

VCH - FC
Biotec
G 883



C-1



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO

883

“Estudio de posibles donadores de electrones alternativos en sistemas P450 de la levadura carotenogénica *Xanthophyllomyces dendrorhous*”

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

MARÍA SOLEDAD GUTIÉRREZ GUTIÉRREZ

Directora de Seminario de Título:

Dra. Jennifer Alcaíno Gorman

Co- Directores de Seminario de Título:

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán

Dra. María Cecilia Rojas



Agosto de 2014

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 la **Srta. María Soledad Gutiérrez Gutiérrez**

“Estudio de posibles donadores de electrones alternativos en sistemas P450 de la levadura carotenogénica *Xanthophyllomyces dendrorhous*”

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

Director Seminario de Título

Dra. Jennifer Alcaíno Gorman

Co-Directores

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán

Dra. María Cecilia Rojas

Comisión de Evaluación

Dr. Ricardo Cabrera
Presidente Comisión

Dra. Claudia Stange
Prof. Evaluadora

Cuatro firmas manuscritas en tinta azul, cada una sobre una línea horizontal. Las firmas corresponden a: Jennifer Alcaíno Gorman, Víctor Cifuentes Guzmán, María Cecilia Rojas, y Ricardo Cabrera. La última firma, la de Claudia Stange, está parcialmente oculta por la línea de la firma anterior.

Santiago de Chile, 22 de Agosto del 2014.

BIOGRAFÍA



Nací un jueves 17 de Abril de 1986 en Concepción, integrándome a mi familia como el *conchito*, la cual estaba formada por mi padre Ociel, mi mamá Irma y mis hermanos Alfredo y Ociel. Junto a mis hermanos nos criamos en el pueblo de Monte Aguila e inicie mis estudios en la escuela básica Orlando Vera (ex Liceo A-71). Posteriormente, los estudios de enseñanza media los realice en la ciudad de Concepción, decisión que mis padres tomaron en busca de una mejor formación académica, por lo cual debí internarme en el Liceo de Niñas de ésta ciudad, momentos de grandes cambios que me otorgaron la capacidad de mirar más allá con el fin de desarrollarme tanto a nivel educacional como personal. Luego, me vine a Santiago para entrar a estudiar Bachillerato en Ciencias en la Universidad de Chile, mi indecisión en la carrera que quería seguir me llevo a la Facultad de Ingeniería, es allí donde me di cuenta que lo que me gustaba era la ciencia y sus laboratorios. Es por esto que ingrese a Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Facultad de Ciencias. Durante el desarrollo de diferentes cursos a lo largo de la carrera mi interés por la ciencia incrementó, esto me motivo a ingresar al Laboratorio de Genética de la facultad, y es aquí donde reafirmó mi vocación científica y decido entrar al Doctorado en Ciencias mención Microbiología, en el cual me encuentro actualmente cursando el segundo año.

DEDICATORIA

A mi papá... en donde estés mi viejito,

A mi mamá,

Y a mis hermanos Alfredo y Janito

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Víctor Cifuentes por permitirme formar parte del Laboratorio de Genética, a la Dra. Jennifer Alcaíno, la Jenny, por su gran apoyo y confianza tanto en el ámbito académico y personal. Además agradezco a todos los integrantes del laboratorio por la buena disposición siempre a ayudar y aclarar dudas en el trabajo.

Además agradezco a la comisión evaluadora de mi seminario de título, al Dr. Ricardo Cabrera y Dra. Claudia Stange, por las observaciones y evaluación del trabajo.

Finalmente, agradezco a mi familia por su infinito apoyo y amor. Y a mis bellos amigos por formar parte de mi vida.

Financiamiento: Proyecto Fondecyt 11121200 y Universidad de Chile.

INDICE DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Sistemas P450.....	1
1.2 <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	7
1.3 Síntesis de astaxantina en <i>X. dendrorhous</i> Participación de un sistema citocromo P450.....	9
1.4 Hipótesis y objetivos.....	13
2 MATERIALES Y MÉTODOS	14
2.1 Cepas y condiciones de cultivo.....	14
2.10 Análisis bioinformático.....	22
2.2. Determinación del crecimiento celular y biomasa.....	15
2.3 Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	16
2.4 RT - qPCR.....	17
2.5 Extracción de carotenoides totales de <i>X. dendrorhous</i> y análisis mediante RP-HPLC.	18
2.6 Extracción de esteroides totales de <i>X. dendrorhous</i> y análisis mediante RP-HPLC. ..	19
2.7 Obtención de la fracción microsomal con proteínas activas.....	20
2.8 Ensayo enzimático (actividad citocromo c reductasa).....	21
2.9 Determinación de la concentración de proteínas.....	21
3 RESULTADOS.....	23
3.1.1 Producción de carotenoides.....	24
3.1.2 Producción de esteroides.....	26
3.1.3 Crecimiento en medio de cultivo sólido con ácido benzoico.....	29
3.2 Identificación en el genoma de <i>X. dendrorhous</i> y caracterización de los posibles genes <i>CBR</i> y <i>CYB5</i> que codifican donadores de electrones alternativos a <i>CrtR</i>	30
3.3 Implementación y optimización de la metodología para la obtención de la fracción microsomal con proteínas activas de <i>X. dendrorhous</i>	36
3.4 Determinación de la expresión a nivel de transcrito de los genes <i>CBR</i> , <i>CYB5</i> , <i>NRI</i> y <i>crtR</i> , y actividad citocromo c reductasa a lo largo de la curva de crecimiento de la cepa silvestre y la mutante <i>crtR</i> de <i>X. dendrorhous</i>	37
4 DISCUSIÓN	43
5 CONCLUSIONES	51
6 PROYECCIONES	52
7 BIBLIOGRAFIA	53

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de <i>X. dendrorhous</i> utilizadas en este trabajo.....	14
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para RT-qPCR.....	17
Tabla 3. Procedimiento de ruptura con cada método.....	20
Tabla 4. Producción de carotenoides totales a lo largo de la curva de crecimiento de la cepa silvestre y mutante de <i>X. dendrorhous</i>	25
Tabla 5. Producción de esteroides totales a lo largo de la curva de crecimiento de la cepa silvestre y mutante de <i>X. dendrorhous</i>	27
Tabla 6. Evaluación de diferentes métodos de ruptura celular para obtener la fracción microsómica con proteínas activas.....	38
Tabla 7. Actividad citocromo c reductasa de la cepa CBS 6938 y CBSTr.....	42

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la organización de los diferentes sistemas P450.	2
Figura 2. Flujo de electrones hacia citocromo P450 en el retículo endoplasmático.....	6
Figura 3. Biosíntesis de terpenoides en <i>X. dendrorhous</i>	11
Figura 4. Curvas de crecimiento de las cepas CBS 6938 y CBSTr.	24
Figura 5. Fenotipo de las cepas de estudio de <i>X. dendrorhous</i>	25
Figura 6. Análisis de la composición de carotenoides.	26
Figura 7. Cromatogramas representativos obtenidos mediante RP-HPLC a 280 nm de esteroides producidos por las cepas CBS 6938 y CBSTr.	28
Figura 8. Producción y composición de esteroides en las cepas CBS 6938 y CBSTr de <i>X. dendrorhous</i> a lo largo de la curva de crecimiento.	28
Figura 9. Cultivo de las cepas CBS 6938 y CBSTr en medio YM-agar en ausencia o presencia de ácido benzoico.	30
Figura 10. Secuencias y estructuras de los genes que codifican CBRs en <i>X. dendrorhous</i>	32
Figura 11. Estructura secundaria de CBRs traducidas <i>in silico</i> con sus dominios característicos y análisis filogenético.....	33
Figura 12. Esquema y secuencia del gen <i>CYB5-1</i> de <i>X. dendrorhous</i>	34
Figura 13. Análisis bioinformático del gen <i>NRI</i> de <i>X. dendrorhous</i>	35
Figura 14. Niveles de expresión de los genes en estudio por RT-qPCR a lo largo de la curva de crecimiento de las cepas CBS 6938 (silvestre) y CBSTr (mutante <i>crtR</i>).....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorbancia
BSA	Albumina sérica bovina
CBR	Citocromo b5 reductasa
CPR	Citocromo P450 reductasa
CYB5	Citocromo b5
Cit c	Citocromo c
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
EDTA	Tetra acetato disódico de etilendiamina
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FMN	Flavín mononucleótido
Hyg	Higromicina
Kb	Kilobases
KDa	KiloDalton
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fósforo
NR1	Novel Reductase 1, proteína tipo CPR citoplasmática
ORF	Marco abierto de lectura
P450 o CYP	Citocromo P450
pb	Pares de bases nucleotídicas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Psi	Libras por pulgada cuadrada
qPCR	PCR cuantitativo o PCR en tiempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RP-HPLC	Cromatografía líquida en fase reversa
RT	Reacción de transcripción reversa
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidades de enzima
UV	Ultravioleta
YM	Medio completo para levadura

