

UCH-FC  
Biotecnología  
L 533  
C. 1



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE  
PREGRADO

**“Caracterización y funcionalidad del gen *CYP51* de  
*Xanthophyllomyces dendrorhous* involucrado en la biosíntesis de  
ergosterol”**

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

**KRITSYE MARION ANDREA LEIVA LEIVA**



Director de Seminario de Título: Dra. Jennifer Alcaíno Gorman.  
Co-Director de Seminario de Título: Dr. Víctor Cifuentes Guzmán.

Enero 2015  
Santiago-Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Srta. Kritsye Marion A. Leiva Leiva.

### **“Caracterización y funcionalidad del gen *CYP51* de *Xanthophyllomyces dendrorhous* involucrado en la biosíntesis de ergosterol”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

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

---

---

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

### **Comisión de Evaluación**

Dra. María Cecilia Rojas Garrido  
**Presidente Comisión**

---

---

Dra. Margarita Carú Marambio  
**Evaluador**



## BREVE BIOGRAFÍA

Mi vida ha sido sencilla, aún no he realizado viajes increíbles ni he vivido experiencias del otro mundo, pero les intentaré contar mi historia de la forma más entretenida posible. Mi nombre es Kritsye Leiva, un increíble gesto de originalidad de mi madre, actualmente tengo 25 años y vivo en Santiago junto a mi hermana Nikky Leiva (otro genuino acto de creatividad). Nací en Chillán, Región del Bío Bío, Chile un 24 de Octubre de 1989. Pero mi crianza se dio en San Carlos, ciudad aún más pequeña de la misma Región. Mi infancia transcurrió de manera placentera llena de amigos y animales, lejos del estrés de las ciudades modernas. Es por esto que los recuerdos que tengo de mis primeros años están llenos de momentos alegres, y de la más profunda inocencia. En cuanto a mi familia, en esos años estaba conformada por mis padres Jacqueline y Jaime, que ahora se encuentran felizmente caminando por senderos separados, para bien de toda la comunidad. Además, como ya había mencionado tengo una hermana menor llamada Nikky, que llegó a llenar de felicidad mi vida cuando apenas tenía tres años de edad. Y, por supuesto, mi abuelo Desiderio, un ser con el cual congeniaba tan bien que aunque nos separaban décadas no era necesario el lenguaje para comunicar nuestras ideas y travesuras, por esto y mucho más es que a este hombre le debo gran parte de lo que soy. Por último, no puedo dejar de mencionar a mi Teito, que lamentablemente se fue al cielo de los perritos este año, siempre lo recordaremos como un amigo inconmensurablemente fiel y juguetón.

Así, entre juegos e infinito amor fui creciendo, y llegó la hora de iniciar la etapa escolar, primero en el jardín y luego en el Instituto Santa María de San Carlos, pequeño colegio católico de la Congregación de Jesús. En esta etapa me destacué principalmente por méritos académicos y compañerismo, siendo francamente no muy bien dotada para deportes y música. Lo pasé muy bien en el colegio, compartí con gente sencilla y de diferentes pensamientos, lo cual me ayudó en la búsqueda de una identidad propia y en términos de valores y principios. Fue dentro de esos años que participé en diferentes actividades con el fin de identificar potenciales habilidades, dentro de ellos: grupos de teatro, concursos de debate, y campeonatos de matemáticas. Esta última actividad cambió radicalmente mi futuro, puesto que motivó mi traspaso hacia el Colegio Seminario Padre Alberto Hurtado, donde terminé la enseñanza media. Por otro lado, dentro de esos torneos de matemática conocí al hombre más maravilloso del mundo, Gustavo Lagos.

Luego, tomé otra decisión crucial en mi vida, inicié los estudios de educación superior en la Universidad de Chile. Fue en esta etapa donde afiné mi percepción del mundo, sinceramente mi vida dio un vuelco en 180° en cuanto a la relevancia de los temas país como la desigualdad social, la pobreza y la injusticia. Gracias a esta casa de estudios pude valorizar la importancia de la equidad en la educación, la falta de oportunidades de las personas en estados vulnerables y todo ello me motivó a poner aún más energía en mi trabajo para aportar de la mejor forma posible para que Chile sea un lugar más fraterno donde vivir. Actualmente, la vida hizo que ampliara mis horizontes y me encuentro realizando un postgrado en Ingeniería en la Pontificia Universidad Católica de Chile. En términos académicos este ha sido un desafío importante, pero confié en Dios que todo se resolverá exitosamente.

## DEDICATORIA

A mi madre por el amor infinito, la confianza y el apoyo incondicional. Por los miles de sacrificios y detalles cariñosos que sólo una madre excepcional es capaz de dar. Por la confianza entregada en cada etapa y decisión. Porque estuviste conmigo, siempre. Pero, principalmente, porque de los muchos privilegios que me ha dado la vida, ser tu hija es el mayor.

A mi hermana Nikky, por su alegría de vivir, por cada momento regalado, por tenerme paciencia y aceptar mis locuras. Por ser una de las personas más cariñosas y nobles que conozco.

A mi familia, en especial a mis abuelos Trinidad y Desiderio, quienes marcaron mi vida desde temprano, con su historia y con mucho amor.

A la familia de Gustavo, por cuidarme y apoyarme en innumerables ocasiones. Por la nobleza de sus corazones y por su generosidad. Especialmente, a Marcelo Lagos (papá), Liliana Flores (mamá) y Elvira González (abuelita).

A mis amigos de Bachillerato, Vanessa Meneses, Mario Leverone, Hugo Ochoa, Sebastián Otárola, Martín Majluf y Camila Miño, por las alegrías que compartimos, por los momentos de estudio y por los de diversión, por la solidaridad, la buena disposición y el compañerismo. Porque transformaron ese proceso en una buena experiencia, y porque espero que la vida nos permita compartir mucho más.

A mis amigos de Ingeniería en Biotecnología, Gustavo Morales, Silvia Cantellano, Consuelo Macaya, Benjamín Cannobio, Camila Flores, Stefania Morales, Luis Felipe Quiroz, Marco Gaete y Pablo Lizama por acompañarme y apoyarme durante toda la carrera. Por ser especiales, alegres y los mejores compañeros que uno puede tener. Por los almuerzos, las tardes de estudio, las risas y la amistad que perdura, pese a la falta de tiempo y a la distancia que en algunas ocasiones nos ha separado. Porque con ustedes, la Facultad de Ciencias se convirtió en un lugar aún más entretenido y acogedor.

A mis amigas del colegio, Camila Campos, Natalie Bustos y Paulette Sarmiento, por los hermosos momentos que compartimos juntas, por la ternura y generosidad que entregan día a día en sus diferentes profesiones, y porque pese al paso del tiempo siempre me han brindado su amistad y afecto.

A mi profesores, José Miguel Hermosilla (colegio), Luis Valdebenito (colegio) y Cristian Reyes (Bachillerato), por guiarme hacia el sendero de las Ciencias, especialmente en el área Matemática. Por enseñarme las maravillas del saber con tanto ahínco, por los consejos, la confianza y el apoyo.

Al laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, por todo el aprendizaje que experimenté durante mi estadía. Por la entrega con la que cumplen sus labores cotidianas, por la solidaridad y nobleza con la que guían a los más nuevos hacia el conocimiento.

Y, finalmente, a Gustavo, por ser mi compañero, mi amigo, y mi confidente durante más de siete años. Por ser infinitamente noble, cariñoso y tierno, por acompañarme en mis locuras y mis momentos intelectuales. Por quererme, cuidarme y hacerme feliz. Porque hemos crecido juntos, y por todos los innumerables detalles que día a día me enamoran. Pero, por sobre todo, porque la vida es más dulce cuando estás a mi lado, y puedo ver esos ojos bonitos.

## AGRADECIMIENTOS

A la vida, por darme la oportunidad de estudiar una carrera tan interesante y ambiciosa, y por enseñarme que lo más importante es entregar lo mejor de sí, brindando alegría a los demás.

A la Universidad de Chile, por acogerme durante estos últimos años. Por permitirme crecer, madurar y aprender. Por enseñarme mucho más de lo que representa un título profesional.

A mis compañeros de generación, Cecilia Salazar, Carlos Muñoz, Violeta Kallens, Felipe Maza, Raúl Segovia, Salomé Muñoz, Francisco Osorio, Erick Armingol, Arantazú Bidegain, Mauro Campos, Javiera Álvarez, Claudio Osorio, Ignacio Avalos, Ignacio Morales, Sergio González, Carolina Moraga, Pablo Flores, Camilo Riquelme, Vicente Muñoz, Pablo Mancilla, Felipe Vega, Pablo Laverde, Arturo Lamilla, Valentina Gárate, Cristóbal Costoya, Marcelo Sotomayor, Felipe Horta, Fernando Ormeño, Francisco Pérez, Gisselle Escobar, Sebastián Pérez y Susana Paredes por las alegrías y sacrificios que marcaron nuestro paso por la Universidad de Chile. Por las tardes de estudio, los trabajos intensos, por las anécdotas, las fiestas, la risas y los hermosos recuerdos que guardaré en mi corazón.

Al laboratorio de Genética de la Universidad de Chile, donde conocí personas increíbles, cuyo amor a la Ciencia supera los constantes obstáculos que el quehacer científico impone. En especial, agradezco a: Jennifer Alcaíno (Proyecto Fondecyt 11121200), Víctor Cifuentes, Nicole Werner y Dionisia Sepúlveda.

A Marco Gaete, por su apoyo, comentarios y sugerencias, y en especial, por su compañía.

A Salvador Barahona, por su infinita paciencia, generosidad y buena voluntad. Por ayudarme en innumerables ocasiones, por dedicar tanto esfuerzo y cariño al trabajo, y por su gran corazón.

A Mario Carrasco, por la alegría y compañerismo de tantas tardes de laboratorio. Por los consejos, confesiones y conversaciones. Por demostrarme que el trabajo duro puedo ir de la mano con una vida saludable y divertida.

A María Soledad Gutiérrez, Gabriela Contreras, Jaime Solís y Pamela Córdova, por sus consejos, apoyo y solidaridad. Por ayudarme en diferentes experimentos, por responder con amabilidad mis dudas y por ser personas de gran nobleza.

A Rafael Negrete, porque sin su apoyo en el laboratorio las cosas no resultarían. Por su buen ánimo, sus tallas y su buena disposición.

A mi familia, porque sin sus consejos y apoyo llegar a la meta habría sido imposible. Gracias por tanto cariño, paciencia y por los sacrificios que han realizado por mí, son el mejor regalo que la vida me ha podido dar.

Y, por último, a Gustavo, por su cariño y apoyo. Por ayudarme a ser perseverante y optimista, y por darme valor para seguir cuando a veces mi espíritu flaqueaba. Gracias, por tanta entrega y amor.

## INDICE DE CONTENIDOS

	Página
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	
ABSTRACT	
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes generales	1
1.2 Enzimas Citocromo P450	9
1.3 Biosíntesis de ergosterol en levaduras	13
1.4 Familia CYP51	15
1.5 Hipótesis del trabajo	18
1.6 Objetivo General	18
1.7 Objetivos Específicos	18
<b>2 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>20</b>
2.1 Cepas, Plásmidos y Cultivo	20
2.2 Obtención de cepas haploides de <i>S. cerevisiae</i>	22
2.3 Oligonucleótidos y Ácidos Nucleicos	24
2.4 Purificación de ácidos nucleicos	25
2.4.1 Purificación de DNA plasmidídico	25
2.4.2 Purificación de RNA total de <i>X. dendrorhous</i>	26
2.5 Reacciones de PCR y RT-PCR	27
2.6 Análisis de DNA	29
2.6.1 Electroforesis en geles de agarosa	29
2.6.2 Secuenciación de DNA	30
2.7 Transformación genética por electroporación	30
2.7.1 Construcción de plásmidos recombinantes	30
2.7.2 Electrotransformación de <i>E. coli</i>	30
2.7.3 Electrotransformación de <i>S. cerevisiae</i>	31
2.7.4 Electrotransformación de <i>X. dendrorhous</i>	32
2.8 Extracción y análisis de carotenoides y ergosterol	32
2.9 Análisis bioinformático de la proteína CYP51 deducida de <i>X. dendrorhous</i>	35

	Página
<b>3 RESULTADOS</b>	36
<b>3.1 Clonación y análisis de secuencia del gen <i>CYP51</i> de <i>X. dendrorhous</i></b>	36
<b>3.2 Análisis de funcionalidad del gen <i>CYP51</i> por complementación heteróloga en <i>S. cerevisiae</i></b>	47
3.2.1 Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	47
3.2.2 Curva de Crecimiento y producción de esteroides en el tiempo.	60
<b>3.3 Análisis de mutantes de <i>cyp51</i> de <i>X. dendrorhous</i> en cuanto a su crecimiento, producción de ergosterol y carotenoides.</b>	64
3.3.1 Obtención de cepa mutante <i>cyp51</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	64
3.3.2 Curva de crecimiento.	69
3.3.3 Producción de pigmentos y esteroides en el tiempo.	71
<b>3.4 Análisis de expresión de genes de la ruta del mevalonato, carotenogénicos y de la biosíntesis de ergosterol por RT-qPCR en mutantes de <i>cyp51</i> de <i>X. dendrorhous</i></b>	74
<b>4 DISCUSIÓN</b>	76
<b>4.1 Clonación y análisis de secuencia del gen <i>CYP51</i> de <i>X. dendrorhous</i></b>	76
<b>4.2 Análisis de funcionalidad del gen <i>CYP51</i> de <i>X. dendrorhous</i></b>	78
<b>5 CONCLUSIONES</b>	86
<b>6 BIBLIOGRAFÍA</b>	87

## INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1.- Cepas de levaduras empleadas y construidas en este trabajo.	21
Tabla 2.- Plásmidos utilizados y construidos en este trabajo.	22
Tabla 3.- Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.	24
Tabla 4.- Composición de esteroides en el tiempo de la cepa parental <i>S. cerevisiae</i> Meyen ex E.C. Hansen, y cepas transformantes <i>S. cerevisiae</i> hERG11 y <i>S. cerevisiae</i> hCYP51 de acuerdo a sus perfiles de RP-HPLC (mg/g peso seco de levadura).	63
Tabla 5.- Composición de carotenoides en el tiempo de la cepa silvestre CBS 6938 y cepa mutante CBS-CYP51+/- de <i>X. dendrorhous</i> (µg/g peso seco de levadura).	72
Tabla 6.- Composición de esteroides en el tiempo de la cepa silvestre <i>X. dendrorhous</i> CBS 6938 y cepa mutante <i>X. dendrorhous</i> CBS-CYP51+/- de acuerdo a sus perfiles de RP-HPLC (mg/g peso seco de levadura).	73

## INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.- Vía del Mevalonato, biosíntesis de astaxantina y ergosterol.	3
Figura 2.- Estructura molecular de metabolitos de la biosíntesis de Ergosterol.	4
Figura 3.- Estructura molecular de metabolitos de la biosíntesis de carotenoides.	5
Figura 4.- Esquema de la reacción de monoxigenación de un sustrato orgánico (RH) realizada por la superfamilia de enzimas citocromo P450.	10
Figura 5.- Esquema de la reacción de 14- $\alpha$ -desmetilación de tres pasos catalizada por CYP51.	16
Figura 6.- Estructura del gen <i>CYP51</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	37
Figura 7.- Comparación de secuencia deducida de <i>CYP51</i> de <i>X. dendrorhous</i> y <i>ERG11</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	38
Figura 8.- Estructura de la proteína <i>CYP51</i> deducida de <i>X. dendrorhous</i> .	40
Figura 9.- Modelos tridimensionales de la proteína <i>CYP51</i> deducida de <i>X. dendrorhous</i> .	41
Figura 10.- Comparación de perfiles energéticos de modelos tridimensionales de la proteína <i>CYP51</i> deducida de <i>X. dendrorhous</i> .	42
Figura 11.- Superposición de estructuras tridimensionales de los modelos obtenidos de <i>CYP51</i> de <i>X. dendrorhous</i> y los respectivos moldes.	44
Figura 12.- <i>Docking</i> del modelo obtenido de <i>CYP51</i> de <i>X. dendrorhous</i> y los potenciales ligandos lanosterol e itraconazol.	45
Figura 13.- Resultado de PCR de colonia de <i>E. coli</i> transformada con el vector YEpNP-gERG11.	48

	Página
Figura 14.- Resultado de PCR de colonia de clon n°18 de <i>E. coli</i> transformado con vector YEpNP-gERG11.	49
Figura 15.- Resultado de PCR de colonia y PCR de DNA plasmídico extraído de <i>E. coli</i> transformado con vector YEpNP-cCYP51.	49
Figura 16.- Resultado de PCR de clones de <i>S. cerevisiae</i> transformados con vector el YEpNP-gERG11.	51
Figura 17.- Resultado de PCR de clones de <i>S. cerevisiae</i> transformados con el vector YEpNP-cCYP51.	52
Figura 18.- Resultado de PCR de clones haploides de <i>S. cerevisiae</i> transformados con el vector YEpNP-gERG11.	55
Figura 19: Resultado de PCR de clones haploides de <i>S. cerevisiae</i> transformados con los vectores YEpNP-gERG11 y YEpNP-cCYP51.	58
Figura 20.- Curva de crecimiento a 22°C de cepas transformantes de <i>S. cerevisiae</i> en medio YM.	61
Figura 21.- Análisis de esteroides por RP-HPLC representativo de la cepa <i>S. cerevisiae</i> Meyen ex E.C Hansen y cepas transformante <i>S. cerevisiae</i> hERG11 y <i>S. cerevisiae</i> hCYP51.	64
Figura 22.- Estructura del módulo para la escisión del gen <i>CYP51</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	66
Figura 23.- Resultado de PCR de cepa mutante de <i>X. dendrorhous</i> CBS-CYP51+/-.	68
Figura 24.- Curva de crecimiento a 22°C de cepas de <i>X. dendrorhous</i> en medio YM.	70
Figura 25.- Análisis de expresión de genes <i>HMGR</i> , <i>CYP51</i> y <i>crtR</i> en silvestre CBS 6938 y cepa mutante CBS-CYP51+/- de <i>X. dendrorhous</i> por RT-qPCR.	75

## INDICE DE ABREVIATURAS

cDNA	DNA complementario
CPR	Citocromo P450 reductasa
CYP	Proteína Citocromo P450
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
DO	Densidad óptica
EDTA	Tetra acetato disódico de etilendiamina
G418	Geneticina
Kb	Kilobases
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
ORF	Marco abierto de lectura
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ppm	Partes por millón
P450	Familia de hemoproteínas Citocromo P450
Rcf	Fuerza centrífuga relativa
RNA	Ácido ribonucleico
RP-HPLC	Cromatografía líquida en fase reversa
TAE	Tris, acetato, EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris, EDTA
YM	Medio de cultivo extracto de levadura-malta
UV	Luz ultra violeta

## RESUMEN

*X. dendrorhous* es una levadura basidiomycete que sintetiza astaxantina, un carotenoide de gran interés biotecnológico. Actualmente, estudios de regulación de la vía carotenogénica en este microorganismo demostraron que los esteroides cumplen un rol importante en la carotenogénesis. Cabe destacar que las vías de síntesis de carotenoides y esteroides se encuentran relacionadas, pues ambas derivan de la vía del mevalonato y en ellas participan enzimas citocromo P450s (CYPs). Las CYPs comprenden una superfamilia de proteínas, donde destaca la familia CYP51 con actividad C14-desmetilasa de esteroides. El objetivo del trabajo fue caracterizar y estudiar la funcionalidad del gen *CYP51* de *X.dendrorhous* involucrado en la biosíntesis de ergosterol.

Mediante análisis bioinformático del genoma y transcriptoma de la levadura, se identificó un posible gen *CYP51*, cuya funcionalidad se estudió por complementación heteróloga en una cepa de *S. cerevisiae* mutante para dicho gen. Se realizó un análisis fenotípico de la cepa transformante hCYP51 mediante construcción de curvas de crecimiento y análisis de producción de esteroides. Cabe destacar que la complementación de la actividad C14-desmetilasa en la cepa mutante de *S. cerevisiae*, permitiendo su sobrevivencia y la biosíntesis de ergosterol confirma la participación del gen *CYP51* de *X. dendrorhous* en la vía de síntesis de ergosterol. Además, se evaluó el impacto de la eliminación de un alelo del gen *CYP51* de *X. dendrorhous* en cuanto a producción de carotenoides y esteroides. Los resultados revelaron una disminución de un 36% del contenido de esteroides, principalmente ergosterol, y un aumento de 30% del contenido de carotenoides respecto a la cepa silvestre de *X. dendrorhous* después de 24 y 120 h de cultivo, respectivamente.

Además, se analizó el cambio en los patrones de expresión de los genes *HMGR*, *crtR* y *CYP51* en la cepa mutante heterocigota *CYP51*<sup>+/-</sup> respecto a la cepa silvestre, esto mostró que la escisión de uno de los alelos del gen *CYP51* provoca una disminución en el nivel de expresión de dicho gen y está asociada a un aumento de los niveles de expresión de los genes *HMGR* y *crtR*, que codifican enzimas involucradas en la vía del mevalonato y en la vía de síntesis de carotenoides o esteroides, respectivamente.

De esta manera, debido a que la expresión del gen *CYP51* de *X. dendrorhous* complementa la deficiencia de la enzima 14  $\alpha$ -desmetilasa de esteroides en *S. cerevisiae* permitiendo su sobrevivencia y la biosíntesis de ergosterol; su mutación en *X. dendrorhous* altera la producción de esteroides y de carotenoides junto con la modificación de los patrones de expresión de genes en ambas vías, se concluye que efectivamente el gen *CYP51* de *X. dendrorhous* corresponde a un 14  $\alpha$ -desmetilasa de esteroides que participa en la biosíntesis de ergosterol.

## ABSTRACT

*Xanthophyllomyces dendrorhous* is a basidiomycete yeast that synthesizes astaxanthin, which is a carotenoid of great biotechnological interest. Currently, studies regarding the regulation of the carotenogenic pathway in this organism showed that sterols play an important regulatory role in carotenogenesis. It is noteworthy that the carotenoid and sterols synthesis pathways are related because both derived from the mevalonate pathway and in both pathways, cytochrome P450 enzymes (CYPs) are involved. The CYPs comprise a superfamily of proteins and among them, the CYP51 family that has sterol C14-demethylase activity is one of the most remarkable. The objective of this work was to characterize and study the functionality of the *CYP51* gene of *X. dendrorhous*, which is involved in ergosterol biosynthesis.

By bioinformatic analyses of the genome and the transcriptome of yeast, a putative *CYP51* gene was identified and its functionality was studied by heterologous complementation in *S. cerevisiae* using a mutant strain. Phenotypic analyses of the hCYP51 transformant strain were performed by the construction of growth curves and the analysis of sterol production. It is noteworthy that the expression of *CYP51* gene complements the deficiency of the 14  $\alpha$ -demethylase enzyme in *S. cerevisiae* allowing its survival and ergosterol biosynthesis, and therefore it can be stated that the *CYP51* gene of *X. dendrorhous* is involved in ergosterol biosynthesis. Furthermore, the impact of the disruption of one allele of the *CYP51* gene in *X. dendrorhous* regarding the production of carotenoids and sterols was evaluated. The results showed a decrease of 36% of the sterol content (principally ergosterol) and an increase of 30% of the carotenoid content compared to the wild type *X. dendrorhous* strain after 24 and 120 h of culture, respectively. In addition, the fold change in the expression of *HMGR*, *crtR* y *CYP51* genes between the mutant strain compared to the wild-type one, showed that

indeed the disruption of one allele of the *CYP51* gene of *X. dendrorhous* cause a reduction in the levels of its transcript, which was associated with increased expression of the *HMGR* and *crtR* genes that encode enzymes involved in the mevalonate pathway and the carotenoid and sterol synthesis pathways, respectively.

In conclusion, because the expression of *CYP51* gene complements the deficiency of the sterol 14  $\alpha$ -demethylase enzyme in *S. cerevisiae* allowing its survival and ergosterol biosynthesis, and that the *CYP51* mutation in *X. dendrorhous* alters the production of sterols and carotenoids, and modifies the expression patterns of genes in both pathways (*HMGR*, *crtR* and *CYP51*), it can be stated that the *CYP51* gene of *X. dendrorhous* is involved in ergosterol biosynthesis.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Antecedentes generales

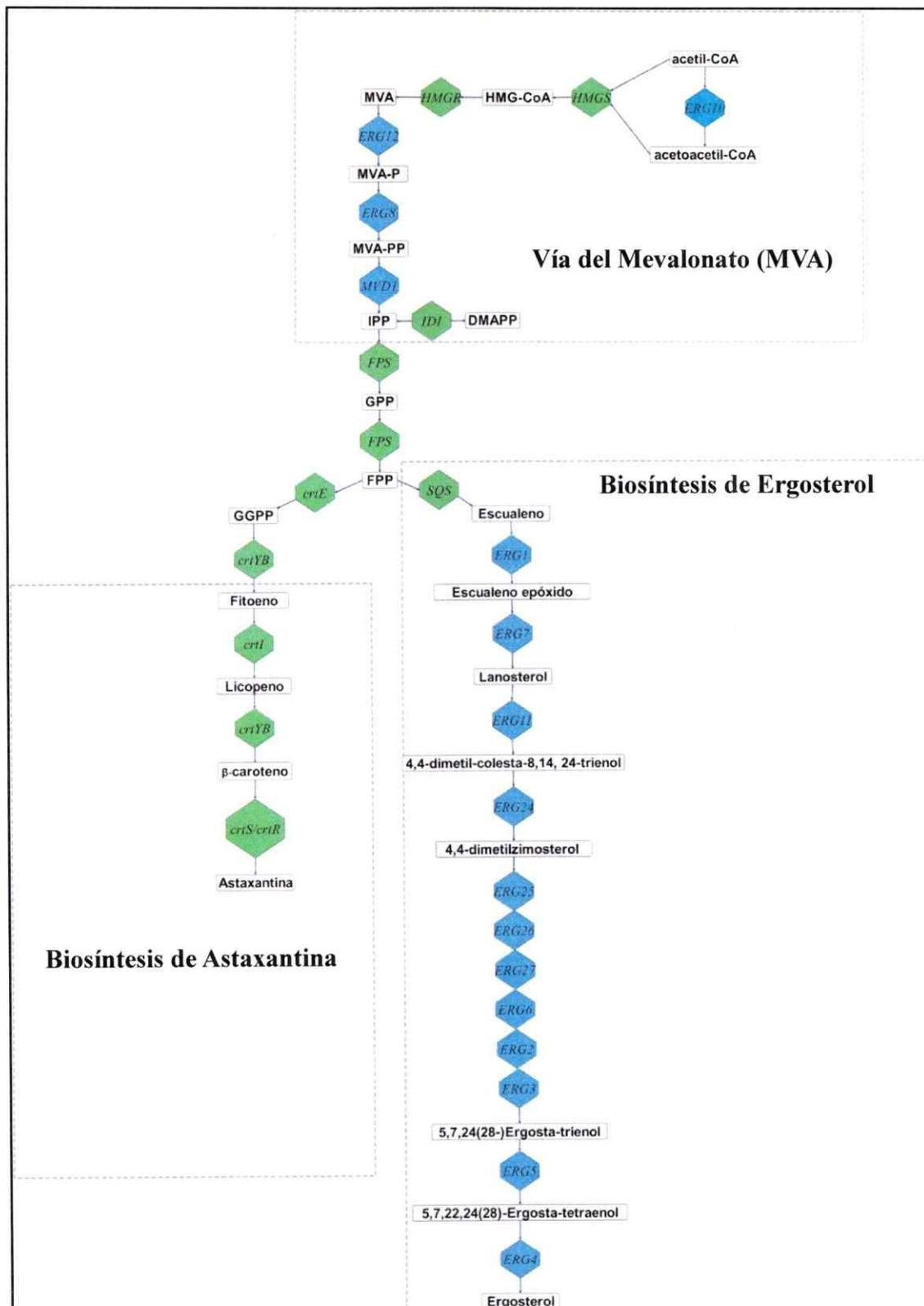
Los isoprenoides o terpenos son un vasto grupo de compuestos naturales que cumplen diversas funciones celulares, desde la síntesis de una gran gama de compuestos (ergosterol, colesterol, carotenoides, ubiquinonas, entre otros) hasta el control del crecimiento (Goldstein y Brown, 1990). Los isoprenoides son metabolitos ubicuos que se encuentran en todos los organismos vivos, siendo especialmente abundantes en el reino vegetal. La estructura básica de esta familia de compuestos es la molécula isopreno (2-metil-1,3-butadieno), cuyas formas activas son el isopentenil pirofosfato (IPP) y su isómero, dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Así, por posteriores reacciones sucesivas de condensación y otras modificaciones químicas como ciclaciones, oxidaciones, entre otras, se genera la enorme complejidad y diversidad de esta clase de compuestos orgánicos con más de 55.000 moléculas identificadas.

