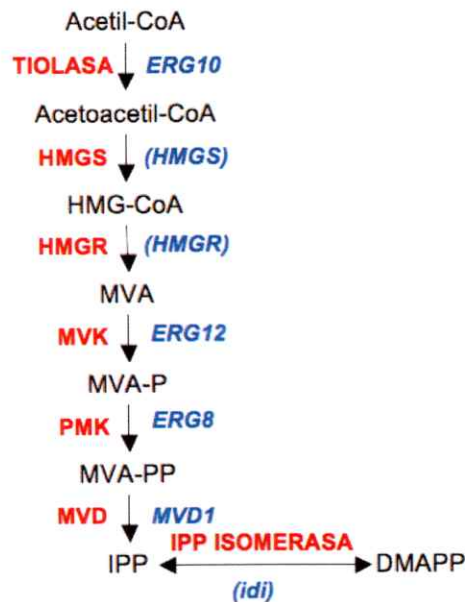


## ESTEROLES

Los esteroides son componentes estructurales de las membranas de las células de eucariontes que regulan su espesor, fluidez y permeabilidad (Zhang y Rao., 2010; Loto y col., 2012), siendo el ergosterol el principal esteroide en hongos incluyendo a las levaduras. La escualeno sintasa, codificada por el gen *ERG9* en *Saccharomyces cerevisiae*, realiza la primera etapa comprometida en la formación de esteroides, generando escualeno. Mutaciones en este gen confieren una obligada auxotrofia de esteroides (Sturley., 2000). El escualeno sufre un proceso de ciclación y da lugar a lanosterol, donde la conversión de este último en ergosterol es un proceso complejo que involucra la acción de varias enzimas unidas a membranas, incluyendo a dos enzimas citocromo P450: CYP51 y CYP61 (Figura 1) (Loto y col., 2012; Leiva y col., 2015).

## RUTA DEL MEVALONATO (MVA)

Tanto los carotenoides como los esteroides pertenecen a la familia de compuestos isoprenoides o terpenos, moléculas sintetizadas a través de sucesivas condensaciones de dos formas de isopreno activadas: el isopentenil-pirofosfato (IPP, C<sub>5</sub>) y el dimetilalil-pirofosfato (DMAPP, C<sub>5</sub>). En eucariontes no fotosintéticos, el IPP y el DMAPP se generan en la ruta del MVA (Figura 2) (Miziorko., 2011).



**Figura 2. Ruta del Mevalonato (MVA).** En letras negras se indican los metabolitos de la ruta, donde: HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA), MVA (mevalonato), MVA-P (MVA-5-fosfato), MVA-PP (MVA-5-pirofosfato), IPP (isopentenil-5-pirofosfato) y DMAPP (dimetilalil-pirofosfato). En letras rojas se indican las enzimas involucradas en cada etapa de la ruta, donde: TIOLASA (acetoacetil-CoA tiolasa), HMGS (HMG-CoA sintasa), HMGR (HMG-CoA reductasa), MVK (MVA-kinasa), PMK (fosfo-MVA-kinasa) y MVD (MVAPP-decarboxilasa). En azul se presentan los genes que codifican dichas enzimas en *S. cerevisiae*, mientras que los genes descritos en *X. dendrorhous* se presentan en paréntesis (Modificado de Loto y col., 2012).

La ruta del MVA primero fue descrita en animales y en levaduras, y hoy es considerada la principal ruta de síntesis de IPP y DMAPP en eucariotas y arqueas. Sin embargo, hay excepciones pues algunas bacterias (que generalmente sintetizan estos precursores por la ruta metil-eritritol-fosfato, MEP) poseen la ruta del MVA, comúnmente explicado por adquisición mediante transferencia horizontal de genes desde donantes eucariotas y arqueas (Lombard y Moreira., 2011). En la levadura *X. dendrorhous*, no se ha descrito formalmente la ruta del MVA y en el Laboratorio de Genética se han identificado 6 genes que posiblemente participarían en ella, siendo

éstos: *ERG10 A* y *ERG10 B* (homólogos del gen *ERG10* de *S. cerevisiae* que codifica una acetoacetil-CoA tiolasa), *HMGS* (HMG-CoA sintasa, siendo *ERG13* su homólogo en *S. cerevisiae*), *HMGR* (HMG-CoA reductasa, siendo *HMG1* y *HMG2* sus homólogos en *S. cerevisiae*), *MVK* (MVA-kinasa, siendo *ERG12* su homólogo en *S. cerevisiae*), *PMVK* (fosfo-MVA-kinasa, siendo *ERG8* su homólogo en *S. cerevisiae*) y *MVD1* (MVAPP-decarboxilasa, siendo *ERG19* su homólogo en *S. cerevisiae*).

Una de las enzimas más estudiadas de esta ruta es la HMG-CoA reductasa y se ha determinado que la reacción catalizada por ella es uno de los principales cuellos de botella en la biosíntesis de isoprenoides, mientras que la relevancia de la reacción catalizada por la enzima acetoacetil-CoA tiolasa en la primera etapa de biosíntesis de isoprenoides en la ruta del MVA no ha sido clásicamente considerada (Fox y col., 2014).

## **TIOLASA Y HMGR, ENZIMAS DE LA RUTA DEL MVA:**

### **TIOLASA**

Las tiolosas son una superfamilia donde la identidad de secuencia entre las enzimas es baja (Haapalainen y col., 2006). Las tiolosas pueden dividirse de acuerdo al mecanismo de condensación, siendo este decarboxilativo y no-decarboxilativo (Jiang y col., 2008). Las tiolosas que tienen un mecanismo de condensación decarboxilativo corresponden a las tiolosas KAS ( *$\beta$ -ketoacyl-acyl-carrier protein synthase*), las PKS (*polyketide synthase*), las KCS ( *$\beta$ -ketoacyl-CoA synthase*) y las CHS (*chalcone synthase family*), mientras que las tiolosas con un mecanismo de condensación no-decarboxilativo corresponden a las tiolosas biosintéticas y degradativas. También se ha

descrito a HMGS como otra familia con un mecanismo de reacción único (Haapalainen y col., 2006).

En las tiolasa biosintéticas y degradativas se han descrito específicamente dos clases (Hiser y col., 1994; Mathieu y col., 1997; Peretó y col., 2005): i) la 3-cetoacil-CoA tiolasa (EC 2.3.1.16), también conocida como acetil-CoA C-aciltransferasa, tiolasa degradativa o tiolasa I, y ii) la acetoacetil-CoA tiolasa (EC 2.3.1.9), conocida como acetil-CoA C-acetiltransferasa, tiolasa biosintética o tiolasa II. Aunque ambos tipos de tiolasa catalizan reacciones reversibles (Fox y col., 2014), la 3-cetoacil-CoA tiolasa está involucrada en procesos catabólicos, mientras que la acetoacetil-CoA tiolasa usualmente muestra una función anabólica bajo condiciones fisiológicas (Peretó y col., 2005; Soto y col., 2011; Fox y col., 2014) tales como la primera etapa de biosíntesis de polihidroxitirato (PHB) en bacterias y de isoprenoides a través de la ruta del MVA en eucariotas.

Se ha descrito que en las células eucariotas ambas clases de tiolasa difieren en su localización sub-celular. La 3-cetoacil-CoA tiolasa ha sido localizada en mitocondrias y peroxisomas, involucrada en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos catalizando el último paso de degradación (Erdmann y Kunau., 1994), mientras que la acetoacetil-CoA tiolasa ha sido encontrada en mitocondrias y en el citoplasma, involucrada en el metabolismo de los cuerpos cetónicos y biosíntesis de esteroides, respectivamente; y también se describió en el peroxisoma (Igual y col., 1992a; Hiser y col., 1994; Peretó y col., 2005). En *S. cerevisiae* se describió una acetoacetil-CoA tiolasa citoplasmática codificada por el gen *ERG10* y una 3-cetoacil-CoA tiolasa peroxisomal (Fox3p) codificada por el gen *POT1*, el cual es reprimible por glucosa e inducible por ácidos grasos (Igual y col., 1991, 1992b). En la levadura *Candida*

*tropicalis* se describió una 3-cetoacil-CoA tiolasa peroxisomal, y dos isoenzimas acetoacetyl-CoA tiolasa codificadas por el mismo gen, una citoplasmática y la otra peroxisomal, donde la última excepcionalmente sólo se ha reportado en esta levadura (Yamagami y col., 2001). Las tiolatas peroxisomales de este organismo participan en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, mientras que la tiolasa citoplasmática tendría un rol en la ruta del MVA (Ueda y col., 2000). En la levadura *Yarrowia lipolytica* se identificó una 3-cetoacil-CoA tiolasa y una acetoacetyl-CoA tiolasa, y se cree que ambas están involucradas en el último paso de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos en el peroxisoma, principalmente porque serían esenciales en la utilización de una fuente de carbono específica (Berninger y col., 1993; Yamagami y col., 2001). En el hongo filamentoso *Aspergillus nidulans* se describió que la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos ocurre en el peroxisoma y en la mitocondria. De acuerdo a estos reportes, se postuló que en el Reino Fungi la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos puede ocurrir en la mitocondria y en el peroxisoma, pero existen levaduras donde la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos ocurre sólo en el peroxisoma (Shen y Burger., 2009). Por otro lado, la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos en las células animales es un proceso complejo y se ha establecido que se inicia en el peroxisoma y finaliza en la mitocondria, donde se completa la oxidación de éstos a acetyl-CoA (Poirier y col., 2006).

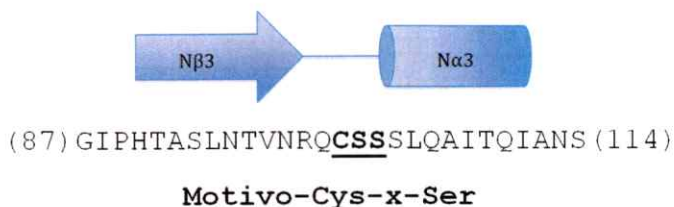
En cuanto a la especificidad de sustrato, la 3-cetoacil-CoA tiolasa tiene una amplia especificidad por sustratos de  $C_4$  a  $C_{22}$  y cataliza la eliminación tiolítica de un grupo acetilo de un 3-cetoacil-CoA, como ocurre en el último paso del ciclo catalítico de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. Por el contrario, la acetoacetyl-CoA tiolasa es específica por sustratos de  $C_4$  y cataliza la condensación de dos moléculas de acetyl-CoA para formar una molécula de acetoacetyl-CoA con liberación de coenzima A (CoA-

SH) (Hiser y col., 1994; Peretó y col., 2005; Fox y col., 2014), siendo éste el primer paso enzimático en la biosíntesis de isoprenoides de la ruta del MVA:



Se ha determinado que la reacción de biosíntesis es termodinámicamente desfavorable, pero el exceso de acetil-CoA (producido durante la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos o después de la glicólisis) y la eliminación inmediata de acetoacetil-CoA por la siguiente enzima en la ruta metabólica, permite que la reacción de biosíntesis proceda *in vivo* (Modis y Wierenga., 1999).

En el sitio activo de las tiolasas se han identificado motivos conservados en *loops* catalíticos. Se han descrito 4 *loops*, donde cada uno de ellos conecta una sábana  $\beta$  con una hélice  $\alpha$  o sábana  $\beta$  (Anbazhagan y col., 2014) como se muestra en la Figura 3. El *loop* N $\beta$ 3-N $\alpha$ 3 contiene al motivo-CxS (Cys-x-Ser), donde la cisteína es la que inicia el primer paso de reacción, ya sea en la dirección de síntesis o de degradación, activando al primer sustrato (acetil-CoA en biosíntesis y 3-cetoacil-CoA en la degradación) mediante ataque nucleofílico permitiendo así la formación de un intermediario acil-enzima.



**Figura 3. Loop Catalítico.** Representación del *loop* N $\beta$ 3-N $\alpha$ 3 de una tiolasa, donde el motivo-Cys-x-Ser contiene al residuo de cisteína conservado que participa en la formación de un intermediario acil-enzima. Los elementos de la estructura secundaria se presentan sobre la estructura primaria, y se indican como: Flecha, tercera sábana  $\beta$  N-terminal (N $\beta$ 3); Cilindro, tercera hélice  $\alpha$  N-terminal (N $\alpha$ 3). N $\beta$ 3 y

Nα3 son conectados mediante un *loop* en el que se localizaría el motivo-Cys-x-Ser (en negritas).

Para que la cisteína genere el ataque nucleofílico, ésta debe ser activada por el residuo de histidina del motivo-GHP (Gly-His-Pro) presente en el *loop* Cβ3-Cα3. Una segunda cisteína involucrada en el sitio catalítico se encuentra en el motivo-CxG (Cys-x-Gly) del *loop* Cβ4-Cβ5 y previamente activada, actúa mediante ataque nucleofílico sobre el segundo sustrato (un acetil-CoA en la dirección de biosíntesis) activándolo para que éste realice un ataque nucleofílico sobre el primer sustrato presente en el intermediario acil-enzima, liberándolo de la enzima y aconteciendo la condensación reflejada en un nuevo enlace C-C (acetoacetil-CoA) (Modis y Wierenga; 1999; Haapalainen y col., 2006). No todas las tiolasas cuentan con esta segunda cisteína, como es el caso de las SCP2 (*sterol carrier protein*) (Anbazhagan y col., 2014). Un cuarto *loop* corresponde al *loop* Cβ2-Cα2 que incluye al motivo-NEAF (Asn-Glu-Ala-Phe), el cual cambia a HDCF (His-Asp-Cys-Phe) en las tiolasas SCP2 y a HEAF (His-Glu-Ala-Phe) en las tiolasas TFE (*mitochondrial trifunctional enzyme thiolase*), donde el primer residuo de estos motivos cumpliría un rol estabilizando al sustrato (Anbazhagan y col., 2014).

La regulación de los genes *ERG*, que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de ergosterol y donde el gen *ERG10* de *S. cerevisiae* codifica una acetoacetil-CoA tiolasa, ha sido estudiada. Las reacciones enzimáticas han sido definidas por la identificación de mutaciones "*erg*" por sus defectos en la biosíntesis de ergosterol (Sturley., 2000). Elementos de promotores de ciertos genes *ERG* han sido identificados, y en particular se ha descrito que la regulación de la transcripción del gen *ERG10* de la levadura *S. cerevisiae* es mediada por los niveles de esteroides (Dimster-

Denk y Rine., 1996), sugiriendo que la regulación de este gen ocurriría a nivel transcripcional y sería mediada por intermediarios de la ruta de biosíntesis de esteroides (Dixon y col., 1997), tal como se ha documentado para HMGR. En esta levadura se ha demostrado que cuando los niveles de ergosterol son bajos, incrementan las actividades enzimáticas de varias enzimas, tales como la acetoacetil-CoA tiolasa y HMGS (Leber y col., 2001).

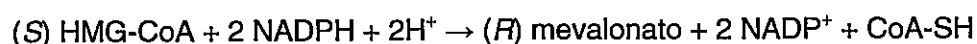
En *X. dendrorhous* se sobreexpresó el gen que posiblemente codifica a una acetoacetil-CoA tiolasa. Se describió que el crecimiento celular alcanzado era igual al de la cepa control, mientras que el contenido intracelular de astaxantina era levemente mayor (Hara y col., 2014). Sin embargo, el gen sobreexpresado correspondería a sólo una de las posibles tiolasas identificadas en nuestro laboratorio (particularmente, tiolasa B codificada por el gen *ERG10 B*). Por otra parte, resultados de nuestro laboratorio (Werner., 2015) han mostrado que la delección del gen *ERG10 A*, segundo gen identificado y codificante de la tiolasa A, afecta la cantidad/composición de carotenoides. Lo cual sugiere la posible participación del gen *ERG10 A* en la ruta del MVA de *X. dendrorhous*.

### **HMGR**

La enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa o HMGR), participa del tercer paso catalítico de la ruta del MVA. Es una enzima altamente conservada, con secuencias homólogas en eucariotas, bacterias y arqueas (Burg y Espenshade., 2011). El número de genes que codifica a la enzima HMGR depende del organismo o de la especie. Animales, arqueas y bacterias sólo tienen un gen *HMGR*, mientras que en plantas se ha postulado al menos tres genes que



codifican diferentes isoenzimas (Croxen y col., 1994; Andrade-Pavón y col., 2014). La levadura *S. cerevisiae* posee dos isoenzimas, Hmg1p y Hmg2p, codificadas por dos genes diferentes *HMG1* y *HMG2* (donde cualquiera de las dos puede suministrar la actividad esencial de HMGR cuando una de ellas es suprimida) (Croxen y col., 1994; Hampton y Rine., 1994; Friesen y Rodwell., 2004; Burg y Espenshade., 2011). La HMGR cataliza la conversión de 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (HMG-CoA) a mevalonato, una reacción de oxido-reducción que es un paso limitante en la síntesis de colesterol en mamíferos y de ergosterol y otros isoprenoides en hongos (Friesen y Rodwell., 2004; Andrade-Pavón y col., 2014). La reacción catalizada por HMGR (EC 1.1.1.34) (Andrade-Pavón y col., 2014; Burg y Espenshade., 2011; Miziorko., 2011) es:



En condiciones fisiológicas, la reacción es efectivamente irreversible a pesar que las enzimas catalizan la reacción en ambas direcciones *in vitro* (Ma y col., 2011). La catálisis tiene lugar en dos transferencias secuenciales de hidruro de NADPH, donde el HMG-CoA se reduce a mevalonato. Este último proporciona IPP y DMAPP, la primera unidad de isopreno.

Los análisis filogenéticos han revelado dos clases de HMGR, Clase I y Clase II. La Clase I se encuentra en eucariotas y utilizan NADPH como dador de electrones, mientras que las enzimas de la Clase II se encuentran principalmente en bacterias y utilizan NADH como dador de electrones (Burg y Espenshade., 2011; Ma y col., 2011; Hedl y col., 2004). Las HMGRs presentes en arqueas varían ampliamente en secuencia respecto a las enzimas de ambas clases. Las HMGRs eucariotas, son

proteínas integrales de membrana residentes en el retículo endoplasmático (Croxen y col., 1994; Burg y Espenshade., 2011), poseen un dominio N-terminal que contiene entre 2 y 8 segmentos de transmembrana (e incluye un SSD, *sterol sensing domain*), el cual puede unir lípidos y juega un rol importante en la regulación de HMGR y un dominio C-terminal catalítico en el citoplasma altamente conservado (Croxen y col., 1994; Hedl y col., 2004; Burg y Espenshade., 2011; Andrade-Pavón y col., 2014). Por otro lado, las HMGRs procariotas son solubles y citoplasmáticas.

La expresión del gen *HMGR* es altamente regulada en diferentes niveles que incluyen la transcripción, traducción, modificación post-traducciona l y degradación proteica (Dimster-Denk y col., 1994; Burg y col., 2008; Andrade-Pavón y col., 2014). En mamíferos se ha informado que tanto la degradación de HMGR como la transcripción del gen *HMGR*, es regulada por la concentración de esteroides. El mecanismo de degradación de HMGR en el RE (retículo endoplásmico) es conservado en mamíferos y levaduras (Hampton y col., 1996; Hampton y Bhakta., 1997; Gardner y Hampton., 1999) y está sujeto a regulación por *feedback* por la ruta del MVA como parte de la regulación de la síntesis de esteroides: un alto flujo a través de la ruta del MVA resulta en una alta velocidad de degradación de HMGR, mientras que un flujo menor, resulta en una lenta degradación de ella (Hampton y col., 1996). Cuando existen bajos niveles de colesterol, la transcripción del gen *HMGR* es estimulada por el factor de transcripción SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*) (DeBose-Boyd., 2008; Burg y Espenshade., 2011; Tsai y col., 2012).

En *X. dendrorhous* se ha observado que la disrupción del gen *CYP61*, involucrado en la síntesis de ergosterol, impide la biosíntesis de ergosterol y provoca la acumulación de otros esteroides como ergosta-5,8,22-trien-3-ol y ergosta-5,8-dien-3-ol



(Loto y col., 2012). En estos mutantes ocurre un aumento en los niveles de transcritos del gen *HMGR*, sugiriendo que el ergosterol regula su expresión por un mecanismo de *feedback* negativo. Además de la alteración del contenido y composición de los esteroides, en los mutantes *cyp61* aumenta significativamente el contenido de carotenoides, sugiriendo que la ausencia de ergosterol favorece la biosíntesis de carotenoides (Loto y col., 2012). Lo anterior también se apoya con observaciones en mutantes *cyp51*-, gen que también codifica una enzima involucrada en la síntesis de ergosterol (Leiva y col., 2015). Si bien en estos últimos mutantes la composición de esteroides no cambia, si disminuye el contenido de ergosterol y aumenta el contenido de carotenoides acompañado de un aumento en los niveles de transcritos del gen *HMGR*, apoyando los resultados que afirman que la reducción de la producción de esteroides favorece la producción de carotenoides (Leiva y col., 2015).

En el Laboratorio de Genética se identificó y caracterizó el gen *HMGR* que codificaría a la enzima HMGR de *X. dendrorhous*, donde a partir de un ORF de 3.276 pb se dedujo una proteína de 1.091 aminoácidos (115,9 kDa). En ésta se identificó el dominio conservado SSD, el cual es el dominio catalítico de la enzima (Loto., 2015). La funcionalidad del gen *HMGR* se evaluó mediante estrategias que consistieron en relacionar los niveles de transcrito del gen *HMGR* con la producción de carotenoides y en evaluar el efecto de la delección del gen *HMGR* en *X. dendrorhous*. También se analizó la expresión del fragmento del gen que codifica el dominio catalítico de HMGR en una cepa de *S. cerevisiae* recombinante productora de carotenoides. Los resultados demostraron que en *X. dendrorhous*, el máximo nivel de transcrito de *HMGR* está relacionado con el inicio de la producción de carotenoides lo que ocurre en la fase estacionaria de crecimiento y se sugirió que dicho gen es esencial, pues no se logró

obtener mutantes homocigotos de delección. Por otro lado, la expresión de la porción del gen que codifica el dominio catalítico de la HMGR de *X. dendrorhous* en la cepa de *S. cerevisiae* recombinante, favoreció la producción de carotenoides y esteroides. Aunque esta levadura posee dos genes diferentes *HMG1* y *HMG2*, este resultado se atribuyó a la sobreexpresión de este fragmento de gen, ya que es una expresión desregulada de éste en *S. cerevisiae*. En otro estudio reciente, se sobreexpresó el gen *HMGR* en *X. dendrorhous*, y se informó que el crecimiento celular alcanzado y el contenido de astaxantina (en mg/g-células) era mayor que la cepa control luego de 72 h de cultivo (Hara y col., 2014).

Con los antecedentes anteriores, resulta interesante sobreexpresar, en la levadura *X. dendrorhous*, genes involucrados en la ruta del MVA como los posibles homólogos de la enzima acetoacetil-CoA tiolasa y sólo el dominio catalítico de HMGR, para determinar el efecto del aumento de los niveles de transcrito de estos genes en la ruta que abastece de precursores a las rutas de biosíntesis de carotenoides y de esteroides. Con particular interés en la sobreexpresión de los genes que codifican a las tiolasas A y B, puesto que actualmente se desconoce si ambas enzimas estarían involucradas en la ruta del MVA. Los antecedentes sobre la existencia de dos diferentes actividades enzimáticas por parte de las tiolasas (acetoacetil-CoA tiolasa y 3-cetoacil-CoA tiolasa), sumado a su localización sub-celular en diferentes compartimentos (citoplasma, mitocondria, peroxisomas), generan el interés en determinar cuál de las dos posibles genes identificados en nuestro laboratorio, *ERG10 A* y *ERG10 B*, codifica a una tiolasa que estaría involucrada en la ruta del MVA de *X. dendrorhous*.

**Hipótesis:**

La sobreexpresión de los genes que codifican las enzimas acetoacetyl-CoA tiolasa y HMG-CoA reductasa de la ruta del MVA, afectará el contenido y/o composición de carotenoides y esteroides en *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

**Objetivo General:**

Evaluar el efecto de la sobreexpresión de los genes *ERG10 A*, *ERG10 B* y *tHMGR* (fragmento del gen que codifica el dominio catalítico de la HMG-CoA reductasa) en la producción/composición de carotenoides y esteroides en la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

**Objetivos específicos:**

1. Analizar bioinformáticamente las secuencias génicas y aminoacídicas deducidas de los genes *ERG10 A* y *ERG10 B*.
2. Construir módulos de expresión de los genes de las enzimas: tiolasa (*ERG10 A* y *ERG10 B*) y el dominio catalítico de la HMG-CoA reductasa de la ruta del MVA en el vector pXdVexp2, y transformar a la levadura *X. dendrorhous*.
3. Analizar la expresión de los genes que codifican estas enzimas por RT-qPCR, y evaluar el contenido/composición de carotenoides y esteroides por RP-HPLC en las cepas mutantes de *X. dendrorhous* generadas en 2.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Materiales

#### 1.1. Microorganismos y condiciones de cultivo

##### 1.1.1 Bacterias

Para los experimentos de clonamiento se utilizó la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* (Sambrook y col., 2001), la cual se cultivó en medio Luria Bertani (LB) (triptona 1 %, extracto de levadura 0,5 %, NaCl 0,5 %) con agitación constante a 37°C. Para la selección de colonias transformantes, se utilizó medio LB semi-sólido (agar 1,5 %) suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/ml).