RESUMEN

Los citocromos P450 (P450s) representan una de las mas grandes superfamilias de proteínas y están presentes en todos los dominios biológicos. Para la catálisis, las enzimas P450s requieren de dos electrones que son transferidos desde NADH y/o NADPH por un sistema donador de electrones. Los sistemas P450 (enzima P450 + donador de electrones) se clasifican según su estructura y localización sub-celular, siendo los de clase II (localizados en la membrana del retículo endoplasmático, microsómicos), los más abundantes en eucariontes. Los sistemas P450 de clase II están formados por dos proteínas integrales de membrana: la enzima citocromo P450 y la citocromo P450 reductasa (CPR), donde el flujo de electrones en la enzima CPR va desde el NADPH al FAD al FMN y finalmente a la enzima citocromo P450. En hongos, las enzimas P450s son claves en el metabolismo primario, secundario y en la detoxificación de xenobioticos, y se ha logrado identificar un alto número de genes que codifican dichas enzimas. Sin embargo, la gran mayoría de las especies presenta sólo un gen para CPR. Por lo tanto, la presencia de una única CPR podría no ser suficiente para permitir la transferencia de electrones necesarios para todo el P450oma en un organismo. Por consiguiente, proteínas de sistemas redox alternativos, tales como la vía formada por citocromo b5 reductasa (CBR) y citocromo b5 (CYB5) (vía CBR-CYB5), desempeñan un rol importante en este proceso. Existen evidencias del rol que cumple la vía CBR-CYB5 en los sistemas P450 en cepas mutantes del gen de CPR en *F. fujikuroi* y *S. cerevisiae*, además de ensayos *in vitro* con CBR y CYB5 de *P. chrysosporium*. En

la levadura carotenogénica *X. dendrorhous* se han identificado 13 genes que codificarían P450s, de los cuales se han caracterizado funcionalmente dos: el gen *crtS* que codifica a la enzima astaxantina sintasa que oxida el β -caroteno formando astaxantina y el gen *CYP61*, que codifica a la enzima C-22 desaturasa esencial en la biosíntesis de ergosterol. Por otra parte, se ha identificado el gen *crtR* de *X. dendrorhous* que codifica una CPR, cuya mutación por interrupción con un módulo que confiere resistencia a antibiótico, bloquea la síntesis de astaxantina. Considerando lo anterior, es interesante estudiar vías alternativas de donación de electrones a P450s, como la vía CBR-CYB5, en *X. dendrorhous*.

De esta manera, el objetivo de este trabajo fue estudiar la participación de una vía donadora de electrones alternativa a citocromo P450 reductasa en los sistemas P450 de *X. dendrorhous*. Para ello en primer lugar se analizó fenotípicamente una cepa mutante *crtR* (CBSTr) y la cepa silvestre (CBS 6938) de la cual deriva. Se determinó que la cepa mutante no produce astaxantina, produce una menor proporción de ergosterol y su crecimiento en presencia de ácido benzoico se ve más afectado que el de la cepa silvestre. Por otro lado, se realizó un análisis bioinformático del genoma y transcriptoma de *X. dendrorhous*, logrando identificar los genes que posiblemente codificarían CYB5 y CBR en esta levadura. Se encontró un gen que codificaría una CBR (*CBR-1*) y dos genes que codificarían CYB5, denominados *CYB5-1* y *CYB5-2*, donde el segundo posiblemente codifica una CYB5 mitocondrial. Además, se identificó un gen (denominado *NR1*) que codificaría una enzima con los dominios característicos de CPR,

excepto la región de trans-membrana que permite el anclaje de CPR en la membrana del retículo endoplasmático. Posteriormente se determinaron los niveles de transcrito de los genes identificados, además del *crtR*, en la cepa CBSTr y la silvestre. En general, los genes *CYB5-1*, *CBR-1* y *crtR* presentan una mayor expresión en la cepa CBSTr que en la silvestre, y el gen *NR1* no presenta diferencias significativas entre ambas cepas. Adicionalmente, se determinó la actividad citocromo c reductasa con NADPH y NADH en ambas cepas, para lo cual fue necesario en primer lugar optimizar las condiciones de preparación de la fracción microsómica (con proteínas activas) y el ensayo enzimático. Se encontró que la actividad citocromo c reductasa de cada cepa depende del tipo de cofactor: la cepa CBSTr presentó mayor actividad con NADH y la cepa silvestre con NADPH. Los mayores niveles de actividad dependiente de NADH junto con los mayores niveles de expresión de *CBR-1* y *CYB5-1* sugieren fuertemente la participación de la vía CBR-CYB5 como vía donadora de electrones a las enzimas P450 en *X. dendrorhous*. Si bien esta vía puede sostener rutas metabólicas donde participan enzimas P450s, como la síntesis de ergosterol, no es capaz de sustentar la síntesis de astaxantina en el mutante *crtR*- de *X. dendrorhous*.

ABSTRACT

Cytochromes P450 (P450s) are one of largest superfamily of proteins, which are present in all biological domains. For catalysis, the P450s enzymes require two electrons that are transferred from NADH and/or NADPH by an electron donor partner, forming the P450 system (P450 enzyme + electron donor). In this way, the P450 systems are classified according to their structure and subcellular localization, being the class II, the most abundant in eukaryotes. The P450 class II systems are composed by two proteins that are anchored to the endoplasmic reticulum membrane (microsomal): the cytochrome P450 enzyme and the cytochrome P450 reductase (CPR); the electron flow in CPR goes from NADPH to FAD to FMN and finally the P450 enzyme. In fungi, the P450s enzymes are key in primary, secondary xenobiotics metabolism, and a large number of genes encoding such enzymes have identified. However, the majority of species have only one CPR gene. Accordingly, the presence of a single CPR may not be enough to allow the electrons flow to all the P450oma in an organism. Therefore, proteins of alternative redox partners, such as cytochrome b5 reductase (CBR) and cytochrome b5 (CYB5) pathway (CBR-CYB5), play an important role. For example, there is evidence of the role of the CBR-CYB5 via at P450 reactions in CPR mutant strains of *F. fujikuroi* and *S. cerevisiae*. Also, *in vitro* enzymatic assays have been performed with the CBR and CYB5 from *P. chrysosporium*.

In the genome of the carotenogenic yeast *X. dendrorhous*, 13 genes that encode P450s have identified. However, only two have been functionally characterized: the *crtS*

gene that encodes the astaxanthin synthase enzyme, which oxidizes β -carotene forming astaxanthin, and the *CYP61* gene, which encodes a C-22-desaturase that is essential in the ergosterol biosynthesis. Furthermore, the *X. dendrorhous* CPR encoding gene (*crtR*) have been characterized and its mutation blocks the astaxanthin synthesis in this yeast. Under this background, it is interesting to study alternative P450s electron donor partners, such as the CBR-CYB5 via in *X dendrorhous*. Thus, the aim of this work was to study the role of this alternative P450 electrons donor pathway in *X. dendrorhous*.

In first place, phenotypic characterizations were performed on a *crtR* mutant strain (CBSTr) and the wild-type parental strain (CBS 6938) from which it was obtained. It was confirmed that the mutant strain does not produce astaxanthin, but it produces ergosterol (although in less proportion that the parental strain) and its growth in the presence of benzoic acid was more affected than parental strain. Furthermore, by bioinformatics analyses over the *X. dendrorhous* genome and transcriptomes, the putative CYB5 and CBR genes were identified. By this way, a CBR encoding gene (*CBR- 1*) and two CYB5 encoding genes (*CYB5-1* and *CYB5-2*, which the second one possibly encodes a mitochondrial CYB5), were isolated. Furthermore, the *NRI* gene, which encodes an enzyme that has the CPR characteristic domains except the trans-membrane region that allows CPR to anchor to endoplasmic reticulum membrane, was isolated. Subsequently, the transcript levels of the identified genes (and also of *crtR*), were quantified in the CBSTr and wild- type strains. In general, the *CYB5-1*, *CBR-1* and *crtR* transcript levels were higher in CBSTr compare to the wild-type strain, and *NRI*

transcript did not show significant differences between the two strains. Additionally, the cytochrome c reductase activity was determined with NADPH and NADH as cofactors in microsomes prepared from both strains. For this, it was necessary to optimize the conditions to obtain the microsomal fraction with active proteins and the enzymatic assay. We found that the cytochrome c reductase activity in each strain depended on the cofactor: the CBSTr strain showed higher activity with NADH and the wild-type strain with NADPH. The higher levels of NADH-dependent activity coupled with the higher transcript levels of *CBR-1* and *CYB5-1* in CBSTr, strongly suggest that the CBR- CYB5 via is involved in *X. dendrorhous* as an alternative electron donor pathway. Although this via can sustain metabolic pathways involving P450s enzymes, such as the ergosterol synthesis, it is not able to sustain the astaxanthin synthesis in the *X. dendrorhous crtR* mutant strain.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Sistemas P450.