En general, en eucariontes la ruta del mevalonato (MVA) es considerada la principal vía de síntesis de IPP. Sin embargo, existe otra ruta, la vía del metileritritol fosfato (MEP), que ha sido descrita en eubacterias y plastidios (Disch y Rohmer, 1998; Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002). En la vía del MVA (resumida en Mizioroko, 2011), en primer lugar ocurre la síntesis acetoacetyl-CoA mediante la condensación de dos moléculas de acetyl-CoA por acción de la enzima acetyl-CoA transferasa. Luego, se forma 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) por la condensación de acetoacetyl-CoA con una tercera molécula de acetyl-CoA. A continuación, la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR) cataliza la reacción limitante en la vía del mevalonato que corresponde a la conversión de HMG-CoA a MVA mediante dos reacciones de reducción. Posteriormente en la ruta de síntesis de IPP, la enzima

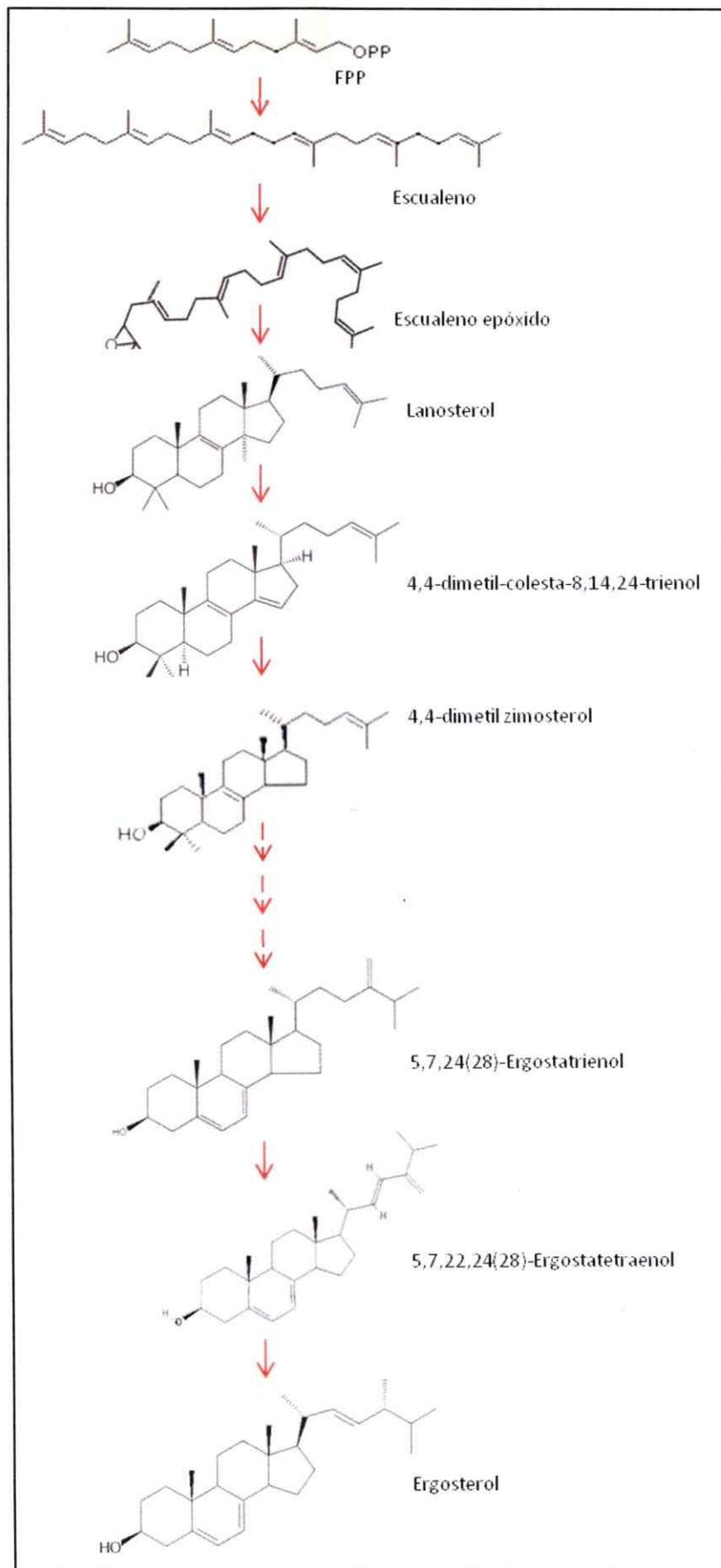
mevalonato quinasa (MK) cataliza la fosforilación del MVA formando MVA-5-fosfato (MVAP). Luego, el MVAP es fosforilado por la enzima fosfomevalonato quinasa (PMK), generando MVA 5-pirofosfato (MVAPP). Finalmente, por acción de la enzima pirofosfomevalonato decarboxilasa (MVD1), el mevalonato 5-pirofosfato es convertido en IPP, el precursor de la biosíntesis de isoprenoides a partir del cual se derivan las rutas de biosíntesis de esteroides y carotenoides en organismos carotenogénicos (Figura 1).

Los esteroides son moléculas celulares esenciales que participan en la regulación de la fluidez y permeabilidad de la membrana, regulación de la actividad de enzimas unidas a membrana y la modulación de la tasa de crecimiento. Además, son precursores de moléculas bioactivas tales como: hormonas esteroidales en mamíferos, hormonas brasinoesteroides en plantas, y ecdiesteroides en insectos que regulan procesos del desarrollo (Lepesheva y Waterman, 2007). El ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol) es el principal esteroide fúngico y su ruta biosintética ha sido caracterizada en diversos organismos, aunque los mecanismos de regulación de su biosíntesis aún no se han dilucidado completamente (Arthington-Skaggs y col., 1996) (Figura 2).

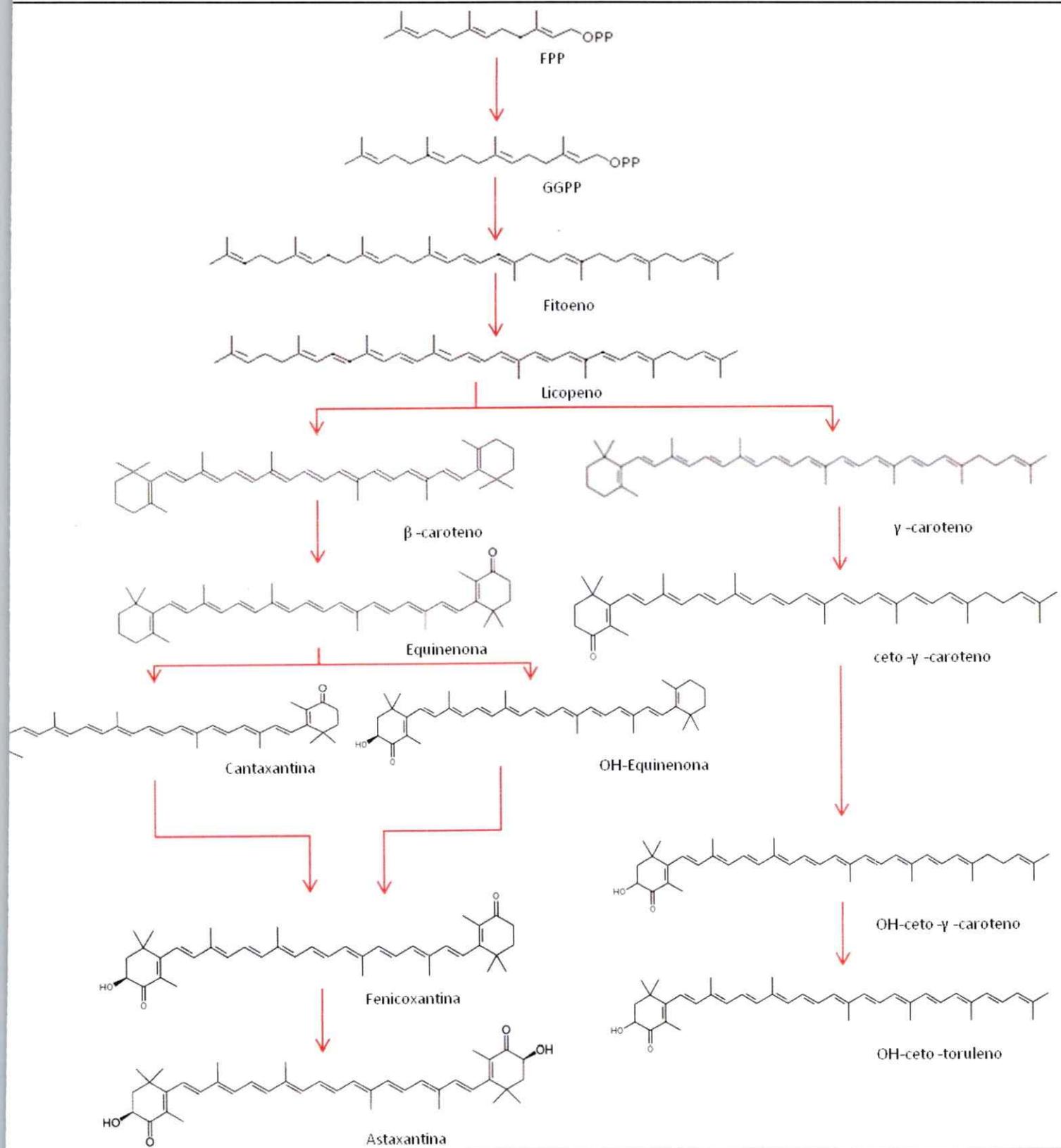
Por otra parte, los carotenoides son pigmentos naturales de colores amarillo, naranja y rojo, producidos por una gran variedad de microorganismos y plantas. Son el grupo más representativo de los tetraterpenos y se clasifican como carotenos y xantófilas, donde los últimos presentan grupos funcionales oxigenados a diferencia de los primeros (Figura 3). Los carotenoides presentan diversas aplicaciones industriales como colorantes y debido a sus diversas propiedades beneficiosas para la salud, son explotados en la industria de alimentos, nutracéutica y recientemente en el mercado farmacológico. Por estos motivos, se ha incrementado el interés en la búsqueda de nuevas fuentes de producción y la optimización de los sistemas productivos existentes



**Figura 1.- Vía del Mevalonato, biosíntesis de astaxantina y ergosterol.** Las flechas representan los pasos catalíticos junto con el gen que codifica la enzima respectiva descrita en las levaduras *Xanthophyllomyces dendrorhous* (nombre del gen escrito en hexágono verde) y *Saccharomyces cerevisiae* (nombre del gen escrito en hexágono azul). Los genes representados de *X. dendrorhous* con sus números de acceso Genbank en paréntesis cuadrados corresponden a: *HMGR* [AJ884949], *idi* [DQ235686], *crtE* [DQ012943], *crtYB* [DQ016503], *crtI* [Y15007], *crtS* [EU713462] y *crtR* [EU884133]. Las secuencias de los genes *HMGS*, *FPS* [KJ140284] y *SQS* de *X. dendrorhous* se presentan en las patentes [DI059433.1, DI032788.1 y EA489199, respectivamente]. Los siguientes genes de *S. cerevisiae* están representados: *ERG10* [NM\_001183842], *ERG13* [NM\_001182489], *ERG12* [AN: NM\_001182715], *ERG8* [NM\_001182727], *MVD1* [NM\_001183220], *ERG20* [NM\_001181600], *ERG1* [M64994], *ERG7* [U23488.1], *ERG11* [NM\_001179137], *ERG24* [NM\_001183118], *ERG25* [NM\_001181189], *ERG26* [NM\_001180866], *ERG27* [NM\_001181987], *ERG6* [NM\_001182363], *ERG2* [NM\_001182709], *ERG3* [NM\_001181943], *ERG5* [NM\_001182511] homólogo de *CYP61* descrito en *X. dendrorhous* y *ERG4* [NM\_001180877]. Abreviaturas: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), mevalonato (MVA), mevalonato-5-fosfato (MVA-P), mevalonato-5-pirofosfato (MVA-PP), isopentenil-pirofosfato (IPP), dimetilalil-pirofosfato (DMAPP), geranyl pirofosfato (GPP), farnesil-pirofosfato (FPP), geranylgeranyl-pirofosfato (GGPP). (Adaptado de Loto y col. 2012).



**Figura 2.-** Estructura molecular de metabolitos de la biosíntesis de Ergosterol.



**Figura 3.-** Estructura molecular de metabolitos de la biosíntesis de carotenoides.

(Lee y Schmidt-Dannert, 2002). En este sentido, el reporte publicado por la BCC *Research* indicó que el mercado a nivel mundial de los carotenoides alcanzó los \$1,2 billones de dólares en el año 2010, con una proyección de crecimiento de US\$1,4 billones hacia el año 2018 (código de reportaje: FOD025D). Entre ellos, el  $\beta$ -caroteno es el principal carotenoide comercializado seguido en tercer lugar por el de la xantófila astaxantina, con un mercado valorado en US\$226 millones en el año 2010 el cual se espera alcance los US\$253 millones hacia el año 2018. La astaxantina (3,3'-dihidroxi- $\beta$ , $\beta$ -caroteno-4-4'-diona), destaca dentro de los carotenoides debido a sus propiedades antioxidantes, alta estabilidad química y permeabilidad lipídica. Además, debido a su pigmentación rojiza resulta especialmente útil para la industria acuícola donde se utiliza como aditivo en salmonicultura, una de las actividades económicas más relevantes de nuestro país. Este pigmento se encuentra presente en la mayoría de los crustáceos, en peces salmónidos y flamencos, lo cual les otorga el color anaranjado característico. Sin embargo, este carotenoide no es sintetizado *de novo* por animales, quienes lo incorporan desde su dieta, principalmente desde microalgas que son la base de la alimentación del zooplancton y el krill (Arai y cols., 1987). En este sentido, la coloración de los salmónidos es muy importante para su comercialización, influyendo en los costos de producción. En consecuencia, la industria acuícola valora y promueve la búsqueda de carotenoides de alta calidad y de bajo costo (Johnson y An, 1991), en particular la búsqueda de un sistema de producción de astaxantina natural a un precio competitivo respecto a su análogo químico.

Por otra parte, la industria farmacéutica ha centrado su interés en la astaxantina dado que se ha demostrado que otorga mayores beneficios para la salud en relación al consumo de otros carotenoides. Según estudios en modelos animales, la astaxantina promueve la regulación del sistema inmune, aumenta la producción de

anticuerpos e incrementa la actividad de diversas células del sistema inmunológico, además de inhibir reacciones autoinmunes (Ranga y cols., 2014). También, de acuerdo a estudios en ratones, se ha reportado que la astaxantina presenta propiedades anticarcinógenas, como para cáncer de vejiga, cavidad oral, cáncer de mama, entre otros (Higuera-Ciapara y cols., 2006; Nakao y cols., 2010). Adicionalmente, se ha descubierto que la astaxantina presenta una serie de propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, por lo que se está investigando como candidato para desarrollar un agente terapéutico contra estrés oxidativo cardiovascular e inflamación, por ejemplo para tratar la arteriosclerosis (Pashkow y col., 2008).

Por las atractivas propiedades y el crecimiento del mercado global de la astaxantina, se ha impulsado el desarrollo de bioprocesos alternativos económicamente viables para reemplazar el método de síntesis químico actual (Schmidt y col., 2011). Entre las pocas fuentes naturales de astaxantina destaca la levadura basidiomicete *Xanthophyllomyces dendrorhous*, ya que sintetiza astaxantina como carotenoide principal en estado no esterificado, forma mayoritaria en que se encuentra el compuesto en los músculos de especies acuícolas de interés (Torrissen y col., 1989).

*X. dendrorhous*, ex: *Phaffia rhodozyma* (Miller y col. 1976), fue aislada por primera vez desde exudados de árboles del Hemisferio Norte a altas altitudes y latitudes, posteriormente se aisló en bosques del Hemisferio Sur (Patagonia, Argentina), hábitats naturales donde comúnmente se encuentran compuestos antifúngicos, especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales peróxidos (Wozniak y cols., 2011). De esta manera, se propone que en este organismo la carotenogénesis se desarrollo como un mecanismo de defensa contra el daño oxidativo producido por las especies reactivas de oxígeno derivadas de su propio metabolismo como también

presentes en su hábitat natural. Si bien la astaxantina es el carotenoide principal producido por *X. dendrorhous*, los niveles en cepas silvestres son bajos (200–400 µg/g de peso seco de levadura) para ofrecer una fuente natural competitiva del pigmento. Por ello, se han llevado a cabo diferentes aproximaciones para favorecer su producción como: la optimización de las condiciones y parámetros de cultivo (Lui y Wu, 2007, Fuente y col., 2010), mutagénesis al azar y la posterior selección de cepas sobreproductoras (Baeza y col., 2009, Stachowiak 2013), e ingeniería metabólica de la vía de biosíntesis de carotenoides (Verdoes y col., 2003, Gassel y col., 2013). Pese a ello, aún no se alcanzan niveles competitivos con el método actual de síntesis.

Si bien en la actualidad el control genético de la síntesis de astaxantina en *X. dendrorhous* se ha descrito, la regulación de esta vía en este microorganismo es poco conocida. Cabe destacar que las vías de síntesis de carotenoides y esteroides se encuentran relacionadas, pues ambas derivan de la vía del mevalonato (MVA) y utilizan precursores comunes. De hecho, estudios en *X. dendrorhous* han comprobado que la disrupción de la ruta de síntesis de ergosterol favorece la producción de pigmentos en la levadura (Loto y col., 2012). Relacionado con lo anterior, se sabe que la vía MVA se encuentra fuertemente regulada, siendo su principal punto de regulación la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR) que sintetiza al MVA, la que está regulada a nivel transcripcional, post-traducciona l y de su degradación (Miziorko, 2011). Por ejemplo, en estudios realizados en *X. dendrorhous* se encontró que la disrupción de la ruta de síntesis de ergosterol en cepas mutantes del gen *CYP61*, que controla uno de los últimos pasos de la vía, aumenta el nivel de expresión del gen *HMGR* hasta 73 veces respecto a la cepa parental (Loto y col., 2012).

Por otra parte, las vías de síntesis de ergosterol y astaxantina en *X. dendrorhous* comparten otro elemento, ya que en ambas vías se encuentran

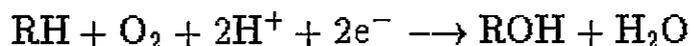
implicadas enzimas citocromo P450, enzimas que catalizan la monooxigenación de una amplia gama de compuestos. En su estado activo, las enzimas P450s son reducidas por electrones derivados de NAD(P)H donados a través de un *partner redox* que en eucariotas generalmente corresponde a una citocromo P450 reductasa. En *X. dendrorhous*, el gen *crtR* codifica la citocromo P450 reductasa que es esencial para la síntesis de astaxantina (Alcaíno y col., 2008). Sin embargo, en cuanto a la síntesis de ergosterol, la función citocromo P450 reductasa es complementada en mutantes *crtR*-aunque la producción es menos eficiente que en la cepa silvestre (Gutiérrez, 2014).

De acuerdo a estos antecedentes, el estudio de la ruta de biosíntesis de ergosterol en *X. dendrorhous* y los mecanismos de regulación implicados resulta fundamental para aumentar el conocimiento actual sobre la síntesis de carotenoides en este microorganismo, y por consiguiente favorecer en el futuro la producción de isoprenoides de alto interés biotecnológico en esta factoría celular.

## **1.2 Enzimas Citocromo P450**

Las enzimas citocromo P450 (CYP) comprenden una superfamilia de hemo-proteínas presentes en todos los dominios de los seres vivos con alrededor de 10.000 miembros que conforman más de 800 familias (Lepesheva y Waterman, 2011). Estas enzimas contribuyen en diversos procesos vitales ya que catalizan la monooxigenación de una amplia gama de compuestos. Esencialmente, las CYPs desarrollan dos funciones principales: i) proporcionan biodefensa (desintoxicación de xenobióticos y la producción de antibióticos) y ii) participan en la biosíntesis de metabolitos endógenos importantes, como esteroides, prostaglandinas y metabolitos secundarios (Lepesheva y col., 2008). La reacción general catalizada es la monooxigenación de un sustrato orgánico con gasto de NAD(P)H, donde el sustrato puede representar un esteroide,

ácido graso, fármaco u otro compuesto que contenga algún sustituyente alcano, alqueno, un anillo aromático o un anillo heterocíclico (Figura 4).



**Figura 4.-** Reacción de monoxigenación de un sustrato orgánico (RH) realizada por la superfamilia de enzimas citocromo P450.

Las CYPs de hongos están involucradas en muchos procesos celulares esenciales, catalizan la conversión de intermediarios hidrofóbicos de vías metabólicas primarias y secundarias, la detoxificación de contaminantes ambientales y permiten a los hongos crecer bajo diferentes condiciones (Cresnar y Petric, 2011). Además, cumplen un rol clave en la degradación de la lignina (Warrilow y col., 2008). Por estos motivos, en lo últimos años se ha aceptado el fuerte potencial de las enzimas CYPs como biocatalizadores para la industria de síntesis de productos químicos, farmacéuticos, agroquímicos y de ingredientes de alimentos. También han sido empleadas en terapia génica contra el cáncer, diseño de biosensores, en sistemas de biorremediación y son especialmente útiles cuando se requiere hidroxilación con alta regio- y estéreo-selectividad (Kumar y col., 2010). Sin embargo, sus aplicaciones son limitadas debido a que, particularmente en mamíferos, muestran una baja tasa de recambio y estabilidad, y requieren una fuente compleja de electrones a través de donadores de electrones y NAD(P)H (Kumar y col., 2010).

Esta familia de hemo-proteínas recibe su nombre P450, ya que originalmente fueron descritas como pigmentos (P) presentes en el hígado y porque en su estado reducido unido a monóxido de carbono se observa un pico de absorbancia característico a los 450 nm (Omura, 1999). En la década de los años 70s se propuso

que estas enzimas fueron una de las primeras formas en que los microorganismos detoxificaron la primera atmósfera oxigenada. Sin embargo, las CYPs pueden llevar a cabo algunas reacciones químicas sin requerimiento de oxígeno, lo cual apunta a una posible existencia y rol ancestral previo a la aparición del oxígeno molecular atmosférico en la Tierra (2.4 Ga) (Holland, 1999). Por otra parte, la secuencia aminoacídica de estas proteínas es extremadamente diversa, con niveles de identidad tan bajos como de 16% en algunos casos; sin embargo, su estructura secundaria y terciaria se ha mantenido a lo largo de la evolución (Reichhart y Feyereisen, 2000). Se sugiere que la gran diversidad de la superfamilia de las citocromo P450 surgió por un extenso proceso de duplicación génica y probablemente, aunque ha sido menos documentado, debido a casos de amplificación génica, conversiones, duplicaciones de genoma, pérdida de genes y transferencia lateral (Reichhart y Feyereisen, 2000).

Con el avance de las técnicas de secuenciación genómica, el número de genes de P450s identificados ha aumentando en forma explosiva, lo cual ha llevado a la necesidad de definir una nomenclatura y clasificar estas enzimas. De esta manera se ha resuelto que las CYPs se denominan de acuerdo a la identidad aminoacídica, criterios filogenéticos y organización génica. Así, la raíz *CYP* es seguida por un número que indica la familia a la que pertenece (generalmente grupos de proteínas con más de un 40% de identidad de secuencia aminoacídica), posteriormente una letra que corresponde a la subfamilia (identidad mayor al 55%) y luego un número que especifica el gen correspondiente (Nelson y col., 1996).

En procariotas, las enzimas P450 son proteínas solubles en su mayoría. En cambio en eucariotas, están por lo general unidas al retículo endoplásmico o a la membrana mitocondrial interna (Reichhart y Feyereisen, 2000). De esta manera, se han definido cuatro clases de P450 en función de cómo los electrones de NAD(P)H

son entregados al sitio catalítico. Las enzimas de clase I requieren de una reductasa que contiene FAD y de una redoxina hierro-azufre. Las enzimas de clase II requieren sólo una citocromo P450 reductasa (CPR) que contiene FAD y FMN para la transferencia de electrones. Las de clase III son autosuficientes y no necesitan de un *partner redox* externo, mientras que las P450 de clase IV reciben electrones directamente del NAD(P)H (Reichhart y Feyereisen, 2000). Entre ellas, las enzimas P450s de clase II cumplen funciones extremadamente diversas y corresponden al grupo más representado en los eucariotas. En hongos, éstas incluyen la síntesis de esteroides de membrana y micotoxinas, la desintoxicación de fitoalexinas y el metabolismo de fuentes de carbono lipídicas (Reichhart y Feyereisen, 2000). En animales, las funciones fisiológicas abarcan muchos aspectos de la biosíntesis y catabolismo de las moléculas de señalización, hormonas esteroidales, ácido retinoico y oxilipinas (Reichhart y Feyereisen, 2000). En vegetales están implicadas en la biosíntesis o catabolismo de todos los tipos hormonales, en la oxigenación de ácidos grasos para la síntesis de cutinas, y en todas las vías de metabolismo secundario como la lignificación, síntesis de los pigmentos y productos químicos de defensa (Reichhart y Feyereisen, 2000).

En los sistemas P450 de clase II, las enzimas P450 y la citocromo P450 reductasa se encuentran ancladas de forma independiente a la cara externa del retículo endoplásmico por una región de anclaje hidrofóbica del extremo amino terminal, y el flujo de electrones va desde el NADPH al FAD al FMN en CPR, y finalmente al grupo hemo en la enzima P450 (De Montellano, 2005). Sin embargo, se ha descrito un donador alternativo de electrones también anclado al retículo endoplásmico por su extremo carboxilo terminal, la enzima citocromo b5, que transfiere electrones desde NADH favoreciendo la actividad de algunas enzimas P450

(Reichhart y Feyereisen, 2000; De Montellano, 2005). Pese a que en un organismo pueden existir varios genes que codifican diferentes enzimas citocromo P450, en la mayoría de las especies sólo existe un gen de CPR, salvo algunas excepciones observadas en plantas y zigomicetes que contienen dos o tres genes de CPR (Alcaíno y col., 2008). Estudios realizados en la levadura *X. dendrorhous* permitieron aislar y caracterizar el gen *crtR*, que codifica la CPR de este organismo, que transfiere los electrones necesarios a la enzima astaxantina sintasa (CrtS) para la oxidación de  $\beta$ -caroteno a astaxantina (Alcaíno y col., 2008). Sin embargo, se requieren estudios adicionales para dilucidar el rol de otros sistemas donadores de electrones para P450s en *X. dendrorhous*, alternativos a CPR. Además, es necesario estudiar los mecanismos que regulan la participación de CPR en las vías de síntesis de carotenoides y esteroides.

### 1.3 Biosíntesis de ergosterol en levaduras

Los esteroides son componentes estructurales y regulatorios esenciales de las membranas celulares en eucariotas, cuya biosíntesis es un proceso complejo (Veen y col., 2003). El ergosterol es el principal esteroide en las membranas de hongos y las enzimas de su biosíntesis corresponden al principal blanco de los antifúngicos actualmente usados en el tratamiento de infecciones fúngicas fatales (Alcazar y Mellado, 2013). La biosíntesis de esteroides es una vía metabólica antigua, que se cree que surgió durante las últimas fases de la evolución procariota. Una vez que el oxígeno molecular estuvo en cantidad suficiente en el ambiente, permitió desviar la conversión de escualeno en triterpenoides pentacíclicos (compuestos tipo esteroides, formados en el ambiente anaeróbico del Precámbrico) hacia la síntesis de esteroides (Lepesheva y col., 2008).



Al igual que la síntesis de carotenoides, la síntesis de ergosterol deriva del IPP el cual es sintetizado a partir de acetil-CoA en la vía del MVA. En la síntesis de isoprenoides (Figura 1), la enzima isopentenil pirofosfato isomerasa, codificada por el gen *idi* (Kajiwara y col., 1997), cataliza la isomerización de IPP para generar DMAPP. En *X. dendrorhous*, las moléculas DMAPP e IPP se condensan por la acción de una enzima prenil transferasa (farnesil pirofosfato sintasa, codificada por el gen *FPS*) para formar el compuesto de 10 carbonos geranil-pirofosfato (GPP, C<sub>10</sub>). La misma enzima adiciona una segunda molécula de IPP al GPP dando lugar a farnesil-pirofosfato (FPP, C<sub>15</sub>). Por un lado, la adición de una tercera molécula de IPP al FPP, da origen a geranilgeranil-pirofosfato (GGPP, C<sub>20</sub>), el cual es el precursor de los carotenoides. En *X. dendrorhous*, este paso es controlado por el gen *crtE* (Alcaíno y col., 2014). Por otro lado, la condensación de dos moléculas de FPP genera escualeno, que a su vez es el precursor de los esteroides (Merkulov y col., 2000). En general, este paso es catalizado por una enzima escualeno sintasa, la que aún no ha sido caracterizada en *X. dendrorhous*.

Si bien la ruta de síntesis de ergosterol aún no se ha descrito en *X. dendrorhous*, se sabe que en ella participan enzimas CYPs. En estudios del gen *CYP61* de *X. dendrorhous*, que codifica para una C-22 esteroil desaturasa, se vio que las mutantes homocigotas obtenidas por la disrupción de dicho gen no producen ergosterol, acumulando otros esteroides como ergosta-5,8, 22-trien-3-ol y ergosta-5,8-dien-3-ol (Loto y col. 2012). Curiosamente, todas las mutantes presentaron un fenotipo de color rojo más intenso que las respectivas cepas parentales, sugiriendo que el ergosterol regula la síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*. Por otro lado, en el genoma de *X. dendrorhous* se han encontrado varios genes de P450s, incluyendo al gen *CYP51* homólogo al gen *ERG11* de *S. cerevisiae* que codifica una C14-

desmetilasa involucrada en la síntesis de ergosterol (Aoyama y col. 1984, Kalb y col. 1987).