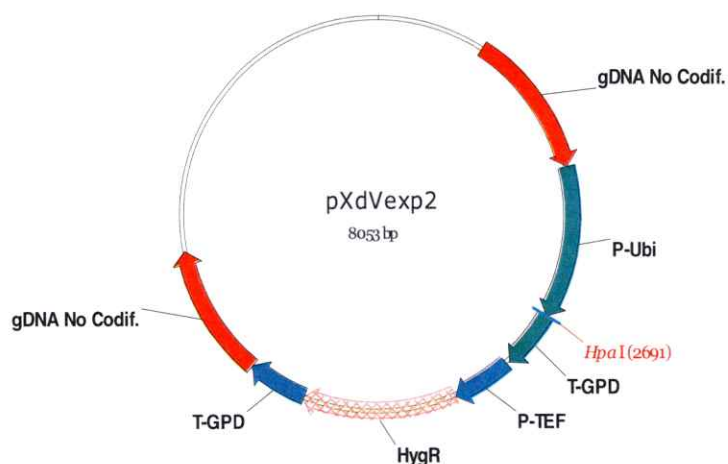
##### 1.1.2 Levadura

Para los experimentos de transformación por recombinación homóloga, se utilizó la cepa silvestre de *X. dendrorhous* ATCC 24230 (UCD 67-385), la cual se cultivó en medio YM (extracto de levadura 0,3 %, extracto de malta 0,3 %, bactopectona 0,5 %) suplementado con glucosa 1 %, en agitación constante a 22°C. Para la selección de colonias transformantes, se utilizó medio YM sólido suplementado con higromicina B (15  $\mu$ g/ml).

#### 1.2 Plásmidos, cepas, enzimas y ácidos nucleicos

Los plásmidos y cepas utilizadas y generadas en este trabajo se describen en la Tabla 1 y Tabla 2, respectivamente. Dentro de los plásmidos usados, se destaca el vector de expresión pXdVexp2, el cual se creó en el Laboratorio de Genética (Figura 4)

y se utilizó en un trabajo anterior para sobreexpresar los genes *FPS* y *crtE* de *X. dendrorhous* (Alcaíno y col., 2014). En esta ocasión, este plásmido se utilizó para sobreexpresar genes de enzimas de la ruta del MVA.



**Figura 4. Vector pXdVexp2 de expresión en *X. dendrorhous*.** Plásmido pBlueScript portador del promotor del gen de ubiquitina (P-Ubi) y del terminador del gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (T-GPD) de *X. dendrorhous*. Presenta un módulo de resistencia a higromicina (HygR), donde el gen *hph* se encuentra río abajo del promotor del gen *TEF-1α* (P-TEF) y río arriba del terminador T-GPD. Las regiones flanqueantes de DNA genómico no codificante (gDNA No Codif.) permiten la integración de la construcción mediante recombinación homóloga en el genoma de *X. dendrorhous*, específicamente en el *locus int* (Genbank: KJ140286), el cual representa una región de DNA no codificante que no revela un nuevo fenotipo evidente cuando es interrumpido. El sitio de restricción *HpaI* permite la integración del cDNA a expresar entre P-Ubi y T-GDP (Alcaíno y col., 2014).

Los partidores utilizados en las reacciones de PCR se indican en la Tabla 3 y fueron sintetizados por *Integrated DNA Technologies*. Las enzimas usadas en este trabajo fueron: DNA ligasa T4, endonucleasas de restricción, transcriptasa reversa Maxima, *PfuUltraII Fusion HS* DNA polimerasa, *Taq* DNA polimerasa, DNasa I, y RNasa A, *T4 polynucleotide Kinase*, *FastAP Thermosensitive alkaline phosphatase*, obtenidas desde Agilent Technologies, ThermoScientific y Life Technologies, y

utilizadas de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Los ácidos nucleicos utilizados incluyen los marcadores de peso molecular Lambda DNA/*Hind*III Marker y GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder de Thermo Scientific.

**Tabla 1. Plásmidos generados y utilizados en este trabajo**

Plásmido	Descripción	Fuente
pXdVexp2	Vector de expresión de <i>X. dendrorhous</i> : Plásmido pBlueScript portador del promotor del gen de ubiquitina y del terminador del gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de <i>X. dendrorhous</i> . Presenta un módulo de expresión que contiene el gen de resistencia a higromicina y regiones flanqueantes de DNA genómico no codificante que permiten la integración de la construcción en el genoma de <i>X. dendrorhous</i> .	Alcaíno y col., 2014
pXdVexp2- <i>cERG10 A</i>	Vector de expresión de <i>X. dendrorhous</i> : pXdVexp2 que contiene el cDNA del gen <i>ERG10 A</i> codificante de la enzima acetoacetil-CoA tiolasa A entre el promotor del gen de ubiquitina y el terminador del gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de <i>X. dendrorhous</i> .	Este trabajo.
pXdVexp2- <i>cERG10 B</i>	Vector de expresión de <i>X. dendrorhous</i> : pXdVexp2 que contiene el cDNA del gen <i>ERG10 B</i> codificante de la enzima acetoacetil-CoA tiolasa B entre el promotor del gen de ubiquitina y el terminador del gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de <i>X. dendrorhous</i> .	Este trabajo.
pXdVexp2- <i>cHMGR</i>	Vector de expresión de <i>X. dendrorhous</i> : pXdVexp2 que contiene el cDNA del gen <i>HMGR</i> codificante del dominio catalítico de la enzima HMG-CoA reductasa entre el promotor del gen de ubiquitina y el terminador del gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de <i>X. dendrorhous</i> .	Este trabajo.



**Tabla 2. Cepas generadas y utilizadas en este trabajo**

Cepa	Genotipo	Fuente
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	Amp <sup>s</sup>	Sambrook y col., 2001
<b><i>X. dendrorhous</i></b>		
UCD 67-385	Cepa parental (diploide e Hyg <sup>s</sup> )	ATCC 24230
385- <i>ERG10 A</i>	Transformante derivado de la cepa UCD 67-385, Hyg <sup>r</sup> . Contiene copia adicional del gen <i>ERG10 A</i> y el módulo de resistencia a higromicina B.	Este trabajo.
385- <i>ERG10 B</i>	Transformante derivado de la cepa UCD 67-385, Hyg <sup>r</sup> . Contiene copia adicional del gen <i>ERG10 B</i> y el módulo de resistencia a higromicina B.	Este trabajo.
385- <i>tHMGR</i>	Transformante derivado de la cepa UCD 67-385, Hyg <sup>r</sup> . Contiene copia adicional del dominio catalítico del gen <i>HMGR</i> y el módulo de resistencia a higromicina B.	Este trabajo.
385-pXdVexp2	Transformante derivado de la cepa UCD 67-385, Hyg <sup>r</sup> . Contiene módulo de resistencia a higromicina B.	Este trabajo

Amp<sup>s</sup> = sensible a antibiótico ampicilina; Hyg<sup>s</sup> = sensible a antibiótico higromicina B; Hyg<sup>r</sup> = resistente a antibiótico higromicina B; ATCC = *American type culture Collection*.

**Tabla 3. Partidores generados y utilizados en este trabajo.**

N°	Identificación	Secuencia (5' - 3')	Dirección
<b>Construcción de módulos de expresión de genes:</b>			
<b><i>ERG10 A</i></b>			
1	Thio1.fw/[ATG]	ATGCCATCTGGAAAGTCCAAG	D
2	Thio1.rv/[STOP]	TCACTGCTCATTACAAACACC	R
3	Erg10A-fwA	GAGAAG GTGTTTGTGACGAGT	D
4	Erg10a.antiA	CCGAACAGATGACCACATCGT	R
<b><i>ERG10 B</i></b>			
5	Thio2-atg/[ATG]	ATGTCTGCCGCCTTCCGTC	D
6	Thio2-stop/[STOP]	TTAGAGCCTCTGGATGACGAC	R
7	Thio2-Fw	TCGTCTGGATGCCGAATTGTTG	D
8	Erg10b.antiB	AGTGAAGGAGGACATGCTAGAG	R

<b>tHMGR</b>			
9	tHmgr-atg /[ATG]	ATGCAGGCCAGTCTCAGATC	D
10	Hmgr-stop /[STOP]	TCAGGCATCCACGTTCACT	R
11	Hmgr-int-rv2	TAACGGATGCTCGGGAGATAAC	R
12	Hmgr-fw	AAGAATCATCGCTGCCAGTGTG	D

**Partidores comunes en la construcción de módulos de expresión:**

13	P.ubi.fw	TCTATGGACTAAGTGTCCGACC	D
14	T.gpd.R	ATGAGAGATGACGGAGATGAT	R

**Transformación de *X. dendrorhous***

<b>Integración en zona de recombinación</b>			
15	Ext-pre-no-cod-F	GTTCTTTGCGTCCCCCAAAC	D
16	Ext-post-no-cod-R	CTGGCCCTCCTGTGGTCTGTC	R
17	Ubi-antisense	CAATGCGAGACACGTGAGAGG	R
18	HF	ATGAAAAGCCTGAACTCACC	D

<b>Módulo de resistencia a Higromicina B</b>			
19	HF	Ver nº 18	D
20	HR	CTATTCCTTTGCCCTCGGAC	R
21	P.Tef.F	ATCGGCTCATCAGCCGACAGT	F
22	T.gpd.R	Ver nº 14	R

<b>Evaluación de Heterocigosis</b>			
23	nocod_rv_post	GGTCTGGGGGTGATAGTAGATG	R
24	nocod_fw_pre	CCAAAATCCAGACGCACCCTC	F

**PCR en tiempo Real (qPCR)**

<b>ERG10 A</b>			
25	Rt_ta_F	TCCGGAAGATCTCCTGGTGGCTG	D
26	Rt_ta_R	GGACGAACACTGTCTGTTGACCG	R
<b>ERG10 B</b>			
27	Rt_tb_F	GCACGGAGTCAAGCCTATGGCCA	D
28	Rt_tb_R	CGTAGAGCGCGACATCGTCAGC	R
<b>HMGR</b>			
29	Hmgr-real-2F	GGCCGATCGCTATACATCCGTTT	D
30	Hmgr-real-2R	ATCCAGTTGATGGCAGAAGGCT	R
<b>ACT</b>			
31	mActF-RT	CCGCCCTCGTGATTGATAAC	D
32	mActR-RT	TCACCAACGTAGGAGTCCTT	R
<b>PDA1</b>			
33	Pda1_F	GGATTCTGCCACTTGACGAT	D
34	Pda1_R	TCGGCAATAACGCCCTTAC	R

D = Directo; R = Reverso.

## **2. Métodos**

La extracción de ácidos nucleicos, así como su purificación y digestión enzimática cuando correspondía, entre otras técnicas, se realizó de acuerdo a métodos estándares (Sambrook y col., 2001) e instrucciones de los proveedores, mientras que la transformación de *X. dendrorhous* incluyó protocolos adaptados y optimizados en el Laboratorio de Genética.

### **2.1 Extracción de ácidos nucleicos**

#### **2.1.1 Extracción de DNA plasmídico desde cultivos de *E. coli***

La purificación de DNA plasmídico se realizó mediante Gene JET Plasmid Miniprep Kit de acuerdo a las indicaciones del proveedor (ThermoScientific). El inserto de los plásmidos construidos en este trabajo (Tabla 1) se secuenciaron completamente (Tabla 3).

#### **2.1.2 Extracción de DNA genómico de *X. dendrorhous***

La extracción de DNA genómico de levadura se realizó mediante ruptura mecánica con perlas de vidrio (Sambrook y col., 2001). Se obtuvo un pellet celular proveniente desde un cultivo en medio sólido o líquido, se suspendió con 600 µl de buffer TE (Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM; pH 8) y 100 µl de perlas de vidrio de 0,5 mm. Se llevó al molidor de células Mini-Beadbeater-16 (BioSpec) por 3 min, se agregó 600 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1, se homogenizó en vórtex por 2 min y se centrifugó a 10.000 x g por 5 min. Se recuperó la fase acuosa, se agregó 600 µl de cloroformo: alcohol isoamílico en una proporción 24:1, se homogenizó en vórtex y se centrifugó a 10.000 x g por 5 min. Nuevamente se recuperó

la fase acuosa y el DNA se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C) incubando a -20°C por al menos 2 h. Luego se centrifugó a 10.000 x g por 10 min, se eliminó el sobrenadante por inversión y se secó a 37°C. El pellet seco se suspendió en 50 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM; pH 8) con RNasa A (34 µg/ml) y se incubó a 37°C por 30 min. El DNA se guardó a -20°C hasta su utilización.

### **2.1.3 Extracción de RNA de *X. dendrorhous***

Para la extracción de RNA, se tomó entre 10-15 ml de un cultivo de levadura y se depositó en tubos de 2 ml que luego se centrifugaron por 5 min a 14.000 x g. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se suspendió con 200 µl de buffer de lisis (acetato de Na<sup>+</sup> 0,002 M pH 5,5, SDS 0,5 %, EDTA 1mM, en agua DEPC 0,1 %), se agregó 100 µl de perlas de vidrio de 0,5 mm y se llevó al molidor de células por 3 min. Luego, se agregó 800 µl de solución TriReagent (Life Technologies), se llevó al molidor por 1 min y se incubó en hielo por 10 min. A continuación se agregó 200 µl de cloroformo, se agitó manualmente por 15 s y se incubó a temperatura ambiente por 6 min. Se centrifugó a 14.000 x g por 10 min a 4°C en centrifuga refrigerada y se recuperó la fase acuosa. Esta última se depositó en un tubo Eppendorf y se le agregó un volumen de isopropanol frío y un 0,5 volumen de buffer de precipitación (NaCl 1,2 M, citrato de Na<sup>+</sup> 0,8 M, en agua DEPC 0,1 %), se incubó 1 h a -20°C. Luego, se centrifugó por 10 min a 14.000 x g a 4°C, se eliminó el sobrenadante, se lavó el pellet con 1 ml de etanol al 70 % y se centrifugó nuevamente por 5 min. El pellet se dejó secar y se suspendió con 20 a 30 µl de agua libre de nucleasa. Finalmente, se incubó a 60°C por 10 min para completar la disolución del pellet.

## 2.2 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

La purificación de DNA a partir de geles de agarosa, se realizó mediante el método de perlas de sílica (Boyle y col., 1995). Los fragmentos de DNA se separaron por electroforesis en un gel de agarosa (0,8 %) en buffer TAE (1X). Las bandas fueron visualizadas bajo luz UV en un transiluminador, cortadas con un bisturí y depositadas en un tubo Eppendorf al cual se agregó 3 volúmenes de KI 6 M (en relación a la masa del trozo de gel en gramos). Para disolver la agarosa, se incubó a 55°C por 10 min. Luego se añadió 7 µl de *Glassmilk* (sílica), se incubó por 10 min a temperatura ambiente, se centrifugó por 10 s y se eliminó el sobrenadante. El pellet se lavó 3 veces con 500 µl de solución NewWash (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 2,5 mM, NaCl 50 mM, Etanol 50 % v/v), centrifugando por 10 s cada vez. El pellet seco se eluyó con 15-20 µl de agua estéril, se centrifugó por 10 s y el sobrenadante se depositó en un tubo Eppendorf nuevo. El DNA obtenido fue evaluado en gel de agarosa (0,8 %).

## 2.3 Digestión de DNA plasmídico y reacción de ligado

Para la creación de los módulos de expresión, el plásmido pXdVexp2 se digirió con la enzima de restricción *HpaI* en un volumen final de 20 µl que incluyó 0,5 - 1 µg de DNA plasmídico. Se incubó por el tiempo y temperatura indicado por el proveedor (ThermoScientific). La reacción de ligado entre el DNA plasmídico digerido y el DNA inserto se realizó con la enzima DNA ligasa T4 en un volumen final de 20 µl en una relación inserto-vector 5:1. Previo a la transformación de células de *E. coli* electrocompetentes, la reacción de ligado se dializó por 10 min.

## 2.4 PCR, RT-PCR y qPCR

### 2.4.1 Amplificación por PCR

Se realizaron reacciones de PCR con la enzima *Taq* DNA polimerasa para la confirmación de plásmidos, integración de fragmentos en el genoma de *X. dendrorhous*, etc. Mientras que la amplificación de los genes de las enzimas de la ruta del MVA desde cDNA, se realizó con *Pfu* DNA polimerasa.

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25  $\mu$ l que incluyó: buffer de PCR 1X (KCl 500 mM, Tris-HCl 200 mM pH 8,4), 2 mM de  $MgCl_2$ , 0,2  $\mu$ M de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 1  $\mu$ M de cada partidor, 1U de enzima y entre 10-20 ng de DNA molde; para el PCR de colonia, se suspendió una colonia en la reacción como DNA molde.

Para la amplificación se utilizó el termociclador Applied Biosystem 2720 con el siguiente programa: denaturación inicial a 94°C por 3 min (5 min para PCR de colonia), 35 ciclos de denaturación a 94°C por 30 s, *annealing* de partidores a 55°C por 30 s y la elongación a 72°C fue ajustada al tamaño del amplificado (30 s para amplificados desde cDNA  $\leq$  1 kb utilizando *Pfu* DNA polimerasa, y 3 min con *Taq* DNA polimerasa) y luego de los ciclos, se prolongó por 10 min a 72°C y finalmente la reacción se mantuvo a 4°C.

### 2.4.2 Síntesis de cDNA (RT-PCR)

Las muestras de RNA se trataron con DNasa I de acuerdo a las indicaciones del proveedor. La reacción de RT se realizó con la enzima Maxima Reverse Transcriptase (ThermoScientific) en un volumen total de 20  $\mu$ l. Se utilizó un

determinado volumen de RNA (5 µg) y se le agregó agua estéril hasta completar 11 µl. A esta mezcla se le añadió 1 µl de oligo-dT (25 µM) y se incubó a 70°C por 5 min. Luego se dejó en hielo por 3 min y se agregó 4 µl de buffer RT 5X, 1 µl de enzima, 2 µl de dNTPs (10 mM), y 1 µl de agua estéril. Se incubó a 42°C por 1 h y luego a 70°C por 10 min, dejando enfriar a 4°C. Para amplificar el cDNA de cada gen se realizó una reacción de PCR como se indica en la sección 2.4.1.

### **2.4.3 PCR en tiempo real (qPCR)**

Se utilizó la mezcla de reacción de PCR según las especificaciones del Kit SensiMix SYBR Green I (Quantance) que incluyó: 10 µl de mezcla del kit, 8 µl de agua estéril, 1 µl de cDNA y 1 µl de mezcla de partidores directo y reverso (10 µM). Los partidores que se utilizaron tenían una eficiencia mayor al 95 %, determinada en curvas estándares con un coeficiente de correlación de  $R^2 \geq 0,996$ . Las muestras se cargaron en el equipo Mx 3000P (Stratagene). Para evaluar los niveles de transcritos, los valores de Ct (*threshold cycle*) se normalizaron respecto al valor obtenido del gen ACT (Genbank: X89898.1) de *X. dendrorhous*, y se expresaron en función de las condiciones control usando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen; 2001).

## **2.5 Transformación de las cepas de *E. coli* y de *X. dendrorhous***

Se prepararon células electrocompetentes de *E. coli* y de *X. dendrorhous* para luego realizar la transformación de éstas con el DNA de interés.

### **2.5.1 Transformación de *E. coli***

Para preparar células electrocompetentes de *E. coli*, se inoculó medio LB con un cultivo de 12 h de *E. coli* DH5α y se incubó con agitación constante a 37°C hasta

alcanzar una DO entre 0,5 y 0,8 medida a 600 nm (cultivo en fase exponencial de crecimiento). Las etapas siguientes se realizaron a 4°C, manteniendo células y soluciones en hielo. Las células se colectaron por centrifugación a 10.000 x g por 5 min en centrífuga refrigerada y se lavaron dos veces, primero con 500 ml y luego con 250 ml de agua destilada estéril. El pellet celular se suspendió con 20 ml de glicerol estéril al 10 % (v/v) y nuevamente se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y se suspendió con glicerol al 10 % (v/v); la suspensión de células se fraccionó en alícuotas de 40 µl que se depositaron en tubos Eppendorf que se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Para la transformación, se descongeló una alícuota de células electrocompetentes y se le agregó DNA transformante en un volumen no mayor a 4 µl. Esta mezcla se depositó en una cubeta de electroporación de 2 mm y se electroporó utilizando el equipo BioRad Gene Pulser X Cell con las siguientes condiciones: 25 µF, 200 Ω y 2,5 kV. Las células se suspendieron con 1 ml de medio LB y se incubaron a 37°C por 1 h. Posteriormente, el cultivo se sembró en alícuotas de 75 µl, 150 µl y 225 µl en placas con medio LB suplementadas con el antibiótico ampicilina (100 µg/ml), y se incubó a 37°C hasta la aparición de colonias.

### **2.5.2 Transformación de *X. dendrorhous***

La preparación de células electrocompetentes de la cepa silvestre de *X. dendrorhous* UCD 67-385 se realizó según lo descrito por Kim y col., (1998) y Adrio y col., (1995). Se inoculó medio YM suplementado con glucosa 1 % con un cultivo de la levadura de 48 h y se incubó con agitación constante a 22°C hasta alcanzar una DO entre 2 y 4 medida a 600 nm (cultivo en fase exponencial de crecimiento). Las células



se colectaron por centrifugación a 4.000 x g por 3 min, se suspendieron con 25 ml de buffer fosfato de potasio (fosfato de potasio 50 mM pH 7, DTT 25 mM) y se incubaron a 22°C por 15 min. Luego, las etapas siguientes se realizaron a 4°C manteniendo células y soluciones en hielo. Las células se colectaron por centrifugación a 4.000 x g por 3 min y se lavaron dos veces con 25 ml de solución STM (sacarosa 270 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 1 mM). El pellet celular se suspendió con solución STM y se almacenó en hielo para su uso durante el mismo día.

La transformación de *X. dendrorhous* UCD 67-385 se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Kim y col., (1998). A una alícuota de 60 µl de células electrocompetentes se le agregó 5 µl de DNA transformante (1 µg del fragmento de DNA). Se electroporó en el equipo BioRad Gene Pulser X Cell bajo las siguientes condiciones: 125 µF, 600 Ω y 450 V. Las células se suspendieron con 1 ml de medio YM y se incubaron a 22°C por 4 h. Posteriormente, el cultivo se sembró en alícuotas de 200 µl en placas YM suplementadas con glucosa e higromicina B (15 µg/ml), y se incubó a 22°C hasta la aparición de colonias.

## **2.6 Extracción de carotenoides y esteroides, y análisis por RP-HPLC**

### **2.6.1 Extracción y análisis de carotenoides**

La extracción de carotenoides se llevó a cabo según el método de extracción con acetona (An y col., 1989). Se colectó un cultivo de levadura crecido en medio YM líquido a 22°C con agitación constante. Se centrifugó a 4.000 x g por 5 min, se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó con 10 ml de agua destilada. Luego, el pellet se suspendió con 1 ml de agua, se transfirió a un tubo de 5 ml y se agregó 500 µl de perlas de vidrio de 0,5 mm. Se llevó al molidor de células por 3 min, se agregó 1 ml de

acetona y nuevamente se llevó al molidor durante 3 min. Después se centrifugó a 4.000 x g por 5 min y se recolectó el sobrenadante. Las extracciones con acetona se repitieron hasta que el extracto celular quedara incoloro. Para cada extracción, se llevó la mezcla por 3 min al molidor, seguido por 5 min de centrifugación a 4.000 x g, recolectando el sobrenadante cada vez en el mismo tubo. Finalmente, se agregó 1/5 de volumen de éter de petróleo al tubo que contenía los sobrenadantes colectados, se mezcló y se centrifugó por 5 min a 4.000 x g. La fase superior, correspondiente al éter de petróleo con los carotenoides, se transfirió a un tubo de vidrio y se determinó la absorbancia a 474 nm para la cuantificación total de los carotenoides. Los análisis se realizaron por triplicado y los pigmentos se normalizaron respecto al peso seco de la levadura. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g pigmentos/g muestra (ppm)} = \frac{\text{vol. éter} \times A_{474} \times 100}{21 \times \text{peso seco (g)} \times c}$$

Donde: vol. éter = volumen de éter de petróleo recuperado en ml; A = absorbancia medida a 474 nm; 21 = coeficiente de extinción 1 % = 2,100 (An y col., 1989); c = cultivo utilizado en ml.

La determinación de la composición de pigmentos se realizó mediante cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC) en un equipo de HPLC con un detector de arreglo de diodos Shimadzu SPD-M10A y una columna Lichrospher RP18 125-4 (Merck). Para ello, se dejó evaporar el éter de petróleo del extracto, se suspendió con 200 µl de acetona y se inyectó 20 µl en el equipo. Como fase móvil se utilizó acetonitrilo: metanol: isopropanol en una proporción 85: 10: 5 (v/v), con un flujo

de 1 ml/min en condiciones isocráticas. Los carotenoides fueron reconocidos de acuerdo a sus tiempos de retención y espectro de absorción de acuerdo a estándares.