Los citocromos P450 (P450s o CYP) representan una de las mas grandes superfamilias de proteínas que están presente en todos los dominios biológicos (Bernhardt, 2006). La terminología P450 se debe a que originalmente se describieron como pigmentos (**P**) y luego se encontró que correspondían a proteínas con grupo hemo del tipo b que muestran una absorción máxima a **450** nm en su estado reducido cuando esta unido a monóxido de carbono, formando el *peak* de Soret (Estabrook, 2003). Los tipos de reacciones que pueden realizar este grupo de proteínas son muy diversas y según el organismo al que pertenezcan pueden contribuir en procesos vitales tales como la asimilación de algunas fuentes de carbono, la biosíntesis de hormonas y de componentes estructurales de las células. Además, participan en la biosíntesis de metabolitos secundarios y en la degradación de xenobióticos (Subramanian y cols., 2010). La gran diversidad de reacciones catalizadas por estas enzimas incluyen hidroxilaciones, epoxidaciones, deshalogenaciones, desaminaciones, N-oxidaciones y otras (Vergeres y cols., 1995; Correia y cols., 1973). La secuencia aminoacídica entre las enzimas P450 de diferentes familias puede ser muy diversa, encontrándose niveles de identidad menores a un 20 % en algunos casos. Sin embargo, su topología general y estructura tridimensional son altamente conservadas, lo que apunta a un mecanismo común de transferencia de electrones y de activación de oxígeno (Hasemann y cols., 1995). En contraste con esto, las regiones más variables son las de reconocimiento de

sustrato (Podust y cols., 2001) lo que permite que las P450s sean uno de los catalizadores biológicos más versátiles conocidos.

La reacción general catalizada por estas enzimas es la siguiente, donde R representa al sustrato: $RH + NAD(P)H + H^+ + O_2 \rightarrow ROH + NAD(P)^+ + H_2O$ (Mansuy, 1998). Para la oxidación del sustrato, las enzimas P450 requieren de dos electrones que son transferidos desde NADH y/o NADPH por un sistema donador de electrones. Dependiendo de sus componentes, los sistemas P450 (enzima P450 + donador de electrones) se clasifican en cuatro clases principales (Figura 1):

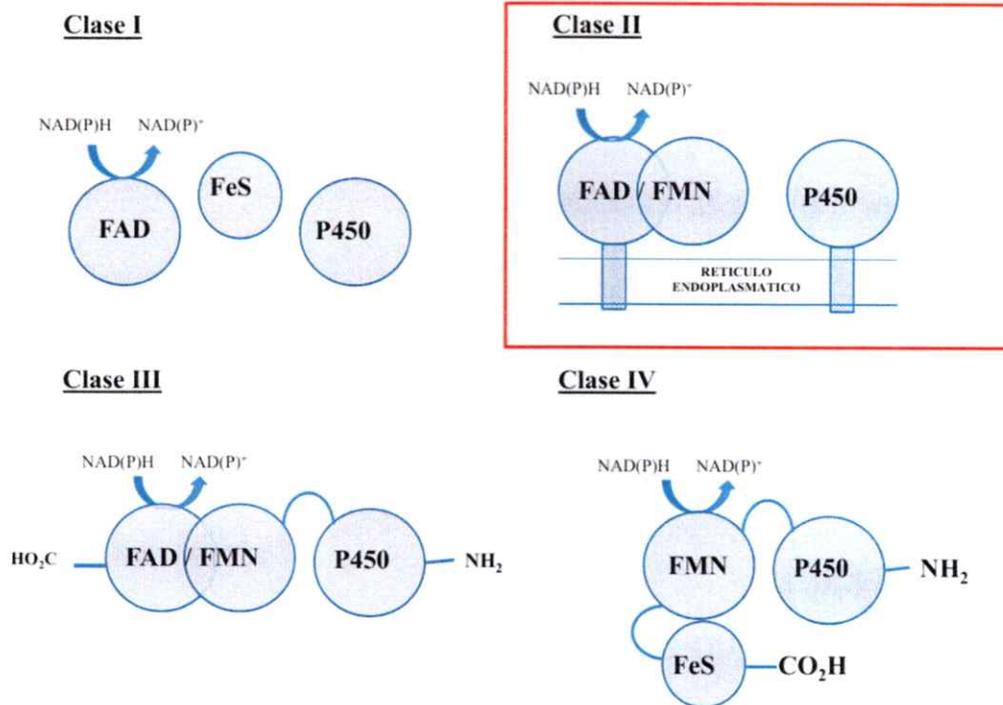


Figura 1. Esquema de la organización de los diferentes sistemas P450. Ilustración de los cuatro sistemas P450 donde se observan sus componentes y organización. En círculos celeste se representan los dominios de P450s, ferredoxina (FeS) y de unión a FAD y FMN. En rojo se enmarca el sistema de clase II o microsómica, característico en eucariontes.

Clase I. Los sistemas de clase I tienen tres componentes: i) una flavodoxina reductasa que contiene FAD, la cual transfiere electrones desde un piridín nucleótido (NADH o NADPH) al segundo componente del sistema, ii) una ferredoxina. Ésta es una proteína hierro-azufre y es la que reduce finalmente a iii) la enzima P450. En bacterias estas tres proteínas son solubles, mientras que en eucariontes, la reductasa y P450 están asociadas a la membrana mitocondrial interna y sólo la ferredoxina es soluble (Bernhardt, 1996).

Clase II. Los sistemas P450s de clase II en su forma más simple están compuestos por dos proteínas que se encuentran ancladas a la cara externa del retículo endoplasmático por los residuos amino terminales. Los dos componentes son: i) la enzima P450 y ii) una citocromo P450 reductasa (CPR).

Clase III. Esta clase de sistema P450 es autosuficiente, ya que una sola proteína contiene un dominio P450 y dominios diflavin reductasa (que unen FMN y FAD) que capta electrones desde el NAD(P)H.

Clase IV. Esta última clase de sistemas P450 también es autosuficiente. En este caso, la región carboxilo del polipéptido posee un dominio tipo ferredoxina que actúa como *linker* entre el dominio monoflavín reductasa (que une FMN) que recibe el electrón desde NAD(P)H y lo transfiere al dominio P450 (Hannemann y cols., 2007).

Los sistemas P450 de clase II son los más abundantes en eucariontes y como se localizan en el retículo endoplasmático, también se conocen como microsómicos. En hongos, las P450s son enzimas claves en el metabolismo primario, secundario y en la detoxificación de xenobioticos y fitoalexinas (Subramanian y cols., 2010). Están



formados por dos proteínas ancladas a la membrana: i) la enzima citocromo P450 y ii) la citocromo P450 reductasa (CPR). Las CPRs son flavoproteínas que contienen un mol de los grupos prostético FAD y FMN por cada mol de proteína (Malonek y cols., 2004), los que son necesarios para el flujo de electrones que van desde el NADPH al FAD luego al FMN y finalmente a la enzima citocromo P450 (van den Brink y cols., 1998). CPR tiene una alta especificidad por NADPH versus NADH, siendo su afinidad por NADPH 4.000 veces mayor (Iyanagi y Mason, 1973). Su estructura consta de una pequeña región de transmembrana en su extremo amino terminal y una región citoplasmática de cuatro dominios: i) de unión a NADPH, ii) de unión a FAD, iii) conector y iv) de unión a FMN. Este último dominio es el que interactúa con la enzima citocromo P450 (Wang y cols., 1997).

Las nuevas herramientas de secuenciación masiva y el creciente número de genomas que se han secuenciado, ha revelado un extenso repertorio de genes de enzimas P450s (P450oma) en hongos. Es por ello que ha sido necesario desarrollar un sistema de nomenclatura general para estas enzimas. Todas las enzimas P450 se denominan CYP, seguido por un número que representa a la familia a la cual pertenece, luego le sigue una letra que representa a la subfamilia y finalmente, un número que corresponde al gen. Así, aquellas enzimas que presentan una identidad mayor al 40 %, pertenecen a un misma familia y si la identidad es mayor al 55 %, pertenecen a la misma subfamilia. Se han identificado 267 familias con más de 5.000 genes y dado a la gran cantidad de información que se ha reunido, ha sido necesario crear bases de datos específicas para P450s. Entre ellas destacan, *Cytochrome P450 Homepage* la cual recopila información

de secuencias y nomenclatura de P450s de todos los dominios biológicos (Nelson, 2009). Una segunda base de datos especializada en secuencias de P450 de hongos es *Fungal Cytochrome P450 Database* (Moktali y cols., 2012), mientras que la base de datos CYPED (*Cytochrome P450 Engineering Database*) además integra información de estructuras de P450s (Fischer y cols., 2006). Todas estas bases de datos facilitan el estudio de P450s, ya que son de libre acceso y contribuyen para determinar la función de ciertos genes, generar modelos estructurales y de interacción entre proteínas, entre otros.