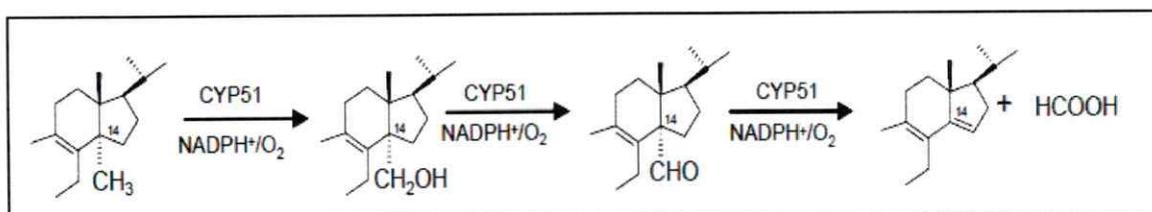
La familia CYP51 presenta una estricta conservación funcional en todos los reinos biológicos, actuando como C14-desmetilasa de esteroides (Lepesheva y col. 2008). En levaduras, CYP51 cataliza la C14-desmetilación de lanosterol, mientras que en hongos filamentosos CYP51 cataliza la C14-desmetilación de eburicol (Warrilow y col. 2008). Actualmente, se están llevando a cabo múltiples investigaciones respecto a la función enzimática y mecanismos de regulación de CYP51 de diversos organismos debido a su gran importancia biológica, ya que se espera que dichos estudios deriven en nuevos conocimientos y aplicaciones biotecnológicas en diversas áreas industriales (Farmacéutica, Acuicultura, Agricultura, entre otras).

#### **1.4 Familia CYP51**

Se ha postulado que la aparición de CYP51 ocurrió luego de la producción de los primeros esteroides, como una de las primeras enzimas de modificación de la biosíntesis de los esteroides. Esto debe haber sucedido en un organismo eucariótico primitivo o posiblemente en una bacteria ancestral, y se estima que su aparición fue alrededor de 1.78–1.68 Ga (Kelly y Kelly, 2013). La familia CYP51 está presente en animales, plantas, levaduras / hongos, en muchos protozoos y en algunas bacterias. Aunque se encuentran en todos los reinos biológicos, hay ciertos grupos de organismos que no contienen estas enzimas, dentro de los cuales cabe señalar a los insectos y gusanos. No obstante lo anterior, las enzimas CYP51 son consideradas como la familia de citocromo P450s más ampliamente distribuida (Lepesheva y Waterman, 2011). Esta enzima cataliza la 14- $\alpha$ -desmetilación de precursores de esteroides, reacción incluida en todas las vías de biosíntesis de esteroides de los

eucariotas. Sin embargo, los sustratos de la enzima en las vías de biosíntesis de esteroides en animales, plantas y hongos son diferentes; ejemplo de la diversificación en la superfamilia P450 (Aoyama, 2005). Por otro lado, varias plantas y hongos contienen múltiples genes *CYP51*. Las razones de la existencia de homólogos de genes *CYP51* en la misma especie o sus funciones precisas se desconocen; sin embargo, se ha reportado que en algunos organismos sólo uno de los genes *CYP51* presentes sería funcional (Lepesheva y Waterman, 2007).

La reacción enzimática catalizada por *CYP51* se desarrolla en 3 pasos, donde cada uno requiere de una molécula de oxígeno y dos equivalentes reducidos derivados de NADPH (Waterman y Lepesheva, 2005) (Figura 5). Durante los dos primeros ciclos, que son monooxigenaciones características de enzimas P450, el grupo 14 $\alpha$ -metilo es convertido sucesivamente en 14- $\alpha$ -carboxialcohol y luego en 14- $\alpha$ -carboxialdehído. En el paso final, el grupo 14- $\alpha$ -aldehído es liberado en forma de ácido fórmico con la introducción simultánea de un doble enlace  $\Delta^{14,15}$  en el núcleo del esteroide. La catálisis de la escisión del enlace de C-C es más complicada y dos mecanismos posibles se han propuesto (reacción radical o proceso iónico (Beayer-Villiger)) (Yoshida, 1992; Shyadehi y col., 1996). Los productos 14- $\alpha$ -desmetilados son intermedios en las vías que conducen a la formación de colesterol en los animales, ergosterol en los hongos y una variedad de esteroides 24-alkilados y olefinados en las plantas, algas y protozoos (Lepesheva y Waterman, 2007).



**Figura 5.-** Esquema de la reacción de 14- $\alpha$ -desmetilación de tres pasos catalizada por *CYP51* (tomado de: Lepesheva y Waterman, 2005).

Por otra parte, la familia CYP51 presenta una gran importancia práctica como diana farmacológica. La inhibición de la actividad enzimática 14- $\alpha$ -desmetilasa bloquea la biosíntesis de esteroides, lo cual es letal para los organismos unicelulares, influye en los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, y disminuye la producción endógena de colesterol en los animales (Lepesheva y Waterman, 2007). Aunque los inhibidores de CYP51 se están estudiando a fondo como potenciales herbicidas y medicamentos para bajar el colesterol, son más ampliamente utilizados como fungicidas para el tratamiento de las micosis humanas (antifúngicos clínicos) y para prevenir las infecciones de los alimentos (antifúngicos agrícolas) (Lepesheva y Waterman, 2007). La demanda por inhibidores de CYP51 está creciendo constantemente debido a la resistencia a los medicamentos de los microorganismos patógenos y al aumento mundial en la incidencia de las infecciones fúngicas oportunistas, como consecuencia del aumento del número de hospederos inmunocomprometidos (infecciones por VIH, quimioterapia contra el cáncer, trasplante de órganos y médula ósea) y pacientes con infecciones primarias como la tuberculosis. (Lepesheva y Waterman, 2007). Dentro de los inhibidores de CYP51 destacan los agentes antifúngicos azólicos que actúan bloqueando el sitio activo de la enzima lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilasa, su modo de acción involucra al nitrógeno nucleofílico del anillo heterocíclico del azólico el cual se une directamente como un sexto ligando al hierro del grupo hemo y a las cadenas laterales de la droga que interactúan con la estructura polipeptídica de la enzima CYP51 (Warrilow y col. 2013).

Esto da cuenta de la importancia transvesal de las enzimas CYP51 en diversas áreas del conocimiento, por lo que una mayor comprensión del funcionamiento y los mecanismos de regulación de enzimas CYP51 en diversos microorganismos permitiría

el desarrollo de nuevos medicamentos antimicrobianos altamente selectivos. Además, contribuiría a encontrar nuevas bases para desarrollar y controlar biosistemas de producción de compuestos de interés industrial derivados de la vía de biosíntesis de esteroides y/o carotenoides, en particular podría contribuir al mejoramiento de la biosíntesis del carotenoide astaxantina en la levadura *X. dendrorhous* debido a que ésta se encuentra estrechamente relacionada con la biosíntesis de ergosterol. De esta manera, en este trabajo se planteó la siguiente hipótesis:

### **1.5 Hipótesis del trabajo**

Si el gen *CYP51*, identificado en el genoma de *X. dendrorhous*, participa en la biosíntesis de ergosterol, específicamente en la eliminación del metilo en C14, entonces la expresión de dicho gen complementará la deficiencia de la enzima 14C-desmetilasa en una cepa mutante de *S. cerevisiae* y su mutación reducirá la biosíntesis de ergosterol en *X. dendrorhous*.

### **1.6 Objetivo General**

Caracterizar y estudiar la funcionalidad del gen *CYP51* de *Xanthophyllomyces dendrorhous* involucrado en la biosíntesis de ergosterol.

### **1.7 Objetivos específicos**

1. Identificar, aislar y caracterizar el gen *CYP51* de *X. dendrorhous*.
2. Estudiar la funcionalidad del gen *CYP51* de *X. dendrorhous* por complementación heteróloga en *S. cerevisiae*.
3. Analizar mutantes *cyp51<sup>-</sup>* de *X. dendrorhous* en cuanto a su crecimiento y producción de esteroides y carotenoides.

4. Analizar la expresión de algunos genes de la ruta del mevalonato, carotenogénicos y de la biosíntesis de ergosterol por RT-qPCR en mutantes de la vía del ergosterol de *X. dendrorhous*.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Cepas, Plásmidos y Cultivo.

Las cepas de levaduras empleadas y construidas en este trabajo se describen en la Tabla 1. Las curvas de crecimiento de levaduras se realizaron por triplicados y el crecimiento se evaluó determinando la densidad óptica del cultivo a 600 nm con un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV150-02 a diferentes tiempos de cultivo ( $DO_{600}$  inicial de cultivos: 0,1).

La levadura *X. dendrorhous* se cultivo en medio YM (0,3% extracto de levadura, 0,3% extracto de malta, 0,5% peptona) o YEP (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa) con agitación constante a 22°C. En el caso de cultivos en placas, se agregó al medio Bacto-agar al 1,5%. Para la selección de transformantes (cepa CBS-*CYP51*<sup>(+/+)</sup>), se agregó al medio el antibiótico higromicina B a una concentración de 100 µg/ml. La cepa S288c de *S. cerevisiae* se cultivó a 30°C en medio YM o YEP. La cepa Meyen ex E.C Hansen YHR007C BY4743, adquirida de la colección de ATCC, se cultivó a 22°C en medio mínimo sintético (SD; 0,67% Yeast nitrogen base sin aminoácidos, 2% glucosa) suplementado con los compuestos que sostienen la auxotrofia de la cepa (0.002% uracilo, 1% histidina y 1% leucina) y el antibiótico geneticina a 200 µg/ml. Las cepas transformantes que derivan de ella, se cultivaron en medio SD suplementado con uracilo, histidina y geneticina, pues el gen *LEU2* presente en el vector YEpNP complementa la auxotrofia para leucina de la cepa. Para los cultivos en placa, se agregó bacto-agar al 1,5% al medio de cultivo.

Para la construcción de plásmidos y su propagación, se utilizó la cepa de *E. coli* DH5α (Sambrook y Ruseel, 2001), la cual se cultivó a 37°C en medio LB (Luria Betrani; 1% triptona, 0,5% extracto de levadura, 0,5% NaCl) con 1,5% de Bacto-agar en los

cultivos en placa. En los casos que correspondía, el medio de cultivo se suplementó con ampicilina 100 µg/ml y X-gal 20 mg/ml (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) para la selección de clones recombinantes.

**Tabla 1.- Cepas de levaduras empleadas y construidas en este trabajo.**

Cepa	Genotipo o característica relevante	Referencia
<i>S. cerevisiae</i> S288c	MAT $\alpha$ , SUC2, gal2, mal, mel, flo1, flo8-1, hap1, ho, bio1, bio6.	Mortimer y Johnston, 1986.
<i>S. cerevisiae</i> Meyen ex E.C Hansen YHR007C BY4743 (cepa: <i>S. cerevisiae erg11<sup>+/+</sup></i> )	MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$ , his3 $\Delta$ 1/ his3 $\Delta$ 1, leu2 $\Delta$ 0/leu2 $\Delta$ 0, lys2 $\Delta$ 0/+, met15 $\Delta$ 0/+, ura3 $\Delta$ 0/ura3 $\Delta$ 0, $\Delta$ ERG11:KanMx. ATCC 26604.	ATCC 26604
<i>S. cerevisiae</i> cCYP51	Transformante diploide que deriva de <i>S. cerevisiae erg11<sup>+/+</sup></i> . Contiene vector de expresión YEpNP-cCYP51.	Este trabajo
<i>S. cerevisiae</i> gERG11	Transformante diploide que deriva de <i>S. cerevisiae erg11<sup>+/+</sup></i> . Contiene vector de expresión YEpNP-gERG11.	Este trabajo
<i>S. cerevisiae</i> hCYP51	Transformante haploide que deriva de <i>S. cerevisiae erg11<sup>+/+</sup></i> . Contiene vector de expresión YEpNP- cCYP51Xd.	Este trabajo
<i>S. cerevisiae</i> hERG11	Transformante haploide que deriva de <i>S. cerevisiae erg11<sup>+/+</sup></i> . Contiene vector de expresión YEpNP-gERG11.	Este trabajo
<i>X. dendrorhous</i> CBS 6938	ATCC 96594, silvestre.	ATCC 96594
<i>X. dendrorhous</i> CBS-CYP51 <sup>+/+</sup>	Transformante heterocigoto derivado de <i>X. dendrorhous</i> CBS 6938 contiene un alelo del locus <i>CYP51</i> interrumpido con un módulo de resistencia a higromicina B.	Este trabajo
<i>X. dendrorhous</i> UCD 67-385	ATCC 24230, silvestre.	ATCC 24230

ATCC: American Type Culture Collection (<http://www.atcc.org/>).

Los plásmidos construidos y utilizados en esta tesis se describen en la Tabla 2. Para el clonamiento en *E. coli* se empleó el plásmido pBluescript SK- (pBS), que permite la selección de recombinantes mediante *screening* de colonias blancas y azules. Para la expresión de genes (*ERG11* de *S. cerevisiae* y *CYP51* de *X. dendrorhous*) en *S. cerevisiae*, se utilizó el vector de expresión YEpNP, construido en el laboratorio de Genética a partir del vector YEpACT4 (Sánchez-Torres y col., 1998,

facilitado por el Dr. Claudio Martínez, USACH). Los clones recombinantes fueron detectados mediante PCR de colonia.

**Tabla 2.- Plásmidos utilizados y construidos en este trabajo.**

Plásmido	Característica	Referencia
pBluescript SK-(pBS)	ColE1 origen de replicación, Amp <sup>R</sup> , usado para clonamiento de módulos.	Invitrogen
pBS_CYP51	pBS con cDNA gen <i>CYP51</i> .	Este trabajo
YEpNP	pBR322 y 2 micron origen de replicación, Amp <sup>R</sup> , marcador de selección gen <i>LEU2</i> para complementar cepas de <i>S. cerevisiae</i> auxótrofas, promotor pACT4 y terminador tTDH3.	Este trabajo
YEpNP-CYP51	YEpNP con cDNA gen <i>CYP51</i> .	Este trabajo
YEpNP-ERG11	YEpNP con DNA gen <i>ERG11</i> .	Este trabajo
pBS_del_CYP51_Hyg	pBS con módulo de resistencia a higromicina B en <i>X. dendrorhous</i> en el sitio <i>HpaI</i> que interrumpe el gen <i>CYP51</i> .	Este trabajo

**Nota:** El cDNA del gen *CYP51* proviene de la cepa UCD 67-385 (ATCC 24230) de *X. dendrorhous* y el gen *ERG11*, de la cepa Meyen ex E.C Hansen (ATCC 26604) de *S. cerevisiae*.

## 2.2 Obtención de cepas haploides de *S. cerevisiae*.

Se obtuvieron cepas haploides que derivan de los transformantes de la cepa Meyen ex E.C Hansen YHR007C BY4743 de *S. cerevisiae* para evaluar la complementación del gen *CYP51* de *X. dendrorhous* en líneas *erg11* de *S. cerevisiae*.

Para la esporulación de las cepas transformantes diploides, éstas se sembraron en placas con medio de Pre-esporulación (0,8% extracto de Bacto-levadura, 0,3% Bacto-peptona, 10% glucosa, 2% Bacto-agar) y se incubaron durante 1-2 días a 22°C antes de transferirlas a placas con medio de Esporulación (SM; 1% Acetato de potasio, 2% Bacto-agar). En el medio de Esporulación, las cepas se incubaron a 22°C por 3-5 días hasta la observación de formación de ascas por microscopía óptica. Cabe destacar que los suplementos necesarios según el genotipo de la cepa diploide fueron adicionados al medio de pre-esporulación y al medio de

esporulación al 25% de su requerimiento. Luego del término del periodo de esporulación, se recuperaron las células desde la placa de Esporulación con un asa estéril y se suspendieron en 1 ml de agua. Con la finalidad de enriquecer las células haploides, se agregó un volumen equivalente de dietil éter y la mezcla se emulsionó por rotación durante 20 min a 22°C. A continuación, la mezcla se dejó a temperatura ambiente hasta que las dos fases se separaron y en seguida la fase superior se removió con una pipeta. El dietil éter disuelve la membrana plasmática de células diploides produciendo su destrucción a diferencia de lo que ocurre con las ascas que están recubiertas por una pared que les otorga protección contra este tratamiento (Dawes y Hardie, 1974). Posteriormente, para degradar la pared celular de las ascas de *S. cerevisiae* y liberar las ascosporas, la mezcla con las células tratadas con dietil éter se centrifugó a 14.000 rpm por 5 min y el pellet celular se suspendió en 25 µl de la enzima zimoliasa-120T (ICN: 100 U/ml en 1 M sorbitol) seguido por la incubación por 2 h a 30°C. Luego, las células se suspendieron en 600 µl de agua destilada y se adicionó 270 mg de esferas de vidrio estériles (diámetro 425-600 µm) para ser agitadas vigorosamente en el molidor de células Mini-Beadbeater-16 (BioSpec) durante 2 min (Sherman, 2002). Finalmente, las células se sembraron en medio SD suplementado con los requerimientos necesarios para las cepas haploides (histidina, uracilo, lisina y metionina), además se agregó al medio geneticina a 200 (µg/ml).

Para la selección de colonias haploides de *S. cerevisiae* derivadas de los transformantes de la cepa YHR007C BY4743, las colonias obtenidas se sembraron en réplicas en placas de selección con medio SD suplementadas con los requerimientos correspondientes para identificar a las cepas auxótrofas para metionina y/o lisina, además se agregó al medio geneticina a 200 (µg/ml) para seleccionar las cepas haploides con poseen el gen *ERG11* de *S. cerevisiae* interrumpido por el módulo

KanMX4 que otorga resistencia a genética (G-418).

### 2.3 Oligonucleótidos y Ácidos Nucleicos.

Los oligonucleótidos diseñados y utilizados en este trabajo fueron sintetizados por IDT (*Integrated DNA Technologies*). El nombre, secuencia y dirección de cada uno de ellos se muestra en la Tabla 3. Como marcadores de peso molecular se usaron  $\lambda$ HindIII (Thermo Scientific) y 1kb (Invitrogen). La cuantificación de ácidos nucleicos se realizó por comparación de intensidad de banda respecto al marcador  $\lambda$ HindIII.

Tabla 3.- Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5' a 3')	DNA blanco o función	Sentido
CYP51ATG.F	atgtcgtcgtccaatcgatc	cDNA del gen <i>CYP51</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Directo
CYP51TAG.R	ctacgcggcagccttctcg	cDNA del gen <i>CYP51</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Reverso
gERG11.F	atgtctgctaccaagcaatcg	DNA del gen <i>ERG11</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Directo
gERG11.R	tttctcagttacaaaccttagatc	DNA del gen <i>ERG11</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Reverso
ERG11.R	ttagatctttgttctggatttc	DNA del gen <i>ERG11</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Reverso
CYP51ScExt.F	ttgccctccatgtgtattc	DNA externo gen <i>ERG11</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Directo
CYP51ScExt.R	aatccagtaggcatgttgc	DNA externo gen <i>ERG11</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Reverso
RTCYP51.F	cagctcgctcagttgattcctaga	cDNA del gen <i>CYP51</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Directo
CYP51_Rb	ctggtaggagattcagtc	cDNA del gen <i>CYP51</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Reverso
leu2.k.F	tcttaactctctcggcgaca	DNA del gen <i>LEU2</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Directo
leu2.k.R	ccctatgctgcccctaagaa	DNA del gen <i>LEU2</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Reverso
KanMX4.F	ccgcgattaattccaacat	Módulo de resistencia a G-418, <i>S. cerevisiae</i> Meyen ex E.C Hansen YHR007C BY4743	Directo
KanMX4.R	cgagcatcaaatgaaactgc	Módulo de resistencia a G-418, <i>S. cerevisiae</i> Meyen ex E.C Hansen YHR007C BY4743	Reverso
KanMX4.F2	ttgtatgggaagcccgatg	Módulo de resistencia a G-418, <i>S. cerevisiae</i> Meyen ex E.C Hansen YHR007C BY4743	Directo
KanMX4.R2	gatcctggtatcggtctgc	Módulo de resistencia a G-418, <i>S. cerevisiae</i> Meyen ex E.C Hansen YHR007C BY4743	Reverso
KanMX4Ext.F	cgtagcctgcaggtcgac	DNA externo a módulo de resistencia a G-418, <i>S. cerevisiae</i> Meyen ex E.C Hansen YHR007C BY4743	Directo
KanMX4Ext.R	ggatggcggcgtagtatc	DNA externo a módulo de resistencia a G-418, <i>S. cerevisiae</i> Meyen ex E.C Hansen YHR007C BY4743	Reverso

Nombre	Secuencia (5' a 3')	DNA blanco o función	Sentido
M13.Fw.FP	tgtaaacgacggccagt	Región M13 del vector YE $\phi$ NP	Directo
M13.Rv.PUC-40	ggaaacagctatgacatg	Región M13 del vector YE $\phi$ NP	Reverso
PRE_CYP51_del.F	ccaagttcctgtgtgctgagt	Región reguladora y promotora del gen <i>CYP51</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Directo
Post_CYP51_del.R	tgccctggataagaaatgaggg	Región terminadora del gen <i>CYP51</i> <i>X. dendrorhous</i>	Reverso
cyp51_del.Fw	catgaaagtggggtcacacga	Región 0,7 kb río arriba del codón de inicio del gen <i>CYP51</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Directo
Cyp51_del.Rv	aacgagatgatacgtaccgac	Región 0,6 kb río abajo del codón de término del gen <i>CYP51</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Reverso
Cyp51_del-HpaI.Fw	gatctttctgattgtaaacatcag acgcttttcctga	Fragmento inicial (20 b) de región terminadora del gen <i>CYP51</i> <i>X. dendrorhous</i> , añade sitio de restricción <i>HpaI</i> y 11 bases de región promotora del gen <i>CYP51</i> <i>X. dendrorhous</i>	Directo
Cyp51_del-HpaI.Rv	aagcgtctgatgtaacaatcaga aagatcgagtcta	Secuencia final (20 b) de región reguladora del gen <i>CYP51</i> <i>X. dendrorhous</i> , añade sitio de restricción <i>HpaI</i> y 11 bases de región terminadora del gen <i>CYP51</i> <i>X. dendrorhous</i>	Reverso
H.F	atgaaaagcctgaactcacc	DNA del gen <i>hph</i> , <i>E. coli</i>	Directo
H.R	ctattcctttgccctcgac	DNA del gen <i>hph</i> , <i>E. coli</i>	Reverso
TEF_Xd.F	gggctcatcagccgacagtca	Promotor TEF, <i>X. dendrorhous</i>	Directo
TEF_Xd_antisense.R	tcctaattctgtcgacaacg	Promotor TEF, <i>X. dendrorhous</i>	Reverso
GPD_Xd_sense.F	ggacaaggcaagaagtgagca	Terminador <i>gpd</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Directo
GPD_Xd.R	atgagagatgacggagatgat	Terminador <i>gpd</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Reverso
CYP51up.F	cgttcttgaggagtctgtgc	DNA del gen <i>CYP51</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Directo
CYP51dw.R	tcggacctgacatagacigc	DNA del gen <i>CYP51</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Reverso
cCYP51.F	ccittgctcgtcgttttctc	cDNA del gen <i>CYP51</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Directo
cCYP51.R	Tcgcccaaatggaagagac	cDNA del gen <i>CYP51</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Reverso
CYP51.Fd	Aaggtaaccgtcgctttgg	DNA del gen <i>CYP51</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Directo
CYP51.Rd	aagctttccaccgagaatcat	DNA del gen <i>CYP51</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Reverso
CYP51_F	caaggatgtcgtatacgattgc	DNA del gen <i>CYP51</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Directo
CYP51_R	gaggtgtcgtgaccggcc	DNA del gen <i>CYP51</i> , <i>X. dendrorhous</i>	Reverso

## 2.4 Purificación de ácidos nucleicos

### 2.4.1 Purificación de DNA

La extracción de DNA plasmídico desde *E. coli* se realizó según lo descrito por Sambrook y cols. (2001) o mediante el uso del kit de Axygene de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. El DNA obtenido se almacenó a -20°C hasta su utilización.

La extracción de DNA genómico de *S. cerevisiae* y de *X. dendrorhous* se efectuó por ruptura mecánica. Para ello se mezclaron 100 µl de microesferas de vidrio de 0,5 mm de diámetro (BioSpec Products, Inc.) con 600 µl de amortiguador TE (25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH=8.0) y células tomadas desde una placa con un asa estéril. La mezcla se puso por 3 min en el molidor de células y posteriormente se centrifugó por 5 min a 14.000 rpm para luego traspasar el sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. A este tubo se le adicionó un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló por vórtex y se centrifugó a 14.000 rpm en una microcentrifuga durante 1 o 10 min para extracción de DNA de *S. cerevisiae* o *X. dendrorhous*, respectivamente. En el caso de extracción de DNA de *X. dendrorhous* se repitió este paso 3 a 5 min. Posteriormente, el sobrenadante se traspasó a un tubo limpio, se adicionó un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) para luego mezclar en vórtex durante 1 min y centrifugar 1 min a 14.000 rpm. Se recogió el sobrenadante en un nuevo tubo y el DNA se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto frío. La mezcla se almacenó a -20°C por 1 h y luego se centrifugó por 10 min a 14.000 rpm para eliminar el sobrenadante por inversión. El DNA se lavó con 1 ml de etanol al 70% y finalmente se suspendió en 50 µl de agua.

#### **2.4.2 Purificación de RNA total de *X. dendrorhous***

La extracción de RNA total de *X. dendrorhous* se realizó por ruptura mecánica de acuerdo al protocolo descrito en Marcoleta y col., 2011. Primero, el pellet celular se suspendió en 200 µl de buffer de lisis (NaC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub> 0.02 M, SDS 0,5%, EDTA 1 mM, agua 0,1%, pH 5,5), luego se agregó 100 µl de perlas de vidrio de 0,5 mm (BioSpec) y se agitó en el molidor de células por 1 min. A continuación se agregó 800 µl de *Tri-Reagent* (Ambion) y se agitó nuevamente en el molidor de células por 1 min. Luego, el

lisado se incubó durante 10 min en hielo y al finalizar ese tiempo, se adicionó 200 µl de cloroformo, se agitó manualmente durante 15 s y se incubó a temperatura ambiente durante 6 min. La fase acuosa se recuperó después de la centrifugación durante 10 min a 14.000 rpm a 4°C. Finalmente, el RNA se precipitó mediante la adición de un volumen de isopropanol y 0,5 volúmenes de buffer de precipitación (NaCl 1,2 M, Na<sub>3</sub>C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O (COO)<sub>3</sub> 0,8 M, agua 0,1%) e incubando a -20°C 1 h. El RNA se lavó con etanol al 70%, se suspendió en 20-30 µl de agua libre de nucleasas y se cuantificó mediante la determinación de absorbancia a 260 nm según lo descrito por Sambrook y Russell, 2001.

## 2.5 Reacciones de PCR y RT-qPCR

Las reacciones de PCR para el análisis de clones y transformantes se hicieron con la enzima *Taq* DNA polimerasa (purificada en Laboratorio de Genética) y en la amplificación de DNA para transformación se usó la enzima *Pfu* DNA polimerasa (*PfuUltra*<sup>TM</sup> II HS DNA *polymerase* de Stratagene).

Las reacciones de PCR con *Taq* DNA polimerasa se realizaron en un volumen final de 25 µl con amortiguador de PCR 1X pH 8.4 (Tris-HCl 200mM, KCl 500 mM), amortiguador de carga BCP 1X (100 mM Rojo cresol, 8,3% de glicerol), 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada deoxinucleótido trifosforilado (dNTP), 1mM de cada partidor, entre 10 y 20 ng de DNA molde y 1 unidad de enzima *Taq* DNA polimerasa. Se utilizó un termociclador 2720 Thermal Cycler de Applied Biosystems con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, 35 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 30 s, alineación de partidores a 56°C por 30 s y elongación a 72°C por 3 min, y por último una elongación final a 72°C por 10 min. En el caso de PCR de colonias, no se agregó DNA a la mezcla sino que se tomó una pequeña cantidad de células con un

mondadientes directamente desde la colonia a analizar y se incorporó a la reacción. A diferencia del protocolo anterior, el tiempo de desnaturalización inicial a 94°C fue de 5 min para permitir la lisis celular. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Por otra parte, las reacciones con *Pfu* DNA polimerasa se realizaron en un volumen final de 75 µl con 2,5 unidades de enzima *Pfu* DNA polimerasa, amortiguador de reacción 1X, 0,2 mM de cada dNTP, 1mM de cada partidor, entre 30 y 60 ng de DNA molde. El protocolo de reacción fue modificado respecto al protocolo para PCR con *Taq* DNA polimerasa reduciendo el tiempo de elongación a 72°C a 1 min.

En el caso de las reacciones de PCR de elongación (OE-PCR, *Overlap Extension* PCR, Higuchi, 1988), se realizaron en un volumen final de 25 µl con 100 ng de cada fragmento de DNA a unir, 1 unidad de enzima *Pfu* DNA polimerasa, amortiguador de reacción 1X y una concentración final de 0,2 mM de cada dNTP. El protocolo utilizado fue: desnaturalización inicial a 94°C por 1 min, 10 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 1 min, alineación de partidores a 50°C por 45 s y elongación a 72°C por 45 s, y por último una elongación final a 72°C por 10 min. Luego, la mezcla de reacción obtenida se amplificó a través de una reacción de PCR estándar con *Pfu* DNA polimerasa y las muestras se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis.