### 2.6.2 Extracción de esteroides

Se colectó cultivo de levadura crecido en medio YM a 22°C con agitación constante. Se centrifugó a 4.000 x g por 5 min, se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó con agua destilada. Luego, el pellet se suspendió con 16 ml de la siguiente solución: EtOH al 60 % y 4 g KOH; y se dejó en baño termo regulado (a 80°C) por 2 h. Luego, se agregó 5 ml de éter de petróleo, se mezcló bien, se centrifugó por 5 min a 4.000 x g y se recuperó la fase superior correspondiente al éter de petróleo. Este procedimiento se realizó 2 veces en total. Para la cuantificación de esteroides se midió la absorbancia a 280 nm, normalizando respecto al peso seco de la levadura. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g esteroides/g muestra} = \frac{\text{vol. éter} \times A_{280} \times 10^4}{11,900 \times \text{peso seco (g)}}$$

Dónde: vol. éter = volumen de éter de petróleo recuperado en ml;  $A_{280}$  = absorbancia medida a 280 nm; 11.900 = coeficiente de extinción molar de ergosterol en acetona en  $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;  $10^4$  = constante de conversión de unidades  $\mu\text{g/g}$ .

Para la determinación de la composición de esteroides mediante RP- HPLC, se dejó secar el éter de petróleo y se suspendió en 200  $\mu\text{l}$  de acetona. Como fase móvil se usó metanol:  $\text{H}_2\text{O}$  en proporción 97:3 (v/v), con flujo 1ml/min en condiciones isocráticas. Los esteroides fueron reconocidos de acuerdo a sus tiempos de retención y espectro de absorción de acuerdo a estándares.

## RESULTADOS

### 1. Análisis bioinformático de la secuencia de las enzimas tiolasas codificadas por los genes *ERG10 A* y *ERG10 B*.

Previamente en el Laboratorio de Genética se caracterizó el gen *HMGR* de *X. dendrorhous* (Loto., 2015). Sin embargo, también se identificó dos posibles genes que codificarían una enzima tiolasa (tiolasa A y tiolasa B) que podrían estar involucrados en la ruta del MVA en *X. dendrorhous* denominados *ERG10 A* y *ERG10 B*, respectivamente. A partir de sus secuencias genómicas y de cDNA se determinó la organización estructural de ambos genes, donde el de la tiolasa A (gen *ERG10 A*) consiste de 6 exones (84 pb, 188 pb, 58 pb, 57 pb, 234 pb y 591 pb) y 5 intrones (88 pb, 148 pb, 107 pb, 80 pb y 92 pb), mientras que su transcrito maduro es de 1.212 bases. En cambio, el gen de la tiolasa B (gen *ERG10 B*) consiste de 8 exones (99 pb, 177 pb, 218 pb, 458 pb, 185 pb, 30 pb, 90 pb y 39 pb) y 7 intrones (306 pb, 150 pb, 115 pb, 97 pb, 86 pb, 81 pb, y 81 pb), y su transcrito maduro es de 1.296 bases.

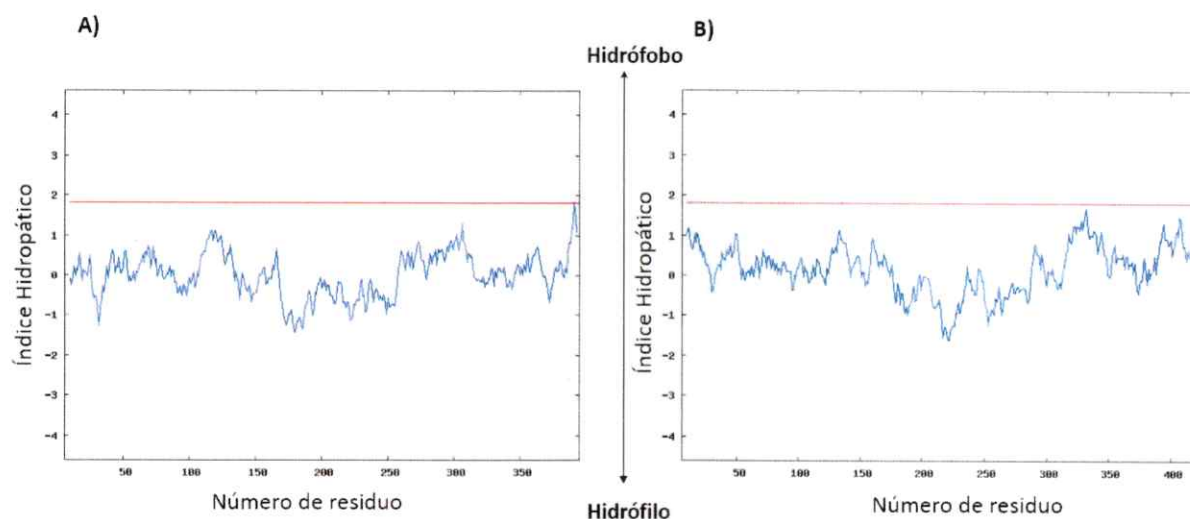
#### Análisis de la estructura primaria:

Para obtener información de las enzimas, se dedujo la secuencia aminoacídica utilizando *Translate Tool* del servidor ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>) y se determinó que los genes *ERG10 A* y *ERG10 B*, codifican proteínas de 403 y 431 aminoácidos, respectivamente. A partir de las secuencias de las proteínas deducidas, se calcularon los parámetros físicos y químicos utilizando *ProtParam Tool* del mismo servidor (<http://web.expasy.org/protparam/>). La tiolasa A tendría un peso molecular de 42,01 kDa y un pI de 7,65, mientras que la tiolasa B tendría un peso molecular de 44,38 kDa y un pI de 7,65. Además, el índice de estabilidad que se define mediante

una ecuación que considera la ocurrencia de ciertos dipéptidos en la proteína (cada dipéptido tiene un valor asignado), la longitud de ésta y análisis estadísticos (Guruprasad y col., 1990), permitió clasificar a ambas proteínas como estables, puesto que el valor obtenido (28,15 para la tiolasa A y 38,11 para la tiolasa B) fue menor a 40 (40 es el valor límite considerado entre las proteínas estables e inestables). Para calcular la vida media, la herramienta considera el aminoácido que ocupa el N-terminal, donde la presencia de metionina, glicina, prolina o valina determinan una vida media larga (Battaner., 2012). En este caso consideró metionina en ambas tiolasas, por lo tanto, la vida media estimada para ambas fue de >20 h en levaduras *in vivo*.

El gran promedio de hidropatía (*Grand Average of hydropathy*, GRAVY) definido como la suma de los valores de hidropatía de todos los aminoácidos dividido por la longitud de la cadena, permite predecir si la proteína es hidrofílica (valores negativos) o hidrofóbica (valores positivos) (Jenssen y col., 2004). El análisis se basa en la escala de hidropatía de Kyte-Doolittle donde a cada aminoácido se le asigna un valor de hidropatía que varía entre -4,5 (Arginina) y +4,5 (Isoleucina) (Kyte y Doolittle, 1982). En el caso de ambas tiolasas analizadas, los valores calculados fueron de -0,009 y 0,182 para las tiolasas A y B, respectivamente, sugiriendo la solubilidad de la tiolasa A en medio acuoso. La escala de hidropatía de Kyte-Doolittle, también permite predecir hélices transmembrana en las proteínas a través de una representación gráfica (<http://gcat.davidson.edu/rakarnik/kyte-doolittle.htm>). Al ingresar la secuencia aminoacídica de la proteína se obtiene una figura (como la Figura 5) que permite determinar posibles regiones transmembrana cuando los valores de los picos son mayores a 1,8 (línea roja horizontal en la Figura 5), al utilizar específicamente una ventana tamaño 19. El tamaño de la ventana se refiere al número de aminoácidos que

son examinados a la vez para determinar un punto de carácter hidrófobo en el gráfico, donde una ventana tamaño 19 es adecuada para examinar dominios transmembrana, pues éstos se destacan agudamente al sobrepasar el valor 1,8 del eje de las ordenadas ya que son muy hidrófobos (Kyte y Doolittle, 1982). Los resultados obtenidos sugieren que las tiolzas A y B no poseen segmentos de transmembrana.



**Figura 5. Perfil de hidropatía de las tiolzas A y B de *X. dendrorhous* en base a la escala de hidropatía de Kyte-Doolittle.** Perfiles de hidropatía de las tiolzas **A)** A y **B)** B de *X. dendrorhous*. El eje de las abscisas representa la posición de los aminoácidos, mientras que el eje de las ordenadas representa el índice de hidropatía; resultados en una ventana de tamaño 19. Los valores positivos en el eje de las ordenadas indican una región hidrofóbica en la proteína, en cambio valores negativos indican una región hidrofílica. La ausencia de picos sobre 1,8 indica que posiblemente ambas tiolzas no poseen dominios de transmembrana.

El servidor SOSUI ([http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosui\\_submit.html](http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosui_submit.html)) también predice hélices transmembrana en base al promedio de hidropatía y sus resultados indican explícitamente si la proteína es soluble o si es de membrana (indicando el número de hélices transmembrana). En concordancia con los resultados anteriores, el servidor SOSUI predijo que ambas tiolzas son solubles. Por lo tanto, los

resultados obtenidos sugieren que ambas tiolasas efectivamente son proteínas solubles no asociadas a membrana.

Posteriormente se realizó un análisis de predicción de la localización sub-celular, donde los resultados fueron variables de acuerdo al servidor que se utilizó. El servidor *PredictProtein* (<https://www.predictprotein.org/>) permite predecir localización sub-celular en los distintos dominios de la vida y la puntuación de confianza que acompaña su resultado va desde 0 (no fiable) a 100 (fiable). Al ingresar las secuencias de ambas tiolasas, la tiolasa B se localizó en el dominio Eucarionte y la localización sub-celular fue la mitocondria, con una puntuación de confianza 46. En el caso de la tiolasa A, no dio resultados. Además, para ambas tiolasas predijo que ninguna contenía una señal de localización nuclear (NLS, *Nuclear localization signal*). El servidor DISTILL (<http://distill.ucd.ie/distill/>) también predice localización sub-celular, pero a diferencia de *PredictProtein*, hace sus predicciones en los Reinos Animal, Planta y Fungi. Además, permite indicar en cuál de ellos se hará la predicción y como resultado entrega la localización sub-celular de la proteína consultada y el nivel de confianza (expresados explícitamente como bajo, medio o alto) en el Reino seleccionado. Para ambas tiolasas se seleccionó el Reino Fungi, y este servidor también predijo localización sub-celular mitocondrial para la tiolasa B con una alta confianza, mientras que la localización sub-celular para la tiolasa A fue citoplasmática con una confianza media. Se destaca que las predicciones del servidor se basan en el predictor SCLPred que no predice localización sub-celular peroxisomal. Finalmente, se utilizó PSORT II (<http://psort.hgc.jp/form2.html>), el cual es recomendado para el análisis de secuencias de proteínas animales y de levaduras; además, permite predecir localización sub-celular peroxisomal junto con otras localizaciones sub-celulares. Para

la tiolasa B encontró una posible señal de destino al peroxisoma (*peroxisomal targeting signal*, PTS) y además predijo una probabilidad menor del 50 % de localización citoplasmática o en la mitocondria. Para la tiolasa A, predijo localización citoplasmática con una probabilidad del 52,2 %.

De acuerdo con los análisis realizados, la posible localización sub-celular de la tiolasa A sería el citoplasma, mientras que para la tiolasa B sería mitocondrial o peroxisomal. Para determinar la posibilidad de localización sub-celular peroxisomal, se analizaron las secuencias de ambas tiolosas a través de un alineamiento de secuencias con tiolosas descritas como peroxisomales. Los peroxisomas poseen receptores conservados que reconocen proteínas destinadas a la matriz peroxisomal a través de sus PTS que consiste en el tripéptido SKL (o una variante conservada) en el extremo del dominio C-terminal (Grunau y col., 2009). Sin embargo, hay proteínas peroxisomales que poseen un PTS2 que consiste en un nonapéptido representado por la secuencia consenso (R/K)(L/V/I/Q)XX(L/V/I/H/Q)(L/S/G/A/K)X(H/Q)(L/A/F), la cual describiría esencialmente todas las variantes del PTS2 (Petřiv y col., 2004). La 3-cetoacil-CoA tiolasa peroxisomal (Fox3p) de *S. cerevisiae* posee un PTS2 en los primeros 16 aminoácidos, por lo tanto, las secuencias de las tiolosas A y B se alinearon con la secuencia de Fox3p para determinar la presencia del PTS2. Además, en las secuencias de las tiolosas peroxisomales se añadieron las secuencias de las tiolosas documentadas de *Yarrowia lipolytica* y *Candida tropicalis* (Berninger y col., 1993; Kanayama y col., 1998; Ueda y col., 2000; Yamagami y col., 2001) (Figura 6). Los resultados sugieren que la tiolasa B posee un PTS2, tal como lo detectó PSORT II, y en consecuencia podría ser una tiolasa con localización sub-celular en el peroxisoma, y en consecuencia, participar de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, ya que en el Reino



Fungi existen levaduras tales como *S. cerevisiae* y *C. tropicalis* donde este proceso se lleva a cabo exclusivamente en el peroxisoma (Shen y Burger., 2009). Por el contrario, en la tiolasa A no se detectó un posible PTS2 mediante alineamientos de secuencias.

Tiolasas peroxisomales	Dominio N-terminal
1. <i>H. sapiens</i>	-----MQR̄LQVVLGH̄LRG--PADSGWMPQAAPCLSGAPQASAADV 38
2. <i>R. norvegicus</i>	MSESVGRTSAMHRLQVVLGHLAG--RPSSALQAAPCSATFPQASASDV 48
3. <i>B. taurus</i>	-----MRRLQVVLGH̄LKGRPASDPE--PQATPCWSGARRASAEDV 38
4. <i>E. caballus</i>	-----MQRLQVVLGH̄LKGRPHSGPEPAPRAAPCWSSTRWPADEDV 40
5. <i>C. lupus familiaris</i>	-----MRRLQVVLGH̄LSGQPPSDGAPAPQAARCLGGAPGASADDV 40
6. <i>M. musculus</i>	-----MHRLQVVLGHLAG--RPSSALQAAPCSARFPQASASDV 38
7. <i>Y. lipolytica</i>	-----MDRLNNLATQLEQN-----P-----AKGLDAITSKNPDDV 30
8. <i>S. cerevisiae</i> (Fox3p)	-----MSQRLQSIKDHLVE-----SAMGKGESKRKNSLLEKRPEDV 36
9. <i>X. dendrorhous</i> (tiolasa B)	-----MSAAFRLTTIKIHLLP--VFSIRPSLASIRSYSMSSSFTPEV 41
10. <i>X. dendrorhous</i> (tiolasa A)	-----MSAAFRLTTIKIHLLP--VFSIRPSLASIRSYSMSSSFTPEV 41
	* * *
secuencia consenso PTS2	= (R/K) (L/V/I/Q) XX (L/V/I/H/Q) (L/S/G/A/K) X (H/Q) (L/A/F)

**Figura 6. Alineamiento múltiple de secuencias de tiolasas peroxisomales.** Se seleccionaron secuencias de tiolasas peroxisomales de distintos organismos y se realizó un alineamiento múltiple de secuencias utilizando ClustalW2 junto a las secuencias de las tiolasas A y B de *X. dendrorhous*. Los asteriscos destacan los residuos conservados en tiolasas peroxisomales diméricas (Mathieu y col., 1997) y son indicados en azul en la secuencia consenso que forma el PTS2. Además, en la primera y segunda secuencia, correspondientes a *H. sapiens* y *R. norvegicus*, se indica en rojo un residuo de cisteína, ya que posterior a él se ha reportado un sitio de corte, ausente en la tiolasa de *S. cerevisiae* (Glover y col., 1994). Como en la tiolasa de *R. norvegicus* la secuencia consenso se obtuvo entre los 23 primeros residuos del N-terminal, se analizó el N-terminal de la tiolasa A de *X. dendrorhous* hasta 25 residuos sin detectar un posible PTS2. Número de acceso: **1)** *Homo sapiens* (NP\_001598.1), **2)** *Rattus norvegicus* (NP\_036621.1), **3)** *Bos taurus* (NP\_001029491.1), **4)** *Equus caballus* (XP\_001488609.1), **5)** *Canis lupus familiaris* (XP\_534222.2), **6)** *Mus musculus* (NP\_570934.1), **7)** *Yarrowia lipolytica* (Q05493.1), **8)** *Saccharomyces cerevisiae* (CAA37472.1), **9)** *Xanthopyllomyces dendrorhous* (tiolasa B), **10)** *Xanthopyllomyces dendrorhous* (tiolasa A).

Integrando los resultados de los análisis bioinformáticos predictivos, se sugiere que la tiolasa B probablemente sea una tiolasa de peroxisoma, mientras que la tiolasa A posiblemente se localice en el citoplasma. Sin embargo, si se realizan alineamientos de a pares entre las tiolasas A y B con tiolasas de localización sub-celular en el

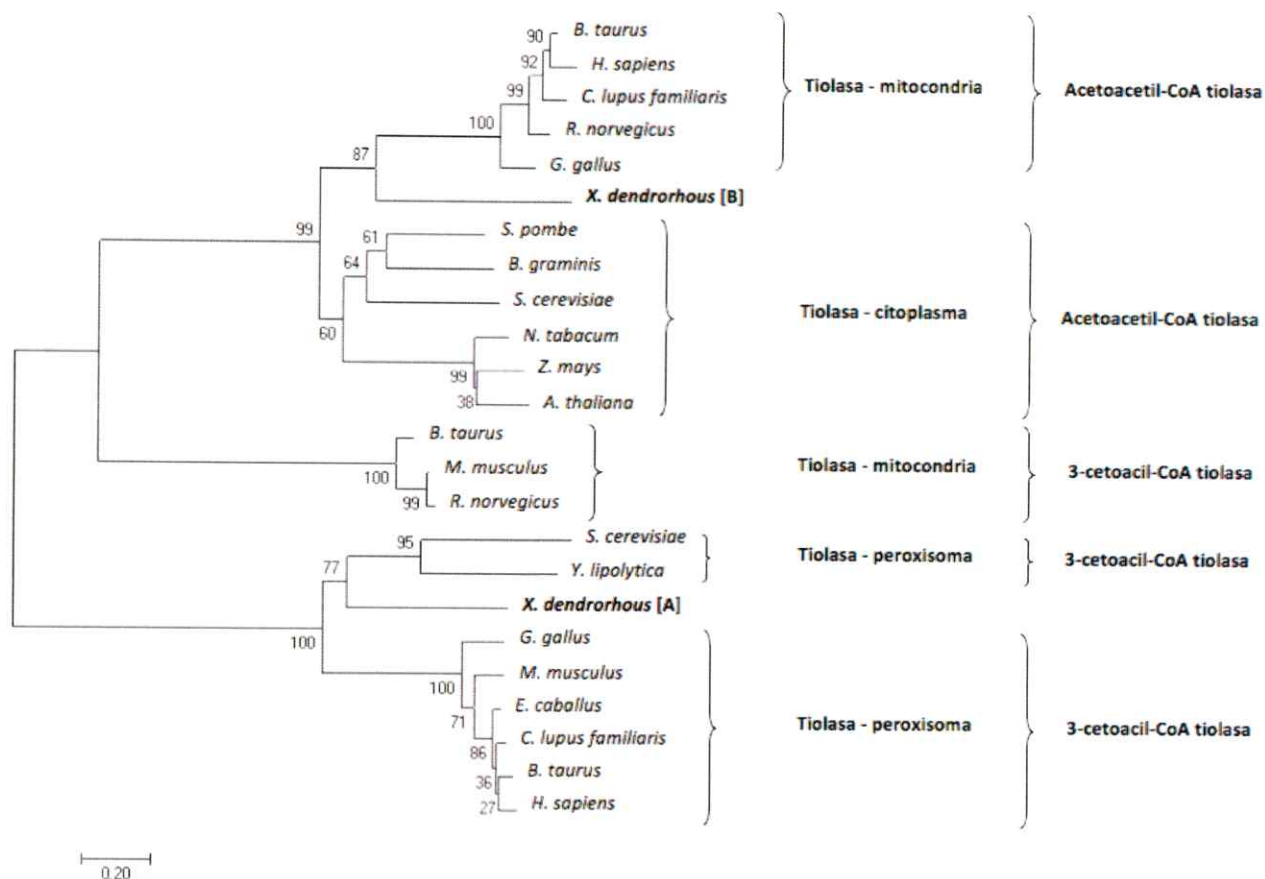
peroxisoma y en el citoplasma, los resultados obtenidos indican que la tiolasa A tiene una mayor identidad con 3-cetoacil-CoA tiolosas, es decir, tiolosas involucradas en procesos degradativos como la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, mientras que la tiolasa B tendría una mayor identidad con acetoacetyl-CoA tiolosas, enzimas involucradas en rutas de síntesis. En primer lugar es importante destacar que la estructura primaria de las tiolosas A y B es distinta, pese a que conservan los residuos aminoacídicos que las clasifican como tiolosas; ambas tiolosas solo comparten un 34 % de identidad con un 95 % de cobertura, en consecuencia podrían estar involucradas en procesos metabólicos distintos. La tiolasa A tiene un 50 % de identidad con un 98 % cobertura con la tiolasa de peroxisoma de *S. cerevisiae* (CAA37472.1), mientras que la tiolasa B, comparte un 32 % de identidad con un 98 % de cobertura con la misma enzima. Si este mismo análisis se hace respecto de la tiolasa de peroxisoma de *Y. lipolytica* (Q05493.1), el resultado es similar, ya que la tiolasa A tiene un 58 % de identidad con un 99 % cobertura con esta proteína, mientras que la tiolasa B un 32 % de identidad con un 93 % de cobertura. Por otro lado, si los análisis se hacen respecto a tiolosas de localización citoplasmática que estarían involucradas en la ruta del MVA, tales como la acetoacetyl-CoA tiolasa de *S. cerevisiae* (P41338.3) y de *S. pombe* (Q9UQW6.1), la tiolasa B tiene una mayor identidad con estas proteínas. Por ejemplo, la tiolasa B tiene un 48 % de identidad con un 91 % cobertura con la acetoacetyl-CoA tiolasa citoplasmática de *S. cerevisiae*, mientras que la tiolasa A, un 36 % de identidad con un 96 % de cobertura. De la misma forma, la tiolasa B tiene un 50 % de identidad con un 90 % cobertura con la tiolasa citoplasmática de *S. pombe*, mientras que la tiolasa A, un 37 % de identidad con un 95 % de cobertura.



### **Análisis filogenético:**

Para complementar el análisis anterior, se realizó un análisis filogenético para determinar la posible localización sub-celular de las tiolasa identificadas como A y B. Para ello se seleccionaron secuencias aminoacídicas de tiolasa en las que se ha descrito su ubicación sub-celular y especificado su función como acetoacetyl-CoA tiolasa o como 3-cetoacetyl-CoA tiolasa. Para el alineamiento múltiple se utilizó el programa ClustalW 2.1 (penalización 10,0 por apertura de *gap*, 0,20 por extensión de *gap* y retraso de divergencia del 30 %), y para crear el árbol filogenético, se usó el método *neighbor-joining* (Saitou y Nei., 1987) con un *bootstrap* de 1.000 réplicas en MEGA6 (<http://www.megasoftware.net/>).

Estos resultados indican que posiblemente la tiolasa A es una 3-cetoacetyl-CoA tiolasa, mientras que la tiolasa B una acetoacetyl-CoA tiolasa, ya que claramente en la Figura 7 ambas tiolasa se presentan en grupos distintos, sean estos el de las 3-cetoacetyl-coA tiolasa y acetoacetyl-CoA tiolasa.



**Figura 7. Árbol filogenético de tiolasa seleccionadas.** El árbol se creó usando el método neighbor-joining (Tamura y col., 2013). Los números en los nodos indican el porcentaje de respaldo para nodos específicos después de 1.000 repeticiones de análisis de *bootstrap*. Números de acceso en paréntesis. **Tiolasa mitocondria/acetoacetyl-CoA tiolasa:** *Bos Taurus* (NP\_001039540.1), *Homo sapiens* (BAA01387.1), *Canis lupus familiaris* (XP\_546539.2), *Rattus norvegicus* (NP\_058771.2), *Gallus gallus* (NP\_001264708.1). **Tiolasa citoplasma/acetoacetyl-CoA tiolasa:** *Schizosaccharomyces pombe* (Q9UQW6.1), *Blumeria graminis f. sp. tritici* 96224 (EPQ61678.1), *Saccharomyces cerevisiae* (P41338.3), *Nicotiana tabacum* (AAU95618.1), *Zea mays* (NP\_001266315.1), *Arabidopsis thaliana* (Q9FIK7.1). **Tiolasa mitocondria/3-cetoacil-CoA tiolasa:** *Bos taurus* (NP\_001030419.1), *Mus musculus* (NP\_803421.1), *Rattus norvegicus* (NP\_569117.1). **Tiolasa peroxisoma/3-cetoacil-CoA tiolasa:** *Saccharomyces cerevisiae* (CAA37472.1), *Yarrowia lipolytica* (Q05493.1), *Gallus gallus* (NP\_001184217.1), *Mus musculus* (NP\_570934.1), *Equus caballus* (XP\_001488609.1), *Canis lupus familiaris* (XP\_534222.2). *Bos taurus* (NP\_001029491.1), *Homo sapiens* (NP\_001598.1). *Xanthophyllomyces dendrorhous* [A]: tiolasa A. *Xanthophyllomyces dendrorhous* [B]: tiolasa B.