En contraste con el alto número de genes de P450s que puede presentar un genoma, en general solo hay un gen de CPR, salvo algunas pocas excepciones (Lah y cols., 2008). Por lo tanto, la presencia de una CPR única podría no ser suficiente para permitir la transferencia de electrones necesarios para todo el P450oma. Por consiguiente, proteínas de sistemas redox alternativos tales como la vía formada por citocromo b5 (CYB5) y citocromo b5 reductasa (CBR) (vía CBR-CYB5) desempeñan un rol importante en este proceso. CBR es una enzima reductasa dependiente de NADH, anclada al retículo endoplasmático (Schomburg y cols., 1994)

En cepas mutantes del gen de CPR del ascomicete *Fusarium fujikuroi*, actividades de P450s involucradas en la biosíntesis de giberelinas mostraron cambios en su regioselectividad, velocidad de reacción y formaron productos alternativos debido a su interacción con los *partners redox* alternativos: CYB5 y CBR (Troncoso y cols., 2008). Por otro lado, en el hongo *Phanerochaete chrysosporium*, CBR y CYB5 participan en la función de CYP63A2 que es una P450 capaz de oxidar hidrocarburos policíclicos aromáticos, alquilo-fenoles y alcanos (Khajamohiddin y cols., 2011). También se demostró que CYB5 y CBR sostienen la actividad de CYP51 en *Saccharomyces cerevisiae*, donde CYP51 es una lanosterol 14 α -demetilasa esencial en la síntesis de ergosterol (Lamb y cols., 1999). Estas evidencias demuestran que la vía CBR-CYB5 es capaz de sustentar las reacciones de P450s tanto del metabolismo primario (por ejemplo, en la síntesis de ergosterol) como secundario (por ejemplo, en la síntesis de carotenoides). De esta manera, CYB5 puede ser reducida tanto por CPR o CBR, entregando los electrones a la enzima P450 (Porter, 2002) (Figura 2).

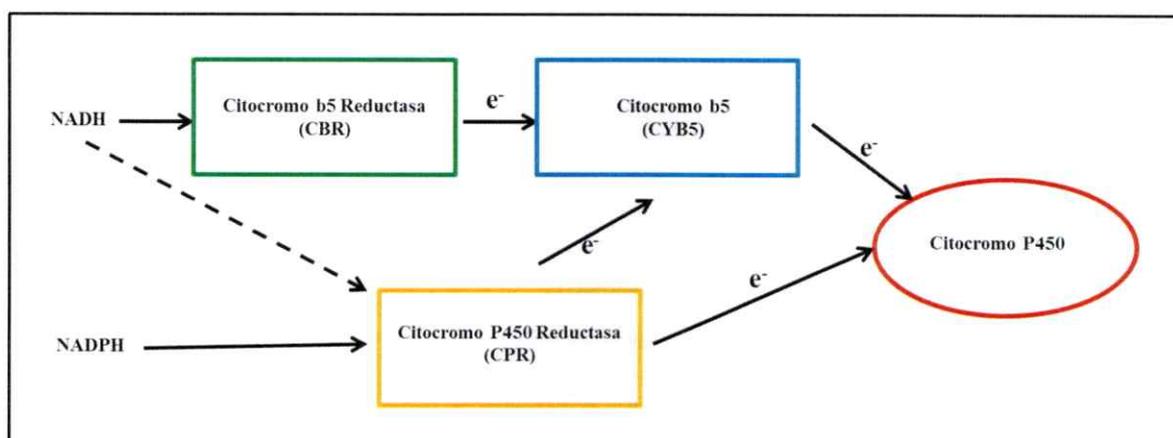


Figura 2. Flujo de electrones hacia citocromo P450 en el retículo endoplasmático. La enzima P450 podría recibir ambos electrones tanto por la vía CBR-CYB5 como de CPR (Modificado de Porter, 2002).

1.2. *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

X. dendrorhous es una levadura carotenogénica basidiomicete en estado telemórfico, es decir, formadora de basidios (Golubev, 1995). Entre sus características destaca su color, ya que tiene la capacidad de sintetizar el carotenoide astaxantina como principal pigmento. Además, es una levadura facultativa que produce etanol por la fermentación de azúcares (Andrewes y cols., 1976). *X. dendrorhous* fue aislada originalmente desde exudados de árboles de regiones montañosas de Japón y Alaska en la década de los 60s por Phaff y colaboradores (Phaff y cols., 1972). Posteriormente, se obtuvieron aislados procedentes de la Patagonia Argentina asociados a cuerpos fructíferos de *Cyttaria hariatii* en árboles del género *Nothofagus* (Libkind y cols., 2007; Libkind y col., 2008) y del sur de Chile desde hojas de eucaliptus (Weber y cols., 2008). Debido a su capacidad de producir carotenoides y la importancia comercial de estos compuestos, *X. dendrorhous* es objeto de un gran número de estudios.

Los carotenoides son un grupo de pigmentos muy diversos y están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Son compuestos orgánicos de 40 átomos de carbono derivados del isopreno y poseen una cadena de dobles enlaces conjugados, sistema de polieno, lo que les otorga sus propiedades cromofóricas (Frengova y Beshkova, 2009). Debido a la alta hidrofobicidad que tienen estas moléculas, generalmente se encuentran en las membranas lipídicas de las células o asociadas a proteínas permitiendo su acceso a ambientes acuosos (Britton y cols., 2004).

Actualmente se conocen más de setecientas estructuras diferentes de este tipo de pigmentos, los que se clasifican como carotenos o xantófilas. Los carotenos sólo poseen átomos de carbono e hidrógeno en su estructura, siendo el β -caroteno uno de los más reconocidos. Las xantófilas son derivados oxigenados y entre ellas se encuentran la zeaxantina, cantaxantina y astaxantina (Britton, 1995). Los carotenoides se encuentran en la mayoría de las formas de vida y son producidos naturalmente por organismos fotosintéticos y algunos procariontes, hongos filamentosos y levaduras (Lu y col, 2008). Por el contrario, los animales no son capaces de sintetizar estos pigmentos, por lo tanto los adquieren desde su dieta (Maoka, 2011). Algunas de las funciones que cumplen los carotenoides son: pigmentos fotosintéticos, precursores de la vitamina A, antioxidantes (protección contra foto-oxidación y radicales libres) y participan en la síntesis de ácido abscísico. También son importantes para la atracción visual de animales polinizadores (Frengova y Beshkova, 2009).

Se postula que en *X. dendrorhous* los carotenoides cumplen un rol antioxidante, principalmente porque su hábitat original, exudados de árboles, es altamente oxidante y contiene sustancias antifúngicas. Por lo tanto, éstos pigmentos estarían ejerciendo un rol protector en la levadura especialmente porque en *X. dendrorhous* hay carencia y baja actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la catalasa, respectivamente (Schroeder y cols., 1993). En apoyo de esta hipótesis, astaxantina es el principal carotenoide producido por esta levadura y se ha demostrado que esta xantófila en particular tiene una alta actividad antioxidante, incluso mayor a la de otros reconocidos antioxidantes como el β -caroteno y el α -tocoferol (Miki, 1991). Por este

motivo, actualmente la astaxantina es comercializada por la industria nutracéutica. Adicionalmente, el mercado más importante de este carotenoide es la industria de la acuicultura ya que se usa como colorante de salmónidos cultivados (Higuera-Ciapara y cols., 2006).