Con respecto a las reacciones de síntesis de cDNA de hebra simple, éstas se realizaron usando 5 µg de RNA total en un volumen de reacción de 20 µl, 0,5 µM de dNTPs, 200 U de enzima transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) y 1,25 µM de primer oligo dT, la mezcla de reacción se mantuvo a 37°C por 1 h (Loto y col., 2012). En las reacciones de qPCR, para determinar los niveles de transcritos relativos de los genes analizados, se utilizó un termociclador de tiempo real Mx300P (Stratagene) usando 1 µl de reacción de transcripción reversa, 0,25 µM de cada partidor y 10 µl de kit SensiMix SYBR Green I (Quantace) en un volumen final de 20 µl. El valor de Ct

obtenido para cada gen fue normalizado respecto al gen de  $\beta$ -actina, *ACT* (GenBank: X89898.1) (Loto y col., 2012).

## 2.6 Análisis de DNA

### 2.6.1 Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de PCR, DNA plasmídico y DNA genómico fueron evaluados mediante electroforesis en geles de agarosa entre 0,7 y 1%, teñidos con bromuro de etidio (0,5  $\mu$ g/ml) y visualizados con un transiluminador UV. Se utilizó BCP (100 mM Rojo cresol, 8,3% glicerol) como amortiguador de carga y TAE 1X (40 mM Tris, 40 mM ácido acético, 1 mM EDTA pH 8.0) como amortiguador de corrida para la electroforesis.

Para recuperar fragmentos de DNA desde geles de agarosa, se utilizó el método de perlas de sílica (Boyle y col., 1995). Desde el gel de agarosa se cortó el fragmento de interés con un bisturí, se transfirió a un tubo Eppendorf, se añadió 300  $\mu$ l de KI 6M y se incubó a 55°C durante 5 a 10 min hasta que la agarosa estuviese totalmente disuelta. Posteriormente, se agregó 5  $\mu$ l de *glassmilk* (perlas de sílica suspendidas en KI 6M) y la mezcla se incubó en hielo durante 10 min. A continuación, se centrifugó durante 5 s para remover el sobrenadante y luego el pellet se lavó dos veces con 600  $\mu$ l de solución *New Wash* (Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2,5 mM; etanol 50%, pH 7,5), manteniendo el tubo en hielo. El sobrenadante se removió después del último lavado y el pellet seco se suspendió en 12  $\mu$ l de agua. Se incubó por 3 min a 45-55°C, se centrifugó durante 30 s a 14.000 rpm y finalmente se recuperó el sobrenadante con el DNA que se evaluó en un gel de agarosa y se guardó a -20°C hasta su utilización.

## **2.6.2 Secuenciación de DNA**

La secuenciación de DNA fue realizada por un servicio externo (Macrogen) mediante electroforesis capilar, utilizando un kit de terminadores fluorescentes determinado por la empresa. Las secuencias se analizaron con el programa Contig Express del paquete de programa Vector NTI v11.5.

## **2.7 Transformación genética por electroporación**

### **2.7.1 Construcción de plásmidos recombinantes.**

Para el clonamiento en los vectores pBS y YepNP, éstos se digirieron con las enzimas *EcoRV* y *XbaI*, respectivamente. Los productos de PCR que fueron clonados, se fosforilaron previamente con la enzima T4 polinucleótido quinasa (T4 PNK, Thermo SCIENTIFIC). A su vez, los vectores (pBS o YepNP) se desfosforilaron con la enzima fosfatasa alcalina de camarón (SAP, Fermentas). Posteriormente, los fragmentos de DNA y los vectores se ligaron con la enzima T4 DNA ligasa (Thermo SCIENTIFIC). Posteriormente, la mezcla de ligado se dializó durante 10 min en una membrana de nitrocelulosa (Millipore) contra agua destilada y se almacenó a -20°C hasta su utilización. Todas las reacciones enzimáticas se efectuaron de acuerdo a las instrucciones de los proveedores.

### **2.7.2 Electrotransformación de *E. coli*.**

Las células electrocompetentes de *E. coli* DH5  $\alpha$  se prepararon desde cultivos en fase exponencial temprana-media de crecimiento ( $DO_{600}$ : 0,4-0,6) en medio LB suplementado con ácido nalidíxico (15  $\mu$ g/ml). Las células se enfriaron en hielo durante 20 min y a continuación se colectaron por centrifugación a 4.000 g durante 15 min. Éstas se lavaron dos veces con 1 L y 500 ml de agua destilada estéril y fría, respectivamente, y una vez con 20 ml de glicerol al 10% (v/v). Finalmente, las células

se suspendieron en 3 ml de glicerol al 10% (v/v), se dividieron en muestras de 40  $\mu$ l en tubos Eppendorf para almacenarlas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

Para la transformación, se descongeló una muestra de células electrocompetentes a la cual se adicionó 4  $\mu$ l de DNA transformante, manteniendo la mezcla en hielo. Se utilizó un electroporador GenePulser Xcell™ (BioRad) y las condiciones de electroporación fueron: 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$  y 2,5 kV en una cubeta de 2 mm. Luego del pulso, a la suspensión de células se le adicionó 1 ml de medio LB y se transfirió a un tubo Eppendorf que se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 h. Finalmente, se sembró en placas con el correspondiente medio selectivo y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta el desarrollo de colonias.

### **2.7.3 Electrotransformación de *S. cerevisiae*.**

Para la preparación de células electrocompetentes de la cepa ERG11<sup>+/</sup> de *S. cerevisiae*, se sembró una colonia en 30 ml de medio YEP líquido suplementado con geneticina a 200  $\mu$ g/ml durante la noche a  $22^{\circ}\text{C}$  con agitación constante. A la mañana siguiente, se agregó al cultivo 30 ml de medio YEP fresco con geneticina a 200  $\mu$ g/ml y se incubó por 3 h más. Las células se recolectaron por centrifugación a 4.000 g durante 5 min, se lavaron tres veces con 40 ml de agua destilada estéril fría y una vez con 4 ml de sorbitol 1M. Finalmente, las células se suspendieron en 0,2 ml de sorbitol 1M y se dividieron en alícuotas de 40  $\mu$ l que se almacenaron a  $4^{\circ}\text{C}$  por un máximo de dos días.

Para transformar, se agregó a una alícuota de células competentes de *S. cerevisiae* 4  $\mu$ l de DNA transformante preparado previamente. La mezcla se puso en una cubeta de electroporación de 2 mm y se incubó en hielo por 5 min antes de dar el pulso eléctrico (1,5 kV, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ ). Posteriormente, las células se suspendieron en medio YEP con geneticina a 200  $\mu$ g/ml y se incubaron a  $22^{\circ}\text{C}$  por 1 h. Las células se

cosecharon por centrifugación, se lavaron con sorbitol 1M y se suspendieron en 1 ml de sorbitol 1M. Las células se sembraron en placas SD suplementadas con geneticina a 200 µg/ml, 0.002% uracilo y 1% histidina y se incubaron a 22°C por 3-5 días.

#### **2.7.4 Electrotransformación de *X. dendrorhous***

La preparación de células electrocompetentes de *X. dendrorhous* se realizó según el protocolo descrito por Kim y col. 1998 a partir de cultivos en fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600}$ : 2-4) en medio YM. Las células se colectaron por centrifugación, se suspendieron en 25 ml de buffer fosfato de potasio (50 mM fosfato de potasio, 25 mM DTT, pH 7,0) y se incubaron 15 min a 22°C. Los siguientes procedimientos se realizaron a 4°C, manteniendo las células y soluciones en hielo. A continuación, las células se lavaron dos veces con 25 ml de solución STM (270 mM sacarosa, 10 mM Tris-HCl, 1 mM  $MgCl_2$ , pH 7,5) y finalmente se suspendieron en 500 µl de solución STM.

A una alícuota de 60 µl de células electrocompetentes se le agregó 10 µg de DNA transformante y se electroporó bajo las siguientes condiciones: 125 µF, 600 Ω y 450 V. Luego, las células se suspendieron en 1 ml de medio YM y se mantuvieron por 4 h a 22°C. El cultivo se sembró en placas YM suplementadas con higromicina B a 35 µg/ml, las que se incubaron por tres días a 22°C.

#### **2.8 Extracción y análisis de carotenoides y esteroides.**

Los carotenoides y esteroides extraídos se normalizaron respecto al peso seco de levadura. Para ello, en cada punto de la curva de crecimiento evaluado se tomó un volumen de 3 ml de cultivo por triplicado en un tubo Eppendorf de 1,5 ml previamente

masado y se dejaron secando a 80°C por 24 h. Luego de este periodo, los tubos se masaron nuevamente para obtener el peso seco de cada muestra.

La extracción de carotenoides se hizo desde el pellet celular cosechado de muestras de 30 ml de cultivo tomadas desde la curva de crecimiento de las cepas CBS 6938 y CBS-CYP51<sup>(+/+)</sup> de *X. dendrorhous*, basándose en el protocolo descrito para *X. dendrorhous* por An y col. 1989. El pellet celular se lavó con 10 ml de agua destilada, se suspendió en 1,5 ml de agua destilada, se agregó 0,5 ml de microesferas de vidrio de 0,5 mm de diámetro y se agitó en molidor de células por 3 min. Para extraer los pigmentos, se agregó 1 ml de acetona, se agitó nuevamente en el molidor por 3 min y se centrifugó por 5 min a 4.000 g para recuperar la fase superior en otro tubo. Este procedimiento se repitió hasta que los restos celulares quedaron de color blanco. A continuación, se midió el volumen recuperado de acetona y se agregó la quinta parte de éter de petróleo. La mezcla se agitó en vórtex durante 5 min, se separaron las fases por centrifugación por 5 min a 4.000 g y se recuperó la fase superior con los pigmentos, posteriormente se repitió el proceso de extracción por éter de petróleo. Luego, se agregó 1 ml de agua al tubo acetona-éter de petróleo, se agitó en vórtex durante 5 min, se separaron las fases por centrifugación a 4.000 g por 5 min y se recuperó la fase superior (éter de petróleo) con los pigmentos. Para determinar la concentración de carotenoides totales, se calculó el volumen de éter de petróleo recuperado y se midió la absorbancia a 465 nm.

El cálculo del contenido total de carotenoides (C; µg de carotenoides/g de peso seco de levadura) de la muestra se realizó según la ecuación (1), donde A corresponde a la absorbancia a 465 nm, V es el volumen de éter de petróleo recuperado (ml), D es la dilución que se usó para medir en el espectrofotómetro, S es el volumen de cultivo

que se usó para medir peso seco de levadura (ml), P es el volumen de cultivo que se usó para la extracción de pigmentos (ml) y W es el peso seco de levadura (g).

$$C (\mu\text{g/g peso seco}) = \frac{V(\text{ml}) * A * D * S (\text{ml}) * 100}{P(\text{ml}) * W(\text{g}) * 21} \quad (1)$$

La extracción de esteroides se hizo desde alícuotas de cultivo tomadas desde la curva de crecimiento de las cepas ERG11<sup>+/+</sup>, hERG11 y hCYP51 de *S. cerevisiae* y CBS 6938 y CBS-CYP51(+/-) de *X.dendrohous*, basándose en los protocolos descritos por Shang y col. 2006, y Cheng y col. 2010. En resumen, se añadió una solución con 4 g de KOH y 16 ml de etanol 60% (v/v) al pellet celular, se mezcló y se dejó a 80 ± 2°C en baño María durante 2 h. Los esteroides fueron extraídos con 10 ml de éter de petróleo y cuantificaron espectrofotométricamente a 280 nm (Lamacka y Sajbidor 1997).

El análisis de la composición de carotenoides y esteroides se realizó mediante cromatografía líquida en fase reversa en un equipo de HPLC (RP-HPLC) con un detector de arreglo de diodos Shimadzu SPD-M10A. Se utilizó una columna Lichrospher RP18 154-4 (Merk) y como fase móvil se usó una mezcla de acetonitrilo:metanol:isopropanol (85:10:5, v/v) o metanol:agua (97:3, v/v), para resolver carotenoides y esteroides, respectivamente, con un flujo de 1 ml/min en condiciones isocráticas. Previo a la inyección de las muestras de carotenoides y esteroides, se dejó evaporar el éter de petróleo y se suspendieron en 100 µl de acetona al momento de cargar la muestra en el equipo. La identificación de carotenoides se realizó por comparación con estándares específicos de acuerdo al tiempo de retención y su espectro de absorción. Los esteroides se visualizaron en el canal de 280 nm y se identificaron por comparación con un estándar comercial (Loto y col. 2012).

## 2.9 Análisis bioinformático de la proteína CYP51 deducida de *X. dendrorhous*

El *docking* automatizado es una técnica computacional que permite explorar las interacciones de unión entre un ligando y su receptor diana con el fin de computar las conformaciones energéticamente más estables de la estructura del complejo proteína-ligando, la que generalmente es definida por los grados de libertad de torsión alrededor de los enlaces rotables del ligando y los grados de libertad de traslación y de orientación (Dhanik y col., 2012). En general, la exploración del espacio conformacional se realiza mediante un algoritmo de toma de muestras y la estabilidad de una conformación del complejo se evalúa usando un *scoring* o función de energía que estima la afinidad de unión del complejo. De esta manera, se utilizó la técnica de *docking* proteína-ligando para evaluar las interacciones de unión entre el modelo tridimensional de la proteína CYP51 de *X. dendrorhous* y sus potenciales ligandos mediante el programa AutoDock4 (Morris y col., 2009) que emplea un algoritmo genético lamarckiano estocástico para computar las conformaciones del ligando y simultáneamente minimizar su función de *scoring* que aproxima la estabilidad termodinámica del ligando unido a la proteína diana (Dhanik y col., 2012).

### 3 RESULTADOS

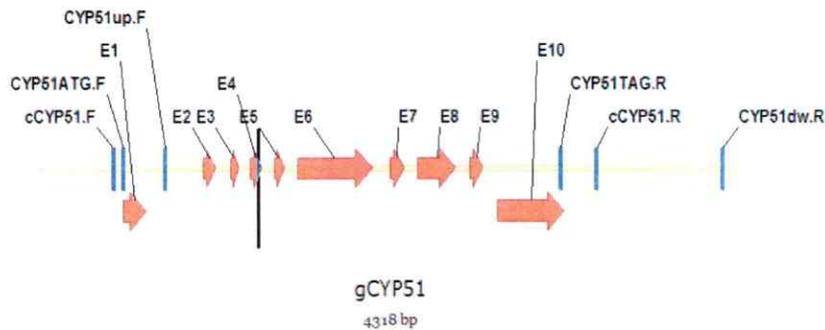
#### 3.1 Clonación y análisis de secuencia del gen *CYP51* de *X. dendrorhous*

La base de datos genómica de *X. dendrorhous* disponible en el Laboratorio de Genética se analizó con la herramienta BLAST del software CLC Genomics Workbench 5 utilizando la secuencia del gen *ERG11* de *S. cerevisiae* disponible en la base de datos GeneBank [NM\_001179137]. De esta forma, se logró identificar el posible gen *CYP51* de *X. dendrorhous*, a partir del cual se diseñaron partidores específicos para amplificar y clonar este gen.

Un fragmento de 4.318 pb se amplificó mediante PCR usando DNA genómico de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* como molde con los partidores CYP51up.F y CYP51dw.R. Este fragmento se insertó en el sitio *EcoRV* del plásmido pBluescript SK, generando el vector pBS-gCYP51. Posteriormente, se construyó el plásmido pBS-cCYP51, que contiene el cDNA del gen *CYP51* con un ORF de 1.653 pb, el cual se obtuvo mediante RT-PCR utilizando los partidores cCYP51.F y cCYP51.R.

El análisis de las secuencias de las versiones genómica y de cDNA del gen *CYP51* permitió determinar su organización estructural que consiste de 10 exones de 141, 70, 47, 63, 60, 462, 86, 233, 83 y 408 pb, y 9 intrones de 356, 95, 79, 80, 86, 110, 90, 87 y 90 pb (Figura 6). El gen *CYP51* posiblemente codifica una proteína CYP51 de 550 aminoácidos con peso molecular de aproximadamente 61,8 kDa y un punto isoeléctrico (*pI*) de 6,64 (Kozłowski 2007). La proteína CYP51 deducida de *X. dendrorhous* presenta un 48% de identidad y 65% de similitud con un 91% de cobertura de secuencia con la 14- $\alpha$ -desmetilasa de esteroides de *S. cerevisiae* (*ERG11*, Swiss Protein: P10614), que pertenece a la familia de proteínas citocromo P450 y está

involucrada en el tercer paso de la biosíntesis de ergosterol: la conversión de lanosterol en 4,4-dimetil-colesta-8,12,24-trieno (Aoyama y col. 1984, Kalb y col. 1987).



**Figura 6.- Estructura del gen *CYP51* de *X. dendrorhous*.** Esquema de la región de DNA amplificada por PCR que incluye el gen *CYP51* de *X. dendrorhous* junto con los sitios de unión de los partidores empleados. Los 10 exones (E1 a E10) del gen *CYP51* se representan como flechas naranjas gruesas.

Por otro lado, se realizó un alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la potencial proteína CYP51 de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* y la enzima ERG11 de la cepa S288c de *S. cerevisiae*. Pese a los múltiples cambios de residuos aminoacídicos dentro del alineamiento, sólo se observaron siete cambios en los cinco sitios de reconocimiento de sustrato descritos por Lepesheva y Waterman, 2004 (Figura 7). Las variaciones fueron D138G, H146S, Q260H, E264A, D267G, A314G y S395K respecto a la secuencia deducida de CYP51 de *X. dendrorhous*.

```

Xd      MSSSQSI FTQLAQLIPREQLPSTPILVLA AIFGFPI LAVLINVSYQLFWPKDPSLPPVVF 60
Sc      MS+++SI + + + + + I + I+ + N+ +QL++ PP+VF
        MSATKSIVGEALEYVNI GLSHFLALPLAQRISLIIIPFIYNIVWQLLYSLRKDRPPLVF 60

Xd      HYVPWLGSAVSYGMDPYKFFYDCREKHGDLFTFILIGRKVTVALGPKGNDMILGGKLSQV 120
Sc      +++PW+GSAV YGM PY+E+ +C++K+GD+F+F+L+GR +TV LGPKG+++++ KL++V
        YWIPWVGS AVVYGMKPYEFFECCQKYGDI FSVLLGRVMTVYLGPKGHEFVFNALADV 120

Xd      SAE EAYTHITTPVFGKDVVYDCPNHVFMEQKKFVKFGLSLENLKAYIPMIFEEFDTMLKT 180
Sc      SAE AY+HITTPVFGK V+YDCPN +MEQKKFVK L+ E +K+Y+P+I EE ++
        SAEAAAYAHITTPVFGKGVYDCPN SRLMEQKKFVKGALTKEAFKSYVPLIAEEVYKYFRD 180

Xd      DDSFKAFKDGSK EWSSFPALKTLGELTILTASRTLQGKEVRAGLDKSFQKYENLDRGFT 240
Sc      F+ + + ++ + T E+TI+TASR+L GKE+RA LD FA Y +LD+GFT
        SKNFRNLNERTTG---TIDVMVTQPEMTIFTASRSLGKEMRAKLDTDFAYLYSLDKGFT 237

Xd      PINFLFPYLP LPSYWKRDQAQKEMSDFYLGIEGRNGESDHEHDMIASLQN-QTYKDGR 299
Sc      PINF+FP LPL Y KRD+AQK +S Y+ +I+ RR+ + +++D+* SL + TYKDG
        PINFVFPNLP LEHYRKR DHAQK AISGTYSMLIKERRKNNDIQDRDLIDSLMKNSTYKQGV 297

Xd      PLS DREIAHIMIALLMAGQHTSSATSSWTLLELANPEVYQRLYDEQVAVLGQPDGSRM 359
Sc      ++D+EIA+++I +LM GQHTS+ATS+W LL LA P+V Q LY+EQ+ VL DG +
        KMTDQEIALLLIGVLMGGQHTSAATS AWILLHLAERP DVQQLYEEQMRVL---DGGKKE 354

Xd      LEYDDIKNLKVMDS CIRET LRIHAP IHSIFRKVISLISVPQALSAPSESGQYVIPKGYV 419
Sc      L YD ++++ +++ I+ETLR+H P+HS+FRKV+ D+ VP++ YVIP GY+V
        LTYDLLQEMPLL NQTIKETLRMHHP LHSLFRKVMKDMHVPNTS-----YVIPAGYHV 406

Xd      LASPGVAQMDARIWENASKWDPARWTDKSGVA AKAGEQYENNAGDKVDYGF GAISKGTES 479
Sc      L SPG +++ + NA +++ RW S Y G+++VDYGF GAISKG S
        LVSPGYTHLRDEYFPNAHQFN IHRWNKDS-----ASSYS--VGEEVDYGF GAISKGVSS 458

Xd      PYQPFAGRHR CIGESFAYVQLSTILAAFVQNMELKLEGG--VPATDYESMIVLPKHPHT 537
Sc      PY PFG GRHR CIGE FAY QL +++ F++ ++ + G VP D+ SM+ LP P
        P YLPFGGGRHR CIGEHFAYCQLGV LMSIFIRTLKWHYPEGKTVPPP DFTSMVTLPTGPAK 518

Xd      IHYRKRQPRKAAA 550
Sc      I + KR+P +
        I IWEKRNPEQKI- 530

```

**Figura 7.- Comparación de secuencia deducida de CYP51 de *X. dendrorhous* y ERG11 de *S. cerevisiae*.** Comparación de secuencia aminoacídica de CYP51 de *X. dendrorhous* (Xd.) cepa UCD 67-385 y ERG11 de *S. cerevisiae* (Sc.) cepa S288c [Swiss Protein: P10614]. Los cambios de aminoácidos donde se reemplaza por un aminoácido con las mismas propiedades se designan con un signo positivo (+). Los sitios de reconocimiento de sustrato de las enzimas P450 se destacan en un marco rojo (Lepesheva y Waterman, 2004).

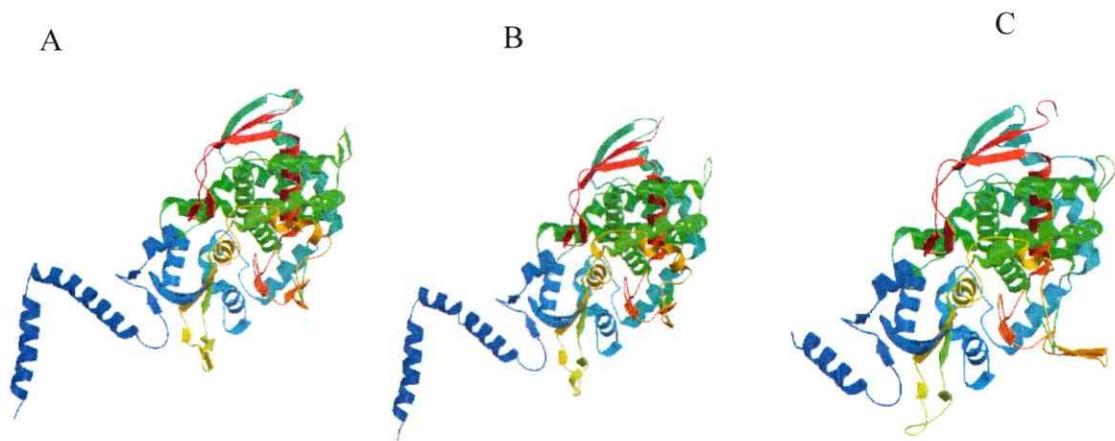
A pesar que las secuencias aminoacídicas de las proteínas de la familia de Citocromo P450s son extremadamente diversas, su plegamiento estructural es altamente conservado (Reichhart y Feyereisen, 2000). En particular, varios elementos estructurales secundarios de Citocromo P450 fueron predichos en la proteína CYP51 deducida de *X. dendrorhous* mediante la aplicación *Predict Structurally Conserved Regions* de la base de datos CYP450 Engineering (Sirim y col., 2009). Esto incluyó las hélices alfa A, B, C, E, F, G, H, I, J, K, K' y L, las hojas beta 1-1, 1-2, 1-5, 3-1, 1-4, 2-1, 2-2, 1-3, 3-3, 4-1, 4-2 y 3-2, un bucle meandro  $\beta$ , que puede estar involucrado en la estabilización de la estructura terciaria y en la unión al grupo hemo, y el bolsillo Cys que contiene el residuo de cisteína conservado involucrado en la unión del grupo hemo (Figura 8).

Por otro lado, existen tres aminoácidos totalmente conservados en la familia de proteínas Citocromo P450, el ácido glutámico y la arginina en el motivo E-X-X-R en la hélice K, que están implicados en la estabilización del *core* de la proteína y la unión del grupo hemo, y la cisteína implicada en la unión del grupo hemo (Sirim y col., 2009). Todos estos residuos están presentes en la proteína CYP51 deducida de *X. dendrorhous*. Además, una potencial región de transmembrana en el extremo amino terminal de la proteína CYP51 fue deducida con el programa TMpred (Hofmann y Stoffel, 1993) que podría anclar esta proteína a la membrana del retículo endoplásmico lo que es característico en las CYPs de clase II (van den Brink y col., 1998).



Figura 8.- Estructura de la proteína CYP51 deducida de *X. dendrorhous*. Los elementos de estructura secundaria fueron predichos con la base de datos CYP450 Engineering (Sirim, D. y col. 2009.) y la potencial región transmembrana fue predicha con el programa Tmpred (Hofmann y Stoffel, 1993). Subrayado y en cursiva: posible hélice transmembrana. Los elementos estructurales se muestran en color con el nombre correspondiente bajo ellos. En color rojo: hélices alfa (h) y en color azul: hojas-beta (b). En letras blancas y resaltado en negro: bucle meandro-β y bolsillo Cys. Los asteriscos (\*) indican los tres aminoácidos totalmente conservados en la familia Citocromo P450.

La técnica de modelación por homología fue empleada para predecir la estructura tridimensional de la proteína CYP51 de *X. dendrorhous* (Figura 9) mediante el servidor web Swissmodel (Biasiani y col., 2014). Como molde se seleccionó el modelo de la proteína ERG11 de *S. cerevisiae* con lanosterol como ligando (Monk y col., 2014, código de modelo: 4lxj.1) y el modelo de ERG11 de *S. cerevisiae* unido a itraconazol con el dominio de transmembrana intacto (Monk y col., 2014, código de modelo: 4k0f.1), ya que ambos modelos presentaron el mayor porcentaje de identidad de secuencia (48%) con la proteína deducida CYP51 de *X. dendrorhous*. Posteriormente, se evaluó los perfiles energéticos de los modelos obtenidos para analizar la estabilidad de las estructuras tridimensionales utilizando la suite del servidor web Modeller (Sali y col., 2008), específicamente el script 'evaluate\_model.py' (Figura 10).



**Figura 9.- Modelos tridimensionales de la proteína CYP51 deducida de *X. dendrorhous*.** Los modelos fueron generados mediante el servidor web Swissmodel (Biasiani y col., 2014). (A) Modelo 1 obtenido utilizando como molde el modelo 4lxj.1 con 95% de cobertura, (B) Modelo 2 obtenido utilizando como molde el modelo 4k0f.1 con 95% de cobertura y (C) Modelo 3 obtenido utilizando como molde el modelo 4lxj.1 con 89% de cobertura (sin los primeros 36 residuos de la secuencia aminoacídica).

Con la ayuda del programa VMD (*Visualizer Molecular Dynamics*) (Humphrey y col., 1996), se determinó los residuos de la proteína deducida CYP51 que interactuarían directamente con los posibles ligandos (lanosterol, oxígeno e itraconazol). Los residuos 310-384 interactuarían con lanosterol, mientras que los residuos 380-470 y 314-318 estarían asociados al grupo hemo y a oxígeno, respectivamente. Por lo tanto, se espera que la región comprendida entre los residuos 300 y 400 de la proteína deducida CYP51 esté bien modelada debido a que corresponde a una región conservada de unión a sustrato y por consiguiente, los modelos generados mediante modelamiento por homología a partir de la proteína ERG11 deberían ser similares en esa región.

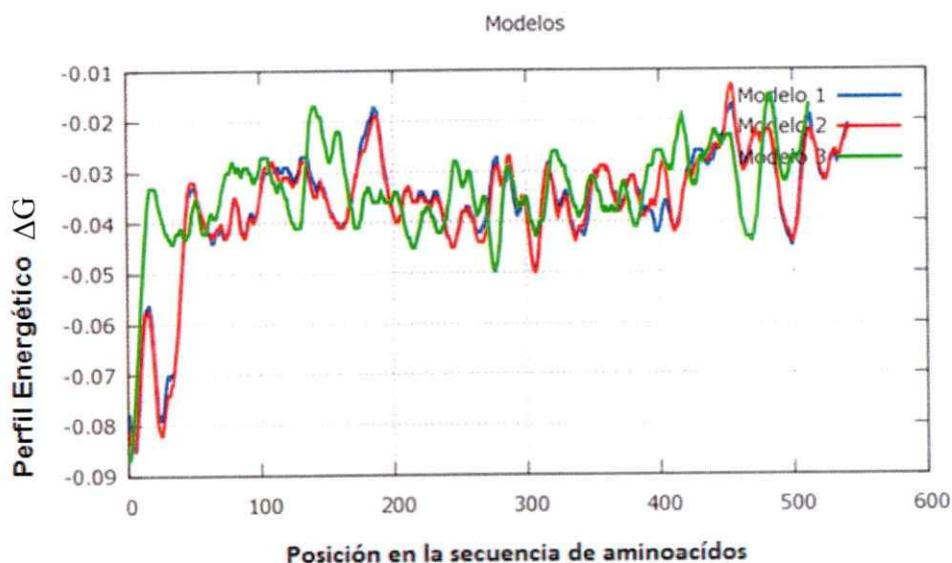
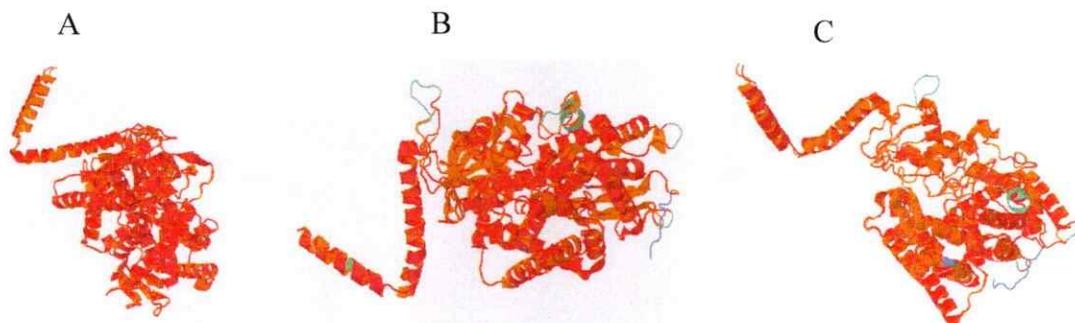


Figura 10.- Comparación de perfiles energéticos de modelos tridimensionales de la proteína CYP51 deducida de *X. dendrorhous*. El gráfico se generó mediante el programa gnuplot (Williams y Kelley, 2011). El modelo 1 está representado en azul; el modelo 2 en rojo; y el modelo 3 en verde.