Posteriormente, para buscar posibles patrones y motivos conservados que son regiones en una secuencia aminoacídica que tiende a corresponderse con elementos estructurales y/o funcionales de una proteína (Elena y Codoñer., 2007), las secuencias de las tiolases se analizaron con la herramienta *ScanProsite* (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>) que permite barrer la secuencia de una proteína contra la base de datos de PROSITE que almacena motivos conservados a partir de alineamientos múltiples.

Al ingresar ambas secuencias aminoacídicas (tiolases A y B), la herramienta detectó tres patrones característicos de las tiolases, identificados por los códigos PS00098, PS00737 y PS00099 (Tabla 4). Un patrón permite caracterizar motivos e indicar qué posiciones de los residuos son más importantes y cuáles pueden variar. PROSITE entrega estos patrones en códigos y su lógica es que cualquier proteína que posea uno de estos patrones deberá desempeñar una función relacionada. Suponiendo lo último, las tiolases pueden ser reconocidas por cualquiera de estos tres patrones, ya que son una familia bien definida (Modis y Wierenga., 1999). *ScanProsite* detectó los tres patrones en la tiolasa B, pero en la tiolasa A, sólo identificó a los patrones PS00098 y PS00737. Los patrones consensos obtenidos se presentan en la Tabla 4.

**Tabla 4. Patrones conservados detectados por *ScanProsite* en la Tiolasa A y Tiolasa B de *X. dendrorhous*.**

---

**Código del patrón:** PS00098

**Identificación del patrón:** "*Thiolases acyl-enzyme intermediate signature*"

**Tiolasa:** Identificado en tiolasa A y B

**Patrón consenso:**

[LIVM]-[NST]-{T}-x-**C**-[SAGLI]-[ST]-[SAG]-[LIVMFYNS]-x-[STAG]-[LIVM]-x(6)-[LIVM]

---

**Código del patrón:** PS00737

**Identificación del patrón:** "*Thiolases signature 2*"

**Tiolasa:** Identificado en tiolasa A y B

**Patrón consenso:**

N-x(2)-G(2)-x-[LIVM]-[SA]-x-G-**H**-P-x-[GAS]-x-[ST]-G

---

**Código del patrón:** PS00099

**Identificación del patrón:** "*Thiolases active site*"

**Tiolasa:** Identificado en tiolasa B.

**Patrón consenso:**

[AG]-[LIVMA]-[STAGCLIVM]-[STAG]-[LIVMA]-**C**-[Q]-[AG]-x-[AG]-x-[AG]-x-[SAG]

---

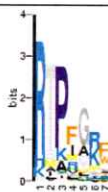



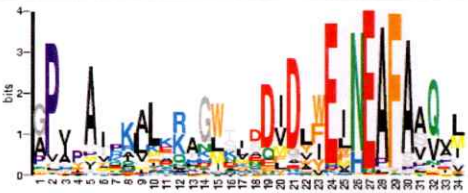
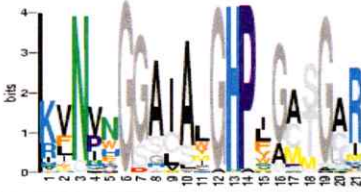
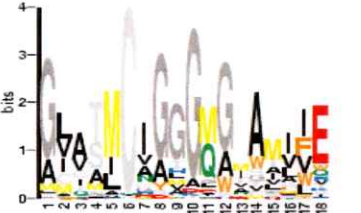
Se indican los patrones detectados en la tiolasa A y/o tiolasa B. En los patrones consenso se indica en rojo los residuos conservados e involucrados en el sitio catalítico de las tiolosas. Residuos entre corchetes indica que cualquiera de ellos puede ocupar la posición, residuos entre llaves son aquellos no aceptados en la posición, "-" es un separador de elementos en el patrón, "-x-" indica que cualquier residuo puede ocupar la posición, x(6) indica cualquier residuo repetido 6 veces. Residuos sin estas características e indicados en rojo son altamente conservados.

Para comprobar la presencia del patrón PS00099 en la tiolasa A, en especial el motivo-CxG portador de la cisteína activadora del segundo sustrato en la reacción, se utilizó otra base de datos para buscar motivos conservados en la proteína. En este caso se utilizó BLOCKS (<http://blocks.fhcrc.org/blocks/>) que almacena segmentos (bloques) muy conservados de alineamientos múltiples de proteínas sin *gaps*. La herramienta *Block Searcher* compara la proteína con la base de datos y busca las regiones más altamente conservadas en grupos de proteínas documentadas en la base de datos InterPro. Al ingresar la secuencia aminoacídica de la tiolasa A, la herramienta detectó 7 bloques utilizando el código IPR002155 de InterPro que identifica a la familia de tiolosas. Uno de los bloques detectado contiene el motivo-CxG (presente en el patrón PS00099 de *ScanProsite*), confirmando su presencia en la tiolasa A. Paralelamente, también se ingresó la secuencia de la tiolasa B, y se detectaron 6 de

los 7 bloques indicados para la tiolasa A al utilizar el mismo código IPR002155 de InterPro.

Una forma de representar un bloque es a través de un logotipo que es una representación gráfica de las secuencias alineadas, donde el tamaño de cada residuo es proporcional a su frecuencia en la posición que ocupa y el color se relaciona con sus características fisicoquímicas (Schneider y Stephens., 1990). En la Tabla 5, se representan gráficamente los 7 bloques en logotipos y se destaca en ellos los residuos aminoacídicos presente en los motivos pertenecientes al posible sitio catalítico de las tiolasas A y B.

**Tabla 5. Alineamiento múltiple esquematizado en logotipos, donde cada uno representa a uno de los 7 bloques identificados por BLOCKS.**

Bloques	Logotipo	Residuos aminoacídicos	
		Tiolasa A	Tiolasa B
<b>Bloque 1</b>		(23-29)	ND
<b>Bloque 2</b> Motivo-CxS (PS00098 de ScanProsite)		(75-119) <b>Cys-101</b>	(99-143) <b>Cys-125</b>
<b>Bloque 3</b>		(161-206)	(198-243)
<b>Bloque 4</b>		(226-258)	(256-288)
<b>Bloque 5</b> Motivo-NEAF		(301-334) <b>Asn-326</b>	(332-365) <b>Asn-357</b>
<b>Bloque 6</b> Motivo-GHP (PS00737 de ScanProsite)		(346-366) <b>His-358</b>	(377-397) <b>His-389</b>
<b>Bloque 7</b> Motivo-CxG (PS00099 de ScanProsite)		(383-400) <b>Cys-388</b>	(412-429) <b>Cys-417</b>

ND: No detectado. Números entre paréntesis indican el rango de residuos en donde BLOCKS detectó cada bloque en las tiolasa A y B. En la columna residuos aminoacídicos: en rojo los residuos conservados del sitio activo, y en azul el residuo asparagina del motivo NEAF detectado en algunas tiolasa.



En el bloque 5 de la Tabla 5 se destaca el motivo-NEAF, el cual tiene alta probabilidad de ocurrencia en esa posición, pero se puede apreciar en el logotipo que existen otros residuos en esa posición con una menor probabilidad. Esto último está relacionado con las secuencias que utilizó BLOCKS del alineamiento múltiple, ya que existen tiolasa que poseen el motivo-HEAF y otras el motivo-NEAF, además de los residuos conservados del sitio catalítico. En la Figura 8, se destaca que las tiolasa A y B poseen el motivo-NEAF, representado por Asn-326 en la tiolasa A y Asn-357 en la tiolasa B. Además, en la misma figura se destacan los residuos pertenecientes al sitio catalítico de las tiolasa en comparación con la tiolasa biosintética mejor caracterizada de la bacteria *Zoogloea ramigera*.

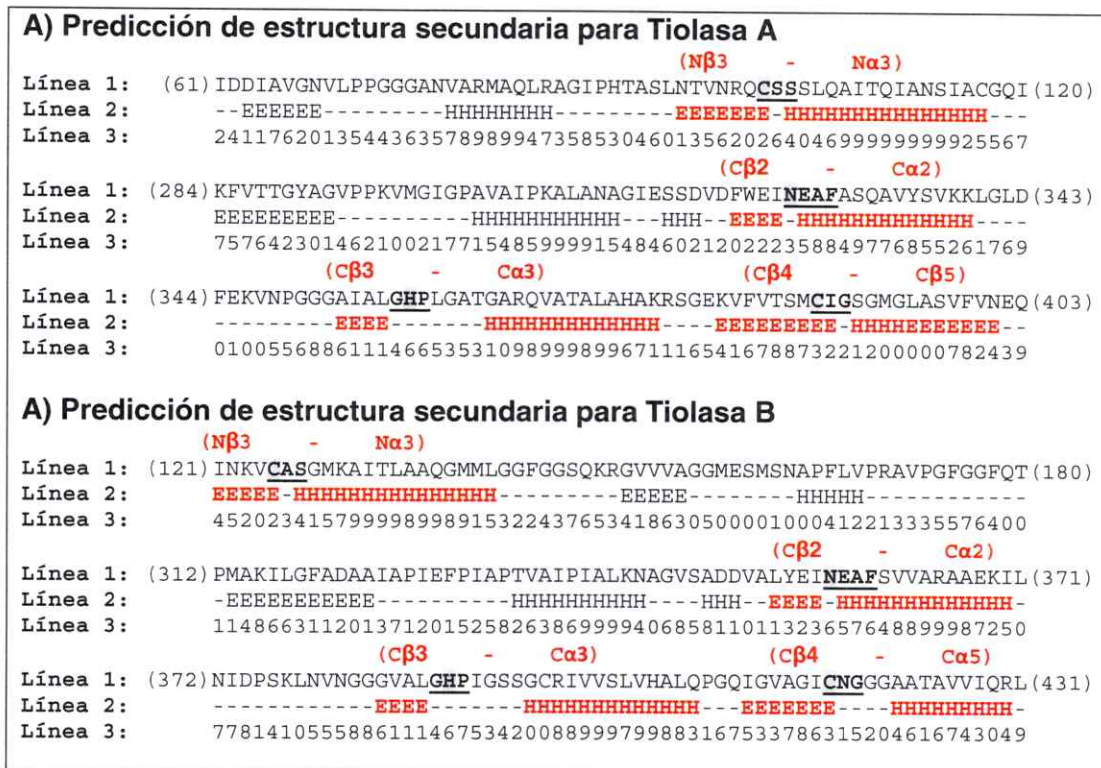
X. d [A]	1	-----MPSGKSKILQKNANDVVICSAVRTPI	TRARKGGLK	35	
X. d [B]	1	MSAAFRLTTIKIHLLPVFSIRPSLASIRSYSSM	SFFTPQEVFIVSAVRTPIG-TLNGALK	59	
Z. r	1	-----MSTPS-----	IVIASARTAVG-SFNGAFA	23	
X. d [A]	36	DTLPEDLLVAVFKATLERSKVDPSLIDDI	AVGNVLP	PPGGANVARMAQLRAGIPHTASLN	95
X. d [B]	60	SQTGVQLGTTAVKAAISRAGIEPSAVEELY	MGQVIQAGAGQSPARQVALAAGCEASTDST	119	
Z. r	24	NTPAHEL	GATVISAVLERAGVAAGEVNEVILGQVLPAGEGQNP	ARQAAMKAGVPQEATAW	83
X. d [A]	96	TVNRQ	CSSSLQAITQIANSIACG-----QISIGIGAGVESMT-----	THYGAGV-LPEK	143 [Cys-101]
X. d [B]	120	TINKV	CASGMKAITLAAQGMMLGGFGGSQKRGVVVAGGMESMSNAPFLVPR-AVPGFGGF	178	[Cys-125]
Z. r	84	GMNQL	CGSGLRAVALGMQIATG-----DASII	VAGGMESMSMAPHCAHLAGGVKMGDF	137 [Cys-89]
X. d [A]	144	ISEDVLSNQEAQDVL--	IPMGITSENVAKFQVTRKEQDEFAAKSYQKAF	AARKVGHFKE	201
X. d [B]	179	QTKDSVQTDGLWDVSNFPMGNCAEHIAAKFS	ISRESQDEHALESYRRAAEAWSTGKFEA	238	
Z. r	138	KMIDTMIKDG	LTDAFYGYHMGTTAENVAKQWQLSRDEQDAFAVASQNKAEAAQKDG	RPKD	197
X. d [A]	202	EIVPVKTEIVDPKSGETKTVL	VEDEDDGIRDGMTAESLAKLKP	AFSKE-GSTHAGNASQVS	260
X. d [B]	239	EIAPV---	TLKGPKE--TVVAEDEDYKK--VIPSKVPTL	KPVFQREGGITIPANASGIN	291
Z. r	198	EIVPF---	IVKGRKGD--ITVDADEYIRHGATLDSMAKLR	PAFDKE-GTVTAGNASGLN	250
X. d [A]	261	DGAAAVLLVRRDVAEK	LKLPILGKFVTTGYAGVPPKVMGIGPAVAI	PKALANAGIESSDV	320
X. d [B]	292	DGASAVVLTG	KEVQEHGVKPMKILGFADAAIPIEFPIAPTVAI	PIALKNAGVSADDV	351
Z. r	251	DGAAAALLMSEAEASRRGI	QPLGRIVSWATVGVDPKVMGTGPI	PASRKALERAGWKIGDL	310
X. d [A]	321	DFWEI	NEAFASQAVYSVKKLGLDFEKNVPGGAI	ALGHPLGATGARQVATALAHAKRSGE	380 [Asn-326, His-358]
X. d [B]	352	ALYEI	NEAFSVVARAAEKILNIDPSKLN	VNGGVALGHPIGSSGCRIVVS-LVHALQPG-	409 [Asn-357, His-389]
Z. r	311	DLVEA	NEAFAAQACAVNKDLGWDPSIVNVNGGAI	AIGHPIGASGARILNTLLFEMKRRGA	370 [Asn-316, His-348]
X. d [A]	381	KVFTSM	CIGSGMGLASVFN	EQ 403 [Cys-388]	
X. d [B]	410	QIGVAGI	CNGGGAATA-VVIQRL	431 [Cys-417]	
Z. r	371	RKGLATL	CIGGGMVA-MCIESL	392 [Cys-378]	

**Figura 8. Alineamiento de secuencias aminoacídicas.** El alineamiento se realizó con ClustalW (2.1). Las secuencias de las tiolasa A y B de *X. dendrorhous* se

compararon con la tiolasa caracterizada de *Zoogloea ramigera* (UniProtKB/Swiss-Prot: P07097.4), donde *X.d* [A] = Tiolasa A de *X. dendrorhous*; *X.d* [B] = Tiolasa B de *X. dendrorhous*; *Z.r* = Tiolasa de *Z. ramigera*. Los residuos conservados en todas las secuencias se presentan en rojo y en corchetes su posición en la secuencia, y corresponden a Cys-89, Asn-316, His-348, Cys-378 en la tiolasa de *Z. ramigera* (Modis and Wierenga, 1999), y Cys-101, Asn-326, His-358, Cys-388 en la tiolasa A, y Cys-125, Asn-357, His-389, Cys-417 en la tiolasa B.

### **Análisis de la estructura secundaria:**

Al utilizar *PredictProtein* (<http://predictprotein.org>), se predijo que la tiolasa A está compuesta por un 36 % de hélices  $\alpha$ , 17,1 % de sabanas  $\beta$  y un 46 % de *loops*; mientras que la tiolasa B por un 39,4 % de hélices  $\alpha$ , 13,9 % de sabanas  $\beta$  y un 46,6 % de *loops*. Se utilizó la herramienta YAPSIN (<http://www.ibi.vu.nl/programs/yaspinwww/>) del servidor IBIVU para determinar la distribución de hélices  $\alpha$ , sabanas  $\beta$  y *loops* (o *coils*) en las proteínas, y además manualmente se identificó a las posibles estructuras (hélices  $\alpha$ , sabanas  $\beta$ ) donde se ha descrito que se encuentran los residuos aminoacídicos involucrados en el sitio catalítico (Anbazhagan y col., 2014). En la Figura 9 se presenta parte de la representación de estructura secundaria predicha por YAPSIN para las tiolosas A y B.



**Figura 9. Predicción de estructura secundaria para las tiolasa A y B por YAPSIN. A) Predicción para tiolasa A y B) Predicción para la tiolasa B.** La línea 1 presenta parte de la predicción de la estructura secundaria determinada en un rango de residuos aminoacídicos (números entre paréntesis), mientras que la línea 2 indica las posibles hélices  $\alpha$  (H), sábanas  $\beta$  (E) y *coils* (-) conformadas por un segmento de residuos. En la línea 3 se muestra la confianza de la predicción de 0 (baja confianza) a 9 (alta confianza). Además, se muestran las posibles hélices  $\alpha$  y sábanas  $\beta$  donde se ha descrito la existencia de los residuos en motivos conservados involucrados en el sitio catalítico (por ejemplo: C $\beta$ 4-C $\beta$ 5, residuo del motivo-CxG entre la cuarta sábana  $\beta$  del dominio C-terminal y entre la quinta  $\beta$  del dominio C-terminal). Los motivos se presentan en letra en negrita y subrayada, y en gris, el residuo involucrado en la reacción.

## **2. Construcción de vectores con módulos de expresión de los genes de la ruta del MVA y transformación de *X. dendrorhous*.**

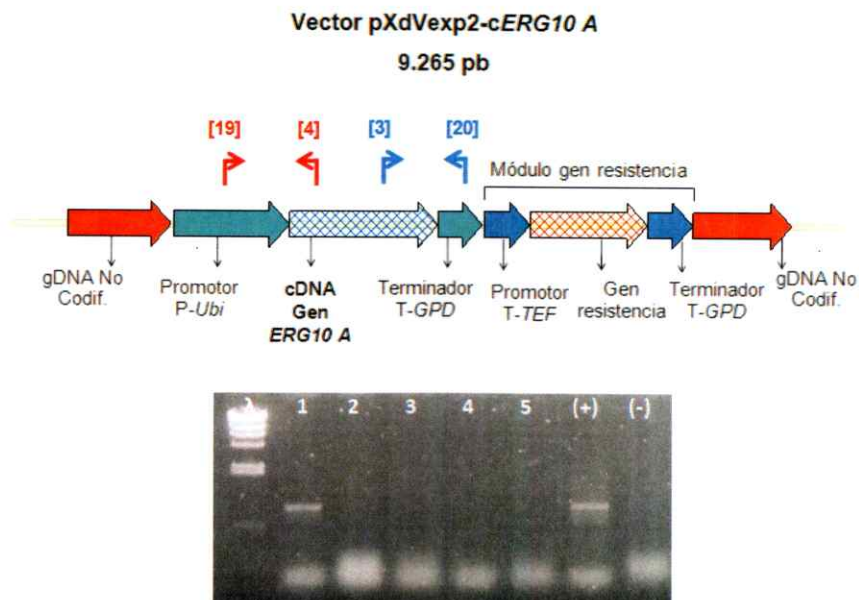
### **2.1 Construcción de vector con módulo de expresión:**

Con el objetivo de evaluar el efecto de la sobreexpresión de los genes de la ruta del MVA en *X. dendrorhous*, se construyeron módulos de expresión de los genes *ERG10 A*, *ERG10 B* y *tHMGR* (fragmento del gen que codifica el dominio catalítico de HMGR) y para ello se utilizó el vector pXdVexp2 (Alcaíno y col., 2014). Los módulos se generaron ligando el cDNA de cada gen (*ERG10 A*, *ERG10 B* y *tHMGR*) al vector, de tal forma que la expresión de cada gen quedó bajo la regulación de un promotor constitutivo (*P-Ubi*, promotor del gen de ubiquitina) y un terminador de la transcripción (*T-GPD*, terminador del gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), de genes de *X. dendrorhous*. El cDNA de cada gen se obtuvo a partir de RNA de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*.

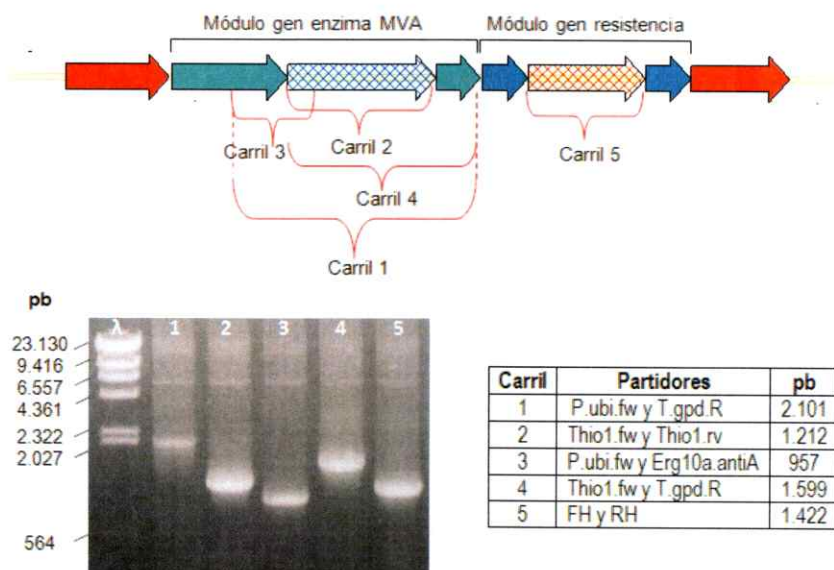
Una vez ligados el vector y cada cDNA, se utilizó la cepa de *E. coli* DH5- $\alpha$  para la replicación de éste. Se seleccionaron aquellas colonias de *E. coli* resistentes al antibiótico ampicilina y se utilizó la técnica de PCR de colonia para seleccionar a las colonias portadoras del vector con el inserto en la orientación correcta entre el promotor y el terminador. Para ello se utilizó una pareja de partidores que amplifica una región que abarca la región promotora y una región del cDNA, o en su defecto, una región del cDNA y una región del terminador. Una vez identificadas las colonias portadoras de los plásmidos diseñados (pXdVexp2-c*ERG10 A*, pXdVexp2-c*ERG10 B* y pXdVexp2-c*tHMGR*), se purificó el DNA plasmídico desde ellas y se analizó mediante PCR. Además, el inserto de los plásmidos se secuenció para confirmar que no había

errores en la secuencia. A modo de ejemplo, la Figura 10 ilustra la construcción del vector pXdVexp2-c*ERG10 A* y su análisis por PCR.

**A) Construcción de Módulo de Expresión**



**B) Vector pXdVexp2-c*ERG10 A***



**Figura 10. Construcción del vector pXdVexp2-c*ERG10 A* y su análisis. A) Vector pXdVexp2 con el módulo de expresión del gen *ERG10 A*. Representación**

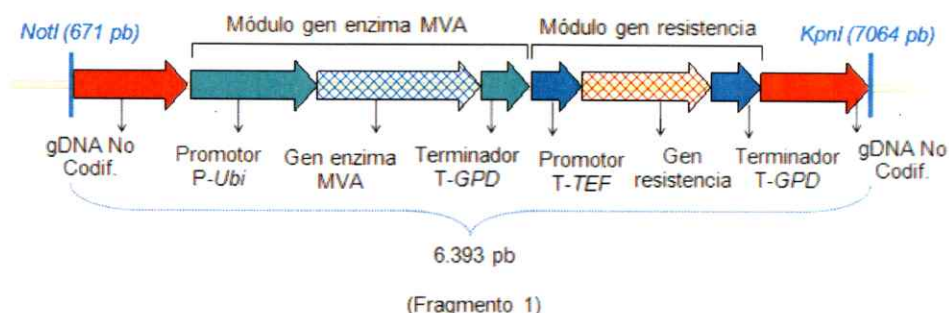
del vector pXdVexp2 ligado al cDNA del gen *ERG10 A*, conformando así el vector pXdVexp2-*cERG10 A*. Se destacan los partidores utilizados como flechas de ángulo recto (en este caso el par rojo identificados como P.ubi.fw y Erg10a.antiA), seguido de fotografía del gel de agarosa, donde se presenta el resultado de la amplificación por PCR de colonia, positivo para el vector pXdVexp2-*cERG10 A*. Carril 1: colonia positiva para la amplificación, por lo tanto, para el vector pXdVexp2-*cERG10 A*, carril "+" es el control positivo (reacción de ligado) y el carril "-" es el control negativo (sin DNA). En el esquema, el módulo de expresión del gen *ERG10 A* está representado por flechas de color verde oscuro (corresponden al promotor y terminador del gen *ERG10 A*), y por una flecha de malla azul (corresponde al gen *ERG10 A*), mientras que el módulo que confiere resistencia a higromicina B está representado por flechas azules (corresponden al promotor y terminador del gen que otorga resistencia), y por una flecha de malla anaranjada (corresponde al gen que otorga resistencia), ambos módulos se encuentran flanqueados por DNA genómico no codificante (flechas rojas), que permite la integración en el genoma de la levadura por un evento de doble recombinación homóloga. **B) Análisis del vector pXdVexp2-*cERG10 A* por PCR.** Representación del vector pXdVexp2-*cERG10 A* y en llaves rojas horizontales el fragmento que se amplificó especificado por un carril del 1 al 5 correspondientes a la imagen del gel. A la derecha de éste, se especifican los partidores utilizados y el tamaño del amplificado en cada carril.  $\lambda$ =marcador de peso molecular Lambda DNA/*HindIII* Marker.