1.3. Síntesis de astaxantina en *X. dendrorhous*: Participación de un sistema citocromo P450.

Los carotenoides son tetraterpenos (C_{40}) cuya unidad básica es la molécula de isopreno (C_5), siendo el isopentenil pirofosfato (IPP) y su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP) las formas activas (Britton y cols., 2004). En eucariontes, el IPP deriva de la vía del mevalonato, donde tres moléculas de acetil-CoA se condensan, seguido por dos reacciones de fosforilación y una descarboxilación (Sandmann, 2001). En la síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous* (Figura 3), en primer lugar el DMAPP se forma por la isomerización del IPP por la enzima IPP isomerasa codificada por el gen *idi* (Kajiwara y cols., 1997). Luego, la condensación de una molécula de IPP con una de DMAPP forma geranil pirofosfato (GPP, C_{10}), al cual se le adiciona una segunda molécula de IPP formando farnesil pirofosfato (FPP, C_{15}). Ambas reacciones son catalizadas por la enzima FPP-sintasa, codificada por el gen *FPS* (Alcaíno, 2014). El siguiente paso es catalizado por la enzima geranilgeranil pirofosfato sintasa (codificada por el gen *crtE*), que agrega una tercera molécula de IPP generando geranilgeranil pirofosfato (GGPP, C_{20}) (Verdoes y cols., 1999b). Posteriormente, la condensación de dos moléculas de GGPP, etapa catalizada por la enzima bifuncional fitoeno- β -caroteno sintasa (PBS) codificada por el gen *crtYB*, produce fitoeno (C_{40}) que es el primer carotenoide de la vía

(Verdoes y cols, 1999a; Alcaíno 2002). A continuación, el fitoeno sufre cuatro desaturaciones por la enzima fitoeno desaturasa (PDS, producto del gen *crtI*) generando licopeno (Verdoes y cols, 1999b). Los extremos del licopeno son ciclados por la actividad licopeno ciclasa de la enzima PBS formando el β -caroteno (Verdoes y cols, 1999a). Finalmente, el β -caroteno es oxidado por acción de la enzima astaxantina sintasa (CrtS, codificada por el gen *crtS*) la cual es una enzima citocromo P450 monooxigenasa (Ojima y cols., 2006). De esta manera, CrtS adiciona un grupo ceto en los carbonos 4 y 4', y un grupo hidroxilo en los carbonos 3 y 3' en los anillos del β -caroteno, generando astaxantina (de la Fuente y cols, 2010). Se ha demostrado que en la síntesis de astaxantina desde β -caroteno en *X. dendrorhous*, también es esencial la enzima CrtR que es una citocromo P450 reductasa codificada por el gen *crtR* (Alcaíno y cols., 2008).



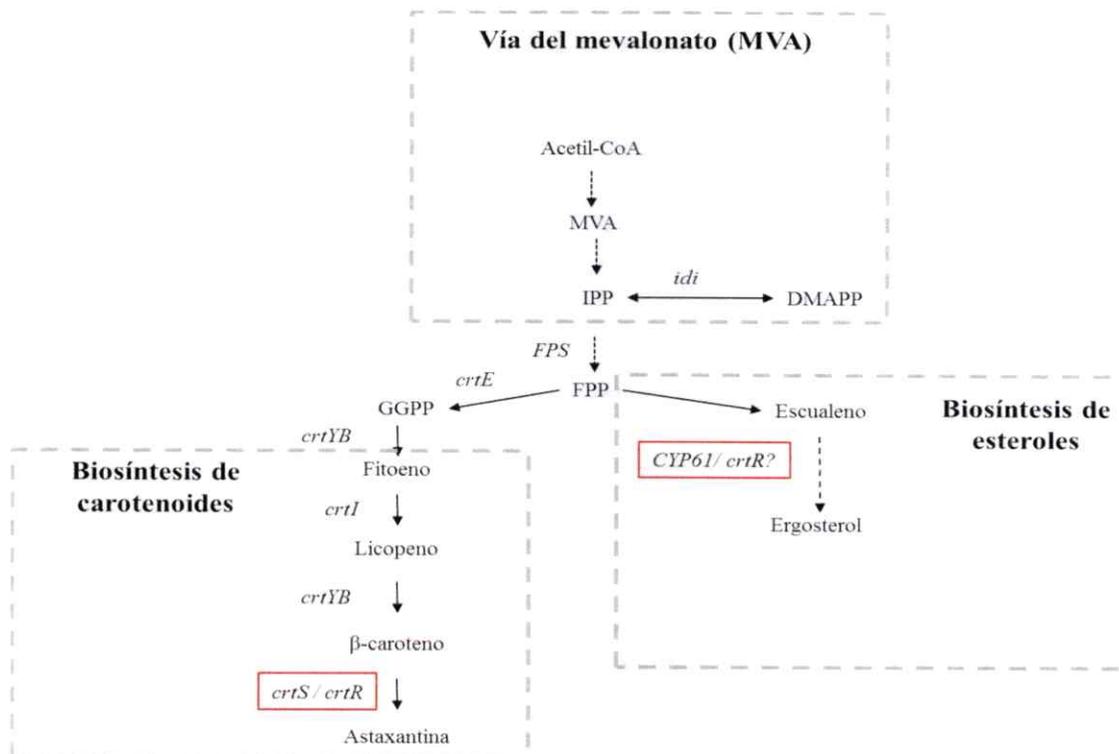


Figura 3. Biosíntesis de terpenoides en *X. dendrorhous*. Se esquematiza la vía del mevalonato, la biosíntesis de carotenoides y la biosíntesis de esteroides de *X. dendrorhous*. En letras cursivas se indica los genes estructurales participantes en cada ruta y a continuación su número de acceso entre paréntesis a la base de datos GenBank: *idi* [DQ235686], *FPS* [DI032788.1, patente US 6872556 B2], *crtE* [DQ012943], *crtYB* [DQ016503], *crtI* [Y15007], *crtS* [EU713462], *crtR* [EU884133] y *CYP61* [JX183236]. Enmarcado en rojo se señala las etapas donde participan sistemas P450. Abreviaciones: Ácido mevalónico (MVA) Isopentenil pirofosfato (IPP), dimetilalil pirofosfato (DMAPP), farnesil pirofosfato (FPP), geranilgeranil pirofosfato (GGPP) (Modificado de Loto, 2012).

Hasta la fecha, *X. dendrorhous* es el único organismo que se conoce que sintetiza astaxantina a través de un sistema citocromo P450. Es interesante el hecho que la interrupción del gen *crtR* bloquea la producción de astaxantina, sin embargo, el mutante es viable (Alcaíno y cols., 2008). Además, en el genoma de *X. dendrorhous* se han identificado 13 genes que probablemente codifican enzimas P450 y todos ellos se transcriben (Bravo y cols., 2012). Más aún, la síntesis de esteroides también deriva de la

ruta de biosíntesis de terpenoides, siendo el FPP su precursor. Con relación a lo recién expuesto, este tipo de moléculas, los esteroides, son componentes estructurales de la membrana plasmática y ejercen un rol muy importante modulando la permeabilidad y la fluidez de la membrana (Zhang y Rao, 2010). En hongos filamentosos y levaduras el principal esteroide es el ergosterol y se ha demostrado en *X. dendrorhous* que en la síntesis de esta última molécula, la enzima C22-desaturasa (CYP61), la cual también pertenece a la superfamilia de las citocromo P450, es esencial (Loto y cols., 2012). Por otro lado, en la descomposición de compuestos fenólicos tóxicos se ha determinado la participación de una P450, la enzima benzoato p-hidroxilasa (Lah y cols., 2011), en el genoma de *X. dendrorhous* se encontró un gen que podría cumplir esta función (Bravo y cols., 2012). Además se han identificado otras enzimas del tipo CPR pero sin el dominio transmembrana en células humanas e invertebrados (Kwasnicka-Crawford y Vincent, 2005; Paine y cols., 2005). Si bien se conoce la función de CPR en los sistemas P450s, el rol que podrían cumplir estas enzimas reductasas, denominadas NR1 (*Novel Reductase*), aún no está claro (Kwasnicka-Crawford y cols., 2003). Estos antecedentes sugieren que en *X. dendrorhous* existe un sistema donador de electrones alternativo a CrtR, probablemente la vía CBR-CYB5, que en el mutante *crtR*⁻ (CBSTr) sostiene algunas reacciones donde participan enzimas P450, tales como aquellas de la biosíntesis de ergosterol.

Acorde a lo anterior, en este trabajo se propuso estudiar la vía CBR-CYB5 que alternativamente a CrtR dona electrones a las enzimas P450 en *X. dendrorhous*.

1.4. Hipótesis y Objetivos.

Hipótesis:

En *X. dendrorhous*, el gen *crtR* codifica la enzima citocromo P450 reductasa la cual es esencial en la síntesis de astaxantina. La vía alternativa de donación de electrones, CBR-CYB5, no es capaz de complementar la mutación *crtR*⁻ en la síntesis de astaxantina *pero podría sostener la actividad de otras enzimas P450 presentes en la levadura como aquellas involucradas en la síntesis de ergosterol.*

Objetivo general

Estudiar la participación de una vía donadora de electrones alternativa a citocromo P450 reductasa en los sistemas P450 de *X. dendrorhous*.

Objetivos específicos

- Analizar fenotípicamente la cepa silvestre y mutante *crtR*⁻ de *X. dendrorhous*, en cuanto a la producción de carotenoides, esteroides y crecimiento en benzoato.
- Identificar en el genoma de *X. dendrorhous* y caracterizar los posibles genes *CBR* y *CYB5* que codifican donadores de electrones alternativos a CrtR.
- Implementar y optimizar una metodología para obtener la fracción microsómica con proteínas activas de *X. dendrorhous*.
- Determinar la expresión a nivel de transcrito de los genes *CBR*, *CYB5*, *NRI* y *crtR*, y evaluar la actividad citocromo c reductasa a lo largo de la curva de crecimiento de la cepa silvestre y de la mutante *crtR*⁻ de *X. dendrorhous*.