De acuerdo a la Figura 10, los modelos de mejor calidad corresponden al modelo 1 y 2, a diferencia del modelo 3 donde la estructura predicha para la región amino terminal presenta mayor energía libre de Gibbs posiblemente debido a que fue modelado con un molde que carece de los primeros 36 residuos de la secuencia aminoacídica. En consecuencia, a pesar que el modelo 3 se obtuvo a partir del molde que presenta mayor identidad de secuencia (50%), este modelo no se consideró en los siguientes análisis.

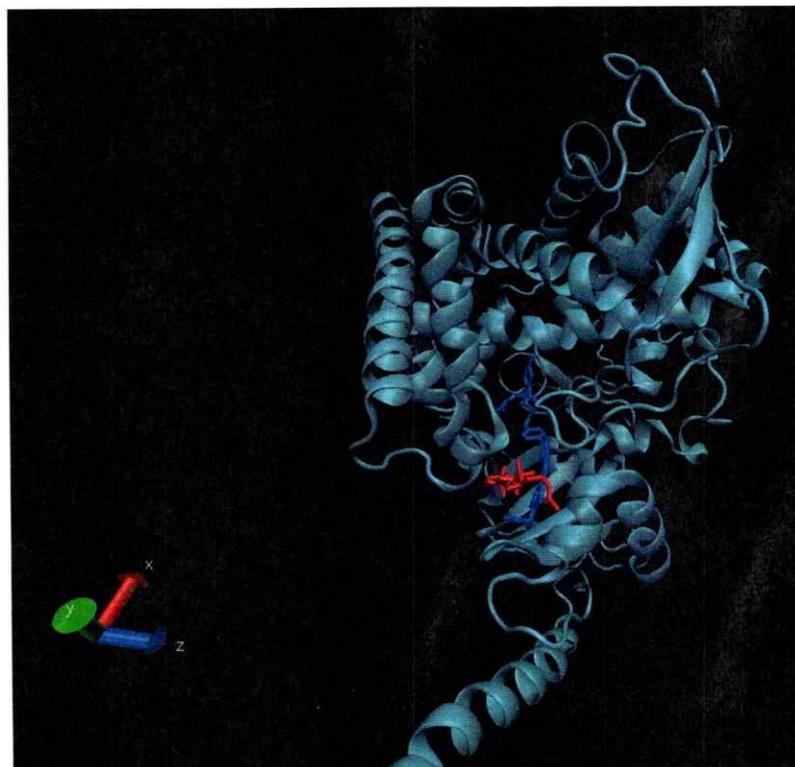
Posteriormente se realizó un alineamiento de estructura tridimensional de los moldes utilizados para el modelamiento por homología con el fin de evidenciar diferencias de plegamiento debido a la presencia de los ligandos lanosterol o itraconazol. Debido a que no se observaron diferencias en la estructura tridimensional en el alineamiento tridimensional de los moldes utilizados (Figura 11A), sólo se utilizó el modelo 4lxj en los siguientes estudios. Similarmente, para evaluar posibles diferencias entre los modelos de CYP51 obtenidos respecto a los moldes utilizados, se realizó un alineamiento de estructura tridimensional. De esta manera se encontró que los modelos generados presentan alta analogía estructural con sus respectivos moldes. Sin embargo, las regiones que presentaron mayor variabilidad corresponden a *loops* dentro de la proteína que posiblemente no hayan sido bien modelados debido a que son regiones no conservadas (Figuras 11B y C).



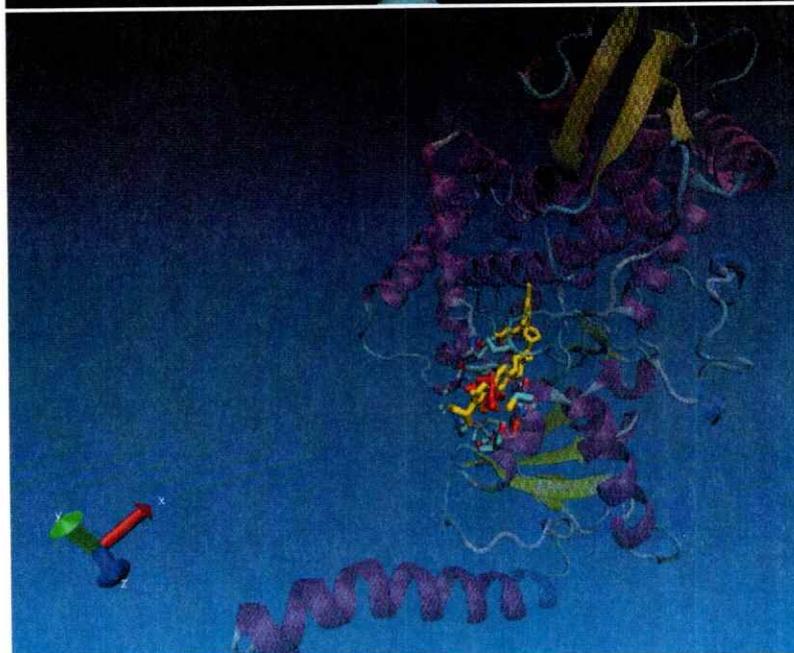
**Figura 11.- Superposición de estructuras tridimensionales de los modelos obtenidos de CYP51 de *X. dendrorhous* y los respectivos moldes.** Se utilizó el servidor web de alineamiento y superposición de estructura de proteínas TopMatch-web (Sippl y Wiederstein, 2008). (A) Moldes 4lxj y 4k0f utilizados para la modelación. (B) Molde 4lxj y modelo 1 de proteína CYP51. (C) Molde 4k0f y modelo 2 de proteína CYP51. Las zonas de color rojo-naranja representan regiones de alta analogía estructural, mientras que las zonas de color azul-verde representan regiones de baja o nula analogía estructural.

A continuación, se utilizó la técnica de *docking* proteína-ligando para evaluar las interacciones de unión entre el modelo 1 de la proteína CYP51 de *X. dendrorhous* y sus potenciales ligandos lanosterol e itraconazol (Figura 12A) para lo cual se usó el programa AutoDock4 (Morris y col., 2009). Posteriormente, se determinó mediante el programa *Visualizer Molecular Dynamics* (Humphrey y col., 1996) que aminoácidos de la proteína CYP51 de *X. dendrorhous* interactúan directamente con los ligandos lanosterol o itraconazol, es decir, los residuos que se encuentran a una distancia menor a 5 Å de estas moléculas con el fin de evaluar la superposición de sitios de unión de los ligandos a la proteína (Figura 12B).

A



B



**Figura 12.- Docking del modelo obtenido de CYP51 de *X. dendrorhous* y los potenciales ligandos lanosterol e itraconazol.** (A) Se utilizó el programa AutoDock4 (Morris y col., 2009) para realizar *docking* automatizado para predecir los sitios de unión de lanosterol (rojo) e itraconazol (azul) al modelo obtenido de la proteína CYP51 de *X. dendrorhous* (B) Se empleó el programa *Visualizer Molecular Dynamics* para determinar los aminoácidos de la proteína CYP51 de *X. dendrorhous* que se encuentran a menos de 5 Å del ligando lanosterol (rojo) o itraconazol (amarillo), respectivamente (Humphrey y col., 1996).

De acuerdo a los resultados anteriores se determinó que los aminoácidos de la proteína CYP51 de *X. dendrorhous* que interactúan directamente con lanosterol serían los siguientes de acuerdo a su posición en la secuencia polipeptídica: 69-70-72-73-74-95-96-98-124-125-126-128-241-242-244-245-389-418-526-528. Mientras que los residuos que podrían estar interactuando con el ligando itraconazol corresponden a: 66-69-70-72-73-95-96-126-129-130-140-239-241-244-245-315-316-317-318-319-320-385-386-387-388-389-525-526-527-528-529. Por lo tanto, se evidencia que la unión del azólico itraconazol a la proteína CYP51 se produciría en el bolsillo de unión de sustrato de la enzima, por ende bloquearía la catálisis enzimática. Por otro lado, al comparar los residuos que interactúan directamente con los ligandos con los resultados de la Figura 5 se observa que las regiones comprendidas entre los aminoácidos 241 y 245, 315 y 320, 385 y 389 corresponden a sitios de reconocimiento de sustrato de las enzimas P450.

### 3.2 Análisis de funcionalidad del gen *CYP51* por complementación heteróloga en *S. cerevisiae*

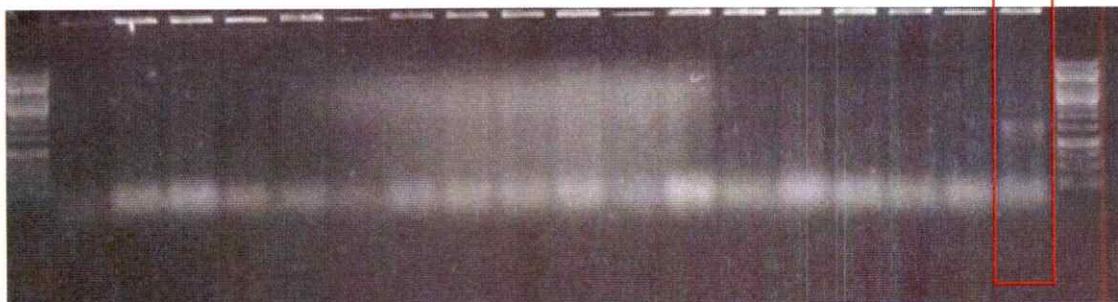
#### 3.2.1 Transformación de *S. cerevisiae*

Previo a la transformación de *S. cerevisiae*, los fragmentos de DNA correspondientes a los cDNAs de los genes *CYP51* de *X. dendrorhous* y *ERG11* de *S. cerevisiae*, se amplificaron por PCR con los partidores señalados en la Tabla 3 y *Pfu* DNA polimerasa desde el plásmido pBS\_CYP51 (Tabla 2) y desde DNA genómico de la cepa Meyen ex E.C Hansen de *S. cerevisiae* (Tabla 1), respectivamente. Los productos de PCR se purificaron desde gel de agarosa y se ligaron independientemente al vector YE<sub>p</sub>NP, el que contiene un sitio de corte para la endonucleasa de restricción *Xba*I que permite ligar el gen de interés entre el promotor *ACT4* y el terminador *TDH3*, ambos de *S. cerevisiae*. Posteriormente, se transformaron células, electrocompetentes de *E. coli* con dichas construcciones seleccionando a los transformantes en placas LB suplementadas con ampicilina. La inserción de cada inserto en el vector y en la orientación deseada fue evaluada por PCR de colonias en los transformantes obtenidos con los partidores gERG11.F y ERG11.R para el plásmido YE<sub>p</sub>NP-gERG11 (Figura 13 y 14), y con CYP51.ATG.F y CYP51.TAG.R para el plásmido YE<sub>p</sub>NP-cCYP51 (Figura 15) que permiten confirmar la presencia del gen deseado. De esta manera se encontró 1 clon positivo para cada plásmido y a partir de ellos se obtuvo el DNA plasmídico para los siguientes experimentos. Los plásmidos generados se denominaron YE<sub>p</sub>NP-cCYP51 y YE<sub>p</sub>NP-gERG11 (Tabla 2) portadores del cDNA del gen *CYP51* de *X. dendrorhous* y *ERG11* de *S. cerevisiae*, respectivamente.

Tamaño  
(kb.)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 M

10  
8  
5  
3,5  
3  
2,5  
2  
1,5  
1



Tamaño  
(kb.)

M 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 M

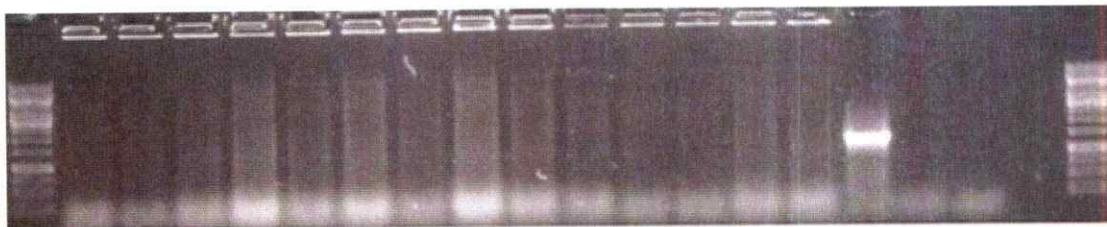
10  
8  
5  
3,5  
3  
2,5  
2  
1,5  
1



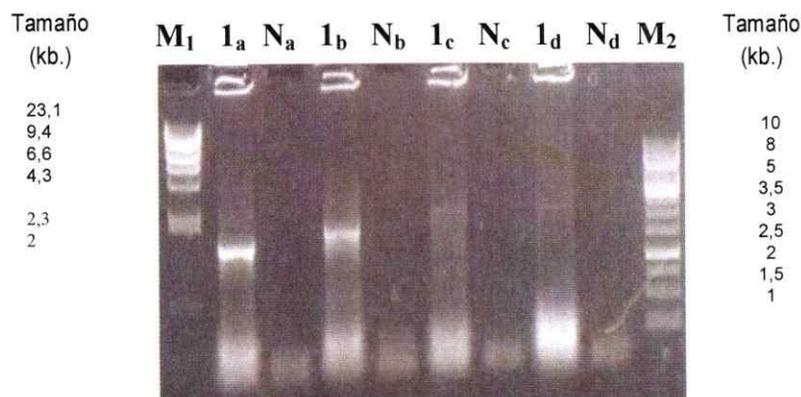
Tamaño  
(kb.)

M 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 P N Xd M

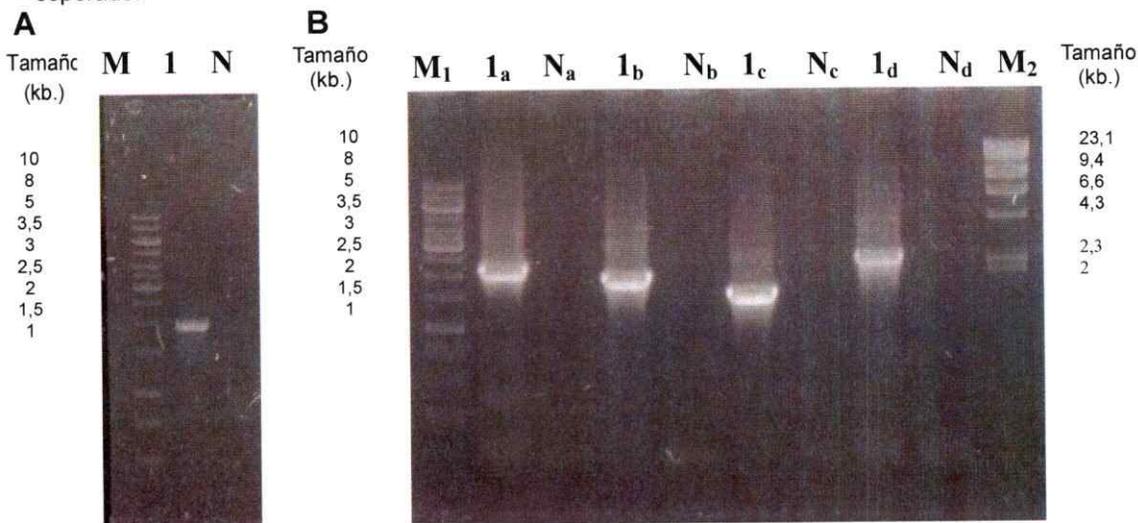
10  
8  
5  
3,5  
3  
2,5  
2  
1,5  
1



**Figura 13.- Resultado de PCR de colonia de *E. coli* transformada con el vector YEpnP-gERG11.** Carril M: Marcador de peso molecular 1Kb. Carril 1-50: PCR de colonias de *E. coli* transformantes YEpnP-gERG11. Carril P: Control positivo, DNA de *S. cerevisiae* cepa parental Meyen ex E.C Hansen. Carril N: Control negativo (sin DNA). Carril Xd: DNA de *X. dendrorhous* cepa 385. Los partidores empleados fueron gERG11.F y ERG11.R. En el recuadro rojo se indica la colonia positiva de *E. coli* transformada con el vector YEpnP-gERG11.



**Figura 14.- Resultado de PCR de colonia de clon n°18 de *E. coli* transformado con vector YEpNP-gERG11.** Carril M: Marcador de peso molecular Lambda/Hind III (M<sub>1</sub>) y 1Kb (M<sub>2</sub>). Carril 1<sub>(a, b, c y d)</sub>: DNA de clon n°18 de *E. coli* transformante con YEpNP-gERG11. Carril N<sub>(a, b, c y d)</sub>: Control negativo (sin DNA). Los partidores empleados con el tamaño del fragmento amplificado esperado entre paréntesis son: (a) gERG11.F y ERG11.R (1600 pb), (b) gERG11.F y M13.Rv.Puc-40 (2000 pb), (c) M13.Fw.FP y ERG11.R (2300 pb) y (d) M13.Fw.FP y M13.Rv.Puc-40 (2400 pb). (a) permite determinar la presencia del gen *ERG11*, (b) y (c) permiten confirmar la orientación deseada en el vector de expresión, y (d) permite confirmar que efectivamente el vector contiene un inserto del tamaño esperado.



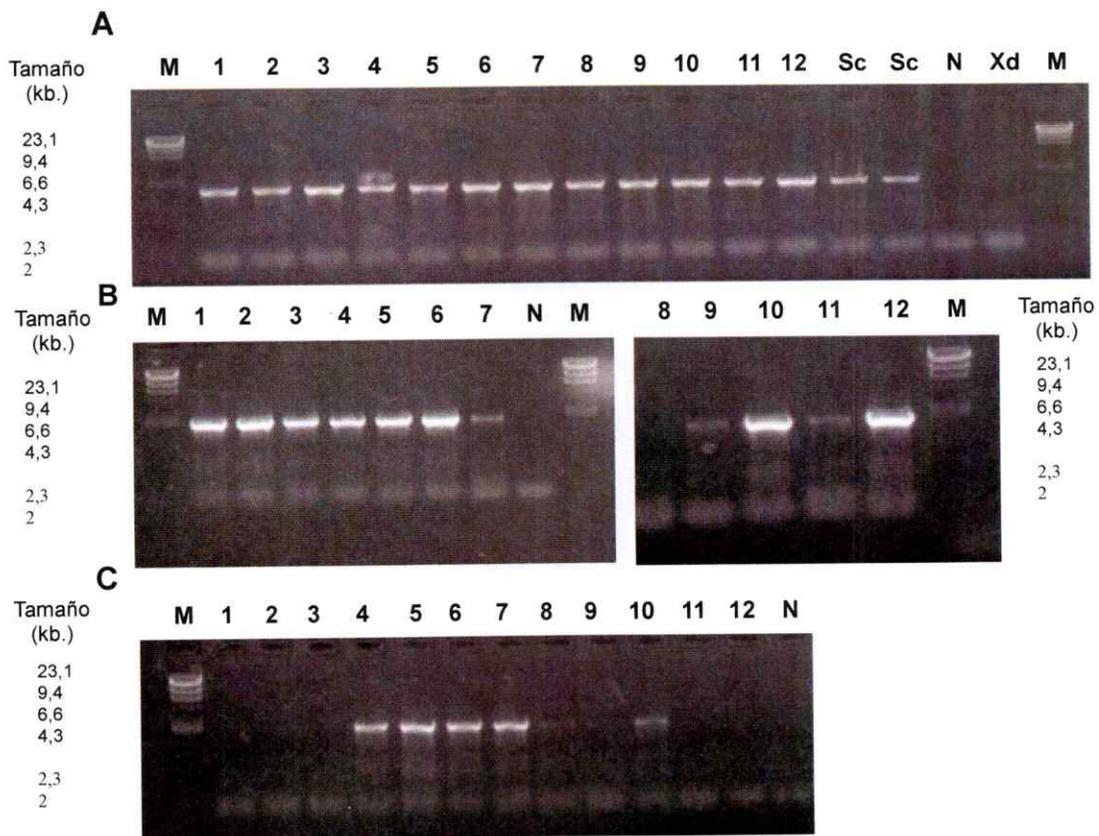
**Figura 15.- Resultado de PCR de colonia y PCR de DNA plasmídico extraído de *E. coli* transformado con vector YEpNP-cCYP51.** PCR de colonia de *E. coli* transformado con vector YEpNP-cCYP51 (Panel A) Carril M: Marcador de peso molecular 1Kb. Carril 1: DNA de el único clon de *E. coli* transformante YEpNP-cCYP51 obtenido. Carril N: Control negativo (sin DNA). Los partidores empleados fueron CYP51.ATG.F y CYP51.TAG.R. PCR de DNA plasmídico extraído de *E. coli* transformada con el vector YEpNP-cCYP51 (Panel B) Carril M: Marcador de peso molecular 1Kb (M<sub>1</sub>) y Lambda/Hind III (M<sub>2</sub>). Carril 1<sub>(a, b, c y d)</sub>: DNA plasmídico de clon transformante de *E. coli* YEpNP-cCYP51. Carril N<sub>(a, b, c y d)</sub>: Control negativo (sin DNA). Los partidores empleados con el tamaño del fragmento amplificado esperado entre paréntesis son: (a) M13.Fw.FP y CYP51.TAG.R (2200 pb), (b) CYP51.ATG.F y M13.Rv.Puc-40 (2000 pb), (c) CYP51.ATG.F y CYP51.TAG.R (1600 pb) y (d) M13.Fw.FP y M13.Rv.Puc-40 (2500 pb). (a) y (b) permiten confirmar la orientación deseada del inserto en el vector de expresión, (c) permite determinar la presencia del cDNA del gen *CYP51* y (d) permite confirmar que efectivamente el vector contiene un inserto del tamaño esperado.

Con los plásmidos obtenidos se transformó células electrocompetentes de la cepa Meyen ex E.C. Hansen de *S. cerevisiae* que es diploide y heterocigota para el gen *ERG11* la cual se obtuvo en el proyecto de escisión genómica de *S. cerevisiae* en el que se reemplazaron cientos de genes (de manera independiente) por el módulo *kanMX* que confiere resistencia a geneticina (G418) (Wach y col., 1994). Además de ser una cepa heterocigota para el gen *ERG11* y para el módulo *kanMX*, la cepa es auxótrofa para leucina, uracilo e histidina (*leu2-/leu2-,ura3-/ura3- e his3-/his3-*) y heterocigota para genes involucrados en la síntesis de lisina y metionina (*lys2-/LYS2 y met15-/MET15*, respectivamente). De esta manera, las cepas de *S. cerevisiae* transformantes con el vector YEpNP (portador del gen a estudiar) son seleccionadas por pérdida de la auxotrofia para leucina en placas SD suplementadas con uracilo, histidina y geneticina. Así se obtuvo 30 y 20 transformantes con los plásmidos YEpNP-gERG11 y YEpNP-cCYP51, respectivamente.

A continuación, se extrajo el DNA total de 12 colonias transformantes con el vector YEpNP-gERG11 seleccionadas al azar para verificar la presencia y orientación del gen *ERG11* en el vector por PCR estándar utilizando diferentes combinaciones de partidores incluyendo el DNA genómico de la cepa parental sin transformar como control. Como se puede observar en la Figura 16, con el DNA de todas las cepas transformantes se amplificó un fragmento correspondiente al gen *ERG11* de *S. cerevisiae* mostrando una banda de 1,6 kb (partidores gERG11.F y ERG11.R). Asimismo se observa que sólo con el DNA de los clones 4, 5, 6, 7, 8 y 10 se amplificó el gen *ERG11* en la región de clonamiento del vector YEpNP dando una banda de alrededor de 2 kb (partidores gERG11.F y M13.Rv.Puc-40) y de 2,3 kb (partidores M13.Fw.FP y ERG11.R.). Luego, se seleccionaron al azar los clones transformantes 6



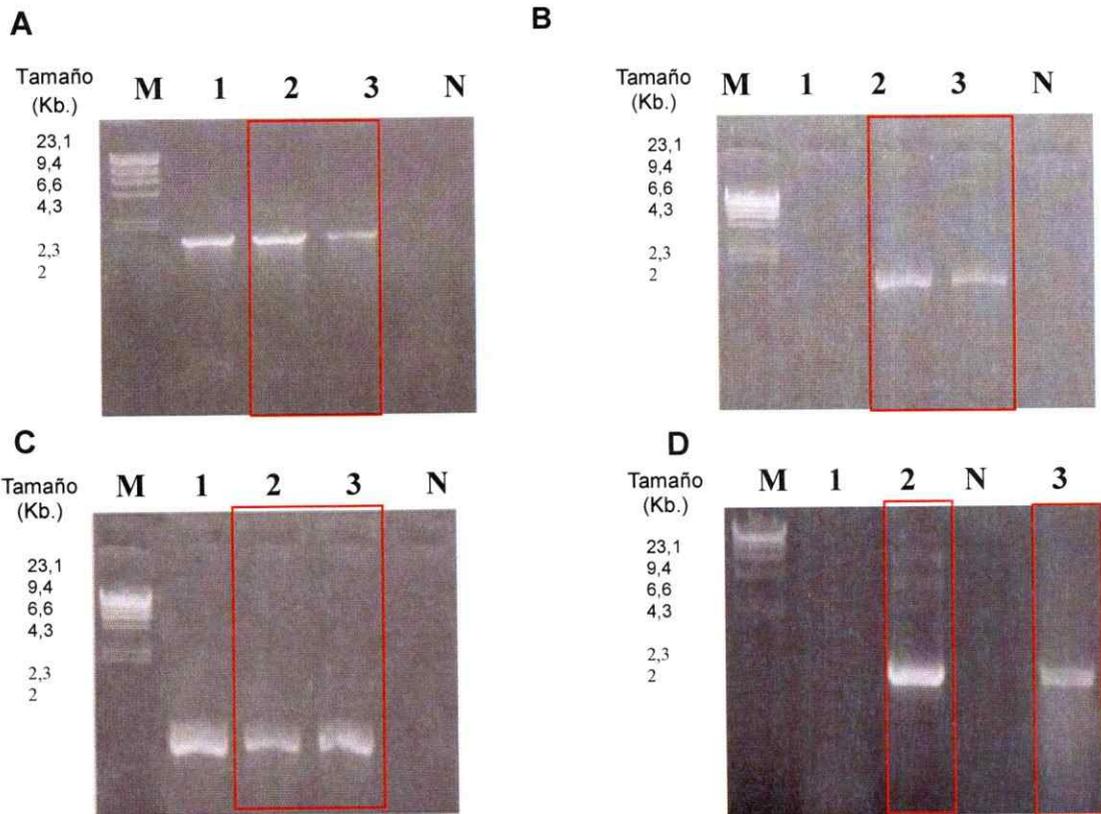
y 7 para realizar el proceso de esporulación con la finalidad de obtener la cepa haploide para estudiar la complementación de dicho gen.



**Figura 16.- Resultado de PCR de clones de *S. cerevisiae* transformados con vector el YE<sub>NP</sub>-gERG11.** Los partidores empleados en las reacciones de PCR fueron los siguientes: gERG11.F y ERG11.R (Panel A) que permiten confirmar la presencia del gen *ERG11* en el vector, M13.Fw.FP y ERG11.R (Panel B) que permiten confirmar la orientación deseada en el vector de expresión, y gERG11.F y M13.Rv.Puc-40 (Panel C) que también permiten confirmar la orientación deseada en el vector de expresión. Carril M: marcador de peso molecular Lambda/ *Hind* III. Carril 1-12: DNA de 12 colonias transformantes de *S. cerevisiae* con el plásmido YE<sub>NP</sub>-gERG11. Carril Sc: DNA *S. cerevisiae* cepa parental Meyen ex E.C. Hansen, Carril Xd: DNA *X. dendrorhous* cepa UCD 67-385, Carril N: control negativo, sin DNA.

Similarmente, se extrajo el DNA total de 3 colonias al azar de *S. cerevisiae* transformantes con YE<sub>NP</sub>-cCYP51 para verificar la presencia del cDNA *CYP51* en el

vector por PCR estándar utilizando los partidores RT.CYP51.F y CYP51\_Rb. Como se ilustra en la Figura 17, con el DNA de las cepas transformantes 2 y 3 se amplificó el fragmento esperado de 1,6 kb, al igual que el módulo de resistencia a geneticina mostrando una banda de alrededor de 0,8 kb y el gen *ERG11* de *S. cerevisiae* mostrando una banda de 1,6 kb.