## 2.2 Transformación de *X. dendrorhous*.

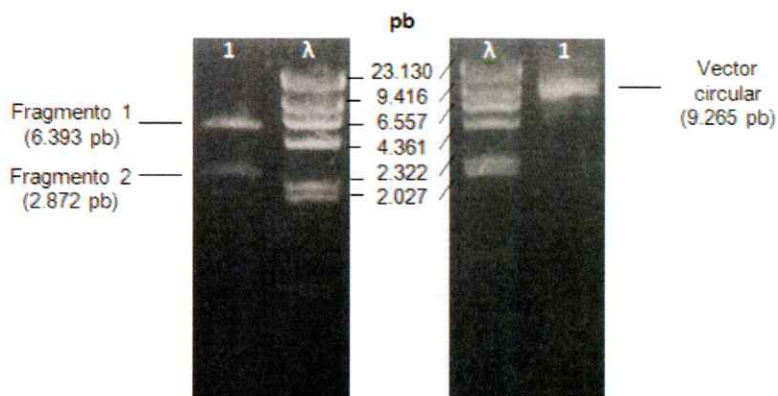
La cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous* se transformó con la digestión enzimática de cada uno de los vectores construidos (pXdVexp2-*cERG10 A*, pXdVexp2-*cERG10 B*, pXdVexp2-*CHMGR* y pXdVexp2). Los vectores se digirieron con las enzimas *NotI* y *KpnI* que permiten liberar el fragmento de DNA transformante portador del módulo de expresión del gen de la ruta del MVA y el módulo que confiere a *X. dendrorhous* resistencia a higromicina B, ambos módulos entre regiones de DNA genómico no codificante de aproximadamente 900 pb que permiten su integración en el genoma de la levadura mediante recombinación homóloga una vez en la célula. En la Figura 11, se muestra la digestión del vector pXdVexp2-*cERG10 A* y la comprobación de la reacción enzimática por análisis de electroforesis en gel; además, se destaca el fragmento portador de los módulos (fragmento 1).



### A) Representación del vector pXdVexp2-cERG10 A



### B) Digestión enzimática vector pXdVexp2-cERG10 A



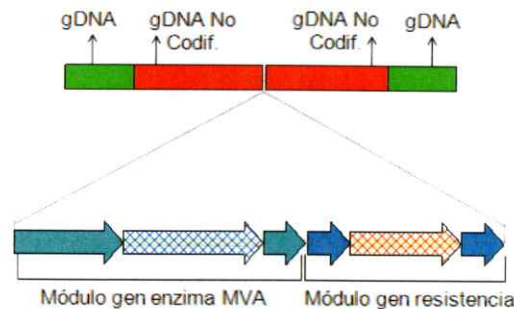
**Figura 11. Representación del vector pXdVexp2-cERG10 A y su análisis por restricción.** **A) Representación del vector pXdVexp2-cERG10 A.** Se indican en el vector los sitios de restricción para las enzimas *NotI* y *KpnI*; la llave horizontal azul representa el fragmento liberado por doble digestión enzimática con *KpnI* y *NotI*. Este fragmento de 6.393 pb (fragmento 1) incluye al módulo de expresión del gen *ERG10 A*, y este último es representado por la flecha de malla azul y el módulo que confiere resistencia a higromicina B (flechas azules corresponden al promotor y terminador del gen que otorga resistencia a higromicina B, y este último es representado por la flecha de malla anaranjada), ambos módulos se encuentran flanqueados por DNA genómico no codificante (flechas rojas), que permite la integración en el genoma de la levadura por un evento de doble recombinación homóloga. **B) Digestión enzimática del vector pXdVexp2-cERG10 A con las enzimas de restricción *KpnI* y *NotI*.** La fotografía del gel a la izquierda muestra la digestión completa del vector, reflejado por la presencia de dos fragmentos de 6.393 pb (DNA transformante, fragmento 1) y de 2.872 pb (plásmido pBluescript, fragmento 2). En la fotografía del gel a la derecha se presenta el vector pXdVexp2-cERG10 A sin digerir. λ=marcador de peso molecular Lambda DNA/*HindIII* Marker.

Se obtuvieron colonias transformantes de *X. dendrorhous* en placas YM suplementadas con antibiótico (higromicina B, 15 µg/ml) y para evaluar a los mutantes, se seleccionaron las colonias más grandes y se les extrajo DNA genómico para confirmar la presencia del fragmento portador de los módulos junto con su correcta integración en el *locus int*. Los mutantes obtenidos se identificaron como 385-*ERG10 A* (mutante donde el gen *ERG10 A* se sobreexpresa), 385-*ERG10 B* (mutante donde el gen *ERG10 B* se sobreexpresa), 385-*tHMGR* (mutante donde la región del gen que codifica el dominio catalítico de HMGR se sobreexpresa) y 385-pXdVexp2 (mutante con módulo de expresión vacío).

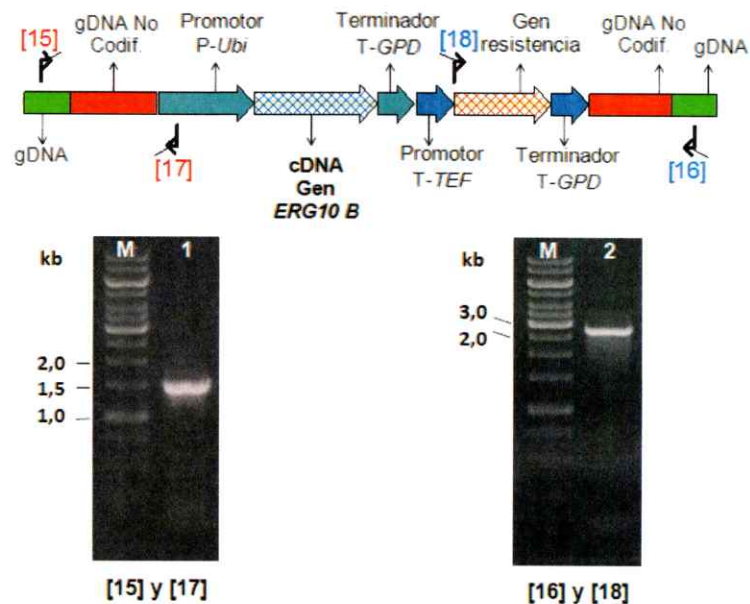
A modo de ejemplo, la Figura 12 muestra la confirmación de la integración del fragmento en el genoma del mutante 385-*ERG10 B* y la presencia del módulo que otorga resistencia al antibiótico en el fragmento en la Figura 13. Conjuntamente, en la Figura 14 se confirma la presencia del módulo de expresión del gen de la ruta de MVA en el fragmento, integrado en el genoma del mutante 385-*ERG10 A*.



**A) Integración por recombinación homóloga en *locus int***

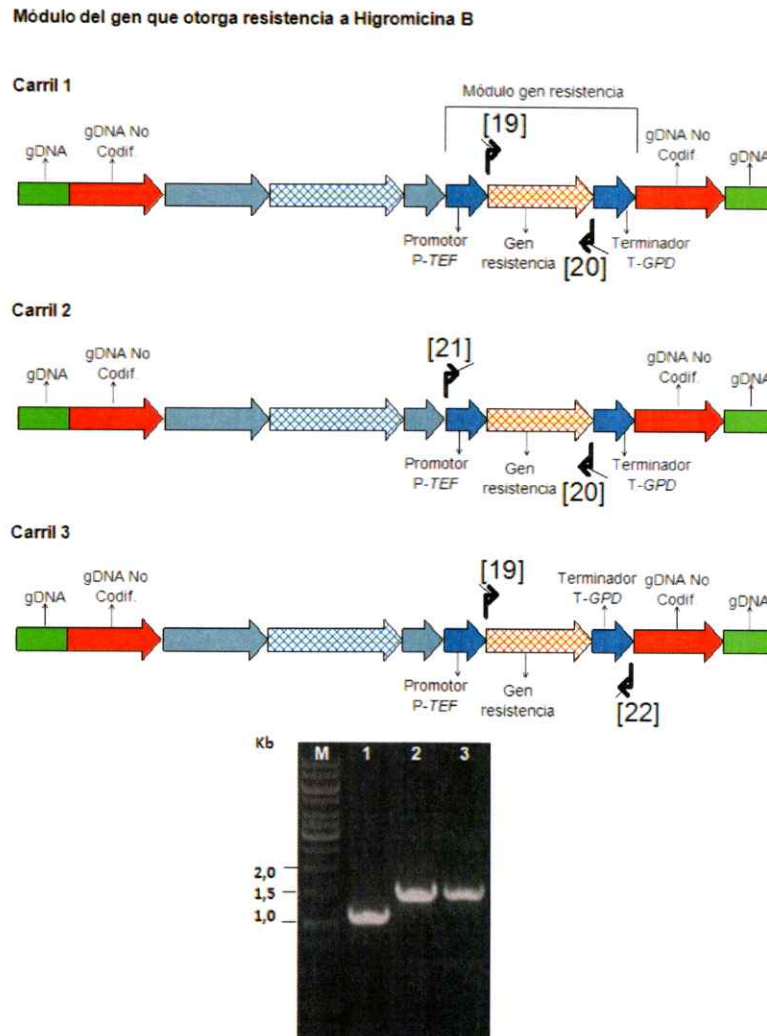


**B) Integración en el *locus int* y análisis por PCR**



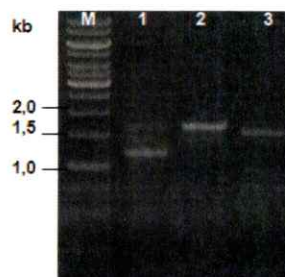
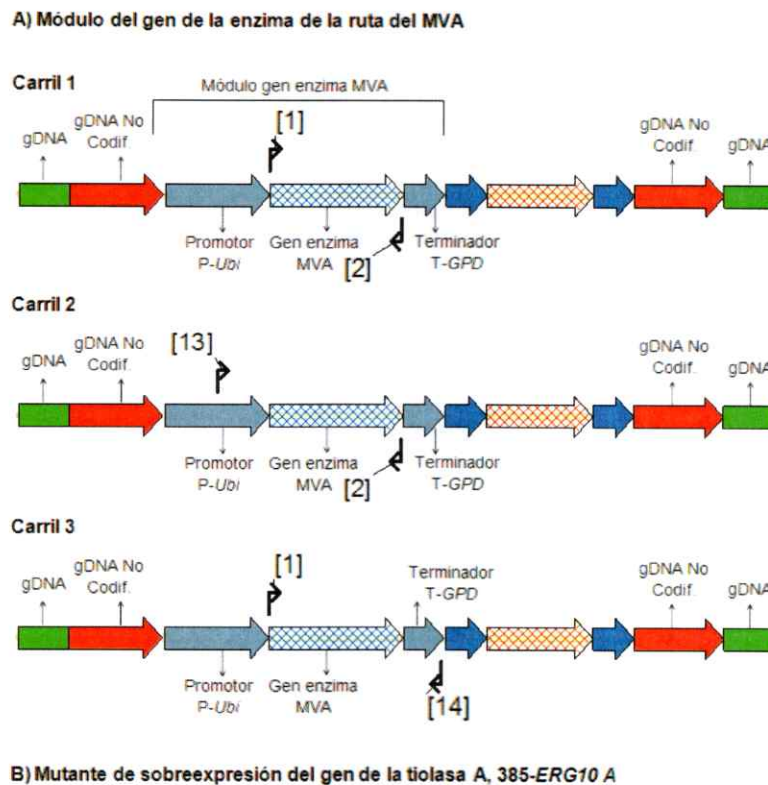
**Figura 12. Verificación de la integración del fragmento en el genoma del mutante de sobreexpresión del gen de la tiolasa B (385-*ERG10 B*).** **A) Representación del *locus int* en el genoma de *X. dendrorhous*.** Las zonas de recombinación están indicados por los rectángulos en rojo e incluyen DNA genómico no codificante (gDNA No Codif.), mientras que el DNA genómico no involucrado en el evento de recombinación está representado por rectángulos de color verde claro (gDNA). El módulo del gen a sobreexpresar está compuesto por las flechas de color verde oscuro y corresponden al promotor y terminador del gen a sobreexpresar, y este último es representado por la flecha de malla azul, mientras que el módulo que confiere resistencia a higromicina B está compuesto por flechas azules que corresponden al promotor y terminador del gen que otorga resistencia a higromicina B, y este último es representado por la flecha de malla anaranjada. **B) Representación del fragmento (módulo de expresión del gen *ERG10 B* + módulo del gen que otorga resistencia a higromicina B, flanqueados por gDNA No Codif.) integrado en el *locus int* y debajo los geles con los amplificados que lo corroboran.** En el

esquema las flechas negras con ángulo recto indican los partidores utilizados. Río arriba del *locus int*, los partidores Ubiantisense y Ext-pre-no-cod-F amplifican 1.353 pb (carril 1 del gel) y abarcan DNA genómico no recombinante y el fragmento. Río abajo del *locus int* los partidores Ext-post-no-cod-R y HF amplifican 2.641 pb (carril 2 del gel) y abarcan el fragmento y DNA genómico no recombinante.



**Figura 13. Representación del módulo del gen que otorga resistencia a higromicina B presente en el fragmento integrado en el genoma de *X. dendrorhous*, y su verificación por PCR en las cepas mutantes.** Los esquemas se denominan carril 1, carril 2 y carril 3, y a cada amplificado le corresponde el carril del gel. Los partidores utilizados corresponden a las flechas negras con ángulo recto en los esquemas. Carril 1=1.026 pb, amplifican el gen que otorga resistencia al antibiótico; carril 2=1.424 pb, amplificado entre el P-TEF y el codón de término del gen; Carril 3=1.422 pb, amplificado entre el codón de inicio del gen y el T-GPD. M, marcador de peso molecular, 1kb Plus DNA Ladder. En todos los esquemas, las zonas de recombinación están indicados por las flechas en rojo e incluyen DNA genómico no

codificante (gDNA No Codif.), mientras que el DNA genómico no involucrado en el evento de recombinación está representado por rectángulos de color verde claro (gDNA). El módulo del gen a sobreexpresar está compuesto por las flechas de color verde oscuro y corresponden al promotor y terminador del gen a sobreexpresar, y este último es representado por la flecha de malla azul, mientras que el módulo que confiere resistencia a higromicina B está compuesto por flechas azules que corresponden al promotor (*P-TEF*) y terminador (*T-GPD*) del gen que otorga resistencia a higromicina B, y este último es representado por flecha de malla anaranjada.



**Figura 14. Verificación del módulo de expresión del gen de la enzima tiolasa A en el fragmento integrado en el genoma de la cepa mutante 385-*ERG10 A*.** A) Representación del módulo de expresión del gen *ERG10 A* codificante de la tiolasa A. Los esquemas se denominan carril 1, carril 2 y carril 3, y a cada amplificado

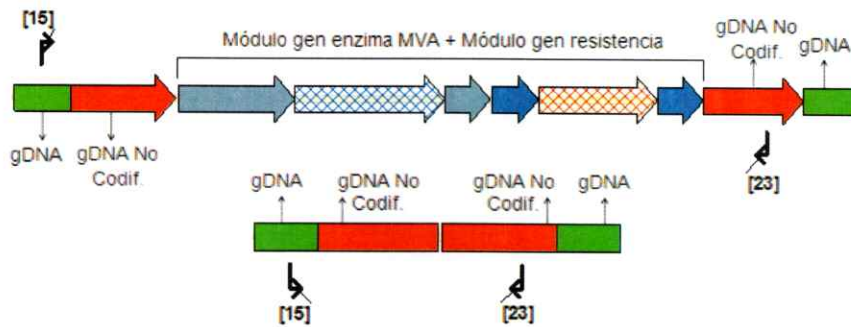
le corresponde el carril del gel del panel B. Los partidores utilizados corresponden a las flechas negras con ángulo recto en los esquemas. **B) Cepa mutante 385-ERG10 A.** Verificación del módulo de expresión del gen *ERG10 A* por PCR en el mutante de sobreexpresión del gen de la tiolasa A. Carril 1=1.212 pb, partidores amplifican el gen *ERG10 A*; carril 2=1.714 pb, amplificado entre el *P-Ubi* y el codón de término del gen *ERG10 A*; carril 3=1.602 pb, amplificado entre el codón de inicio del gen *ERG10 A* y el *T-GPD*. En todos los esquemas, las zonas de recombinación están indicados por las flechas en rojo e incluyen DNA genómico no codificante (gDNA No Codif.), mientras que el DNA genómico no involucrado en el evento de recombinación está representado por rectángulos de color verde claro (gDNA). El módulo del gen a sobreexpresar está compuesto por las flechas de color verde oscuro y corresponden al promotor (*P-Ubi*) y terminador (*T-GPD*) del gen a sobreexpresar, y este último es representado por la flecha de malla azul, mientras que el módulo que confiere resistencia a higromicina B está compuesto por flechas azules que corresponden al promotor y terminador del gen que otorga resistencia a higromicina B, y este último es representado por la flecha de malla anaranjada. M, marcador de peso molecular, 1kb Plus DNA Ladder.

Se evaluó la posible heterocigosis de la mutación en las cepas transformantes, ya que se ha sugerido que la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* es diploide (Hermosilla y col., 2003). Con este propósito, se analizó por PCR la integración del fragmento (que contiene al módulo de expresión del gen de la ruta del MVA y al módulo de expresión que otorga resistencia a higromicina B) en el *locus int*, y se utilizaron partidores que abarcaron la zona de recombinación y el DNA genómico no recombinante, tal como se representa en la Figura 15. Por lo tanto, si el mutante era heterocigoto para la mutación se obtendría un fragmento de aproximadamente 1.400 pb que correspondería a la amplificación del *locus int* del cromosoma homólogo intacto. Por otro lado, también era esperable que los partidores amplificaran el *locus int* del cromosoma homólogo donde ocurrió la integración del fragmento, pero se utilizó un tiempo de elongación de 3 min y la reacción de amplificación fue con la enzima *Taq* DNA polimerasa (1 kb por min), por lo tanto, el fragmento esperado de aproximadamente 6.200 kb que corresponde al *locus int* interrumpido con ambos módulos de expresión no sería amplificado. Debido a que se amplificó un fragmento de

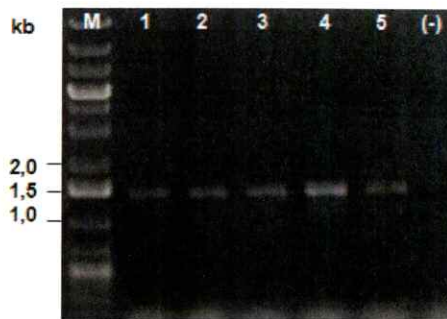
aproximadamente 1.400 pb en todas las cepas mutantes y anteriormente se había determinado la presencia de ambos módulos (del gen de la enzima de la ruta del MVA y del gen que otorga resistencia al antibiótico) en el *locus int* de los transformantes, se comprobó que todos eran heterocigotos para la mutación.

A continuación se evaluó el efecto de la incorporación de una copia adicional de un posible gen de la ruta del MVA en las cepas, en cuanto a la cantidad y composición de los pigmentos y esteroides luego de 36 h y 120 h de crecimiento.

**A) Representación del *locus int***



**B) Amplificación de zona de integración**



**Figura 15. Integración del fragmento que posee el módulo de expresión de un gen de la ruta del MVA (*ERG10 A*, *ERG10 B* o *tHMGR*) y el módulo que confiere resistencia a higromicina B en el *locus int* del genoma de *X. dendrorhous*. A) Representación del *locus int* en mutantes heterocigotos. Se presenta el *locus int* en los cromosomas homólogos, donde la integración del fragmento ocurrió sólo en uno de los dos alelos. Las flechas y los rectángulos en rojo indican el DNA genómico no codificante (gDNA No Codif.) que permite la recombinación homóloga, y en consecuencia, la integración del fragmento en el *locus***

*int*. Además, en rectángulos de color verde claro se presentan regiones de DNA genómico no recombinante (gDNA) río arriba y río abajo del *locus int*. El módulo del gen a sobreexpresar está compuesto por flechas de color verde oscuro que corresponden al promotor y terminador del gen a sobreexpresar, y este último es representado por la flecha de malla azul, mientras que el módulo que confiere resistencia a higromicina B está compuesto por flechas azules que corresponden al promotor y terminador del gen que otorga resistencia a higromicina B, y este último es representado por la flecha de malla anaranjada. Las flechas negras con ángulo recto indican los partidores utilizados que amplifican un fragmento de aproximadamente 1.400 pb en el cromosoma homólogo donde no se integró el fragmento transformante.

**B) Amplificación por PCR del *locus int* en mutantes y cepa UCD 67-385.** Los partidores amplifican el fragmento de menor tamaño (aprox.1.400 pb) correspondiente al *locus int* del cromosoma donde no hubo un evento de recombinación homóloga en cada mutante, desde los carriles 1 al 4. Carril 1=385-*ERG10 A*, carril 2=385-*ERG10 B*, carril 3=385-*tHMGR*, carril 4=385-pXdVexp2, carril 5=cepa silvestre UCD 67-385, (-) control negativo (sin DNA). M, marcador de peso molecular, 1kb Plus DNA Ladder.

### **3. Evaluación del efecto del aumento de la dosis de los genes *ERG10 A*, *ERG10 B*, y *tHMGR* en la composición y cantidad de carotenoides y esteroides en *X. dendrorhous*.**

Para evaluar el efecto de la copia adicional del gen de la enzima de la ruta del MVA en las cepas mutantes de *X. dendrorhous*, se realizó una curva de crecimiento en medio YM por 5 días a 22°C en agitación constante. De la curva se extrajeron muestras luego de 36 h y 120 h de crecimiento, para posterior análisis en cuanto a producción de carotenoides y esteroides. La cantidad de carotenoides y esteroides se evaluó mediante la determinación de la absorbancia a 474 nm y 280 nm, respectivamente; mientras que la composición de éstos se analizó por cromatografía en fase reversa (RP-HPLC). En un experimento se crecieron paralelamente bajo las mismas condiciones y en triplicados la cepa silvestre UCD 67-385 y los mutantes 385-*ERG10 A*, 385-*ERG10 B* y 385-pXdVexp2; y en otro experimento, la cepa silvestre y los mutantes 385-*tHMGR* y 385-pXdVexp2.

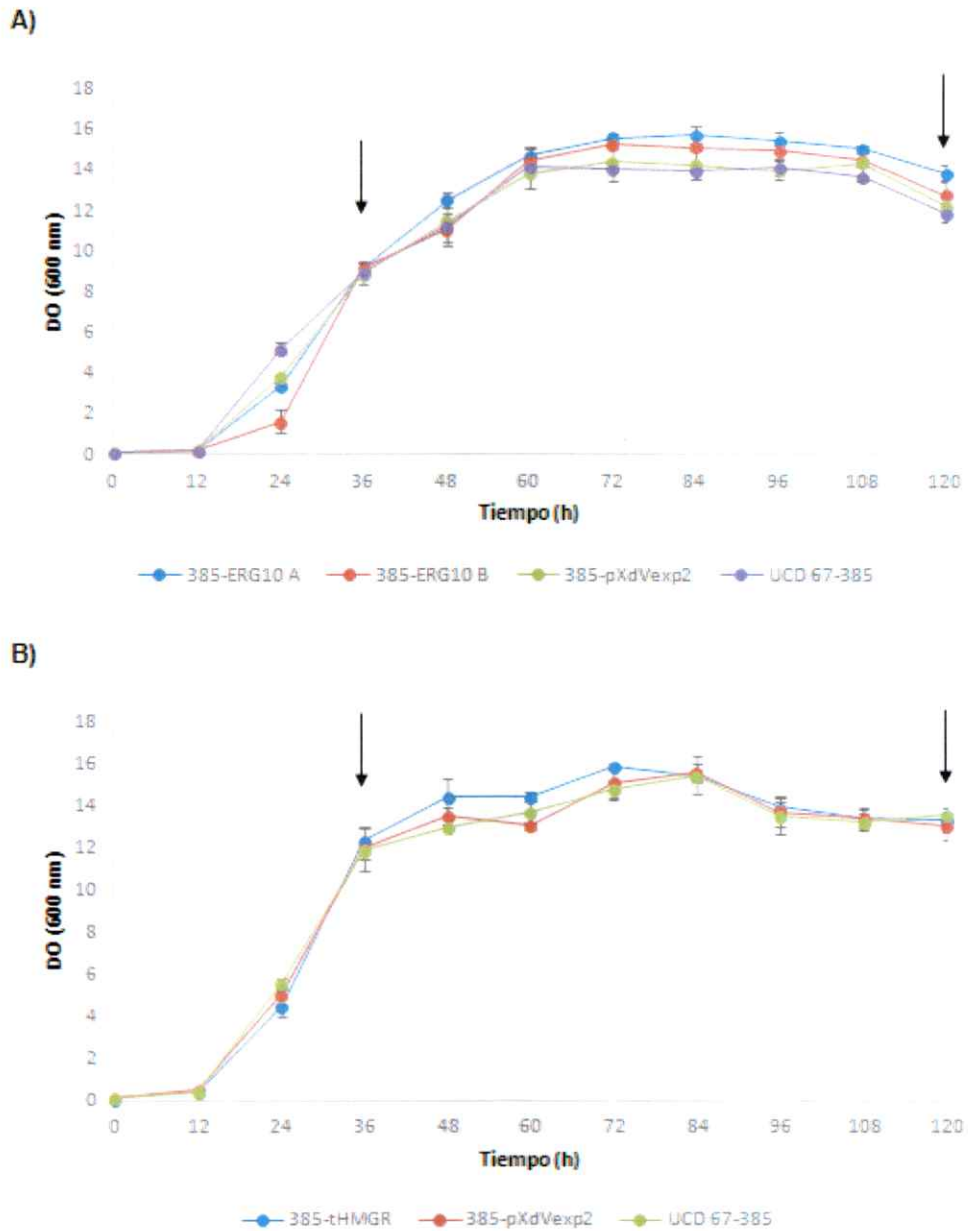
### 3.1 Fenotipo y curva de crecimiento

El efecto de la sobreexpresión de cada gen sólo se evidenció a simple vista en el cambio de fenotipo de la cepa mutante 385-*tHMGR* respecto a la cepa silvestre UCD 67-385, donde la primera sobreexpresaba el fragmento del gen que codifica el dominio catalítico de la enzima HMGR. En cambio las cepas mutantes 385-*ERG10 A*, 385-*ERG10 B* y 385-pXdVexp2 no mostraron un cambio evidente en el fenotipo de color comparado con la cepa silvestre (Figura 16).