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Cepas y condiciones de cultivo.

Las cepas de *X. dendrorhous* utilizadas en este trabajo se describen en la Tabla 1 y se cultivaron a 22 °C en medio completo YM (extracto de levadura 3 g/L, extracto de malta 3 g/L, glucosa 10 g/L y peptona 5 g/L) con agitación constante. Para los cultivos en medio semi-sólido, al medio YM se le adicionó agar al 1,5 %. Adicionalmente, el crecimiento de las cepas de levaduras se evaluó en placas con medio YM semi-sólido (pH 5,5) suplementado con benzoato a 250 mg/mL, incubadas a 22 °C. En este caso, para evaluar el crecimiento, se tomó un registro fotográfico de las placas cada 48 h.

Tabla 1. Cepas de *X. dendrorhous* utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo o características relevantes	Referencia
UCD 67-385	ATCC 24230, cepa silvestre	ATCC
CBS 6938	ATCC 96594, cepa silvestre	ATCC
CBSTr	(<i>crtRΔNdeI::hph</i>). Transformante de la cepa CBS 6938 que acumula β-caroteno, ya que se escindió una porción del gen <i>crtR</i> y se reemplazó por un módulo que confiere resistencia a higromicina B.	Alcaíno y cols., 2008.

2.2. Determinación del crecimiento celular y biomasa. El crecimiento celular se determinó midiendo la densidad óptica del cultivo a 600 nm con un espectrofotómetro UV-630 de JASCO cada 10 - 12 h. Las curvas de crecimiento se realizaron por triplicados. Para ello, se inocularon matraces Erlenmeyer de 1 L que contenían 400 mL de medio YM con un cultivo de 72 h para alcanzar una DO_{600} inicial entre 0,1 y 0,2. Los cultivos se incubaron a 22 °C con agitación constante a 150 rpm y luego de 24, 38, 72 y 120 h, se colectaron muestras de 65 mL para: i) determinar el peso seco de levadura en el cultivo (2 muestras de 2,5 mL), ii) extraer RNA (4 muestras de 5 mL), iii) extraer carotenoides (1 muestra de 15 mL), iv) extraer esteroides (1 muestra de 5 mL) y v) obtener la fracción microsómica (2 muestras de 10 mL). Los pellets de células se lavaron con agua destilada y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior procesamiento. La biomasa se determinó como el promedio del peso seco de levadura, para lo cual el pellet celular de dos muestras de 2,5 mL de cultivo se secaron a 80 °C por toda una noche (16 h aproximadamente).

2.3. Extracción de RNA y síntesis de cDNA. La extracción de RNA se realizó de acuerdo a Chomczynski y Sacchi (1987). Brevemente, se tomó una muestra de 5 mL de un cultivo de la levadura y se centrifugó a 4.000 x g por 5 min descartando el sobrenadante. El pellet celular se suspendió en 200 μ L de solución de lisis (Acetato de Sodio 0,02 M a pH 5,5, SDS 0,5 % y EDTA 1 mM), se adicionó 100 μ L de perlas de vidrio de 0,5 mm (BioSpec) y se agitó por 1 min en un homogeneizador Mini-Beadbeater-16 (BioSpec). Luego se agregó 800 μ L de TRI Reagent (Ambion) y nuevamente se agitó en homogeneizador por 1 min e incubó en hielo por 10 min. Posteriormente, se adicionó 200 μ L de cloroformo, se agitó manualmente por 15 s y se incubó por 6 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 14.000 x g por 10 min a temperatura ambiente y se recuperó la fase acuosa a la que se le adicionó un volumen de isopropanol frío, ½ volumen de solución de precipitación (NaCl 1,2 M, citrato de sodio 0,8 M). La mezcla se incubó por 1 h a -20 °C y posteriormente se centrifugó por 10 min a 14.000 x g descartando el sobrenadante. El precipitado se lavó con 1 mL de etanol 70 % y se centrifugó por 5 min a 14.000 x g. Nuevamente se descartó el sobrenadante con una micro-pipeta para eliminar todo el etanol (cuando fue necesario, el precipitado se calentó a 65 °C hasta evaporar el etanol). El precipitado se suspendió en 20 – 40 μ L de agua bidestilada libre de nucleasas y la muestra de RNA obtenida se almacenó a -80 °C hasta su análisis. Para determinar la calidad del RNA extraído, se determinó la razón de absorbancias $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ de una alícuota (Sambrook y Russell, 2001). La concentración se determinó utilizando el coeficiente de extinción (1 $A_{260\text{ nm}} = 40 \mu\text{g RNA/mL}$) por el factor de dilución correspondiente en cada caso. La síntesis de cDNA, se realizó con 5 μg de RNA total, 1,25 μM de partidor oligo-dT, 0,5 μM de dNTPs y 200

U de transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) en un volumen final de 20 μ L, según las indicaciones del fabricante de la enzima.

2.4. RT - qPCR. La determinación de los niveles de expresión relativa se realizó de acuerdo a Livak, 2001 (Livak y Schmittgen, 2001) utilizando el kit SensiMix SYBR Green I (Quantance) según las indicaciones del proveedor en un equipo Mx 3000 P (Stratagene). La reacción se realizó en un volumen final de 20 μ L con 1 μ L de cDNA molde y 0,25 μ M de cada partidor específico para cada gen (Tabla 2). A las parejas de partidores utilizados se les determinó la eficiencia mediante una curva estándar con diluciones seriadas de cDNA. Los valores de Ct obtenidos se normalizaron con el valor respectivo del gen de actina [GenBank: X89898.1] (Wery y cols., 1996).

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para RT-qPCR.

Partidor	Secuencia 5' a 3'	Blanco de hibridación
crtR_RT.F	TGTGTTTGGCCTGGGAAACAAGAC	gen <i>crtR</i>
crtR_RT.R	TGTCGTAACCGAGGTTTCCTAACCA	gen <i>crtR</i>
cytb5_RT.F	CGTCCGATTCTGGAAAGATTACCC	gen <i>CYB5</i>
cytb5_RT.R	AAGCTGGTAAGGATGCGACTGA	gen <i>CYB5</i>
RT-CBR1.F	AAGCACATCGACGGACTCAA	gen <i>CBR-1</i>
RT-CBR1.R	TTCCTCGGTCACATTAGCGT	gen <i>CBR-1</i>
cytb5R_RT.F	CAAGGCTGGCTTCAAGGGTACATT	gen <i>CBR-2</i>
cytb5R_RT.R	TCTTGCTTCGAAAGGAATGGGACG	gen <i>CBR-2</i>
NR1_RT.F	GGGGAAGATCCAGCTTTGTATTGC	gen <i>NR1</i>
NR1_RT.R	CTTTCCTCGAGACCGTCTTTTAG	gen <i>NR1</i>
mactF-RT	CCGCCCTCGTGATTGATAAC	gen <i>ACT</i>
mactR-RT	TCACCAACGTAGGAGTCCTT	gen <i>ACT</i>
oligodT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	mRNAs

2.5. Extracción de carotenoides totales de *X. dendrorhous* y análisis mediante RP-HPLC. La extracción de carotenoides totales se realizó con acetona desde precipitados celulares (An y cols, 1989). Para ello, se recolectó el pellet celular por centrifugación de 15 mL de cultivo y se suspendió en 1 mL de agua con 500 μ L de perlas de vidrio de 0,5 mm (BioSpec). La muestra se agitó durante 3 min en un homogeneizador Mini-Beadbeater-16 (BioSpec), se agregó 1 mL de acetona y nuevamente se llevó al homogeneizador durante otros 3 min. El homogeneizado se centrifugó a 4.000 x g por 5 min y se recolectó el sobrenadante. Las extracciones con 2 mL de acetona se repitieron hasta que el extracto celular fuese incoloro juntando todos los sobrenadantes en un mismo tubo. Posteriormente, se agregó 1/6 del volumen final de sobrenadante recuperado de éter de petróleo, se mezcló y se centrifugó por 5 min a 4.000 x g. La fase superior (éter de petróleo) se transfirió a un tubo de vidrio y se determinó su absorbancia a 465 nm. La cantidad de carotenoides se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Total de carotenoides}(\mu\text{g/g peso seco}) = \frac{(v \text{ éter})(A)(100)}{(\epsilon)(\text{peso seco levadura})}$$

Donde: *A*= Absorbancia a 465 nm, *v éter*= volumen de éter de petróleo recuperado (mL) y ϵ = coeficiente extinción 100 % = 21 (An y cols, 1989).