**Figura 17.- Resultado de PCR de clones de *S. cerevisiae* transformados con el vector YEpNP-cCYP51.** Los partidores empleados en las reacciones de PCR fueron los siguientes: RT.CYP51.F y CYP51\_Rb que amplifican al gen *CYP51* de *X. dendrohous* (Panel A), gERG11.F y ERG11.R que amplifican al gen *ERG11* de *S. cerevisiae* (Panel B), KanMX4.F y KanMX4.R que amplifican el módulo de resistencia a geneticina de la cepa Meyen ex E.C Hansen de *S. cerevisiae* (Panel C) y Leu2.k.F y Leu2.k.R que amplifican el gen *LEU2* de *S. cerevisiae* (Panel D). Carril M: marcador de peso molecular Lambda/ Hind III. Carril 1-3: DNA de colonias de *S. cerevisiae* transformantes con YEpNP-cCYP51, Carril N: control negativo, sin DNA. En los recuadros rojos se indican las colonia positivas de *S. cerevisiae* transformados con el vector YEpNP-cCYP51.

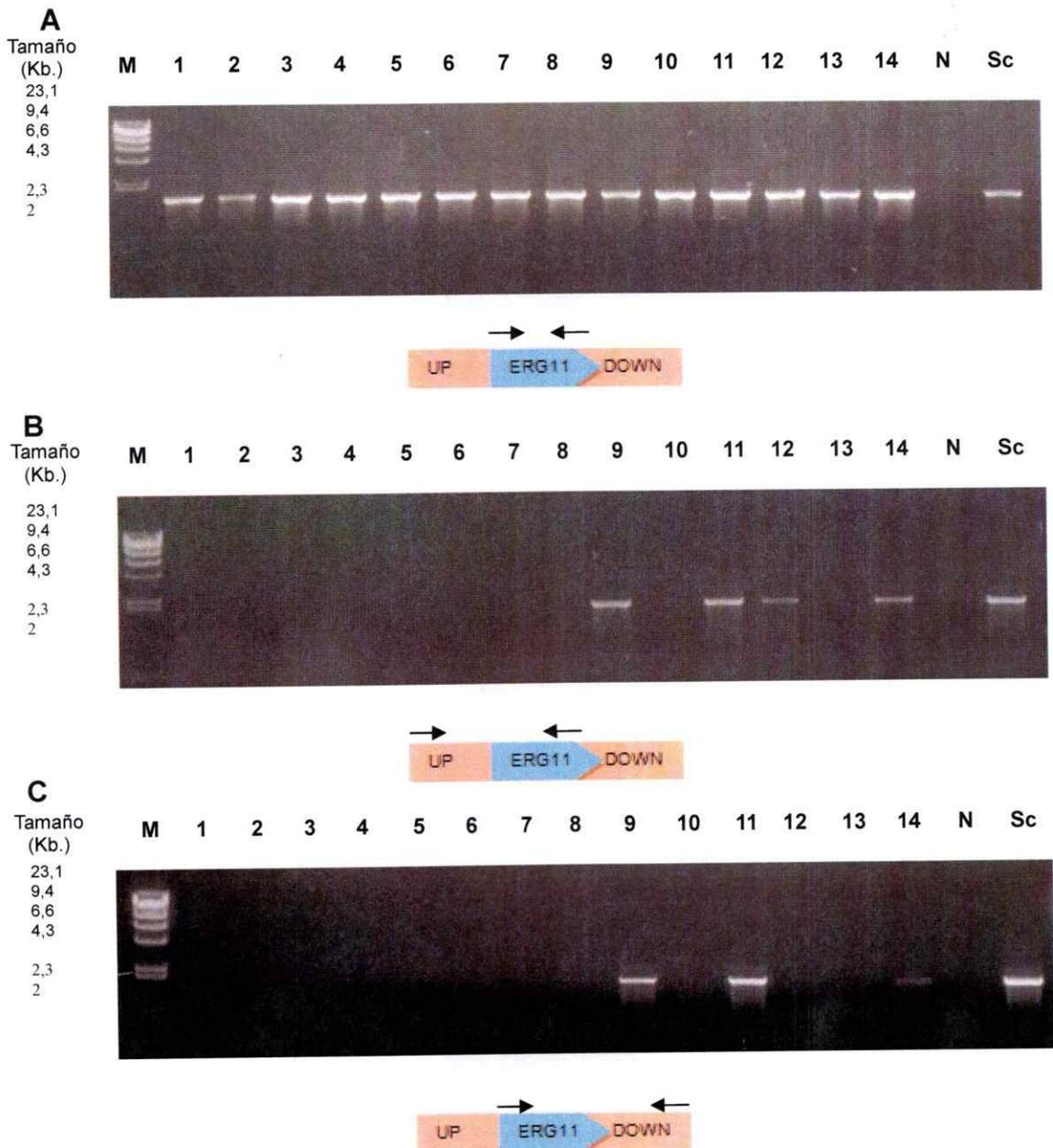
En consecuencia, los clones 2 y 3 se seleccionaron para realizar el proceso de esporulación con la finalidad de obtener la cepa haploide para estudiar la funcionalidad del gen *CYP51* mediante complementación heteróloga en *S. cerevisiae*.

La esporulación de los clones transformantes seleccionados de *S. cerevisiae* con YEpNP-gERG11 y YEpNP-cCYP51 se confirmó por la observación de ascosporas mediante microscopía óptica. Luego, las ascas resultantes se rompieron y se incubó en placas de medio mínimo suplementadas con uracilo, histidina, lisina, metionina y G418. Bajo estas condiciones, solo crecen aquellas cepas que tienen al vector (*LEU2*) y la mutación del gen de interés (resistencia a G418). Sin embargo, dentro de las cepas resistentes a G418, hay cepas haploides y diploides (heterocigotas del marcador *kanMX* y gen de interés), por lo que se deben seleccionar las cepas haploides auxótrofas para lisina y/o metionina (ambos marcadores heterocigotos en la cepa original). Así, las colonias seleccionadas se siembran por triplicado en placas de medio mínimo suplementadas con G418 y los metabolitos: i) uracilo/histidina/lisina, ii) uracilo/histidina/metionina y iii) uracilo/histidina/metionina/lisina, para seleccionar aquellas colonias que crezcan en placas suplementadas con los cuatro metabolitos mencionados, pero no cuando se omite lisina o metionina.

En específico, para la obtención de la línea haploide de *S. cerevisiae* transformante YEpNP-gERG11, se sembraron por triplicado 133 clones derivados del proceso de ruptura de ascas en placas de medio mínimo suplementadas con G418 y los metabolitos de selección señalados anteriormente. De los 133 clones, 44 presentaron crecimiento diferencial en las placas de selección por auxotrofia para metionina y/o lisina, dentro de los cuales 8 mostraron doble auxotrofia. De esta manera, se seleccionaron los 8 clones con doble auxotrofia y 6 clones al azar para extraer DNA total y evaluar mediante PCR estándar la pérdida del alelo

correspondiente al gen *ERG11* de *S. cerevisiae*. Para ello se utilizaron las siguientes parejas de partidores gERG11.F y ERG11.R, CYP51ScExt.F y ERG11.R, y gERG11.F y CYP51ScExt.R, que permiten seleccionar las líneas haploides deseadas (Figura 16). De los clones estudiados se encontró que 10 (clones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 y 13) corresponden a la línea haploide control de *S. cerevisiae* YEpNP-gERG11 ya que a partir de su DNA sólo se amplificó el gen *ERG11* inserto en el vector (Figura 18 A), pero no la versión cromosómica de dicho gen (Figura 18 B y C). Entre ellos se seleccionó el clon 4 para los siguientes experimentos como cepa control, esta cepa se denominó *S. cerevisiae* hERG11.

Con respecto a la obtención de la línea haploide de *S. cerevisiae* transformante YEpNP-cCYP51 se seleccionaron 185 clones derivados del proceso de esporulación y ruptura de asca que presentaron crecimiento diferencial en las placas de selección por auxotrofia para metionina y/o lisina. Se extrajo el DNA total a todos los clones seleccionados para evaluar por PCR la ausencia del gen *ERG11* de *S. cerevisiae*

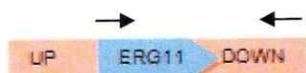
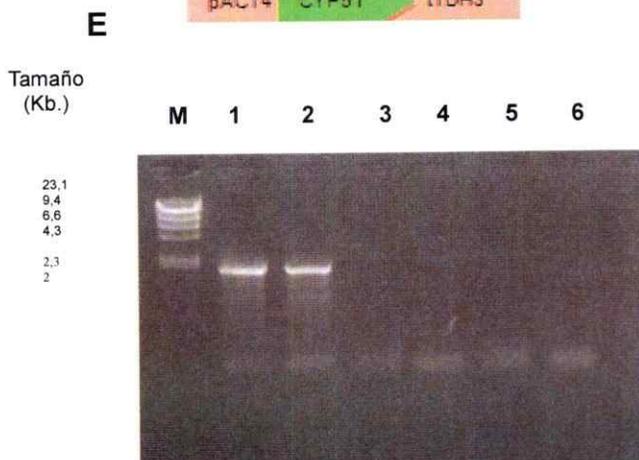
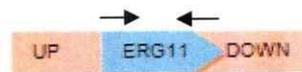
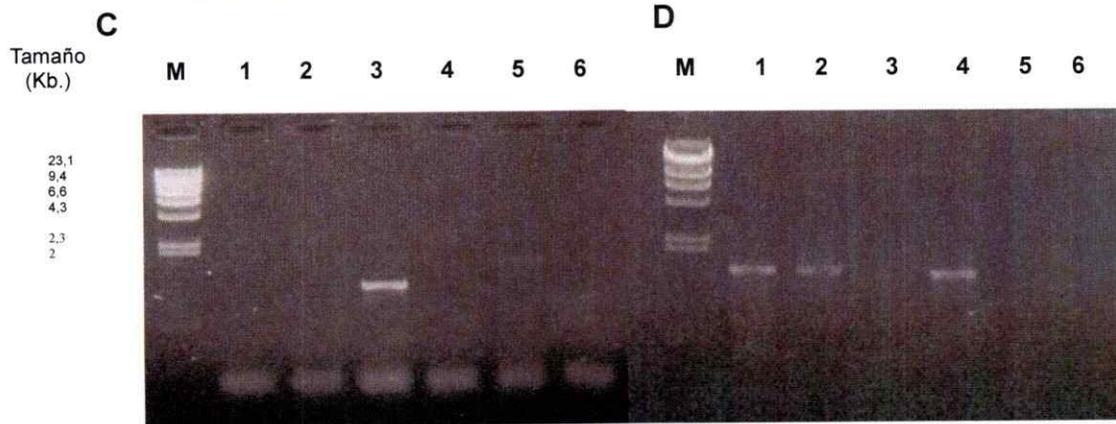
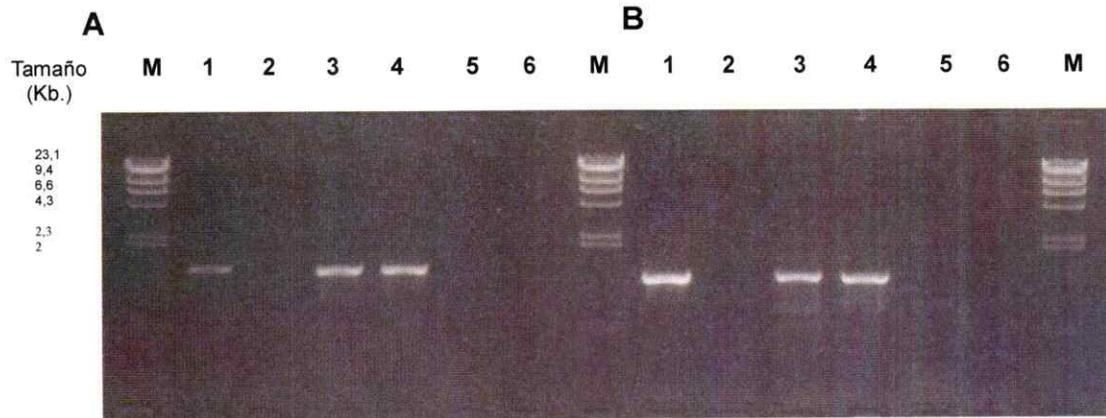


**Figura 18.- Resultado de PCR de clones haploides de *S. cerevisiae* transformados con el vector YEpNP-gERG11.** Los partidores empleados en las reacciones de PCR fueron los siguientes: gERG11.F y ERG11.R (Panel A), CYP51ScExt.Fy ERG11.R (Panel B) y gERG11.F y CYP51ScExt.R (Panel C). Carril M: marcador de peso molecular Lambda/ Hind III. Carril 1-14: DNA de clones de *S. cerevisiae* transformantes con YEpNP-gERG11 post esporulación, Carril N: control negativo, sin DNA. Carril Sc: DNA *S. cerevisiae* cepa S288c. Abajo de cada panel se muestra un esquema representativo de los módulos de expresión, donde se indica por flechas los sitios de unión de partidores. Las regiones UP y DOWN corresponden a regiones de 300 pb ubicadas río arriba y río abajo del gen *ERG11* en el genoma de *S. cerevisiae*, respectivamente.

utilizando las siguientes parejas de partidores: CYP51ScExt.F y KanMX4.R2, KanMX4.F2 y CYP51ScExt.R, ambas parejas permiten amplificar el módulo *kanMX* que confiere resistencia a geneticina (G418), el cual reemplaza al gen *ERG11* de *S. cerevisiae* en la cepa parental Meyen ex E.C. Hansen, RTCYP51.F y CYP51.Rb que permiten amplificar el gen *CYP51* de *X. dendrorhous*, gERG11.F y ERG11.R que permiten amplificar el gen *ERG11* de *S. cerevisiae*, y gERG11.F y CYP51ScExt.R que permiten amplificar la versión cromosómica del gen *ERG11* de *S. cerevisiae*.

A partir de este análisis, se encontró que el clon 49 efectivamente contiene el gen *CYP51* de *X. dendrorhous* y no contiene el gen *ERG11* de *S. cerevisiae*, lo que permite estudiar la funcionalidad de dicho gen por complementación heteróloga. Esta cepa se denominó *S. cerevisiae* hCYP51. En la Figura 19 se resume el análisis de las cepas *S. cerevisiae* hERG11 y *S. cerevisiae* hCYP51 que confirma la haploidía y características genéticas de ambas cepas. A partir del DNA de las líneas haploides de *S. cerevisiae* transformantes YEpNP-gERG11 y YEpNP-cCYP51 y la cepa parental Meyen ex E.C. Hansen, se amplificó el fragmento correspondiente al módulo de resistencia de geneticina más una región externa río arriba del módulo de 300 pb mostrando una banda de alrededor de 1,1 kb (con los partidores CYP51ScExt.F y KanMX4.R2, Figura 19 A). De la misma forma, a partir del DNA de estas cepas se amplificó un fragmento correspondiente al módulo de resistencia de geneticina más una región externa río abajo del módulo de 300 pb mostrando una banda de alrededor de 1 kb (partidores KanMX4.F2 y CYP51ScExt.R, Figura 19 B). Por otro lado, se amplificó una banda de 1,6 kb (partidores CYP51.Fd y CYP51\_Rb, Figura 19 C) solo desde el DNA de la cepa hCYP51 de *S. cerevisiae* correspondiente al cDNA del gen *CYP51* y con los mismos partidores, se amplificó una banda de alrededor de 2 kb al utilizar el DNA genómico de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous*, ya que ésta

posee la versión el gen *CYP51* que contiene intrones. Sólo desde el DNA de las cepas de *S. cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen, S288c, y hERG11 de *S. cerevisiae*, se amplificó un fragmento de alrededor de 1,6 kb (partidores gERG11.F y ERG11.R, Figura 19 D) correspondiente al gen *ERG11* de *S. cerevisiae* (sin discriminar si este está en un cromosoma o en el vector). Por último, sólo a partir del DNA de las cepas de *S. cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen y S288c se amplificó un fragmento de 2 kb (partidores gERG11.F y CYP51ScExt.R) correspondiente al locus *ERG11* en el genoma de *S. cerevisiae* (Figura 19 E). Estos resultados permitieron confirmar la haploidía de las cepas transformantes hERG11 y hCYP51 de *S. cerevisiae* (al menos para el locus *ERG11*).



**Figura 19.- Resultado de PCR de clones haploides de *S. cerevisiae* transformados con los vectores YEpNP-gERG11 y YEpNP-cCYP51.** Los partidores empleados en las reacciones de PCR fueron los siguientes: CYP51ScExt.F y KanMX4.R2 (Panel A), KanMX4.F2 y CYP51ScExt.R (Panel B), RTCYP51.F y CYP51.Rb (Panel C), gERG11.F y ERG11.R (Panel D), y gERG11.F y CYP51ScExt.R (Panel E). Carril M: marcador de peso molecular Lambda/ Hind III. Carril 1: DNA *S. cerevisiae* cepa parental Meyen ex E.C. Hansen, Carril 2: DNA *S. cerevisiae* cepa S288c, Carril 3: DNA clon haploide de *S. cerevisiae* transformante YEpNP-cCYP51, Carril 4: DNA clon haploide de *S. cerevisiae* transformante YEpNP-gERG11, Carril 5: DNA *X. dendrorhous* cepa UCD 67-385, Carril 6: control negativo, sin DNA. Abajo de cada panel se muestra un esquema representativo de los módulos de expresión, donde se indica por flechas los sitios de unión de partidores. Las regiones UP y DOWN corresponden a regiones de 300 pb ubicadas río arriba y río abajo del gen *ERG11* de *S. cerevisiae*, respectivamente. La región KanMX4 corresponde al módulo *kanMX* que confiere resistencia a geneticina (G418), la región pACT4 corresponde al promotor pACT4 y la región tTDH3 corresponde al terminador tTDH3, ambos de *S. cerevisiae*.

### 3.2.2 Curva de Crecimiento y producción de esteroides en el tiempo.

Para evaluar si los módulos de expresión en los vectores YEpNP-cCYP51 y YEpNP-ERG11 tienen algún efecto sobre el crecimiento de las cepas *S. cerevisiae* hCYP51 y *S. cerevisiae* hERG11, se construyeron curvas de crecimiento de éstas cepas en comparación con la cepa parental de *S. cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen cultivadas en medio YM con agitación constante a 22°C.

En la Figura 20 se ilustran las tres curvas de crecimiento y se observa que las cepas transformantes *S. cerevisiae* hCYP51 y hERG11 no presentan diferencias significativas en su crecimiento, sin embargo estas cepas alcanzaron con un 95% de confianza una  $DO_{600}$  promedio menor en un 14% y 11%, respectivamente, que la cepa *S. cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen al final del tiempo analizado, indicando que la expresión de los módulos estudiados altera la producción de biomasa.

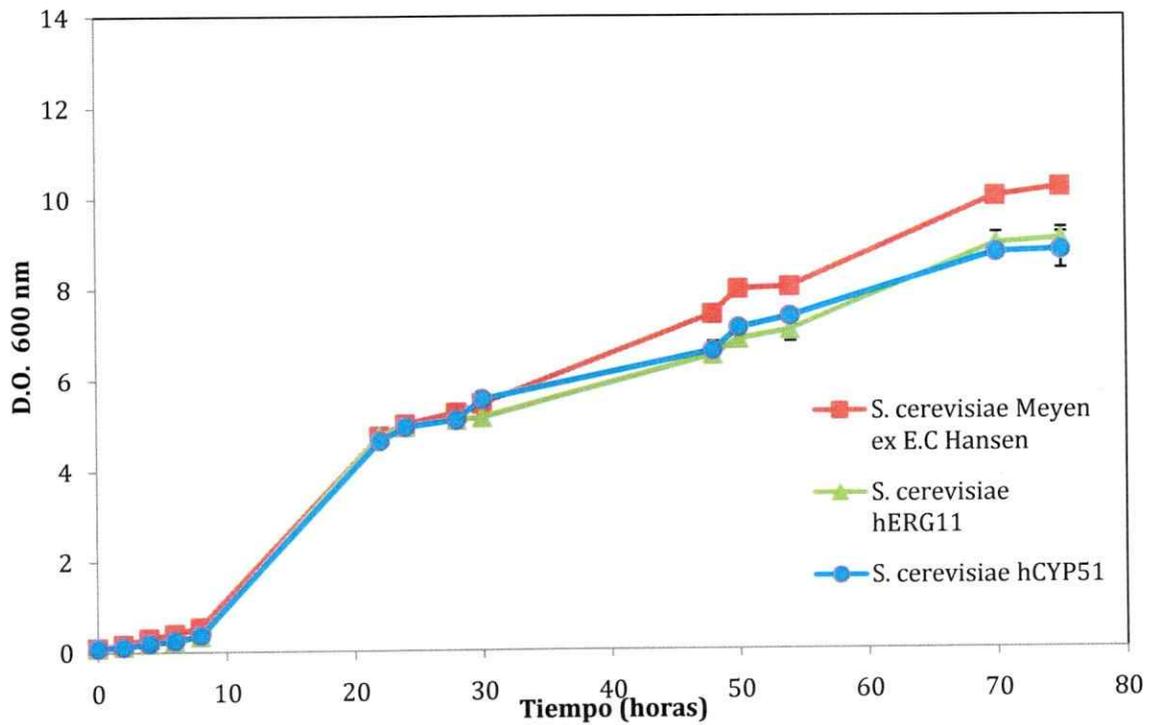


Figura 20.- Curva de crecimiento a 22°C de cepas transformantes de *S. cerevisiae* en medio YM. Verde: cepa *S. cerevisiae* hERG11, Azul: cepa *S. cerevisiae* hCYP51, Rojo: cepa parental *S. cerevisiae* Meyen ex E.C Hansen. Cada punto representa el promedio de tres cultivos independientes y su desviación estándar se indica mediante barras verticales.

Paralelamente, se evaluó la producción y composición de esteroides a lo largo de la curva de crecimiento por RP-HPLC. Para ello se tomaron muestras de 15 ml de cultivo en diferentes tiempos, las cuales se dividieron en fracciones de 3 ml para medir biomasa como peso seco, por triplicado, y 10 ml para extracción y análisis de esteroides.

La Figura 21 muestra un cromatograma representativo obtenido a partir de los esteroides extraídos desde las cepas *S. cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen, *S. cerevisiae* hERG11 y *S. cerevisiae* hCYP51. En las diferentes cepas se observó un pico predominante (pico 1) en el canal de 280 nm aproximadamente a los 13 min con las características espectrales de ergosterol en el espectro de absorción UV cuya identidad fue confirmada mediante co-inyección con una muestra de ergosterol estándar. Por otro lado, en la cepa parental y en las cepas transformantes además se observó la acumulación de otros esteroides, denominados picos 2 y 3, los cuales se encontraron en proporciones 1% y 7%, 1% y 15%, y 1% y 10% en las cepas Meyen ex E.C. Hansen, hERG11 y hCYP51 de *S. cerevisiae*, respectivamente.

Los esteroides totales obtenidos en las diferentes cepas se muestran en la Tabla 4. En general, en comparación con la cepa parental (*S. cerevisiae* ERG11<sup>+/</sup>) y la cepa haploide control (*S. cerevisiae* hERG11), la cepa *S. cerevisiae* hCYP51 presenta un contenido total de esteroides menor. Además, se observa que la producción de esteroides disminuye en las tres cepas a las 24 h de cultivo, luego de lo cual se observa un aumento importante a las 56 h de cultivo, en especial en la cepa *S. cerevisiae* hERG11. De hecho, los análisis estadísticos realizados permiten afirmar que la cantidad promedio de esteroides totales después de 56 h de cultivo de la cepa *S. cerevisiae* hERG11 es mayor que en la cepa parental y en la cepa la *S. cerevisiae* hCYP51 con un 95% de confianza.

**Tabla 4.- Composición de esteroides en el tiempo de la cepa parental *S. cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen, y cepas transformantes *S. cerevisiae* hERG11 y *S. cerevisiae* hCYP51 de acuerdo a sus perfiles de RP-HPLC (mg/g peso seco de levadura).**

	Cepas								
	<i>S. cerevisiae</i> Meyen ex E.C. Hansen			<i>S. cerevisiae</i> hERG11			<i>S. cerevisiae</i> hCYP51		
Tiempo de Cultivo (h)	10	24	56	10	24	56	10	24	56
Ergosterol*	22,59±4,65	10,11±1,01	19,51±2,27	16,78±2,17	15,05±4,26	34,33±6,42	16,06±2,79	8,90±3,17	17,81±1,61
Pico 2**	ND	0,03±0,02	0,21±0,26	ND	0,06±0,02	0,47±0,41	ND	0,02±0	0,21±0,04
Pico 3***	2,62±0,99	0,74±0,12	1,45±0,03	3,83±1,47	1,51±0,41	3,13±0,41	2,44±0,59	0,68±0,06	1,59±0,09
Esteroides totales	25,21±5,41	10,89±1,16	21,17±2,53	20,60±7,89	16,62±4,69	37,93±6,99	18,50±3,38	9,60±1,04	19,61±1,75

La tabla muestra los valores promedios ± la desviación estándar de tres experimentos independientes.  
 Tiempo retención: \*:11 min \*\*: 12,5 min y \*\*\*: 15 min. ND: no detectado en RP-HPLC.

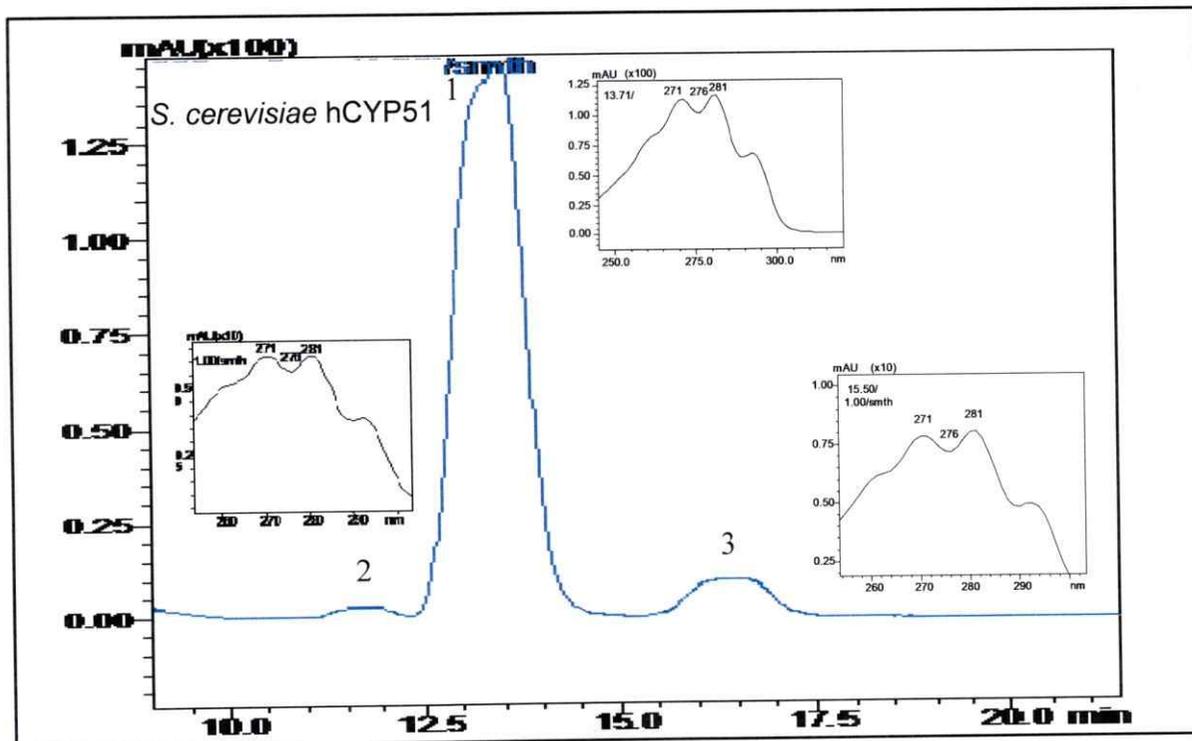


Figura 21.- Análisis de esteroides por RP-HPLC representativo de la cepa *S. cerevisiae* Meyen ex E.C Hansen y cepas transformante *S. cerevisiae* hERG11 y *S. cerevisiae* hCYP51. El cromatograma (a 280 nm) corresponde a los esteroides extraídos a partir de la cepa transformante *S. cerevisiae* hCYP51 como se describe en la sección Materiales y Métodos. Al lado de cada pico (picos N° 1 a 3), se incluyeron los espectros de absorción UV correspondientes. El ergosterol corresponde al pico n°1.

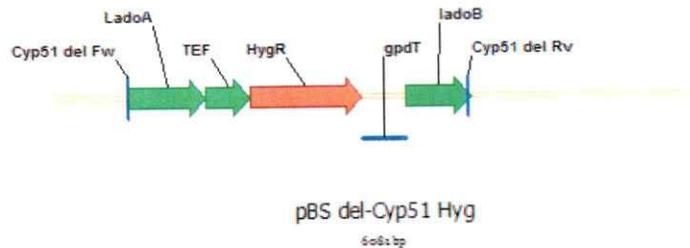
### 3.3 Análisis de mutantes de *cyp51* de *X. dendrorhous* en cuanto a su crecimiento y producción de ergosterol y carotenoides.