**Figura 16. Comparación de fenotipos entre las cepas mutantes y silvestre de *X. dendrorhous*.** Placa agar-YM, donde: **385-*ERG10 A***: mutante donde se sobreexpresa el gen *ERG10 A* que codifica a la tiolasa A, **385-*ERG10 B***: mutante donde se sobreexpresa el gen *ERG10 B* que codifica a la tiolasa B, **385-*tHMGR***: mutante donde se sobreexpresa el fragmento del gen que codifica el dominio catalítico de HMGR, **385-pXdVexp2**: mutante con módulo de expresión de la enzima de la ruta del MVA vacío, y cepa silvestre **UCD 67-385**.

En cuanto al crecimiento (Figura 17), los mutantes 385-*ERG10 A*, 385-*ERG10 B*, 385-pXdVexp2 y 385-tHMGR, no presentaron diferencias significativas respecto a la cepa silvestre UCD 67-385 en las distintas fases de crecimiento durante 5 días.



**Figura 17. Curvas de crecimiento. A) Cultivos paralelos de mutantes 385-*ERG10 A*, 385-*ERG10 B* y 385-pXdVexp2, y la cepa silvestre UCD 67-385. B) Cultivos paralelos de mutantes 385-tHMGR y 385-pXdVexp2, y la cepa silvestre**



**UCD 67-385.** En todos los casos, no se observan cambios significativos en el crecimiento de las cepas mutantes respecto con la cepa silvestre durante 5 días de crecimiento que fue monitoreado a 600 nm. Las cepas se cultivaron en medio YM a 22°C en agitación constante. Las flechas indican los tiempos en que se tomó una muestra de cultivo para análisis posteriores. Los valores son el promedio  $\pm$  desviación estándar de 3 cultivos independientes de cada cepa estudiada.

### **3.2 Cantidad y composición de pigmentos**

Se mencionó anteriormente que se realizaron dos experimentos de curvas de crecimiento, y en consecuencia dos análisis de muestras independientes. En ambos experimentos se utilizó como controles la cepa silvestre UCD 67-385 y la cepa mutante 385-pXdVexp2, y se determinó que entre estas cepas no existen diferencias significativas en la producción y composición de los pigmentos. En ambas, el pigmento principal producido, tanto a las 36 h como a las 120 h de cultivo, es la astaxantina. Por ejemplo, a las 120 h de incubación junto con las cepas 385-*ERG10 A* y 385-*ERG10 B*, las cepas UCD 67-385 y 385-pXdVexp2 produjeron un 75,4 % y un 74,4 % de astaxantina (respecto al total de carotenoides), respectivamente (Tabla 6). A las 120 h de incubación junto con el mutante 385-*tHMGR*, las cepas UCD 67-385 y 385-pXdVexp2 produjeron un 74,9 % y un 73,7 % de astaxantina (respecto al total de carotenoides) (Tabla 7).

**Tabla 6. Composición de carotenoides de las cepas mutantes y silvestre de *X. dendrorhous* en ppm ( $\mu\text{g/g}$  peso seco de levadura) de acuerdo a su perfil de RP-HPLC.**

Tiempo de cultivo (h)	UCD 67-385			385-pXdVexp2			385-ERG10 A			385-ERG10 B		
	36	120	36	120	36	120	36	120	36	120	36	120
Astaxantina*	121,0 $\pm$ 3,2 (62,7)	270,6 $\pm$ 4,2 (75,4)	113,0 $\pm$ 0,7 (59,9)	299,0 $\pm$ 1,0 (74,4)	95,1 $\pm$ 2,4 (56,6)	270,7 $\pm$ 8,1 (68,7)	99,2 $\pm$ 5,6 (58,3)	258,2 $\pm$ 4,9 (73,8)	19,9 $\pm$ 2,4 (11,7)	48,0 $\pm$ 2,2 (12,2)	19,9 $\pm$ 2,4 (11,7)	38,0 $\pm$ 2,1 (10,9)
Fenicoxantina*	22,1 $\pm$ 1,0 (10,9)	41,5 $\pm$ 1,1 (11,6)	21,4 $\pm$ 0,0 (11,3)	43,4 $\pm$ 2,8 (10,8)	19,9 $\pm$ 2,7 (11,8)	14,1 $\pm$ 2,3 (3,6)	19,9 $\pm$ 2,4 (11,7)	38,0 $\pm$ 2,1 (10,9)	19,9 $\pm$ 2,4 (11,7)	48,0 $\pm$ 2,2 (12,2)	19,9 $\pm$ 2,4 (11,7)	38,0 $\pm$ 2,1 (10,9)
Cantaxantina*	ND	10,8 $\pm$ 0,00 (3,0)	ND	12,0 $\pm$ 0,7 (3,0)	ND	14,1 $\pm$ 2,3 (3,6)	ND	11,7 $\pm$ 2,0 (3,3)	ND	14,1 $\pm$ 2,3 (3,6)	ND	11,7 $\pm$ 2,0 (3,3)
OH-equinona*	21,4 $\pm$ 1,1 (11,1)	11,0 $\pm$ 1,4 (3)	21,9 $\pm$ 0,4 (11,6)	13,8 $\pm$ 1,5 (3,4)	20,9 $\pm$ 0,4 (12,4)	19,0 $\pm$ 2,2 (4,8)	18,0 $\pm$ 1,8 (10,6)	10,5 $\pm$ 1,3 (3,0)	19,0 $\pm$ 2,2 (4,8)	19,0 $\pm$ 2,2 (4,8)	18,0 $\pm$ 1,8 (10,6)	10,5 $\pm$ 1,3 (3,0)
Equinonona*	5,8 $\pm$ 0,7 (3,0)	6,4 $\pm$ 1,1 (1,8)	8,0 $\pm$ 1,8 (4,2)	6,9 $\pm$ 0,4 (1,7)	7,6 $\pm$ 1,0 (4,5)	10,6 $\pm$ 1,6 (2,7)	8,8 $\pm$ 0,5 (5,2)	6,2 $\pm$ 1,3 (1,8)	8,8 $\pm$ 0,5 (5,2)	10,6 $\pm$ 1,6 (2,7)	8,8 $\pm$ 0,5 (5,2)	6,2 $\pm$ 1,3 (1,8)
Lycopeno**	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
$\beta$ -caroteno*	15,7 $\pm$ 1,2 (8,1)	10,1 $\pm$ 2,6 (2,8)	17,1 $\pm$ 0,6 (9,1)	10,5 $\pm$ 0,2 (2,6)	19,4 $\pm$ 1,6 (11,5)	16,2 $\pm$ 3,5 (4,1)	19,0 $\pm$ 1,5 (11,2)	9,9 $\pm$ 1,5 (2,8)	19,4 $\pm$ 1,6 (11,5)	16,2 $\pm$ 3,5 (4,1)	19,0 $\pm$ 1,5 (11,2)	9,9 $\pm$ 1,5 (2,8)
Fitoeno**	1,9 $\pm$ 0,3 (1,0)	ND	1,6 $\pm$ 0,5 (0,8)	ND	1,3 $\pm$ 1,2 (0,8)	ND	2,8 $\pm$ 0,6 (1,6)	ND	1,3 $\pm$ 1,2 (0,8)	ND	2,8 $\pm$ 0,6 (1,6)	ND
OH-k-toruleno	6,8 $\pm$ 1,8 (3,5)	8,7 $\pm$ 0,9 (2,4)	7,5 $\pm$ 1,4 (4)	16,2 $\pm$ 0,9 (4,0)	5,2 $\pm$ 2,3 (3,1)	15,4 $\pm$ 1,4 (3,9)	5,4 $\pm$ 2,2 (3,2)	15,6 $\pm$ 1,4 (4,5)	5,2 $\pm$ 2,3 (3,1)	15,4 $\pm$ 1,4 (3,9)	5,4 $\pm$ 2,2 (3,2)	15,6 $\pm$ 1,4 (4,5)
<b>Total carotenoides</b>	<b>192,9 <math>\pm</math> 31,8 (100)</b>	<b>359,0 <math>\pm</math> 16,3 (100)</b>	<b>188,6 <math>\pm</math> 14,4 (100)</b>	<b>401,7 <math>\pm</math> 26,8 (100)</b>	<b>188,0 <math>\pm</math> 10,4 (100)</b>	<b>394,1 <math>\pm</math> 15,9 (100)</b>	<b>170,3 <math>\pm</math> 28,1 (100)</b>	<b>349,7 <math>\pm</math> 24,8 (100)</b>	<b>170,3 <math>\pm</math> 28,1 (100)</b>	<b>394,1 <math>\pm</math> 15,9 (100)</b>	<b>170,3 <math>\pm</math> 28,1 (100)</b>	<b>349,7 <math>\pm</math> 24,8 (100)</b>

La tabla muestra el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres cultivos independientes. ND: no detectado; números en negrita y en paréntesis representan los porcentajes de cada uno. \*: Carotenoides bicíclicos; \*\*: Carotenoides acíclicos.

**Tabla 7. Composición de carotenoides de las cepas mutantes y silvestre de *X. dendrorhous* en ppm ( $\mu\text{g/g}$  peso seco de levadura) de acuerdo a su perfil de RP-HPLC.**

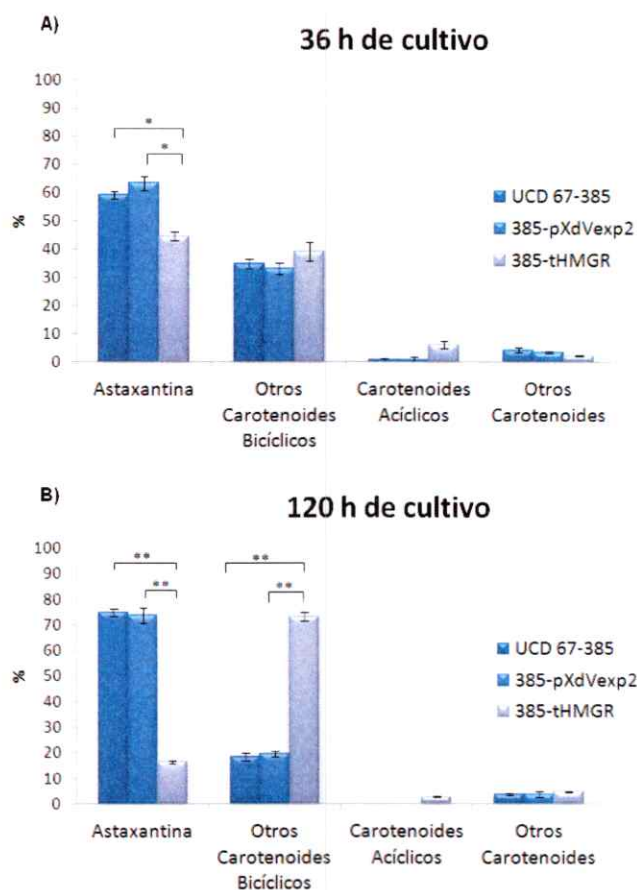
Tiempo de cultivo (h)	Cepas <i>X. dendrorhous</i>					
	UCD 67-385		385-pXdVexp2		385-tHMGR	
	36	120	36	120	36	120
Astaxantina*	86,4 $\pm$ 2,1 (59,0)	259,6 $\pm$ 5,1 (74,9)	68,2 $\pm$ 2,7 (63,3)	265,9 $\pm$ 10,7 (73,7)	56,3 $\pm$ 1,9 (44,6)	120,4 $\pm$ 3,0 (16,5)
Fenicoxantina*	17,1 $\pm$ 0,1 (11,7)	38,8 $\pm$ 2,3 (11,2)	12,7 $\pm$ 0,6 (11,8)	43,4 $\pm$ 1,6 (12,0)	12,3 $\pm$ 0,8 (9,7)	64,5 $\pm$ 4,1 (8,8)
Cantaxantina*	ND	ND	ND	ND	ND	21,4 $\pm$ 1,4 (2,9)
OH-equinona*	17,8 $\pm$ 2,0 (12,2)	10,7 $\pm$ 1,6 (3,1)	12,1 $\pm$ 1,6 (11,2)	11,6 $\pm$ 1,6 (3,2)	15,8 $\pm$ 0,7 (12,5)	81,0 $\pm$ 5,9 (11,1)
Equinonona*	4,4 $\pm$ 0,8 (3,0)	6,7 $\pm$ 4,2 (1,9)	2,8 $\pm$ 0,4 (2,6)	6,0 $\pm$ 0,6 (1,7)	5,9 $\pm$ 1,1 (4,7)	102,4 $\pm$ 2,8 (14,0)
Licopeno**	ND	ND	ND	ND	2,6 $\pm$ 0,2 (2,1)	7,5 $\pm$ 0,6 (1,0)
$\beta$ -caroteno*	11,6 $\pm$ 1,2 (11,9)	7,7 $\pm$ 2,0 (2,2)	8,1 $\pm$ 1,4 (7,5)	9,5 $\pm$ 2,4 (2,6)	25,4 $\pm$ 3,8 (20,2)	286,1 $\pm$ 9,1 (39,3)
Fitoeno**	1,2 $\pm$ 0,7 (0,8)	ND	0,9 $\pm$ 1,2 (0,8)	ND	5,3 $\pm$ 1,8 (4,2)	12,9 $\pm$ 1,6 (1,8)
OH-k-toruleno	6,3 $\pm$ 1,3 (4,3)	12,6 $\pm$ 1,3 (3,6)	3,8 $\pm$ 0,5 (3,5)	13,5 $\pm$ 4,0 (3,7)	3,0 $\pm$ 0,2 (2,4)	10,3 $\pm$ 1,3 (1,4)
Ndt	ND	ND	ND	ND	ND	8,0 $\pm$ 1,9 (1,1)
Ndt	ND	ND	ND	ND	ND	16,9 $\pm$ 2,7 (2,3)
<b>Total carotenoides</b>	<b>145,4 <math>\pm</math> 11,3 (100)</b>	<b>346,6 <math>\pm</math> 26,8 (100)</b>	<b>107,7 <math>\pm</math> 39,1 (100)</b>	<b>360,6 <math>\pm</math> 19,8 (100)</b>	<b>126,6 <math>\pm</math> 28,3 (100)</b>	<b>731,4 <math>\pm</math> 65,1 (100)</b>

La tabla muestra el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes. ND: no detectado; números en negrita y en paréntesis representan los porcentajes de cada uno; Ndt: Carotenoide no determinado. \*: Carotenoides bicíclicos; \*\*: Carotenoides acíclicos.

Las cepas 385-*ERG10 A* y 385-*ERG10 B*, no presentaron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad y composición de carotenoides respecto a la cepa silvestre UCD 67-385, siendo la astaxantina el pigmento principal producido tanto a las 36 h como a las 120 h de cultivo. El mutante 385-*ERG10 A* produjo un 68,7 % de astaxantina (respecto al total de carotenoides) a las 120 h de cultivo y el mutante 385-*ERG10 B*, un 73,8 % de astaxantina (respecto al total de carotenoides) en el mismo tiempo de cultivo. La composición y cantidad de pigmentos producidos por estas cepas se presenta en la tabla 6.

Por el contrario, la cepa 385-*tHMGR* presentó diferencias significativas en la cantidad de pigmentos, pero sólo a las 120 h de cultivo (Prueba t-student;  $p < 0,01$ ). Produjo 2,1 veces más carotenoides que la cepa silvestre UCD 67-385 (en la Tabla 7 se observa que la cepa 385-*tHMGR* produjo 731,4 ppm y la cepa silvestre 346,6 ppm a las 120 h de cultivo). Además, la composición de los pigmentos se alteró tanto a las 36 h como a las 120 h de cultivo, aunque como se mencionó, la cantidad de pigmentos fue significativamente mayor sólo a las 120 h de cultivo. En la Figura 18 se presentan gráficamente los pigmentos producidos agrupados de acuerdo a su estructura química a las 36 h y 120 h de cultivo. A las 36 h, el mutante 385-*tHMGR* produjo significativamente menos astaxantina respecto a la cantidad total de pigmentos, en comparación a la cepa silvestre UCD 67-385. El mutante produjo un 44,6 % de astaxantina, mientras que la cepa silvestre produjo un 59 % del mismo pigmento. En este mismo tiempo de cultivo, los otros carotenoides bicíclicos distintos a astaxantina (fenicoxantina, cantaxantina, OH-equinona, equinenona,  $\beta$ -caroteno) y los carotenoides acíclicos (licopeno, fitoeno) no variaron significativamente. En el mismo mutante, a las 120 h de cultivo la astaxantina se redujo a un 16,5 % (respecto al total de pigmentos), y

esta vez los otros carotenoides bicíclicos distintos a astaxantina aumentaron significativamente alcanzando un 75 % del contenido total de pigmentos producidos, en comparación a la cepa UCD 67-385 donde estos pigmentos alcanzaron aproximadamente un 19 %.



**Figura 18. Porcentaje de carotenoides respecto a los carotenoides totales en las cepas mutantes 385-tHMGR y 385-pXdVexp2, y cepa silvestre UCD 67-385. A) Composición de pigmentos luego de 36 h de cultivo. B) Composición de pigmentos luego de 120 h de cultivo. Otros carotenoides bicíclicos: fenicoxantina, cantaxantina, OH-equinona, equinenona y  $\beta$ -caroteno. Carotenoides acíclicos: licopeno y fitoeno. Los valores son el promedio  $\pm$  desviación estándar de 3 cultivos independientes de cada cepa (Prueba t-student; \*\*p<0,01; \*p<0,05).**

### 3.3 Cantidad y composición de esteroides

Retomando lo mencionado anteriormente, la cantidad y composición de los pigmentos no presenta diferencias significativas entre la cepa silvestre UCD 67-385 y la cepa mutante 385-pXdVexp2, en ambos experimentos realizados. Sumado a esto, la cantidad y composición de los esteroides tampoco presenta diferencias significativas en las mismas condiciones. En ambas cepas el esteroide principal producido tanto a las 36 h como a las 120 h de cultivo, es ergosterol. En cuanto a la cantidad, a las 120 h de cultivo las cepas UCD 67-385 y 385-pXdVexp2 produjeron 3,5 y 3,8 mg de ergosterol por g de peso seco de levadura, respectivamente; cuando se incubaron junto a las cepas 385-*ERG10 A* y 385-*ERG10 B* (Tabla 8). Cuando se incubaron junto al mutante 385-*tHMGR*, produjeron 2,9 y 3,5 mg de ergosterol por g de peso seco de levadura, respectivamente (Tabla 9).

**Tabla 8. Composición de esteroides de las cepas mutantes y silvestre de *X. dendrorhous* (mg/g peso seco de levadura) de acuerdo a su perfil RP-HPLC.**

	Cepas <i>X. dendrorhous</i>							
	UCD 67-385		385-pXdVexp2		385- <i>ERG10 A</i>		385- <i>ERG10 B</i>	
Tiempo de cultivo (h)	36	120	36	120	36	120	36	120
Total ergosterol (100%)	4,9 ± 0,6	3,5 ± 0,4	5,0 ± 0,4	3,8 ± 0,1	4,7 ± 0,6	3,9 ± 0,2	4,7 ± 0,3	3,9 ± 0,1

La tabla muestra el promedio ± desviación estándar de tres cultivos independientes de cada cepa.

**Tabla 9. Composición de esteroides de las cepas mutantes y silvestre de *X. dendrorhous* (mg/g peso seco de levadura) de acuerdo a su perfil RP-HPLC.**

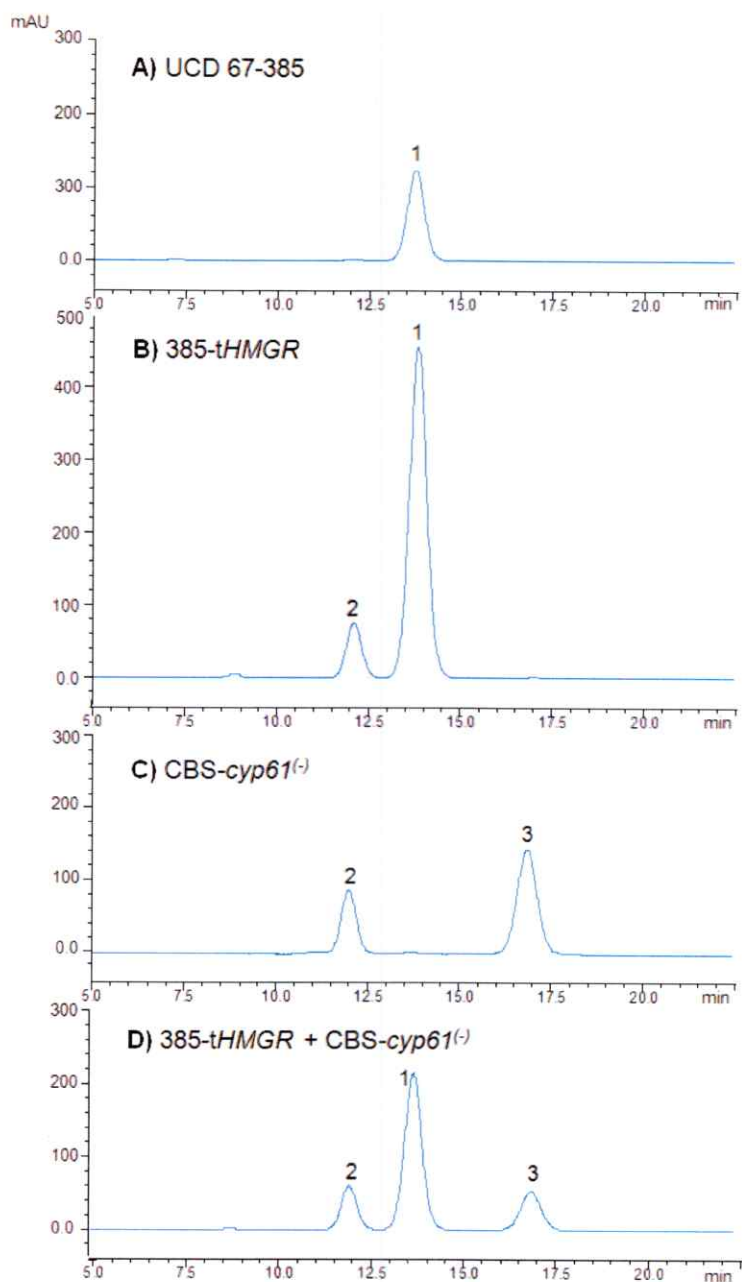
	Cepas <i>X. dendrorhous</i>					
	UCD 67-385		385-pXdVexp2		385- <i>tHMGR</i>	
Tiempo de cultivo (h)	36	120	36	120	36	120
Ergosterol	3,5 ± 0,3	2,9 ± 0,09	3,8 ± 0,08	3,5 ± 0,2	4,9 ± 0,04	4,2 ± 0,01
Pico 2	ND	ND	ND	ND	0,4 ± 0,04	0,7 ± 0,01
Total esteroides (100%)	3,5 ± 0,3	2,9 ± 0,09	3,8 ± 0,08	3,5 ± 0,2	5,2 ± 0,4	4,9 ± 0,8

La tabla muestra el promedio ± desviación estándar de tres cultivos independientes de cada cepa. Pico 2: Intermediario de la biosíntesis de ergosterol presente en cromatograma. (Figura 19.)

Sin embargo, la cepa 385-*tHMGR* presentó diferencias significativas en la cantidad de esteroides luego de las 36 h y 120 h de cultivo. En la Tabla 9 se presenta la cantidad de esteroides producida por 385-*tHMGR*, 385-pXdVexp2 y UCD 67-385 a las 36 h y 120 h de cultivo, y se destaca que 385-*tHMGR* produjo 1,5 y 1,4 veces más esteroides que las cepas UCD 67-385 y 385-pXdVexp2 a las 36 h, respectivamente; y 1,7 y 1,4 veces más respecto a las mismas cepas a las 120 h de cultivo (Prueba t-student;  $p < 0,05$ ). Es importante mencionar que en el análisis de composición de esteroides mediante RP-HPLC se observó que el mutante 385-*tHMGR* acumula un segundo esteroide, cuyo tiempo de retención aproximado es de 12 min (pico 2 en la Tabla 9), además de ergosterol (tiempo de retención aproximado de 14 min, pico 1); por lo tanto, a diferencia de la cepa silvestre el ergosterol sólo alcanzó un 93,5 % a las 36 h y un 85,7 % 120 h de cultivo, respecto al total de esteroides producidos. La Figura 19 muestra el cromatograma obtenido desde las muestras de esteroides donde se pueden apreciar dos picos en la cepa 385-*tHMGR* (picos 1 y 2) a diferencia de la cepa silvestre (pico 1) que sólo muestra un pico que corresponde a ergosterol.