A continuación se dejó evaporar totalmente el éter del extracto de carotenoides, cubriendo los tubos con papel aluminio, los que luego se disolvieron en acetona (50-100 μ L). La composición de pigmentos se determinó mediante cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC, Shimatzu SPD-M10VP) con un detector con arreglo de diodos, usando una columna Lichrospher RP18 125-4 (Merck) y como fase móvil, una mezcla

de acetonitrilo:metanol:isopropanol (85:10:5) con un flujo de 1 mL/min. Cada pigmento se identificó de acuerdo a su tiempo de retención y su espectro de absorción, en comparación a estándares (Britton y cols., 2004).

2.6. Extracción de esteroides totales de *X. dendrorhous* y análisis mediante RP-HPLC. La extracción de esteroides se realizó según el protocolo descrito previamente por Shang y colaboradores (Shang y cols., 2006 y Cheng y cols., 2010). Brevemente, se agregó 4 g de KOH y 16 mL de etanol 60 % al pellet celular, se mezcló y se sumergió en un baño a 80 °C por 2 h (saponificación). Los esteroides no saponificables fueron extraídos con 10 mL de éter de petróleo y se cuantificaron espectrofotométricamente a 280 nm (Lamacka y Sajbidor, 1997). Posteriormente el extracto de esteroides se dejó secar completamente y la composición se determinó mediante cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC, Shimadzu SPD-M10VP), usando una columna Lichrospher RP18 125-4 (Merck). Como fase móvil se utilizó una mezcla de metanol:agua (97:3) con un flujo de 1 mL/min. Como estándar se utilizó ergosterol comercial (Sigma-Aldrich, CAS No. 57-87-4).

2.7. Obtención de la fracción microsómica con proteínas activas. El pellet celular de 10 mL de cultivo se suspendió en 4 mL de buffer de extracción (EDTA 1 mM, Tris HCl 50 mM a pH 7,5, DTT 1 mM, Sorbitol 0,3 M, inhibidor de proteasas Complete™ de Boehringer Mannheim) y se sometió a los métodos de ruptura descritos en la Tabla 3. El extracto obtenido por cada método de ruptura se centrifugó a 1.000 x g por 3 min, se recuperó el sobrenadante el cual se centrifugó a 20.000 x g a 4 °C por 30 min. Posteriormente, el nuevo sobrenadante se centrifugó a 100.000 x g a 4 °C por 1 h y en esta oportunidad se descartó el sobrenadante. El pellet se suspendió en buffer de lavado (EDTA 1 mM, Tris HCl 50 mM a pH 7,5, DTT 1 mM, sorbitol 0,3 M) y se centrifugó a 100.000 x g por 1 h a 4 °C. Finalmente, el pellet obtenido (que corresponde a la fracción microsómica), se suspendió en 200 µL de buffer (Fosfato de Potasio 30 mM a pH 7,8 y EDTA 0,1 mM) y se dividió en alícuotas de 40 µL que se congelaron con nitrógeno líquido en tubos Eppendorf y se almacenaron a -80 °C.

Tabla 3. Procedimiento de ruptura con cada método.

Método de ruptura	Descripción
Homogeneizador Mini-Beadbeater-16 (BioSpec)	Al pellet celular colectado y lavado se le adicionó 500 µL de perlas de vidrio de 0,5 mm (BioSpec) y se sometió a 2 ciclos de 1 min de agitación e incubación de 1 min en hielo.
Prensa fría (X-Press)	Al pellet celular colectado y lavado se le adicionó 16 mL de buffer de extracción y se congeló a -20 °C en un tubo de 50 mL. Posteriormente, la muestra se sometió a una presión de 12.000 Psi .
Sonicador (Cole-Parmer)	Al pellet celular colectado y lavado se le adicionó 500 µL de perlas de vidrio de 0,5 mm (BioSpec) y se sonicó por 20 ciclos de 20 s e incubación de 1 min en hielo.

2.8. Ensayo enzimático (actividad citocromo c reductasa). El ensayo enzimático se adaptó de Vermillion y colaboradores (1974) y se llevó a cabo midiendo la absorbancia a 550 nm cada 1 s por 5 min en un espectrofotómetro UV-630 de JASCO en modo cinético a 22 ± 1 °C. Para esto, en una cubeta (UV-Micro de BRAND) de 275 μ L de volumen se le agregó 237,5 μ L de solución de ensayo (Fosfato de Potasio 260 mM a pH 7,8, EDTA 0,09 mM, BSA 0,01 mg/ml y citocromo c 31 μ M), 5-10 μ L de la muestra de microsomas y la reacción se inició con 12,5 μ L de NADPH (2 mM) o NADH (2 mM) según corresponda cada ensayo. Las velocidades iniciales de cada curva de progreso se determinaron con el software *Spectra Analysis* de JASCO.

2.9. Determinación de la concentración de proteínas. La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford con el kit *Coomassie Plus Assay* (Thermo Scientific) según las indicaciones del proveedor. Se realizó una curva estándar por triplicado con un rango de concentraciones de 0 a 750 μ g/mL de proteína BSA. Para esto, a 750 μ L del reactivo *Coomassie Plus* se le agregó 25 μ L de cada muestra de concentración estándar de proteína, se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 10 min y posteriormente se determinó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro UV-630 de JASCO en modo de análisis cuantitativo (según el software del equipo). Posteriormente, la curva estándar se utilizó para determinar la concentración de proteínas de cada una de las muestras microsómicas obtenidas.

2.10. Análisis bioinformático. Para los análisis de secuencias se utilizaron las herramientas ContigExpress y AlignX del programa Vector NT Advance v.11 (Invitrogen); Geneious 6 y los programas disponibles en línea como la herramienta BLAST u ORF Finder del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Además, las secuencias del transcriptoma y genoma de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* disponibles en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, se analizaron con el programa CLC Genomics Workbench 5.

3. RESULTADOS

3.1. Análisis fenotípico de la cepa silvestre y mutante *crtR*⁻ de *X. dendrorhous*, en cuanto a la producción de carotenoides, esteroides y crecimiento en benzoato.

Los antecedentes antes mencionados permiten postular que las enzimas CBR y CYB5 podrían participar como dadores de electrones alternativo para las enzimas P450 en *X. dendrorhous*. Por este motivo se propuso como objetivo evaluar el fenotipo relacionado con vías metabólicas donde participan enzimas P450s: producción de carotenoides, síntesis de ergosterol y tolerancia a benzoato en una cepa silvestre y una mutante *crtR*⁻ de *X. dendrorhous*. El análisis de la producción y composición de carotenoides, permitió evaluar indirectamente la funcionalidad de la enzima CrtS (astaxantina sintasa), una P450 que cataliza la síntesis de astaxantina a partir de β -caroteno. Por otra parte, la producción y composición de esteroides, vía donde se demostró la participación de la enzima P450 CYP61 (C22-desaturasa) (Loto et al., 2012), también nos permitió evaluar el aporte de un sistema donador de electrones alternativos para P450s. Finalmente, también se evaluó la funcionalidad de una posible benzoato 4-hidroxilasa (que también pertenece a la familia de las P450s), involucrada en la descomposición de compuestos fenólicos tóxicos (Lah y cols., 2011), ya que en el genoma de *X. dendrorhous* se encontró un gen que podría cumplir esta función (Bravo y cols., 2012). Como en la cepa CBSTr el gen *crtR* está interrumpido (Alcaíno y cols., 2008), representa un buen modelo de estudio para evaluar la participación de una vía donadora de electrones alternativa a CPR. De esta manera, los análisis de carotenoides y ergosterol se realizaron desde muestras que se tomaron luego de 21, 38, 72 y 120 h de cultivo de las cepas CBS 6938 (silvestre) y CBSTr (mutante *crtR*⁻) (Figura 4). Estos

tiempos representan las etapas exponencial temprana, exponencial media, estacionaria temprana y estacionaria tardía de crecimiento de la levadura, respectivamente. En cuanto a la tolerancia a benzoato, se comparó cualitativamente el crecimiento de la cepa silvestre y de la mutante *crtR*⁻ en presencia de ácido benzoico.