#### 3.3.1 Obtención de cepa mutante *cyp51* de *X. dendrorhous*.

Previo a la transformación, los fragmentos de DNA correspondientes a la región de 0,7 kb río arriba del codón de inicio del gen *CYP51* de *X. dendrorhous* (lado A) y 0,6 kb río abajo del codón de término de dicho gen (lado B), se amplificaron por PCR usando *Pfu* DNA polimerasa desde DNA genómico de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* (Tabla 1) con los partidores *CYP51\_del.Fw* y *CYP51\_del-HpaI.Rv*, y *CYP51\_del-HpaI.Fw* y *CYP51\_del.Rv*, respectivamente. Los partidores utilizados permiten generar extremos complementarios entre ambos fragmentos. De esta manera, los productos de PCR se purificaron desde gel de agarosa y posteriormente se unieron por PCR de elongación (OE-PCR). Finalmente, el fragmento de DNA obtenido se amplificó a través de una reacción de PCR estándar con *Pfu* DNA polimerasa, utilizando la mezcla de reacción del OE-PCR como DNA molde. El fragmento obtenido se ligó al vector pBS digerido previamente con la endonucleasa de restricción *EcoRV* para posteriormente transformar células electrocompetentes de *E. coli* seleccionando a los transformantes en placas LB suplementadas con ampicilina.

A continuación, se purificó el DNA plasmídico de un clon transformante y de acuerdo al diseño de partidores utilizados para unir las regiones río arriba y río abajo del locus *CYP51*, se incluyó un sitio de restricción *HpaI* que permitió insertar el módulo de resistencia a higromicina B (Niklitschek, 2007). De esta manera se obtuvo el vector pBS\_del\_CYP51\_Hyg (Figura 22). Posteriormente se digirió dicho vector con las endonucleasas de restricción *NofI* y *XhoI* para liberar el módulo de resistencia a

higromicina B integrado entre las regiones homólogas río arriba y río abajo del gen *CYP51* de *X. dendrorhous* para luego transformar células electrocompetentes de la levadura seleccionando a los transformantes en placas YM suplementadas con higromicina B.

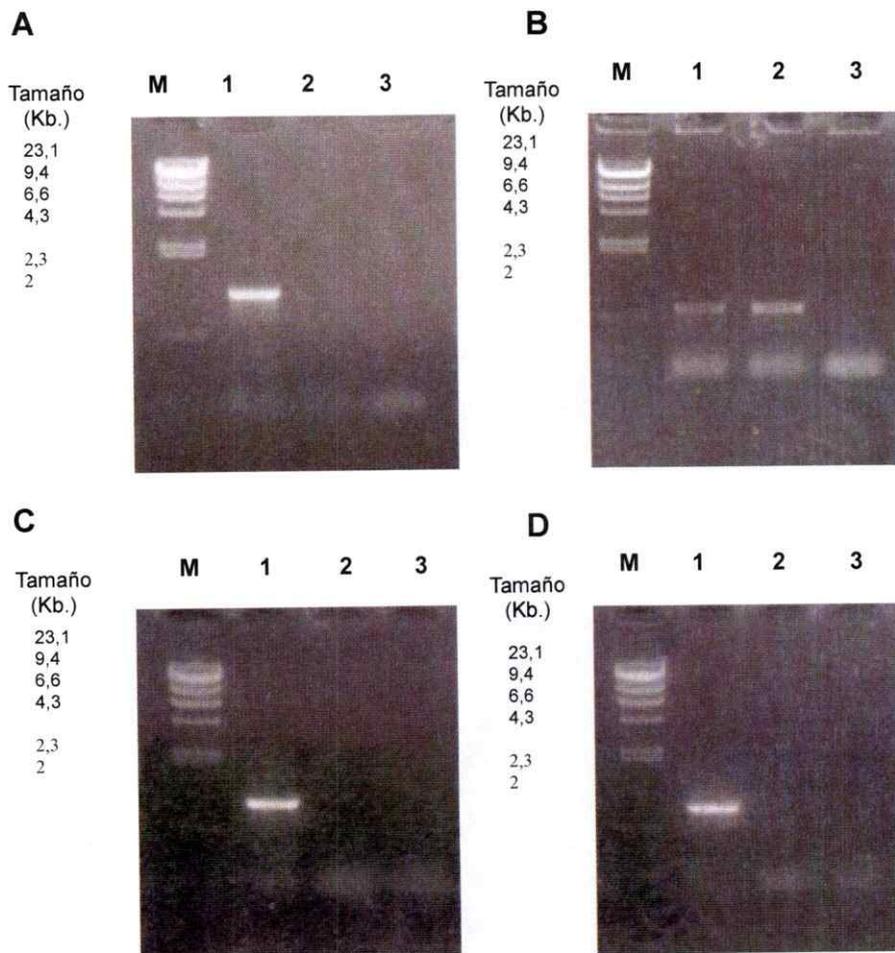


**Figura 22.- Estructura del módulo para la escisión del gen *CYP51* de *X. dendrorhous*.** En flechas verdes se ilustran los fragmentos de DNA correspondientes a la región de 0,7 kb río arriba del codón de inicio del gen *CYP51* de *X. dendrorhous* (lado A) y 0,6 kb río abajo del codón de término del gen *CYP51* de *X. dendrorhous* (lado B), y el módulo de resistencia al antibiótico higromicina B (HygR), compuesto por el gen *hph*, bajo el promotor *TEF* y el terminador *gpd* de *X. dendrorhous*.

De esta manera, se obtuvo 1 transformante de *X. dendrorhous* y se le extrajo el DNA total para verificar por PCR la presencia del módulo de resistencia a higromicina B en el *locus CYP51* utilizando diferentes combinaciones de partidores. Como se puede observar en la Figura 23, sólo desde el DNA del clon transformante se amplificó un fragmento correspondiente al gen *hph* de *E. coli* mostrando una banda de 1kb (partidores H.F y H.R). De igual forma se observa que sólo a partir de este clon se amplificó fragmentos correspondientes a la región río arriba del codón de inicio del gen *CYP51* de *X. dendrorhous* (lado A) unida al promotor *TEF* del módulo de resistencia a higromicina B dando una banda de 0,7 kb (partidores PRE\_CYP51\_del.F y TEF\_Xd\_antisense.R) y la región río abajo del codón de término del gen *CYP51* de *X. dendrorhous* (lado B) unida al terminador *gpd* del módulo de resistencia a higromicina B dando una banda de 0,7 kb (partidores GPD\_Xd\_sense.F y Post\_CYP51\_del.R). Por

lo tanto, se confirmó la integración del módulo de resistencia a higromicina B en el *locus CYP51* de *X. dendrorhous*.

Pese a que el nivel de ploidía de la cepa CBS 6938 de *X. dendrorhous* es desconocido, estudios previos basados en experimentos de mutagénesis al azar y transformación de genes carotenogénicos han resuelto que esta variedad es aneuploide (Loto y col., 2012, Alcaíno y col., 2008), por lo que es necesario un análisis genotípico basado en PCR para determinar la escisión de un gen específico. De esta manera en la Figura 23 B, se observa que desde el DNA del clon transformante y de la cepa silvestre CBS 6938 se amplifica un fragmento de DNA correspondiente al gen *CYP51* de *X. dendrorhous* dando una banda de alrededor de 0,6 kb (partidores *CYP51up.F* y *CYP51.Rd*), por lo tanto se concluye que el módulo de resistencia a higromicina B sólo reemplazó uno de los alelos del gen *CYP51* de *X. dendrorhous*. Así, el clon transformante obtenido probablemente corresponde a una cepa mutante heterocigota para el gen *CYP51* de *X. dendrorhous*, la cual se denominó *X. dendrorhous* CBS-CYP51+/-.

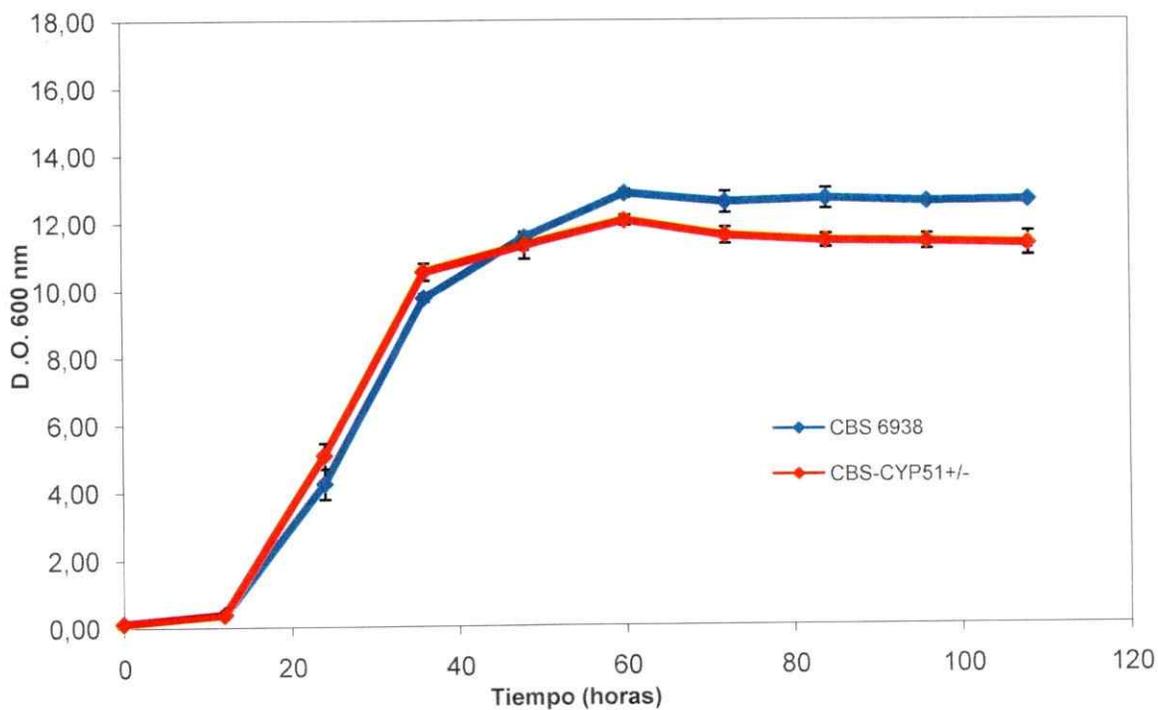


**Figura 23.- Resultado de PCR de cepa mutante de *X. dendrorhous* CBS-CYP51+/-.** Los partidores empleados en las reacciones de PCR fueron los siguientes: H.F y H.R que amplifican el gen *hph* de *E. coli* (Panel A), CYP51up.F y CYP51.Rd que amplifican el gen *CYP51* de *X. dendrorhous* Panel B), PRE\_CYP51\_del.F y TEF\_Xd\_antisense.R que amplifican la región río arriba del codón de inicio del gen *CYP51* de *X. dendrorhous* unida al promotor *TEF* del módulo de resistencia a higromicina B (Panel C), y GPD\_Xd\_sense.F y Post\_CYP51\_del.R que amplifican la región río abajo del codón de término del gen *CYP51* de *X. dendrorhous* (lado B) unida al terminador *gpd* del módulo de resistencia a higromicina B (Panel D). Carril M: marcador de peso molecular Lambda/ Hind III. Carril 1: DNA de cepa mutante de *X. dendrorhous* CBS-CYP51+/-, Carril 2: DNA de *X. dendrorhous* CBS-6938, Carril 3: control negativo, sin DNA.

### 3.3.2 Curva de crecimiento.

Posteriormente, para evaluar si la escisión de uno de los alelos del gen *CYP51* en la cepa mutante CBS-*CYP51*(+/-) de *X. dendrorhous* tiene algún efecto sobre el crecimiento de ésta, se confeccionaron curvas de crecimiento de la cepa heterocigota CBS-*CYP51*(+/-) y de la cepa silvestre CBS 6938 de *X. dendrorhous* cultivadas en medio YM con agitación constante a 22°C.

En la Figura 24 se ilustran las dos curvas de crecimiento y se observa que el crecimiento de ambas cepas no presenta diferencias significativas en los primeros tiempos. Sin embargo, en fase estacionaria puede afirmarse con un 95% de confianza que la cepa mutante CBS-*CYP51*(+/-) alcanza una  $DO_{600}$  promedio menor en un 10% que la cepa silvestre, indicando que la escisión de una de las copias del gen *CYP51* afecta significativamente la biomasa alcanzada bajo las condiciones utilizadas.



**Figura 24.-** Curva de crecimiento a 22°C de cepas de *X. dendrorhous* en medio YM. Azul: cepa *X. dendrorhous* CBS 6938, Rojo: cepa *X. dendrorhous* CBS-CYP51+/- . Cada punto representa el promedio de tres cultivos independientes, y su desviación estándar se indica mediante barras verticales.

### 3.3.3 Producción de pigmentos y esteroides en el tiempo.

Paralelamente, se evaluó la producción de pigmentos y esteroides a lo largo de la curva de crecimiento de la cepa silvestre CBS 6938 y la cepa heterocigota CBS-CYP51+/- de *X. dendrorhous*. Para ello se tomaron muestras de 35 ml y 15 ml de cultivo de ambas cepas en diferentes tiempos de cultivo para extracción de pigmentos y esteroides, respectivamente.

Los pigmentos (carotenoides) totales obtenidos desde ambas cepas se muestran en la Tabla 5. En general, la cepa CBS-CYP51+/- de *X. dendrorhous* presenta una mayor producción de carotenoides que la cepa silvestre CBS 6938, de hecho puede afirmarse con una confianza del 95% que la cepa CBS-CYP51+/- produce alrededor de un 30% más de carotenoides totales que la cepa silvestre luego de 120 h de cultivo.

Como se ilustra en la Tabla 5, el principal carotenoide producido por ambas cepas es astaxantina. No obstante, se observa la producción de otros pigmentos en menor proporción en ambas cepas, entre ellos: fenicoxantina, cantaxantina, OH-ceto- $\gamma$ -caroteno, OH-ceto-toruleno, ceto- $\gamma$ -caroteno y OH-equinenona, cuyos niveles de producción varían de acuerdo al tiempo de crecimiento de la levadura. La producción de pigmentos de la cepa CBS-CYP51+/- y la cepa silvestre CBS 6938 aumenta en el tiempo, hasta alcanzar después de las 120 h de cultivo un valor de 398 y 302 ( $\mu\text{g/g}$  peso seco de levadura), respectivamente, lo que coincide con la fase estacionaria tardía de crecimiento de la levadura. Por otro lado, la composición de carotenoides producidos por ambas cepas también varía en el tiempo, particularmente a medida que aumenta el tiempo de cultivo la producción de carotenoides se diversifica ampliando la gama de compuestos sintetizados. Pese a lo anterior, no hay diferencias significativas entre los principales carotenoides producidos por ambas cepas en los diferentes

tiempos de cultivo, siendo estos astaxantina, fenicoxantina y cantaxantina. Sin embargo, cabe destacar que en fase estacionaria la cepa CBS-CYP51+/- produce significativamente una mayor cantidad de carotenoides derivados de  $\gamma$ -caroteno como OH-ceto- $\gamma$ -caroteno, OH-ceto-toruleno y ceto- $\gamma$ -caroteno, respecto a la cepa parental CBS 6938.

**Tabla 5.- Composición de carotenoides en el tiempo de la cepa silvestre CBS 6938 y cepa heterocigota CBS-CYP51+/- de *X. dendrorhous* ( $\mu\text{g/g}$  peso seco de levadura).**

Tiempo de Cultivo (h)	Cepas					
	CBS 6838		CBS-CYP51+/-		$\Delta$ 24 h	$\Delta$ 120 h
	24	120	24	120	(%)	(%)
Astaxantina	62,60 $\pm$ 5,19	200,12 $\pm$ 21,19	92,72 $\pm$ 11,19	229,10 $\pm$ 12,52	48%	15%
Fenicoxantina	26,81 $\pm$ 0,35	26,65 $\pm$ 2,73	27,76 $\pm$ 2,26	38,59 $\pm$ 1,47	4%	44%
Cantaxantina	18,60 $\pm$ 0,12	43,10 $\pm$ 4,24	17,05 $\pm$ 4,24	74,60 $\pm$ 6,41	-8%	73%
OH-ceto- $\gamma$ -caroteno	1,65 $\pm$ 0,27	9,10 $\pm$ 2,95	1,9 $\pm$ 0,95	37,93 $\pm$ 6,99	15%	317%
OH-ceto-toruleno	ND	ND	ND	15,59 $\pm$ 1,59	ND	Nuevo
ceto- $\gamma$ -caroteno	0,57 $\pm$ 0,24	2,47 $\pm$ 0,25	0,69 $\pm$ 0,25	8,40 $\pm$ 2,22	21%	240%
OH-equinenona	0,23 $\pm$ 0,15	5,55 $\pm$ 2,19	0,44 $\pm$ 0,19	10,53 $\pm$ 0,98	91%	90%
Equinenona	ND	5,99 $\pm$ 1,41	0,41 $\pm$ 0,07	8,90 $\pm$ 1,41	Nuevo	49%
Fitoeno	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Licopeno	ND	0,38 $\pm$ 0,02	ND	0,54 $\pm$ 0,09	ND	50%
$\gamma$ -caroteno	0,06 $\pm$ 0,09	0,55 $\pm$ 0,02	ND	0,01 $\pm$ 0,01	ND	-99%
$\beta$ -caroteno	ND	1,49 $\pm$ 0,92	ND	0,60 $\pm$ 0,39	ND	-60%
Carotenoides totales	154,66 $\pm$ 13,03	302,20 $\pm$ 31,52	164,66 $\pm$ 13,92	398,00 $\pm$ 50,59	7%	32%

La tabla muestra los valores promedios  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes. ND: no detectado en RP-HPLC.

$\Delta$ : Diferencia en la cantidad promedio de carotenoides entre la cepa mutante CBS-CYP51+/- y la cepa parental CBS 6838.

Por otro lado, los esteroides totales obtenidos desde la cepa silvestre CBS 6938 y la cepa CBS-CYP51+/- se muestran en la Tabla 6. En general se puede observar que en ambas cepas la producción de esteroides totales disminuye en el tiempo,

obteniéndose 60% y 31% menos de rendimiento de esteroides totales a las 120 h de cultivo en relación a lo obtenido a las 24 h de cultivo para la cepa silvestre y la cepa mutante, respectivamente. Como se puede observar, el principal esteroide producido por las diferentes cepas fue ergosterol. De igual forma, en el análisis de esteroides de la cepa silvestre CBS 6938 y la cepa mutante CBS-CYP51+/- se observa la producción de otros dos esteroides aunque en muy baja proporción, con tiempos de retención cercanos a los 11 min (pico 2) y 15 min (pico 3). Estos dos picos también poseen las características espectrales de los esteroides.

**Tabla 6.- Composición de esteroides en el tiempo de la cepa silvestre *X. dendrorhous* CBS 6938 y cepa CBS-CYP51+/- de acuerdo a sus perfiles de RP-HPLC (mg/g peso seco de levadura).**

Tiempo de Cultivo (h)	Cepas				$\Delta_{24\text{ h}}$	$\Delta_{120\text{ h}}$
	CBS 6938		CBS-CYP51+/-			
	24	120	24	120		
Ergosterol*	10,00±0,86	5,01±0,17	7,20±0,35	5,58±0,40	-28%	11%
Pico 2**	0,14±0,04	0,09±0,01	0,12±0,01	0,08±0,01	-14%	-
Pico 3***	0,09±0,05	0,01±0,01	0,03±0,01	0,01±0,00	-66%	-
Esteroides totales	13,33±2,36	5,38±0,39	8,54±0,69	5,92±0,28	-36%	10%

La tabla muestra los valores promedios  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes. Tiempo retención: \*:11 min \*\*: 12,5 min y \*\*\*: 15 min. ND: no detectado en RP-HPLC.  $\Delta$ : Diferencia en la cantidad promedio de esteroides entre la cepa mutante CBS-CYP51+/- y la cepa parental CBS 6838.

De acuerdo a los resultados estadísticos obtenidos, puede afirmarse con un 95% de confianza que la cepa silvestre CBS 6938 presenta un contenido total de esteroides mayor que la cepa CBS-CYP51+/- a las 24 h de cultivo, en específico se evidenció una disminución del rendimiento de esteroides totales de 36% en la cepa



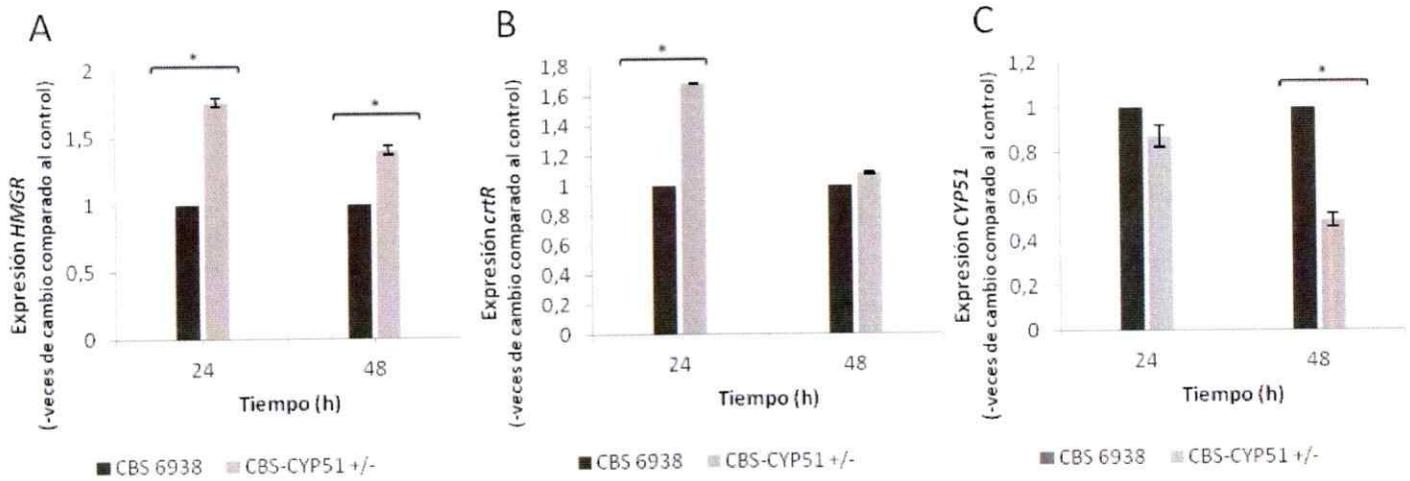
mutante respecto a la silvestre. Sin embargo, a las 120 h de cultivo, con un nivel de confianza del 95% los datos no apoyan la afirmación de que las cepas CBS 6938 y CBS-CYP51+/- producen diferentes niveles de esteroides totales, alcanzando ambas cepas alrededor de 6.000 µg esteroides totales/g peso seco de levadura.

### **3.4 Análisis de expresión de genes de la ruta del mevalonato, carotenogénicos y de la biosíntesis de ergosterol por RT-qPCR en mutantes de *cyp51* de *X. dendrorhous***

En forma paralela, se analizó la expresión de genes de la ruta del mevalonato, carotenogénicos y de la biosíntesis de ergosterol a lo largo de la curva de crecimiento de la cepa silvestre CBS 6938 y la cepa mutante CBS-CYP51+/- de *X. dendrorhous*. En específico, se cuantificó los niveles de mRNA de *HMGR*, *crtR* y *CYP51* por RT-qPCR para ambas cepas después de 24 y 48 h de cultivo. Los valores de Ct obtenidos se normalizaron respecto al valor del gen constitutivo beta-actina, *ACT* [Genbank: X89898.1] y luego se expresaron en función de las condiciones control usando el algoritmo  $\Delta\Delta Ct$  (Livak y Schmittgen, 2001).

Los resultados de análisis de expresión relativa de los genes *HMGR*, *crtR* y *CYP51* de ambas cepas se muestran en la Figura 25. En general, los patrones de expresión de los genes estudiados fueron diferentes entre la cepa mutante CBS-CYP51+/- y la cepa silvestre CBS 6938 de *X. dendrorhous*. De hecho puede afirmarse con una confianza del 95% que la cepa mutante CBS-CYP51+/- alcanza niveles de expresión de *HMGR* alrededor de 1,8 y 1,4 veces mayores, que la cepa silvestre luego de 24 y 48 h de cultivo, respectivamente. Asimismo, se puede afirmar con el mismo grado de confianza que la cepa mutante CBS-CYP51+/- alcanza un nivel de expresión de *crtR* alrededor de 1,6 veces mayor que la cepa silvestre luego de 24 h de cultivo; sin embargo, esta diferencia no se observa a las 48 h de cultivo. Por otro lado, se puede afirmar que la cepa mutante CBS-CYP51+/- alcanza un nivel de expresión de

*CYP51* alrededor de 0,5 veces menor, que la cepa silvestre luego de 48 h de cultivo, en contraste con lo anterior no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre ambas cepas a las 24 h de cultivo.



**Figura 25.-** Análisis de expresión de genes *HMGR*, *crtR* y *CYP51* en las cepas silvestre CBS 6938 y mutante CBS-CYP51+/- de *X. dendrorhous* por RT-qPCR. La expresión de los genes *HMGR* (A), *crtR* (B) y *CYP51* (C) se determinó por RT-qPCR normalizada por la expresión del gen de actina después de 24 y 48 h de cultivo. A su vez, los niveles de transcrito normalizados de cada gen, se normalizaron con los niveles respectivos en la cepa control (cepa silvestre). Negro: cepa silvestre CBS 6938 (= 1), Gris: cepa mutante CBS-CYP51+/- . Los valores representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes (\* $p \leq 0,05$ ; test T de Student).

## 4 Discusión

### 4.1 Clonación y análisis de secuencia del gen *CYP51* de *X. dendrorhous*

En este estudio se aisló y caracterizó el gen *CYP51* de *X. dendrorhous*, el cual posiblemente codifica un polipéptido de 550 aminoácidos que presenta un 48% de identidad y 65% de similitud con la 14- $\alpha$ -desmetilasa de esteroides de *S. cerevisiae* (ERG11): una enzima que pertenece a la familia de proteínas citocromo P450 y que está involucrada en la biosíntesis de ergosterol.

A partir del alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la potencial proteína *CYP51* de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* y la enzima ERG11 de la cepa S288c de *S. cerevisiae*, se determinó que sólo siete residuos aminoacídicos difieren entre ambos microorganismos en los cinco sitios de reconocimiento de sustrato descritos por Lepesheva y Waterman, 2004, lo cual da cuenta de la importancia de éstas regiones para la actividad enzimática de estas proteínas. Cabe destacar que pese a que las secuencias aminoacídicas de las proteínas de la familia de Citocromo P450s son extremadamente diversas, su plegamiento estructural se encuentra altamente conservado (Reichhart y Feyereisen, 2000). En particular *CYP51* es considerada como una enzima ancestral conservada estructural y funcionalmente que participa en la biosíntesis de ergosterol en membrana. De esta manera, en este trabajo fueron predichos varios elementos estructurales secundarios de Citocromo P450s en la proteína *CYP51* deducida de *X. dendrorhous*, esto incluyó 12 hélices alfa, 12 hojas beta y un bucle meandro  $\beta$  posiblemente involucrado en la estabilización de la estructura terciaria de la proteína. Además, en la proteína *CYP51* deducida se identificaron los tres residuos totalmente conservados en la familia de proteínas Citocromo P450: el ácido glutámico y la arginina en el motivo E-X-X-R en la hélice K y

la cisteína implicada en la unión del grupo hemo (Syed y Masehle, 2014). También, fue posible predecir una potencial región de transmembrana en el extremo amino terminal de la proteína CYP51 deducida, lo cual permitiría anclar esta proteína a la membrana del retículo endoplásmico lo que es característico en las CYPs de clase II (van den Brink y col., 1998). En conjunto, estas observaciones sugieren que el gen *CYP51* de *X. dendrohous* identificado codifica la enzima citocromo P450 CYP51 o lanosterol desmetilasa.

Posteriormente, mediante modelamiento por homología se predijo la estructura tridimensional de la proteína CYP51 deducida de *X. dendrohous*, utilizando como molde la proteína ERG11 de *S. cerevisiae* con lanosterol como ligando (Monk y col., 2014, código de modelo: 4lxj.1). A continuación, el alineamiento de estructura tridimensional entre el modelo de la proteína CYP51 deducida y su respectivo molde permitió realizar la superposición estructural de ambas proteínas, mostrando una alta analogía estructural entre la enzima ERG11 de *S. cerevisiae* y la proteína CYP51 deducida de *X. dendrohous*; lo que es esperable pues ambas proteínas pertenecen a la superfamilia de enzimas Citocromo P450 que se caracterizan porque su estructura secundaria y terciaria se ha mantenido a lo largo de la evolución (Reichhart y Feyereisen, 2000). Por otro lado, mediante la técnica de *docking* proteína-ligando se predijo los sitios de unión de los potenciales ligandos lanosterol e itraconazol en la proteína CYP51 deducida de *X. dendrohous* y se evaluó su disposición espacial. Cabe destacar que de acuerdo a los resultados obtenidos, itraconazol se uniría de forma similar a lanosterol al bolsillo hidrofóbico de la proteína mediante interacciones con los residuos Met-315 y el grupo P-metilo de Thr-322, interacciones reportadas en estudios previos como sitios de unión de antifúngicos azólicos a proteínas CYP51 (Sharma y Bathia, 2011). Además, se observó que ambos ligandos se unirían en los sitios de

reconocimiento de sustrato de las enzimas P450 (Lepesheva y Waterman, 2004), lo cual permitió comprobar que la unión del azólico itraconazol a la proteína CYP51 se produciría en el *pocket* de unión de sustrato de la enzima y por ende bloquearía su actividad catalítica impidiendo la síntesis de ergosterol, reproduciendo el mecanismo de acción de esta familia de compuestos antifúngicos azólicos (Warrilow y col. 2013).