Para identificar el esteroide adicional que acumula la cepa 385-*tHMGR*, se analizaron muestras de esteroides de los mutantes 385-*tHMGR* y CBS-*cyp61*<sup>(-)</sup>, donde este último presenta una mutación en el gen que codifica una citocromo P450 involucrada en la biosíntesis de ergosterol, por lo tanto, no produce ergosterol y acumula otros dos esteroides que podrían corresponder a ergosta-5,8-dien-3-ol y ergosta-5,8,22-trien-3-ol (Loto y col., 2012), picos 2 y 3, respectivamente (Figura 19, panel C). Por lo tanto, el esteroide adicional a ergosterol producido por el mutante 385-*tHMGR* podría corresponder a ergosta-5,8-dien-3-ol de acuerdo a su tiempo de

retención de aproximadamente 12 min y de acuerdo a la sobreposición de picos cuando ambas muestras se co-inyectan.



**Figura 19. Análisis de esteroides por RP-HPLC de las cepas UCD 67-385, 385- tHMGR y CBS-cyp61<sup>(-)</sup>. Los cromatogramas (a 280 nm) corresponden a esteroides extraídos desde las cepas mutantes 385-tHMGR y CBS-cyp61<sup>(-)</sup>, y la cepa silvestre**



UCD 67-385. Los picos en los cromatogramas se enumeraron del 1 al 3. Cepas: **A)** UCD 67-385, el pico 1 correspondería a ergosterol, **B)** 385-*tHMGR*, el pico 1 correspondería a ergosterol y el pico 2 a otro esteroles, **C)** CBS-*cyp61*<sup>(-)</sup>, presenta una mutación en el gen que codifica una citocromo P450 involucrada en la biosíntesis de ergosterol, por lo tanto, no produce ergosterol (pico 1) y acumula otros esteroides que podrían corresponder a ergosta-5,8-dien-3-ol (pico 2) y ergosta-5,8,22-trien-3-ol (pico 3) (Loto y col., 2012), **D)** Co-inyección de muestras de esteroides de 385- *tHMGR* y CBS-*cyp61*<sup>(-)</sup>.

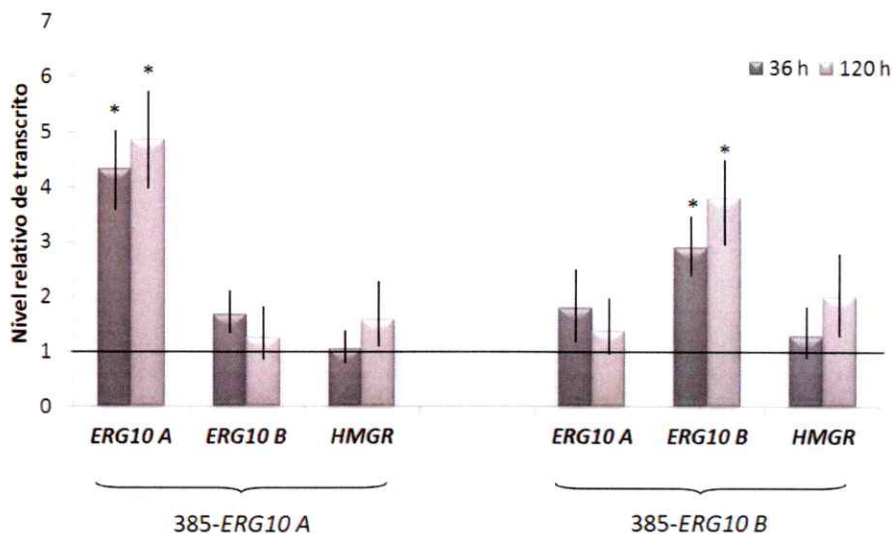
#### **4. Análisis de expresión de genes de la ruta del mevalonato y otros genes involucrados en la carotenogénesis.**

Con el fin de confirmar que efectivamente la integración de una copia adicional de cada gen tiene como consecuencia un mayor nivel de transcrito de dichos genes, se determinó la expresión relativa de los genes *ERG10 A*, *ERG10 B* y *tHMGR* por RT-qPCR en las cepas mutantes y en la cepa silvestre UCD 67-385 luego de las 36 h y 120 h de cultivo. Además, en la cepa 385-*tHMGR* se evaluó el nivel de los transcritos de los genes carotenogénicos *crtS* y *crtR*, ya que justamente se encontraron mayores diferencias en la proporción de carotenoides involucrados en el paso controlado por dichos genes.

Se analizó el nivel de expresión de los genes *ERG10 A*, *ERG10 B*, *HMGR*, *crtS* y *crtR* en la cepa silvestre UCD 67-385 y en la cepa mutante 385-pXdVexp2. El nivel de transcrito de cada gen se normalizó en cada cepa respecto al nivel de transcrito del gen *ACT*, a las 36 y 120 h de cultivo. Posteriormente, los niveles de transcrito normalizados de cada gen, se normalizaron nuevamente con los niveles respectivos utilizando como control a la cepa UCD 67-385. No se detectaron diferencias significativas en los niveles de transcrito de los genes analizados entre ambas cepas; por lo tanto, se utilizó la cepa 385-pXdVexp2 como control para evaluar los niveles de

transcritos en los mutantes 385-*ERG10 A*, 385-*ERG10 B* y 385-*tHMGR*. Se determinó que la cepa 385-pXdVexp2 es un buen control, pues es resistente al antibiótico higromicina B al igual que los mutantes de sobreexpresión, y la cantidad/composición de carotenoides y esteroides no varían significativamente con respecto a la cepa silvestre UCD 67-385.

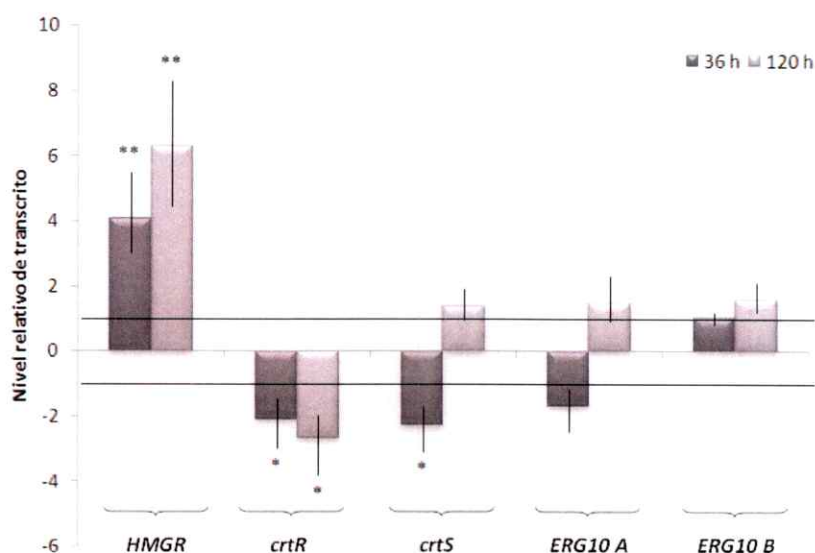
En la Figura 20 se observa que los niveles de transcrito alcanzados por el gen *ERG10 A* en el mutante 385-*ERG10 A* fueron 4,3 y 4,9 veces mayores que la cepa control, después de las 36 h y 120 h de cultivo, respectivamente. Por otro lado, los niveles de transcrito alcanzados por el gen *ERG10 B* en el mutante 385-*ERG10 B* fueron 2,6 y 3,2 veces mayores que la cepa control, a las mismas horas de cultivo. Adicionalmente, se observó que el nivel de transcrito alcanzados por *HMGR* en ambas cepas mutantes no es significativo.



**Figura 20. Análisis de los niveles de transcrito de los genes *ERG10 A*, *ERG10 B* y *HMGR* en los mutantes 385-*ERG10 A* 385-*ERG10 B*.** Los niveles de transcrito de los genes *ERG10 A*, *ERG10 B* y *HMGR*, se determinó por RT-qPCR normalizada a la expresión del gen *ACT*, después de las 36 h y 120 h de cultivo. A su vez, los niveles de transcrito normalizados de cada gen, se normalizaron con los

niveles respectivos de la cepa 385-pXdVexp2 (Línea horizontal =+1). (Prueba t-student; \*p<0,01)

Conjuntamente, en la Figura 21 se observa que los niveles de expresión del gen *HMGR* en el mutante 385-*tHMGR* fueron 4,1 y 6,3 veces mayores que la cepa control, a las 36 h y 120 h. Además, los niveles de transcrito de los genes carotenogénicos *crtS* y *crtR* disminuyeron significativamente 2,1 y 2,3 veces, respectivamente; en relación a la cepa control a las 36 h de cultivo. Sin embargo, a las 120 h sólo la expresión del gen *crtR* disminuyó significativamente 2,7 veces respecto a la cepa control. No se observan diferencias significativas en los niveles de transcrito de los genes *ERG10 A* y *ERG10 B* en el mutante 385-*tHMGR* (Figura 21).



**Figura 21. Análisis de los niveles de transcrito de los genes *HMGR*, carotenogénicos *crtR* y *crtS*, *ERG10 A* y *ERG10 B* en el mutante 385-*tHMGR*, luego de 36 h y 120 h de cultivo. Los niveles de transcrito de los genes *HMGR*, *crtR*, *crtS*, *ERG10 A* y *ERG10 B* se determinaron por RT-qPCR y se normalizaron respecto al transcrito del gen *ACT*, después de 36 h y 120 h de cultivo. A su vez, los niveles de transcrito normalizados de cada gen en el mutante 385-*tHMGR*, se normalizaron con los niveles respectivos del mutante 385-pXdVexp2 (Línea horizontal =+1, e =-1). (Prueba t-student; \*\*p<0,01; \*p<0,05).**

## DISCUSIÓN

En este seminario de tesis se estudió el efecto de la sobreexpresión de genes codificantes de enzimas de la ruta del MVA en la producción de carotenoides y esteroides de *X. dendrorhous*. En particular, se evaluó el efecto de la sobreexpresión del posible gen codificante de la acetoacetil-CoA tiolasa, *ERG10 A* y *ERG10 B*, la primera enzima de la ruta, y la sobreexpresión del fragmento del gen que codifica el dominio catalítico de la HMGR, siendo ésta la tercera enzima de la ruta del MVA. El efecto de la sobreexpresión de estos genes no había sido estudiado particularmente en esta levadura, pero en forma paralela al desarrollo de este seminario de título, se publicó un artículo donde se sobreexpresó el gen que codificaría a la acetoacetil-CoA tiolasa y el gen que codifica a la HMGR de la ruta del MVA de *X. dendrorhous* (Hara y col., 2014). Sin embargo, los resultados reportados en este seminario difieren a lo informado por estos autores, y serán discutidos.

En general, la sobreexpresión de los genes *ERG10 A* y *ERG10 B* no tiene un efecto significativo en la producción de carotenoides y esteroides, mientras que con la sobreexpresión del fragmento del gen que codifica el dominio catalítico de HMGR se obtiene un cambio significativo en esta producción. Por el contrario, en el estudio de Hara y col., (2014), la sobreexpresión del gen que posiblemente codifica a la tiolasa de la ruta del MVA y que posee un 98 % de identidad con el gen *ERG10 B* identificado en nuestro laboratorio, y la sobreexpresión del gen que codifica a HMGR, aumentan leve e igualmente el contenido intracelular y la concentración volumétrica de astaxantina luego de 72 h de cultivo. Sin embargo, no queda claro si esta cantidad se refiere al contenido total de carotenoides producidos por las cepas, y tampoco si la

sobreexpresión fue del gen que codifica a HMGR o sólo la porción de éste que codifica el dominio catalítico de la enzima. Si el aumento se refiere particularmente a astaxantina, el resultado discrepa con el obtenido en este seminario, pues en el mutante donde ocurre la sobreexpresión del gen que codifica a la posible tiolasa de la ruta del MVA, se produce alrededor de un 74 % de astaxantina en fase estacionaria, y no varía significativamente de la cepa silvestre. Mientras que en el mutante donde ocurre la sobreexpresión del fragmento del gen que codifica el dominio catalítico de HMGR (385-tHMGR), la astaxantina solo representa el 16,5 % bajo las mismas condiciones de cultivo. Por otro lado, si el aumento se refiere a los carotenoides totales producidos, el resultado también discrepa, ya que en el mutante donde ocurre la sobreexpresión del gen que codifica a la tiolasa, la producción de carotenoides no varía significativamente de la cepa silvestre, mientras que 385-tHMGR produce 2,1 veces más carotenoides que la cepa silvestre.

Existen estudios que han obtenido resultados similares a los de esta tesis, por ejemplo, se ha observado que la sobreexpresión del gen codificante de la acetoacetil-CoA tiolasa citoplasmática de *S. uvarum* en *S. cerevisiae* y en la misma *S. uvarum*, no incrementa el contenido de ergosterol en estas levaduras comparado con las cepas silvestres (Denquin y col., 1988 a, 1988 b). Además, en otro estudio se informó que la sobreexpresión conjunta de los genes codificantes de la acetoacetil-CoA tiolasa y de la enzima HMGR (gen *HMG2*) en *S. cerevisiae*; si bien aumenta el contenido de esteroides, esto no se debe al efecto de la sobreexpresión del gen de la acetoacetil-CoA tiolasa (Dimster-Denk y Rine, 1996). Por lo tanto, llama la atención que en el estudio de Hara y col., (2014) la sobreexpresión del gen que codifica la enzima HMGR, tenga el mismo efecto que la sobreexpresión del gen que codifica a la posible acetoacetil-

CoA tiolasa, ya que es esperable que la sobreexpresión de un gen que codifica una enzima considerada un paso limitante en la ruta del MVA, favorecería el flujo de metabolitos por ésta. En efecto, se ha informado que HMGR tiene un rol crítico en la producción de moléculas derivadas desde el MVA (su producto) (Hampton y col., 1996) y la sobreexpresión del gen que la codifica aumenta el suministro de FPP (Yan y col., 2012), que a su vez es precursor de las rutas de síntesis de carotenoides y esteroides. Por lo tanto, también es razonable inferir que si se sobreexpresa el gen que codifica una HMGR carente de la región N-terminal que posee un dominio conocido como SSD (*Sterol Sensing Domain*) requerido en la regulación de la degradación de la enzima (Theesfeld y col., 2011; Burg y Espenshade., 2011), se genera una HMGR catalíticamente activa, no asociada a membrana y no regulada por esteroides (DeBose-Boyd R., 2008), lo que tendría un efecto significativo en las rutas metabólicas de biosíntesis de carotenoides y esteroides debido a que ambas vías utilizan como precursor al IPP derivado de la ruta del MVA. Precisamente, la expresión de sólo la porción del gen que codifica el dominio catalítico de HMGR tiene un efecto en la ruta de síntesis de carotenoides y esteroides, ya que en nuestro laboratorio previamente se evaluó la funcionalidad de este fragmento en una cepa recombinante de la levadura *S. cerevisiae* productora de  $\beta$ -caroteno, logrando un incremento de 3 y 2 veces en la producción de carotenoides y ergosterol, respectivamente. (Loto., 2015). Naturalmente, la sobreexpresión de este fragmento de gen tiene un efecto similar en la cepa de *X. dendrorhous*, donde la producción de carotenoides y esteroides aumenta de 2,1 y 1,7 veces, respectivamente, luego de 120 h de cultivo. Sin embargo, este aumento no es significativo en la producción de carotenoides luego de 36 h de cultivo. Justamente, se espera que la diferencia en la producción se presente luego de las 36 h de cultivo, donde particularmente la cepa 385-*tHMGR* alcanza la fase exponencial tardía de

crecimiento, fase en la cual se ha observado que los niveles de expresión de los genes carotenogénicos aumenta y correspondería con la inducción de la carotenogénesis en *X. dendrorhous* (Loto y col., 2012). En particular el gen *HMGR* alcanza un máximo nivel de transcrito y una mayor actividad específica, que luego disminuye aunque la concentración intracelular de carotenoides sigue aumentando (Loto., 2015). Por lo tanto, es esperable que el aumento significativo en la producción de carotenoides sólo se haya observado luego de 120 h de cultivo en la cepa 385-*tHMGR* respecto a la cepa silvestre. Por otro lado, el efecto de la sobreexpresión en la composición de los carotenoides ya es evidente a las 36 h de cultivo, pese a que no existe una diferencia significativa en la cantidad de carotenoides totales producidos por la cepa mutante respecto a la cepa silvestre.

En fase estacionaria, la cepa silvestre de *X. dendrorhous* además de astaxantina, también acumula  $\beta$ -caroteno y otros intermediarios de la ruta de síntesis en una menor proporción (Verwaal y col., 2007). Luego de 36 h y 120 h de cultivo, la cepa silvestre produce aproximadamente un 60 % y 75 % de astaxantina, respectivamente, mientras que en el mutante 385-*tHMGR* la producción de astaxantina disminuye aproximadamente a un 45 % y 17 %, respectivamente. Específicamente, a las 120 h de cultivo se registra un aumento en la producción de carotenoides bicíclicos distintos a astaxantina, entre ellos el  $\beta$ -caroteno, los cuales alcanzan un 73 % del contenido total de pigmentos producidos en comparación con la cepa silvestre donde estos pigmentos alcanzan aproximadamente un 20 %. Además, en el mutante 385-*tHMGR* se produce una disminución en el nivel de transcrito de los genes carotenogénicos *crtR* y *crtS*, los que precisamente codifican las enzimas que intervienen en la conversión del  $\beta$ -caroteno en astaxantina: la astaxantina sintasa,

codificada por el gen *crtS* que requiere de la citocromo P450 reductasa, codificado por el gen *crtR* para la conversión de  $\beta$ -caroteno en astaxantina en *X. dendrorhous* (Alcaíno y col., 2008, Alcaíno y col., 2012). Por lo tanto, la disminución conjunta en el nivel de transcrito en ambos genes observada luego de 36 h de cultivo, refleja la dependencia de las enzimas que codifican y podría explicar el aumento en la fracción de  $\beta$ -caroteno (y disminución de la fracción de astaxantina).

Por otro lado, es esperable que la disminución en el nivel de transcrito del gen *crtR* tenga algún efecto en la ruta de síntesis de esteroides, ya que la citocromo P450 reductasa codificada por este gen probablemente aporta electrones a citocromos de la ruta de síntesis de ergosterol. Por ejemplo, la delección del gen que codifica a CYP51, una citocromo P450 reductasa involucrada en la ruta de síntesis del ergosterol, aumenta el nivel de transcrito del gen *crtR* (Leiva., 2015). Entonces, se puede inferir que si el nivel de expresión del gen *crtR* está disminuido, la producción de esteroides también se vería disminuida, pero esto no sucede en mutante 385-*tHMGR*. Al parecer, la sobreexpresión del fragmento del gen que codifica el dominio catalítico de HMGR favorece el flujo de precursores hacia la ruta de síntesis de ergosterol, ya que a las 36 h de cultivo se registra un aumento significativo en la cantidad de esteroides, no así de carotenoides. Además, se ha informado que esta citocromo P450 reductasa al parecer es esencial para la síntesis de astaxantina, no así para la síntesis de ergosterol (Gutiérrez., 2014).

El conocimiento de la regulación de la ruta síntesis de ergosterol en *X. dendrorhous*, es limitado. Además de CYP51 (Leiva y col., 2015) se ha identificado otro citocromo P450 en esta ruta, el cual corresponde a CYP61 (Loto y col., 2012). CYP61 controlaría un paso metabólico posterior a CYP51 y posiblemente alguno de los pasos



finales de la ruta que concluye con la producción de ergosterol. La delección del gen *CYP61* genera mutantes que no producen ergosterol y acumulan otros esteroides, posiblemente ergosta-5,8-dien-3-ol y ergosta-5,8,22-trien-3-ol (Loto y col., 2012). El mutante *385-tHMGR* posiblemente acumula ergosta-5,8-dien-3-ol, reduciendo la proporción de ergosterol a aproximadamente un 94 % y 86 %, luego de las 36 h y 120 h de cultivo, respectivamente. Por lo tanto, existiría la acumulación de un intermediario, posiblemente al final de la ruta de síntesis de ergosterol. Este resultado difiere un poco de otros estudios, donde la sobreexpresión del fragmento del gen que codifica el dominio catalítico de HMG1 en la levadura *S. cerevisiae*, genera la acumulación de escualeno, el primer esteroide de la ruta (Polakowski y col., 1998). Además, es esperable que la producción de esteroides se reduzca en las cepas mutante y silvestre, ya que se ha observado que existe una disminución en la tasa de formación de esteroide en fase estacionaria (Leiva., 2015).

Por otro lado, la localización de las tiolasas codificadas por *ERG10 A* y *ERG10 B* no es completamente clara mediante el análisis bioinformático. Sin embargo, la evidencia experimental permite vincular una función a estas enzimas, es decir, como acetoacetil-CoA tiolasa o como 3-cetoacil-CoA tiolasa, como se discute a continuación para los genes *ERG10 A* y *ERG10 B*. En general, estas enzimas estarían involucradas en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y en la ruta del MVA.

En primer lugar, respecto a la ruta del MVA, la sobreexpresión del gen que codificaría a la tiolasa de esta ruta conduciría a una mayor cantidad de la enzima acetoacetil-CoA tiolasa disponible para la síntesis de acetoacetil-CoA a partir de la condensación de dos moléculas de acetil-CoA. Por lo tanto, la sobreexpresión del gen que posiblemente codifica a la tiolasa de la ruta del MVA, en particular el gen *ERG10*

*B*, tendría un leve efecto en la ruta. No obstante, el análisis bioinformático de la tiolasa que codifica sugiere que posee un posible PTS2 N-terminal, y por ello es probable que esta enzima se localice en la matriz del peroxisoma, ya que se ha descrito la presencia de una tiolasa participante de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos en ese organelo en levaduras (Shen y Burger., 2009). Esta tiolasa posee residuos aminoacídicos presentes en la secuencia consenso PTS2 N-terminal determinada en el estudio de Petriv y col., (2004). Sin embargo, estos autores informan que la secuencia consenso PTS2 es demasiado amplia en su definición para ser utilizado de forma fiable como un factor determinante en la localización peroxisomal de una proteína. Además es probable que en *X. dendrorhous* existan otras secuencias consenso de localización sub-celular que aún no han sido descritas. Por otra parte, en el árbol filogenético, la tiolasa B se agrupa con las acetoacetyl-CoA tiasas que se localizan en el citoplasma y en la mitocondria, involucradas en rutas de síntesis de esteroides y cuerpos cetónicos, respectivamente (Peretó y col., 2005), siendo la segunda ubicación descrita en las células animales (Peretó y col., 2005; Anbazhagan y col., 2014). Entonces, si *ERG10 B* efectivamente codifica a la tiolasa involucrada directamente en la ruta del MVA, su sobreexpresión no conduciría a cambios significativos en la producción de esteroides y carotenoides posiblemente porque se ha reportado que la reacción catalizada por HMGR es el paso limitante en la ruta del MVA en hongos (Andrade-Pavón y col., 2014), pues es una enzima altamente regulada en distintos niveles (DeBose-Boyd., 2008). Además, en este seminario la sobreexpresión de *ERG10 B* no afecta el nivel de transcrito de *HMGR*.

Se infiere que el gen que codifica a la tiolasa de la ruta del MVA en *X. dendrorhous* debe de ser esencial, tal como se ha descrito en *S. cerevisiae*. Además,

hasta el momento sólo se ha logrado obtener un mutante heterocigoto del *ERG10 B* en *X. dendrorhous* (no se ha logrado obtener un mutante homocigoto) (Werner., 2015), que a simple vista no muestra cambios significativos en la pigmentación. Sin embargo, se podría esperar que esta delección favorecería de cierta forma a las rutas metabólicas que utilizan acetil-CoA como sustrato, en particular la ruta de síntesis de ácidos grasos, ya que se ha informado una relación inversa entre esta ruta y la ruta de síntesis de carotenoides. Por ejemplo, en cepas de *Phaffia rhodozyma* sobreproductoras de astaxantina disminuye significativamente el contenido total de ácidos grasos (Miao y col., 2010a, 2010b; Xiao y col., 2015) y levemente el contenido de ergosterol (Miao y col., 2010a, 2010b), además se ha demostrado que el bloqueo de las rutas de síntesis de ergosterol y ácidos grasos en la cepa silvestre de esta levadura aumenta el contenido total de astaxantina (Miao y col., 2010b).

Por otro lado, en la secuencia de la tiolasa A, codificada por el gen *ERG10 A*, no se detecta un posible PTS. Por lo tanto, es probable que esta enzima esté involucrada en la ruta del MVA, ya que además es soluble en medio acuoso de acuerdo al análisis bioinformático y recientemente se describió que la delección homocigota del gen *ERG10 A* afecta la producción de carotenoides, generando una cepa mutante fenotípicamente distinta a la cepa silvestre, pero esta delección no altera significativamente la cantidad/composición de los esteroides en la levadura *X. dendrorhous* (Werner., 2015). No obstante, en el árbol filogenético esta tiolasa es agrupada con las 3-cetoacil-CoA tiolasas que justamente se localizan en el peroxisoma, lo cual es posible porque no es necesario que posea una señal con destino al peroxisoma para localizarse en este organelo. Es más, se ha descrito que proteínas sin una señal de destino al peroxisoma pueden translocarse a la matriz de

éste por un mecanismo de acoplamiento con otras proteínas que posean un PTS (Olivier y col., 2000), y como se mencionó anteriormente, es probable que en *X. dendrorhous* existan otras secuencias consenso de localización sub-celular. Un reporte que apoya la posible localización peroxisomal de la tiolasa A, es que la  $\beta$ -oxidación facilita la utilización de lípidos en ausencia de glucosa, ya que este carbohidrato reprime el ensamblaje del peroxisoma y la expresión de los genes involucrados en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos en algunos hongos (Kretschmer y col., 2012). Precisamente, el nivel de expresión del gen *ERG10 A* es reprimido por glucosa disminuyendo su nivel de transcrito hasta 120 veces, respecto de la cepa control, y este valor se normaliza cuando la glucosa del medio de cultivo es consumida (Werner., 2015). Además, el gen *ERG10 A* no es esencial, puesto que se obtuvo la delección homocigota de este gen en *X. dendrorhous* (Werner., 2015), y se ha descrito que en la cepa haploide de *S. cerevisiae*, la delección del gen que codifica a la tiolasa del peroxisoma afecta la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, sin afectar la morfología del peroxisoma, pero esta levadura es incapaz de crecer en un medio cuando la fuente de carbono son exclusivamente ácidos grasos (Marchesini y Poirier., 2003; Zhang y col., 2006). Por lo tanto, si se sobreexpresa el gen que codifica a la tiolasa involucrada en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, aumentaría la cantidad de enzima disponible para catalizar el último paso de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, donde la degradación del 3-cetoacil-CoA por esta tiolasa, produce acil-CoA (n-2) y acetil-CoA (Beopoulos y col., 2011), donde el último producto es el sustrato de la tiolasa de la ruta del MVA, la cual condensa dos acetil-CoA para generar acetoacetil-CoA (Hiser y col., 1994; Peretó y col., 2005; Fox y col., 2014). Posiblemente, la sobreexpresión de *ERG10 A* no tiene efectos en la ruta del MVA, debido a que la reacción catalizada por HMGR es el paso

limitante, tal como se mencionó anteriormente para el caso de la sobreexpresión de *ERG10 B*.

Entonces, la delección homocigota del gen *ERG10 A* afectaría el suministro de acetil-CoA hacia la ruta del MVA, afectando las rutas de síntesis de carotenoides y esteroides. No obstante, la delección de este gen sólo afecta significativamente la producción de carotenoides (Werner., 2015). Esto último es posible, debido a que la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos no es la única fuente de acetil-CoA. La conversión del piruvato a acetaldehído y luego a citrato, produce acetil-CoA, además, en levaduras oleaginosas como *X. dendrorhous* (Xiao y col., 2015), se ha identificado una ruta extra de síntesis de acetil-CoA, donde el exceso de citrato derivado del ciclo de Krebs es convertido a oxaloacetato + acetil-CoA en el citoplasma (Tehlivets y col., 2007). Pero el acetil-CoA no es sustrato exclusivo de la ruta del MVA, sino también de la síntesis de ácidos grasos (Miao y col., 2010a), de la acetilación de residuos de lisina en muchas proteínas, contribuyendo a su estabilidad y función (Lee y col., 2011) y además es el combustible del ciclo de Krebs (Berg y col., 2002). Por lo tanto, existiría una competencia por el acetil-CoA por las diferentes rutas metabólicas, que podría reflejarse en un aumento en el nivel de transcrito del gen *ERG10 B* que codificaría la tiolasa de la ruta del MVA. En efecto, cuando se deleta *ERG10 A*, el nivel de transcrito de *ERG10 B* aumenta hasta 8,7 veces, respecto al control (Werner., 2015). Serían privilegiadas aquellas rutas conducentes a la formación de metabolitos primarios involucrados directamente con la producción de biomasa y energía. Particularmente, la síntesis de carotenoides tendría un rol menor en el crecimiento, ya que se considera que la astaxantina es producida como un metabolito secundario en *Phaffia rhodozyma*

(An y col., 1991; Choudhary y Johri., 2009), en consecuencia esto explicaría la disminución de la producción sólo de los carotenoides.

Entonces, basándose en todos estos antecedentes, es muy probable que los genes *ERG10 A* y *ERG10 B* codifiquen a una 3-cetoacil-CoA tiolasa y una acetoacetyl-CoA tiolasa, respectivamente. Sin embargo, el análisis bioinformático de localización sub-celular no es muy efectivo, pero no se descarta.

Finalmente, los resultados de este seminario de tesis indican que la sobreexpresión de genes que controlan la ruta del MVA favorece la producción de carotenoides en *X. dendrorhous*, en especial de genes que codifican enzimas que controlan pasos limitantes en la ruta y que poseen una conocida regulación por los niveles de esteroides, como es el caso de HMGR. El conocimiento de la red metabólica de *X. dendrorhous* no es completa, y el entendimiento de la ruta de producción de carotenoides en esta levadura sigue siendo parcial. La sobreexpresión de genes no regulados, por ejemplo por el nivel de esteroides, favorece la producción de carotenoides en *X. dendrorhous*. Por lo tanto, este estudio también se podría abordar desde en la comprensión de la maquinaria que detecta los niveles de esteroides.



## CONCLUSIONES

- La sobreexpresión de los genes *ERG10 A* y *ERG10 B*, que posiblemente codifican enzimas que están involucradas en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y en la ruta del MVA, respectivamente, y que estarían controlando etapas metabólicas que preceden a HMGR, no tiene efecto en las rutas de síntesis de carotenoides y esteroides.
- La sobreexpresión del fragmento del gen que codifica el dominio catalítico de HMGR favorece la producción de carotenoides y de esteroides en *X. dendrorhous*, probablemente porque se genera una enzima cuya degradación no puede ser regulada por los niveles de esteroides como ha sido reportado en otras levaduras.

## BIBLIOGRAFIA

- Adrio J, Veiga M. 1995. Transformation of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol Tech* **9**:509-512.
- Alcaíno J, Barahona S, Carmona M, Lozano C, Marcoleta A, Niklitschek M, Sepúlveda D, Baeza M, Cifuentes V. 2008. Cloning of the cytochrome p450 reductase (*crtR*) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiology* **8**:169.
- Alcaíno J, Fuentealba M, Cabrera R, Baeza M, Cifuentes V. 2012. Modeling the interfacial interactions between CrtS and CrtR from *Xanthophyllomyces dendrorhous*, a P450 system involved in astaxanthin production. *J Agric Food Chem* **60**:8640-8647.
- Alcaíno J, Romero I, Niklitschek M, Sepúlveda D, Rojas MC, Baeza M, Cifuentes V. 2014. Functional characterization of *Xanthophyllomyces dendrorhous* farnesyl pyrophosphate synthase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase encoding genes that are involved in the synthesis of isoprenoid precursors. *PLoS One* **9**:e96926.
- An G, Bielich J, Auerbach R, Johnson F. 1991. Isolation and characterization of carotenoid hyperproducing mutants of yeast by flow cytometry and cell sorting. *Biotechnology* **9**:70-73.
- An G, Schuman D, Johnson E. 1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl Environ Microbiol* **55**:116-124.
- Anbazhagan P, Harijan R, Kiema T, Janardan N, Murthy M, Michels P, Juffer A, Wienenga R. 2014. Phylogenetic relationships and classification of thiolases and thiolase-like proteins of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*. *Tuberc* **94**:405-412.
- Andrade-Pavón D, Sánchez-Sandoval E, Rosales-Acosta B, Ibarra J, Tamariz J, Hernández-Rodríguez C, Villa-Tanaca L. 2014. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductases from fungi: a proposal as a therapeutic target and as a study model. *Rev Iberoam Micol* **31**:81-85.
- Armstrong G. 1994. Eubacteria show their true colors: genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *J Bacteriol* **176**:4795-4802.
- Battaner E. 2012. Estructura de las proteínas. *En* Battaner E (Ed) *Biomoléculas: una introducción estructural a la bioquímica*, pp 294-295, Salamanca, España.
- Beopoulos A, Nicaud J, Gaillardin C. 2011. An overview of lipid metabolism in yeast and its impact on biotechnological process. *Appl Microbiol Biotechnol* **90**:1193-1206.



Berninger G, Schmidtchen R, Casel G, Knörr A, Rautenstrauss K, Kunau W, Schweizer E. 1993. Structure and metabolic control of the *Yarrowia lipolytica* peroxisomal 3-oxoacyl-CoA thiolase gene. *Eur J Biochem* **216**:607-613.

Berg J, Tymoczko J, Stryer L. 2002. *Biochemistry*. New York: W H Freeman. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22427/>

Boyle J, Lew A. 1995. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends Genet* **11**:8.

Burg J, Espenshade P. 2011. Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. *Prog Lipid Res* **50**:403–410.

Burg J, Powell D, Chai R, Hughes A, Link A, Espenshade P. 2008. Insig regulates HMG-CoA reductase by controlling enzyme phosphorylation in fission yeast. *Cell Metab* **8**:522-531.

Choudhary K, Johri B. 2009. Basidiomycetus yeast: current status. *En Satyanarayama T, Kunse G. (Eds), Yeast biotechnology: Diversity and applications*, pp 38, Springer, Germany.

Contreras G, Barahona S, Rojas M, Baeza M, Cifuentes V, Alcaíno J. 2013. Increase in the astaxanthin synthase gene (*crtS*) dose by *in vivo* DNA fragment assembly in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Biotechnology* **13**:84.

Croxen R, Goosey M, Keon J, Hargreaves J. 1994. Isolation of an *Ustilago maydis* gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzymeA reductase and expression of a C-terminal-truncated form in *Escherichia coli*. *Microbiology* **140**:2363-2370.

DeBose-Boyd R. 2008. Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. *Cell Res* **18**:609-621.

Denquin S, Boutelet F, Servouse M, Karst F. 1988 b. Effect of acetoacetyl-CoA thiolase amplification on sterol synthesis in the yeast *S. cerevisiae* and *S. uvarum*. *Biotech Letters* **10**:457-462.

Denquin S, Gloeckler R, Herbert C, Boutelet F. 1988 a. Cloning, sequencing and analysis of the yeast *S. uvarum* *ERG10* gene encoding acetoacetyl-CoA. *Curr Genet* **13**:471-478.

Dimster-Denk D, Rine J. 1996. Transcriptional regulation of a sterol-biosynthetic enzyme by sterol levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**:3981-3989.

Dimster-Denk D, Thorsness M, Rine J. 1994. Feedback regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **5**:655-665.

Dixon G, Scalon D, Cooper S, Broad P. 1997. A reporter assay for fungal sterol biosynthesis inhibitors. *J Steroid Biochem Molec Biol* **62**:165-171.

Echavarrí-Erasun C, Johnson E. 2004. Stimulation of astaxanthin formation in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* by the fungus *Epicoccum nigrum*. *FEMS Yeast Res* **4**:511-519.

Elena S, Codoñer F. 2007. Herramientas bioinformáticas en fisiopatología. En Pallás V, Escobar C, Rodríguez P, Marcos J (Eds), Herramientas biotecnológicas en fisiopatología, pp 112-116, Científicos, España.

Erdmann R, Kunau W. 1994. Purification and immunolocalization of peroxisomal 3-oxoacyl-CoA thiolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**:1173-1182.

Fox A, Soto G, Mozzicafreddo M, García A, Cuccioloni M, Angeletti M, Salerno J, Ayub N. 2014. Understanding the function of bacterial and eukaryotic thiolases II by integrating evolutionary and functional approaches. *Gene* **533**:5-10.

Friesen J, Rodwell V. 2004. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. *Genome Biol* **5**:248.

Gardner R, Hampton R. 1999. A highly conserved signal controls degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase in eukaryotes. *J Biol Chem* **274**:31671-31678.

Glover J, Andrews D, Subramani S, Rachubinski R. 1994. Mutagenesis of the amino targeting signal of *Saccharomyces cerevisiae* 3-ketoacyl-CoA thiolase reveals conserved amino acids required for import into peroxisomes *in vivo*. *J Biol Chem* **269**:7558-7563.

Grunau S, Wolfgang S, Linnepe R, Neufeld C, Cizmowski C, Reinartz B, Meyer H, Warscheid B, Girzalsky W, Erdmann R. Peroxisomal targeting of PTS2 pre-import complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 2009. *Traffic* **10**:451-460.

Gu W, An G, Johnson E. 1997. Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*. *J Ind Microbiol Biot* **19**:114-117.

Guruprasad K, Reddy B, Pandit M. 1990. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting *in vivo* stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng* **4**:155-161.

Gutiérrez M. 2014. Estudio de posibles donadores de electrones alternativos en sistemas P450 de la levadura carotenogénica *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Haapalainen A, Meriläinen G, Wierenga R. 2006. The thiolase superfamily: condensing enzymes with diverse reaction specificities. *Trends Biochem Sci* **31**:64-71.

Hampton R, Bhakta H. 1997. Ubiquitin-mediated regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:12944-12948.

Hampton R, Gardner R, Rine J. 1996. Role of 26S proteasome and HRD genes in the degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Mol Biol Cell* **7**:2029-2044.

Hampton R, Rine J. 1994. Regulated degradation of HMG-CoA reductase, an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum, in yeast. *J Cell Biol* **125**:299-312.

Hara K, Morita T, Mochizuki M, Yamamoto K, Ogino C, Araki M, Kondo A. 2014. Development of a multi-gene expression system in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Microb Cell Fact* **13**:175.

Hedl M, Tabernero L, Stauffacher C, Rodwell V. 2004. Class II 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoenzymeA reductases. *J Bacteriol* **186**:1927-1932.

Hermosilla G, Martínez C, Retamales P, León R, Cifuentes V. 2003. Genetic determination of ploidy level in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **84**:279-287.

Hiser L, Basson M, Rine J. 1994. *ERG10* from *Saccharomyces cerevisiae* encodes acetoacetyl-CoA thiolase. *J Biol Chem* **269**:31383-31389.

Igual J, González-Bosch C, Dopazo J, Pérez-Ortín J. 1992 a. Phylogenetic analysis of the thiolase family. Implications for the evolutionary origin of peroxisomes. *J Mol Evol* **35**:147-155.

Igual J, González-Bosch C, Franco L, Pérez-Ortín J. 1992 b. The *POT1* Gene for yeast peroxisomal thiolase is subject to three different mechanisms of regulation. *Mol Microbiol* **6**:1867-1875.

Igual J, Matallana E, González-Bosch C, Franco L, Pérez-Ortín J. 1991. A new glucose-repressible gene identified from the analysis of chromatin structure in deletion mutants of yeast *SUC2* locus. *Yeast* **7**:379-389.

Jenssen H, Andersen J, Mantzilas D, Gutterberg T. 2004. A wide range of medium-sized, highly cationic, alpha-helical peptides show antiviral activity against herpes simplex virus. *Antiviral Res* **64**:119-126.

Jiang C, Young Kim S, Suh D. 2008. Divergent evolution of the thiolase superfamily and chalcone synthase family. *Mol. Phylogenet. Evol.* **49**:691-701.

Kanayama N, Ueda M, Atomi H, Tanaka A. 1998. Genetic evaluation of physiological functions of thiolase isozymes in the n-alkane-assimilating yeast *Candida tropicalis*. *J Bacteriol* **180**:690-698.

Kim I, Nam S, Sohn J, Rhee S, An G, Lee S, Choi E. 1998. Cloning of the ribosomal protein L41 gene of *Phaffia rhodozyma* and its use as a drug resistance marker for transformation. *Appl Environ Microbiol* **64**:1947-1949.

Klassen J. 2010. Phylogenetic and evolutionary patterns in microbial carotenoid biosynthesis are revealed by comparative genomics. *PLoS One* **5**:e11257.

Kretschmer M, Wang J, Kronstad J. 2012. Peroxisomal and mitochondrial  $\beta$ -oxidation pathways influence the virulence of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* **11**:1042-1054.

Kyte J, Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**:105-132.

Leber R, Zenz R, Schröttner K, Fuchsbichler S, Pühlinger B, Turnowsky F. 2001. A novel sequence element is involved in the transcriptional regulation of expression of the *ERG1* (squalene epoxidase) gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **268**:914-924.

Lee S, Son H, Lee J, Min K, Choi G, Kim J, Lee Y. 2011. Functional analyses of two acetyl coenzyme A synthases in ascomycete *Gibberella zeae*. *Eukaryot Cell* **10**:1043-1052.

Leiva K. 2015. Caracterización y funcionalidad del gen *CYP51* de *Xanthophyllomyces dendrorhous* involucrado en la biosíntesis de ergosterol. Tesis para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Leiva K, Werner N, Sepúlveda D, Barahona S, Baeza M, Cifuentes V, Alcaíno J. 2015. Identification and functional characterization of the *CYP51* gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* that is involved in ergosterol biosynthesis. *BMC Microbiology* **15**:89.

Livak K, Schmittgen T. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. *Methods* **25**:402-408.

Lodato P, Alcaíno J, Barahona S, Niklitschek M, Carmona M, Wozniak A, Baeza M, Jimenez A, Cifuentes V. 2007. Expression of the carotenoid biosynthesis genes in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biol Res* **40**:73-84.

Lombard J, Moreira D. 2011. Origins and early evolution of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis in the three domains of life. *Mol Biol Evol* **28**:87-99.

Loto I, Gutiérrez M, Barahona S, Sepúlveda D, Martínez-Moya P, Baeza M, Cifuentes V, Alcaíno J. 2012. Enhancement of carotenoid production by disrupting the C22-sterol desaturase gene (*CYP61*) in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiol* **12**:235.

Loto I. 2015. 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 para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Ma S, Garcia D, Redding-Johanson A, Friedland G, Chan R, Batth T, Haliburton J, Chivian D, Keasling J, Petzold C, Lee T, Chhabra S. 2011. Optimization of a

heterologous mevalonate pathway the use of variant HMG-CoA reductases. *Metab Eng* **13**:588-597.

Marchesini S, Poirier Y. 2003. Futile cycling of intermediates of fatty acid biosynthesis toward peroxisomal  $\beta$ -oxidation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**:32596-32601.

Marcoleta A, Niklitschek M, Wozniak A, Lozano C, Alcaíno J, Baeza M, Cifuentes V. 2011. Glucose and ethanol-dependent transcriptional regulation of the astaxanthin biosynthesis pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiol* **11**:190.

Mathieu M, Modis Y, Zeelen J, Engel C, Abagyan R, Ahlberg A, Rasmussen B, Lamzin V, Kunau W, Wierenga R. 1997. *J Mol Biol* **273**:714-728.

Miao L, Wang Y, Chi S, Yan J, Guan G, Hui B, Li Y. 2010 a. Reduction of fatty acid flux results in enhancement of astaxanthin synthesis in a mutant strain of *Phaffia rhodozyma*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **37**:595-602.

Miao L, Chi S, tang Y, Su Z, Yin T, Guan G, Li Y. 2010 b. Astaxanthin biosynthesis is enhanced by high carotenogenic gene expression and decrease of fatty acids and ergosterol in *Phaffia rhodozyma* mutant strain. *FEMS Yeast Res* **11**:192-201.

Miziorko H. 2011. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* **505**:131-143.

Modis Y, Wierenga R. 1999. A biosynthetic thiolase in complex with a reaction intermediate: the crystal structure provides new insights into the catalytic mechanism. *Structure* **7**:1279-1290.

Olivier L, Kovacs W, Masuda K, Keller G, Krisans S. 2000. Identification of peroxisomal targeting signals in cholesterol biosynthetic enzymes: AA-CoA thiolase, HMG-CoA synthase, MPPD, and FPP synthase. *J Lipid Res* **41**:1921-1935.

Peretó J, López-García P, Moreira D. 2005. Phylogenetic analysis of eukaryotic thiolases suggests multiple proteobacterial origins. *J Mol Evol* **61**:65-74.

Petriv O, Tang L, Titorenko V, Rachubiski R. 2004. A new definition for the consensus sequence of the peroxisome targeting signal type 2. *J Mol Biol* **341**:119-134.

Poirier Y, Antonenkov V, Glumoff T, Hiltunen J. 2006. Peroxisomal  $\beta$ -oxidation. A metabolic pathway with multiple functions. *Biochim Biophys Acta* **1763**:1413-1426.

Polakowski T, Stahl U, Lang C. 1998. Overexpression of a cytosolic hydroxymethylglutaryl-CoA reductase leads to squalene accumulation in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* **49**:66-71.

Reynders M, Rawling D, Harrison S. 1997. Demonstration of Crabtree effect in *Phaffia rhodozyma* during continuous and fed-batch cultivation. *Biotechnol Lett* **19**:549-552.

- Rodríguez-Sáiz M, de la Fuente J, Barredo J. 2010. *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. *Appl Microbiol Biotechnol* **88**:645-658.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**:406-425.
- Sambrook J y Russel D. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schmidt I, Schewe H, Gassel S, Jin C, Buckingham J, Hümbelin M, Sandmann G, Schrader J. 2011. Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**:555-571.
- Schmidt-Dannert C. 2000. Engineering novel carotenoids in microorganisms. *Curr Opin Biotechnol* **11**:255-261.
- Schneider T, Stephens R. 1990. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res* **18**:6097-6100.
- Schroeder W, Johnson E. 1993. Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. *J Gen Microbiol* **139**:907-912.
- Shen Y, Burger G. 2009. Plasticity of a key metabolic pathway in fungi. *Funct Integr Genomics* **9**:145-151.
- Soto G, Stritzler M, Lisi C, Alleva K, Pagano M, Ardila F, Mozzicafreddo M, Cuccioloni M, Angeletti M, Ayub N. 2011. Acetoacetyl-CoA thiolase regulates the mevalonate pathway during abiotic stress adaptation. *J Exp Bot* **62**: 5699-5711.
- Sturley S. 2000. Conservation of eukaryotic sterol homeostasis: new insights from studies in budding yeast. *Biochim Biophys Acta* **1529**:155-163.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**: 2725-2729.
- Tehlivets O, Scheuringer K, Kohlwein S. 2007. Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochim Biophys Acta*. **1771**:255-270.
- Theesfeld C, Pourmand D, Davis T, Garza R, Hampton R. 2011. The sterol-sensing domain (SSD) directly mediates signal-regulated endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase isozyme Hmg2. *J Biol Chem* **286**:26298-26307.
- Tsai Y, Leichnerb G, Pearce M, Wilson G, Wojcikiewicz R, Roitelmanb J, Weissman A. 2012. Differential regulation of HMG-CoA reductase and Insig-1 by enzymes of the ubiquitin-proteasome system. *Mol Biol Cell* **23**:4484-4494.

- Ueda M, Kanayama N, Tanaka A. 2000. Genetic evaluation of peroxisomal and cytosolic acetoacetyl-CoA thiolase isozymes in n-alkane-assimilating diploid yeast *Candida tropicalis*. *Cell Biochem Biophys* **32**:285-290.
- Vazquez M, Santos V, Parajo J. 1997. Effect of the carbon source on the carotenoid profiles in *Phaffia rhodozyma* strains. *J Ind Microbiol Biot* **19**:263-268.
- Verdoes J, Krubasik K, Sandmann G, van Ooyen A. 1999 a. Isolation and functional characterization of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Mol Gen Genet* **262**:453-461.
- Verdoes J, Misawa N, van Ooyen A. 1999 b. Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnol Bioeng* **63**:750-755.
- Verwaal R, Wang J, Meijnen J, Visser H, Sandmann G, van den Berg J, van Ooyen A. 2007. High-level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Environ Microbiol* **73**:4342-4350.
- Visser H, van Ooyen A, Verdoes J. 2003. Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *FEMS Yeast Res* **4**:221-231.
- Werner, N. 2015. Estudio genético, funcional y regulatorio de la ruta del mevalonato de *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis inédita para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Wery J, Gutker D, Renniers A, Verdoes J, van Ooyen A. 1997. High copy number integration into the ribosomal DNA of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Gene* **184**:89-97.
- Yamagami S, Iida T, Nagata Y, Ohta A, Takagi M. 2001. Isolation and characterization of acetoacetyl-CoA thiolase gene essential for n-decane assimilation in yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochem Biophys Res Commun* **282**:832-838.
- Xiao A, Jiang X, Ni H, Yang Q, Cai H. 2015. Study on the relationship between intracellular metabolites and astaxanthin accumulation on *Phaffia rhodozyma* fermentation. *Electron J Biotechnol* **18**:148-153.
- Yan G, Wen K, Duan C. 2012. Enhancement of  $\beta$ -carotene production by over-expression of HMG-CoA reductase coupled with addition of ergosterol biosynthesis inhibitors in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Microbiol* **64**:159-163.
- Zhang B, Carlson R, Srienc F. 2006. Engineering the monomer composition of polyhydroxyalkanoates synthesized in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **72**:536-543.
- Zhang Y, Rao R. 2010. Beyond ergosterol: Linking pH to antifungal mechanisms. *Virulence* **1**:551-554.