En consecuencia, estas últimas observaciones apoyan la hipótesis de que la proteína CYP51 deducida de *X. dendrorhous* corresponde a una enzima Citocromo P450 que participa en la ruta de biosíntesis de ergosterol.

#### **4.2 Análisis de funcionalidad del gen CYP51 de *X. dendrorhous*.**

La funcionalidad del gen *CYP51* de *X. dendrorhous* se evaluó mediante dos vías: i) complementación heteróloga en *S. cerevisiae* y ii) mutación génica en *X. dendrorhous*.

Para la complementación heteróloga en *S. cerevisiae*, se utilizó la cepa Meyen ex E.C Hansen YHR007C BY4743 (*S. cerevisiae erg11<sup>+/−</sup>*), que es diploide y heterocigota para el gen *ERG11* de *S. cerevisiae*. El gen *ERG11* de *S. cerevisiae* y el cDNA del gen *CYP51* de *X. dendrorhous* fueron clonados en el vector de expresión YEpNP de *S. cerevisiae* para transformar la cepa *S. cerevisiae erg11<sup>+/−</sup>*. De esta manera se obtuvieron las cepas diploides: *S. cerevisiae* cCYP51 y *S. cerevisiae* gERG11, a partir de las cuales luego del proceso de esporulación y selección de líneas haploides se obtuvieron las cepas para los estudios de expresión heteróloga *S. cerevisiae* hERG11 y *S. cerevisiae* hCYP51, respectivamente.

La complementación génica se evaluó mediante análisis fenotípico de las cepas haploides transformantes a través de construcción de curvas de crecimiento y análisis de producción de esteroides. La curva de crecimiento se hizo en medio YM a

22°C, temperatura cercana al óptimo de crecimiento de la cepa parental *S. cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen y, temperatura óptima de crecimiento de *X. dendrorhous* (Melillo, 1983), considerando que se está estudiando la expresión del gen *CYP51* de *X. dendrorhous*. De esta manera se encontró que la expresión de los módulos estudiados afecta el crecimiento de las cepas haploides en relación a su parental diploide, lo que podría estar relacionado con una variación en la distribución de flujos metabólicos debido a la expresión constitutiva de los módulos de expresión estudiados en vectores de alto número de copias limitando la tasa de crecimiento de la levadura.

En cuanto a la producción de esteroides de las cepas haploides hERG11 y hCYP51, y de la cepa parental diploide Meyen ex E.C Hansen de *S. cerevisiae*, se encontró que las tres cepas contienen la misma composición de esteroides, siendo el ergosterol el esteroide mayoritario (92%). Sin embargo, la cepa hERG11 mostró un mayor contenido de esteroides totales a las 56 horas de cultivo, aproximadamente el doble que las otras dos cepas. Esto posiblemente se debe al mayor número de copias de este gen integrado en un vector y que además está regulado por un promotor fuerte y constitutivo. Por lo tanto es de esperar que el nivel de producción de esteroides alcanzado por la cepa que expresa el módulo con el gen endógeno sea mayor que la cepa parental y que al de la cepa hCYP51, pues esta cepa expresa un gen heterólogo y por ende la funcionalidad del producto génico posiblemente no sea equivalente a la enzima nativa de *S. cerevisiae*.

Ahora bien, pese a que la cepa hCYP51 mostró un menor contenido de esteroides que las cepas parental diploide y hERG11 de *S. cerevisiae* en todos los tiempos analizados (Tabla 4), el sólo hecho de que la cepa hCYP51 sea viable y capaz de producir ergosterol indica que el gen *CYP51* de *X. dendrorhous* complementa la mutación *erg11* de *S. cerevisiae*, puesto que las mutantes *erg11* de *S. cerevisiae* no

son viables (Winzeler y col., 1999). En consecuencia, estos resultados permiten concluir que efectivamente el gen *CYP51* de *X. dendrorhous* codifica una 14- $\alpha$  desmetilasa de esteroides.

Por otra parte, se obtuvieron mutantes *cyp51<sup>-</sup>* de *X. dendrorhous* por recombinación homóloga del *locus CYP51* con un módulo de resistencia a antibiótico (Alcaíno y col., 2014). En específico, se obtuvo un mutante de *X. dendrorhous* para el gen *CYP51* que posiblemente es heterocigoto, pues al reemplazar dicho gen por un módulo que confiere resistencia a higromicina B, aun se detectó mediante PCR un alelo *CYP51*. Sin embargo, este resultado era de esperar ya que estudios previos de mutación al azar y transformación genética de la cepa parental utilizada (CBS 6938), sugieren que esta cepa sería aneuploide (Loto y col., 2012, Alcaíno y col., 2008). Además, probablemente la obtención de un mutante homocigoto del gen *CYP51* no es posible, ya que en otras levaduras se ha demostrado que su mutación es letal (Winzeler y col., 1999, Lepesheva y Waterman, 2007). Sin embargo, la cepa obtenida igualmente es útil para estudiar la funcionalidad del gen *CYP51* de *X. dendrorhous* en cuanto a crecimiento y producción de esteroides y pigmentos en relación a su parental, ya que el carecer de uno de los alelos podría presentar un efecto de dosis génica como ha sido reportado en estudios previos de cepas heterocigotas de *X. dendrorhous* para algunos genes, entre ellos *crTE*, *FPS* (Alcaíno y col., 2014) y *crTR* (Alcaíno y col., 2008), las cuales han mostrado variaciones fenotípicas respecto a su parental.

Se realizaron curvas de crecimiento en triplicado de la cepa silvestre CBS 6938 y CBS-*CYP51<sup>+/+</sup>* de *X. dendrorhous*, a 22°C en medio YM con agitación constante y se tomaron muestras luego de 24 y 120 h de cultivo para extraer carotenoides y esteroides. En cuanto al crecimiento, se encontró que la escisión de uno de los alelos del gen *CYP51* afecta el crecimiento de la levadura pues, en fase estacionaria, la cepa

mutante CBS-CYP51(+/-) alcanzó una menor  $DO_{600}$  que la cepa silvestre lo cual podría relacionarse a una variación en la distribución de flujos metabólicos limitando la tasa de crecimiento de la levadura. Adicionalmente, al evaluar la producción de esteroides en la cepa silvestre y mutante, se encontró que el contenido de esteroides en ambas cepas varió en el tiempo, mostrando una menor cantidad en la fase estacionaria de cultivo y, asimismo, ambas cepas tienen la misma composición de esteroides siendo el ergosterol el principal. Sin embargo, la cepa mutante presentó un 36% menos de esteroides totales respecto a la cepa silvestre a las 24 h de cultivo, lo cual se debe principalmente a una baja en ergosterol (Tabla 6). Este resultado muestra que la escisión de uno de los alelos del gen CYP51 de *X. dendrorhous* afecta la producción de ergosterol en esta levadura, de lo cual se infiere que la enzima CYP51 codificada por dicho gen participa en la biosíntesis de ergosterol en *X. dendrorhous*. Si bien a las 120 h de cultivo no se observó una diferencia significativa en el contenido de esteroides totales entre ambas cepas, esto podría explicarse por un mecanismo de regulación de la producción de esteroides de acuerdo al estado metabólico de la levadura, reduciendo su biosíntesis hasta un nivel basal en la fase estacionaria de crecimiento. De esta manera, este efecto regulatorio estaría presente tanto en la cepa mutante como en la cepa silvestre modificando la producciones de esteroides totales en base al estadio de crecimiento celular. De manera similar, estudios previos han reportado en levaduras y hongos filamentosos una disminución de la tasa de formación de ergosterol en fase estacionaria de crecimiento (Zil y col., 1988; Loto y col., 2012)

Además de las alteraciones en el contenido y composición de esteroides, la cepa mutante CBS-CYP51(+/-) de *X. dendrorhous* exhibió un fenotipo de color diferente a simple vista respecto a la cepa silvestre de la cual deriva. Efectivamente los análisis de carotenoides revelaron que la cepa mutante produce más carotenoides totales que la

cepa silvestre (Tabla 5), demostrando que la escisión de uno de los alelos del gen *CYP51* de *X. dendrorhous* afecta la biosíntesis de carotenoides. La mayor diferencia se observó a las 120 h de cultivo (fase estacionaria tardía), donde la cepa mutante CBS-CYP51+/- produce alrededor de un 30% más carotenoides totales que la cepa silvestre, principalmente debido a un aumento en la producción de astaxantina. Estudios previos del proceso de carotenogénesis han mostrado que los niveles máximos de expresión de los genes carotenogénicos se alcanzan al final de la etapa exponencial y al inicio de la fase estacionaria de crecimiento de *X. dendrorhous*, coincidiendo con la inducción de la carotenogénesis. Por lo tanto, se espera que las mayores diferencias en el contenido de carotenoides se observen una vez que se ha inducido la carotenogénesis (Loto y col., 2012). De forma similar a estos resultados, otros estudios han demostrado un incremento en la producción de astaxantina en *Phaffia rhodozyma* (estado anamórfico de *X. dendrorhous*) cuando los niveles de ergosterol están reducidos por tratamiento con el agente azólico fluconazol (Miao y col., 2011). Una posible explicación para el incremento de carotenoides en la cepa mutante CBS-CYP51+/- podría ser un aumento en la disponibilidad de precursores de carotenoides en condiciones de disminución de la regulación de realimentación negativa de ergosterol. Este razonamiento se apoya en un estudio previo de mutantes *cyp61* de *X. dendrorhous* en el cual se determinó que el ergosterol regularía la expresión del gen *HMGR* por un mecanismo de retroalimentación negativa y de esta manera contribuye a la regulación de la biosíntesis de carotenoides (Loto y cols., 2012). En ese sentido, otros estudios han mostrado que la suplementación de cultivos de *Phaffia rhodozyma* con MVA (compuesto sintetizado por la enzima HMGR), resulta en un incremento en la producción de carotenoides (Calo y cols, 1995). Asimismo, la delección del gen que codifica la escualeno sintasa (*ERG9*) en combinación con la

sobreexpresión del dominio catalítico de HMGR en una cepa recombinante de *C. utilis* productora de carotenoides produjo un incremento de la biosíntesis de licopeno (Shimada y cols., 1998). Por estos motivos se evaluó la expresión del gen *HMGR* además de los genes *crtR* y *CYP51*, que codifican enzimas involucradas en la vía de síntesis de ergosterol, mediante RT-qPCR en la cepa mutante CBS-*CYP51*(+/-) y en la cepa silvestre de *X. dendrorhous* después de 24 y 48 h de cultivo. Cabe destacar que el gen *crtR* también participa en la síntesis de astaxantina ya que codifica una citocromo P450 reductasa.

En primer lugar, los análisis revelaron que la cepa mutante alcanza niveles mayores del transcrito *HMGR*, en todos los tiempos analizados que la cepa silvestre, indicando que la escisión de uno de los alelos del gen *CYP51* de *X. dendrorhous* afecta la expresión de *HMGR*, siendo este uno de los principales pasos regulatorios para la biosíntesis de carotenoides y ergosterol (Parks y Casey, 1995). De esta manera el incremento en la expresión de *HMGR* podría explicar en parte el aumento en el contenido de carotenoides en la cepa mutante CBS-*CYP51*(+/-). De forma similar a estos resultados, otros estudios han demostrado un incremento de los niveles de transcrito de *HMGR* y del contenido de carotenoides en el hongo *Blaskelea tripora* al tratarlo con ketoconazol, que es un inhibidor específico de *CYP51* (Tang y col., 2008). Asimismo, otros estudios realizados en *S. cerevisiae*, que posee dos isogenes que codifican para HMG-CoA reductasa, *HMG1* y *HMG2*, han demostrado que la expresión de *HMG1* es controlada a nivel transcripcional por ergosterol (Veen y Lang, 2004). Además, se ha observado que la sobreexpresión de *HMG1* combinada con el tratamiento con ketoconazol incrementó la producción de  $\beta$ -caroteno en una cepa recombinante de *S. cerevisiae* (Yan y col., 2012). Por otro lado, estudios previos realizados en *X. dendrorhous* han revelado un incremento en los niveles de transcrito

de *HMGR* y del contenido de carotenoides en mutantes *cyp61*, gen que codifica también para una citocromo P450 involucrada en la biosíntesis de ergosterol (Loto y col., 2012).

En segundo lugar, los análisis de expresión también revelaron que la cepa mutante alcanza un mayor nivel de transcritos del gen *crtR* después de 24 h de cultivo que la cepa silvestre. Por lo tanto, la escisión de uno de los alelos del gen *CYP51* de *X. dendrorhous* afecta la expresión de *crtR*, que codifica una citocromo P450 reductasa (CPR) que actúa como donador de electrones para la biosíntesis de carotenoides y de ergosterol. Sin embargo, respecto a la biosíntesis de astaxantina, el gen *crtR* es esencial, no así para la biosíntesis de ergosterol (Gutierrez, 2014). De acuerdo a los resultados, el incremento en la expresión de *crtR* podría explicar el aumento en el contenido de astaxantina en la cepa mutante CBS-*CYP51(+/-)*.

Es importante señalar que pese a que en un organismo pueden existir varios genes que codifican diferentes enzimas citocromo P450, generalmente hay sólo un gen que codifica la enzima citocromo P450 reductasa. Por lo tanto, es necesario un complejo mecanismo de regulación de la expresión de *crtR* para ajustar los niveles de actividad citocromo P450 reductasa en relación a las diversas proteínas citocromo P450 existentes. De hecho, estudios previos han mostrado diferencias entre los patrones de expresión del gen *crtR* y el resto de los genes carotenogénicos, posiblemente debido a la existencia de un mecanismo regulatorio de la expresión de *crtR* diferente dado que CPR se encuentra involucrado en otras vías metabólicas de levaduras (Alcaíno y col., 2008). De esta forma, la citocromo P450 reductasa codificada por el gen *crtR* estaría actuando como *partner* redox de enzimas citocromo P450 de las vías de síntesis de carotenoides y ergosterol, de manera que éstas compiten por la transferencia de electrones, en este sentido la deficiencia de uno de

los alelos *CYP51*, y por consiguiente la posible disminución de la enzima *CYP51* que participa en la biosíntesis de ergosterol permitiría un incremento en el flujo de electrones mediado por CPR hacia la producción de carotenoides.

Por otro lado, en relación a la utilización de precursores comunes en las vías de síntesis de carotenoides y ergosterol, el aumento en la expresión de *crtR* en la cepa mutante CBS-*CYP51*(+/-) y del contenido de carotenoides, estaría relacionado a un incremento en la utilización de farnesil pirofosfato para la biosíntesis de carotenoides en desmedro de la producción de ergosterol. De forma similar estudios previos han mostrado que en cepas de *S. cerevisiae* recombinantes que producen altos niveles de licopeno por expresión de genes carotenogénicos, el nivel de ergosterol se correlacionó de forma inversa al contenido de licopeno, sugiriendo que las vías de síntesis de ergosterol y licopeno compiten por el uso de farnesil pirofosfato (Bahieldin y col., 2014).

Por último, los análisis de expresión revelaron que efectivamente la cepa mutante CBS-*CYP51*(+/-) alcanza un menor nivel de transcritos *CYP51*, en todos los tiempos de cultivo analizados, cercano a un 50% que en la cepa silvestre. Lo anterior confirma que la escisión de uno de los alelos del gen *CYP51* de *X. dendrorhous* conlleva una disminución en el nivel de expresión de este gen en la levadura, lo que a su vez estaría relacionado con la reducción del contenido de esteroides totales en la cepa mutante, que a su vez se relaciona con una mayor producción de carotenoides.

## 5 CONCLUSIONES

- Los análisis bioinformáticos realizados sobre el gen *CYP51* identificado surgieron que éste codificaría una proteína Citocromo P450 de 550 aminoácidos con peso molecular de aproximadamente 61,8 kDa, ya que contiene todos los motivos conservados y características estructurales de una proteína Citocromo P450.
- El gen *CYP51* de *X. dendrorhous* complementa la mutación *erg11* en *S. cerevisiae*, por lo tanto este gen efectivamente codifica una 14- $\alpha$  desmetilasa de esteroides.
- La mutación *CYP51* en *X. dendrorhous* afectó la síntesis de ergosterol sugiriendo su participación en la biosíntesis de esteroides. Por otro lado, al igual que en otros trabajos, se observó una relación entre una disminución de ergosterol con un aumento de carotenoides en *X. dendrorhous*, apoyando la hipótesis de que ergosterol regula la síntesis de carotenoides en esta levadura. Probablemente este sería por un mecanismo de *feedback* negativo donde el ergosterol participaría en la regulación del gen *HMGR*, principal punto de regulación de la vía del Mevalonato (MVA) y de esta manera contribuiría a la regulación de la biosíntesis de carotenoides. Similarmente, el ergosterol estaría involucrado en la regulación del gen *crtR*, lo que también contribuye en la regulación de la síntesis de carotenoides.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

- Alcaíno, J. y col. 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. y col. 2014. Functional Characterization of the *Xanthophyllomyces dendrorhous* Farnesyl Pyrophosphate Synthase and Geranylgeranyl Pyrophosphate Synthase encoding genes that are involved in the synthesis of Isoprenoid Precursors. *PLoS ONE* 9(5): e96626.
- An, G. H. y col. 1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl Environ Microbiol.* 55:116-124.
- Alcazar, F. L. y Mellado, E. 2013. Ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: its relevance as an antifungal target and role in antifungal drug resistance. *Front Microbiol.* 3(439):1-6.
- Aoyama, Y. y col. 1984. Yeast cytochrome P-450 catalyzing lanosterol 14 $\alpha$ -demethylation. II. Lanosterol metabolism by purified P-450<sub>14DM</sub> and by intact microsomes. *J. Biol. Chem.* 259:1661-1666.
- Aoyama, Y. 2005. Recent progress in the CYP51 research focusing on its unique evolutionary and functional characteristics as a Diversozyme P450. *Frontiers in Bioscience* 10:1546-1557.
- Arai, S. y col. 1987. Pigmentation of juvenile coho salmon with carotenoid oil extracted from Antarctic krill. *Aquaculture* 66(2-3): 255-264.
- Arthington-Skaggs, B. A. y col. 1996. Positive and negative regulation of a sterol biosynthetic gene (*ERG3*) in the post-squalene portion of the yeast ergosterol pathway. *FEBS Letters* 392:161-165.
- Baeza, M. y col. 2009. Isolation, characterization and long term preservation of mutant strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *J. Basic Microbiol.* 49:135-141.
- Bahieldin, A. y col. 2014. Efficient production of lycopene in *Saccharomyces cerevisiae* by expression of synthetic *crt* genes from a plasmid harboring the ADH2 promoter. *Plasmid* 72:18-28.
- Basson, M. E. y col. 1986. *Saccharomyces cerevisiae* contains two functional genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Proc Natl Acad Sci.* 83:5563-5567.
- BCC Research, Global Carotenoids Market To Reach \$1.4 Billion In 2018, 2011. [http://www.bccresearch.com/pressroom/fod/global-carotenoids-market-reach-\\$1.4-billion-2018](http://www.bccresearch.com/pressroom/fod/global-carotenoids-market-reach-$1.4-billion-2018) [Consulta: jueves, 27 de Noviembre de 2014].
- Boyle, J. y Lew, A. 1995. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends in genetics* 11(1):8.
- Cresnar, B. y Petric, S. 2011. Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. *Biochim. Biophys. Acta* 1814(1):29-35.
- De Montellano, P. R. O. (Ed.) 2005. *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*. Springer.
- Disch, A. y Rohmer, M. 1998. On the absence of the glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate pathway for isoprenoid biosynthesis in fungi and yeasts. *FEMS Microbiology Letters* 168:201-208.
- Espenshade, P. J. y Hughes A. L. 2007. Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 41:401-427.
- Fuente, J. L. y col. 2010. High-titer production of astaxanthin by the semi-industrial

- fermentation of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. J. Biotechnol. 148:144–146.
- Gassel, S. y col. 2013. Multiple improvement of astaxanthin biosynthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous* by a combination of conventional mutagenesis and metabolic pathway engineering. Biotechnol. Lett. 35:565–569.
- Goldstein, J. L. y Brown, M. S. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. Nature 343(6257):425-430.
- Gutierrez, M. S. 2014. Estudio de posibles donadores de electrones alternativos en sistemas P450 de la levadura carotenogénica *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Seminario de título para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Higuchi, R. y col. 1988. A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. Nucleic Acids Res. 16(15):7351-7367.
- Higuera-Ciapara, I. y col. 2006. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 46:185-196.
- Hofmann, K. y Stoffel, W. 1993. TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374,166.
- Holland, H. 1999. When did the Earth's atmosphere become oxic? A Reply. Newsletter of The Geochemical Society 100:20-22.
- Humphrey, W. y col. 1996. VMD: Visual Molecular Dynamics. J. Mol. Graphics 14:33-38.
- Johnson, E. A. y Gil-Hwan, A. 1991. Astaxanthin from a microbial sources. Crit. Rev. Biotechnol. 11:297-326.
- Kajiwara, S. y col. 1997. Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. Biochem. J. 324:421-426.
- Kalb, V. F. y col. 1987. Primary structure of the P450 lanosterol demethylase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. DNA 6(6):529-537.
- Kelly, S. L. y Kelly, D. E. 2013. Microbial Cytochromes P450: biodiversity and biotechnology Where do cytochromes P450 come from, what do they do and what can they do for us? Phil. Trans. R. Soc. B. 368(1612):1-18.
- Kim, I. G. y col. 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(5): 1947–1949.
- Kozlowski, L. P. 2007-2013 Isoelectric Point Calculator. <http://isoelectric.ovh.org>
- Kumar, S. 2010. Engineering Cytochrome P450 Biocatalysts for Biotechnology, Medicine, and Bioremediation. Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol. 6(2): 115–131.
- Lee, P. y Schmidt-Dannert, C. 2002. Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. Appl. Microbiol. Biot. 60(1-2):1-11.
- Lepesheva, G. y Waterman, M. 2007. Sterol 14-alpha-Demethylase Cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all Biological Kingdoms. Biochim. Biophys. Acta 1770(3): 467–477.
- Lepesheva, G. y col. 2008. CYP51: A Major Drug Target in the Cytochrome P450 Superfamily. Lipids 43(12): 1117–1125.
- Lepesheva, G. y Waterman, M. 2011. Structural basis for conservation in the CYP51 family. Biochim. Biophys. Acta 1814(1): 88–93.
- Loto, I. y col. 2012. Enhancement of carotenoid production by disrupting the C22-sterol desaturase gene (*CYP61*) in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. BMC

- Microbiology 12(235):1-16.
- Lui, Y. S. y Wu, J. Y. 2007. Perfusion culture process plus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulation for efficient astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Biotechnol. Bioeng. 97(3):568-573.
- Marcoleta, A. y col., 2011. Glucose and ethanol-dependent transcriptional regulation of the astaxanthin biosynthesis pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. BMC Microbiology 11:190.
- Melillo, E. 1983. *Xanthophyllomyces dendrorhous* as a Platform Organism for the Production of Terpenes. Tesis para obtener el grado de Doctor en Matemáticas y Ciencias Naturales. Facultad de Matemática y Ciencias Naturales, Universidad de Groningen, Holanda.
- Merkulov, S. y col. 2000. Cloning and characterization of the *Yarrowia lipolytica* squalene synthase (*SQS1*) gene and functional complementation of the *Saccharomyces cerevisiae* *erg9* mutation. Yeast 16:197-206.
- Miao, L. y col. 2011. Astaxanthin biosynthesis is enhanced by high carotenogenic gene expression and decrease of fatty acids and ergosterol in a *Phaffia rhodozyma* mutant strain. FEMS Yeast Res. 11:192-201.
- Miller, M. W. y col. 1976. *Phaffia*, a new yeast genus in the Deuteromycotina (Blastomycetes). Int. J. Syst. Micr. 26:286-291.
- Miziorko, H. 2011. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. Arch. Biochem. Biophys. 505(2):131-143.
- Morris, G. M. y col. 2009. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. J. Comput. Chem. 16: 2785-2791.
- Nakao, R. y col. 2010. Effect of dietary astaxanthin at different stages of mammary tumor initiation in BALB/c mice. Anticancer Res. 30(6):2171-2175.
- Nelson, D. R y col. 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. Pharmacogenetics 6(1):1-42.
- Niklitschek, M. 2007. Desarrollo de un cassette de Resistencia a antibiótico en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular, Universidad de Chile.
- Omura, T. 1999. Forty Years of Cytochrome P450. BBRC 266(3):690-698.
- Parks, L. W. y Casey, W. M. 1995. Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. Annu Rev Microbiol 49:95-116.
- Pashkow, F. J. y col. 2008. Astaxanthin: a novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. Am. J. Cardiol. 101:58-68.
- Quain, D. E. y Haslam, J. M. 1982. Yeast 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase: an Enzyme Committed to Catabolite Derepression Before Exhaustion of Fermentable Substrate. J. Gen. Microbiol. 128:2653-2660.
- Ranga, A. y col. 2014. Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications. Mar Drugs 12(1): 128-152.
- Reichhart, D. W. y Feyereisen, R. 2000. Cytochromes P450: a success story. Genome Biology 1(6):3003.1-3003.9.
- Rodríguez-Concepción, M. y Boronat, A. 2002. Elucidation of the Methylerythritol Phosphate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria and Plastids. A Metabolic Milestone Achieved through Genomics. Plant Physiol. 130:1079-1089.
- Romero, I. 2010. Participación del gen farnesil pirofosfato sintasa (*FPS*) en la biosíntesis de astaxantina en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Seminario de título para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de

- Ciencias, Universidad de Chile.
- Sánchez-Torres, P. y col. 1998. Heterologous expression of a *Candida molischiana* anthocyanin- $\alpha$ -glucosidase in a Wine Yeast Strain. *J. Agric. Food Chem.* 46:354:360.
- Sambrook, J. y Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor, Nueva York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schmidt, I. y col. 2011. Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma*/*Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl. Microbiol. Biot.* 89(3):555-571.
- Shyadehi, A. y col. 1996. The mechanism of the acyl-carbon bond cleavage reaction catalyzed by recombinant sterol 14  $\alpha$ -demethylase of *Candida albicans* (other names are: lanosterol 14  $\alpha$ -demethylase, P-45014DM, and CYP51. *J. Biol. Chem.* 271:12445-12450.
- Sippl, M. J. y Wiederstein, M. 2008. A note on difficult structure alignment problems. *Bioinformatics* 24(3):426-7.
- Sirim, D. y col. 2009. The cytochrome P450 engineering database: integration of biochemical properties. *BMC Biochem.* 10:27.
- Stachowiak, B. 2013. Efficiency of selected mutagens in generating *Xanthophyllomyces dendrorhous* strains hyperproducing astaxanthin. *Polish J. Microbiol.* 62(1): 67-72.
- Syed, K. y Mashele, S. 2014. Comparative analysis of p450 signature motifs EXXR and CXG in the large and diverse kingdom of fungi: identification of evolutionarily conserved amino acid patterns characteristic of P450 family.
- Tang, Q. y col. 2008. Effects of an ergosterol synthesis inhibitor on gene transcription of terpenoid biosynthesis in *Blakeslea trispora*. *Curr. Microbiol.* 57:527-531.
- Torrissen, O. y col. 1989. Pigmentation of Salmonids - Carotenoid Deposition and Metabolism. *Aquat. Sci.* 1(2):1-17.
- Van den Brink, H. M. y col. 1998. Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 23:1-17.
- Veen, M. y Lang, C. 2004. Production of lipid compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 63:635-646.
- Veen, M. y col. 2003. Combined overexpression of genes of the ergosterol biosynthetic pathway leads to accumulation of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 4:87-95.
- Verdoes, J. y col. 2003. Metabolic Engineering of the Carotenoid Biosynthetic Pathway in the Yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Appl. Environ. Microb.* 69(7): 3728-3738.
- Warrilow, A. y col. 2008. Expression and Characterization of CYP51, the Ancient Sterol 14-demethylase Activity for Cytochromes P450 (CYP), in the White-Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Lipids* 43:1143-1153.
- Warrilow, A. y col. 2013. Azole Affinity of Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase (CYP51) Enzymes from *Candida albicans* and *Homo sapiens*. *Antimicrob. Agents Ch.* 57(3): 1352-1360.
- Waterman, M. y Lepesheva, G. 2005. Sterol 14  $\alpha$ -demethylase, an abundant and essential mixed function oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 338:418-422.
- Sali, A. y col. 2008. Protein structure modeling with MODELLER. *Methods Mol. Biol.* 426:145-159.

- Sharma, V. y Bhatia, R. 2012. Triazoles in Antifungal Therapy: A Review. J. Pharm. Biomed, Sci. 2:2229- 3701.
- Yan, G. y col. 2012. Enhancement of  $\beta$ -carotene production by overexpression of HMG-CoA reductase coupled with addition of ergosterol biosynthesis inhibitors in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Microbiol. 64:1-5.
- Yoshida, Y. 1992. Sterol biosynthesis. Cytochrome P450. Ed.n°2, 93-101.
- Zill, G. y col. 1988. Determination of ergosterol as a measure of fungal growth using Si 60 HPLC. Z. Lebensm. Unters. Forsch. ;187(3):246-249.