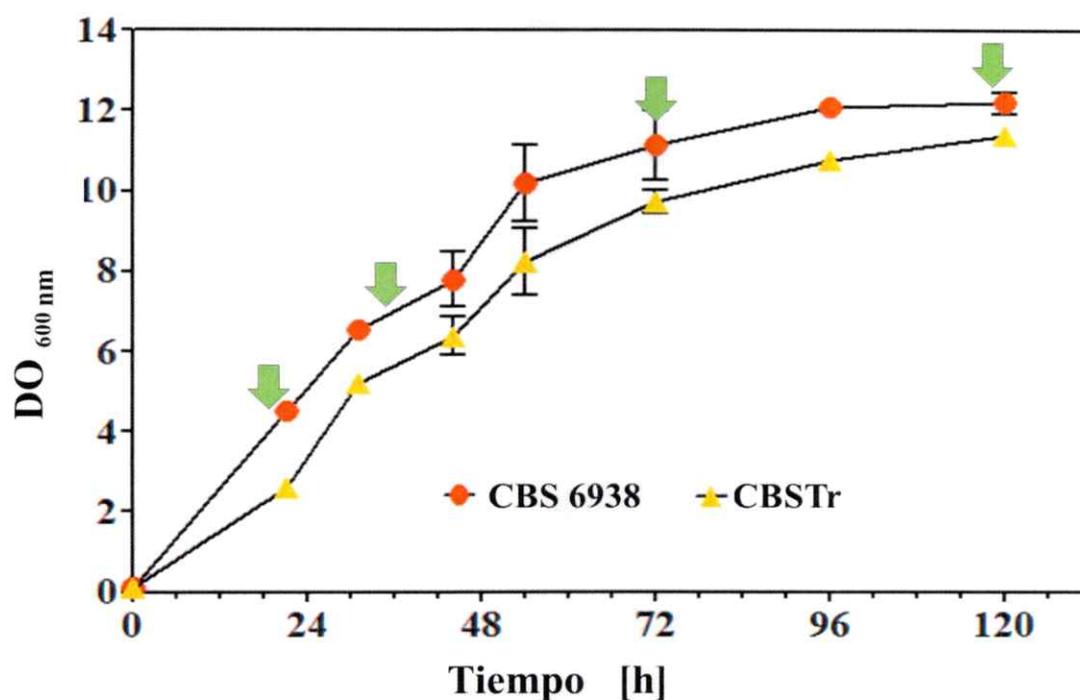


Figura 4. Curvas de crecimiento de las cepas CBS 6938 y CBSTr. Las cepas se cultivaron en triplicados a 22°C en medio YM con agitación constante. Las flechas verdes indican los tiempos (21, 38, 72 y 120 h) en que se tomaron las muestras para la extracción de carotenoides (punto 3.1.1), esteroides (punto 3.1.2), RNA (punto 3.5) y para la preparación de fracción microsómica (punto 3.5).

3.1.1. Producción de carotenoides.

En la Figura 5 se puede apreciar la notoria diferencia en la coloración de los cultivos de ambas cepas en estudio: la cepa silvestre tiene la pigmentación anaranjada característica de *X. dendrorhous*, en cambio CBSTr es de color amarillo. Lo anterior sugiere que la producción de carotenoides en ambas cepas es radicalmente diferente, lo que se confirmó cuantitativamente. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 4, donde

se observa que en todos los tiempos analizados, la cepa silvestre CBS 6938 contiene menos carotenoides totales que la cepa CBSTr, llegando a producir un 64 % menos de carotenoides por peso seco de levadura luego de 120 h de cultivo. A continuación se analizó la composición de los carotenoides producidos por ambas cepas mediante RP-HPLC. Como era esperado, la cepa CBSTr no produce astaxantina, siendo el β -caroteno el carotenoide principal a diferencia de la cepa silvestre cuyo carotenoide principal es astaxantina (Alcaíno y cols., 2008) (Figura 6).

Tabla 4. Producción de carotenoides totales a lo largo de la curva de crecimiento de la cepa silvestre y mutante de *X. dendrorhous*

Tiempo [h]	Pigmentos Totales [ug/g peso seco]	
	CBS-6938	CBSTr
21	15,4 \pm 3,3	50,5 \pm 5,9
38	26,8 \pm 0,6	30,2 \pm 2,6
72	441,2 \pm 9,9	661,2 \pm 90,1
120	476,1 \pm 22,0	783,0 \pm 59,2

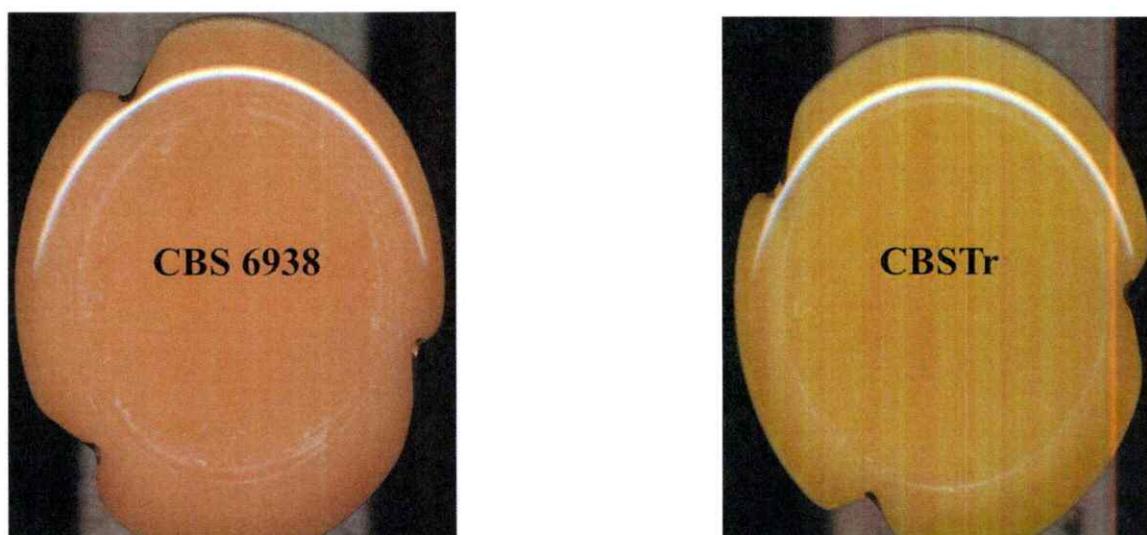


Figura 5. Fenotipo de las cepas de estudio de *X. dendrorhous*. Fotografía de los cultivos en matraces de la cepa parental CBS 6938 y la cepa mutante *crtR*⁻ CBSTr, luego de 120 h de cultivo en medio YM a 22 °C.

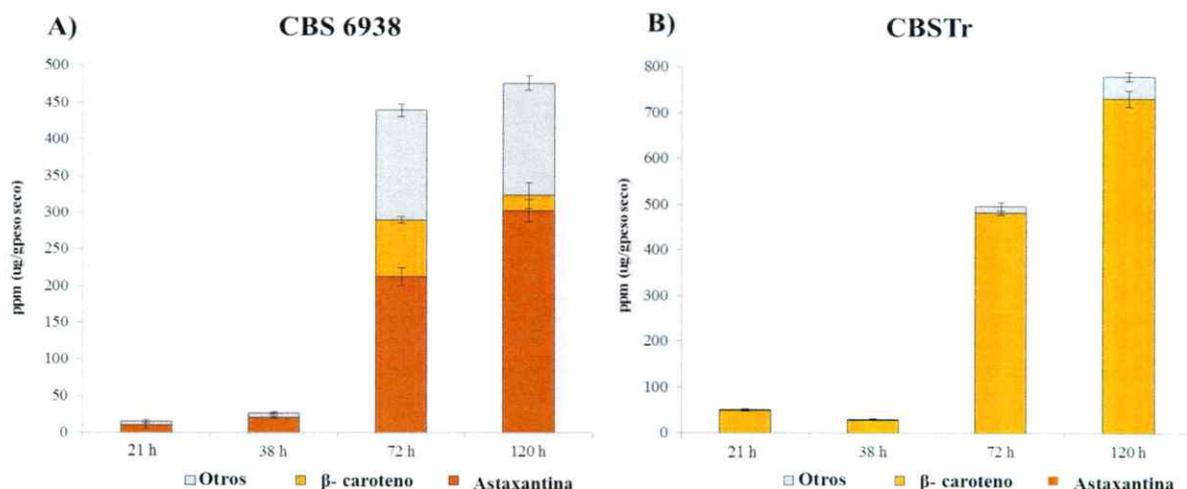


Figura 6. Análisis de la composición de carotenoides. Cantidad de pigmentos mayoritarios en 4 puntos de la curva de crecimiento (21, 38, 72 y 120 h): **A)** Cepa CBS 6938. **B)** Cepa CBSTr. La categoría “otros” incluye carotenoides bajamente representados como hidroxitoruleno, hidroxiequinenona, licopeno, cantaxantina, fenicoxantina y equinenona. Los datos corresponden al promedio de tres experimentos independientes.

3.1.2. Producción de esteroides.

En *X. dendrorhous* se determinó que la enzima CYP61 es esencial para la síntesis de ergosterol. Las cepas mutantes *cyp61⁻* no producen ergosterol y acumulan dos intermediarios de su síntesis con 15 y 22 min de tiempo de retención luego de RP-HPLC (Loto y cols., 2012). Ambas cepas, CBS 6938 y CBSTr, producen niveles equivalentes de esteroides totales a lo largo de la curva de crecimiento, alcanzando la mayor producción a las 21 h de cultivo con aproximadamente 8 mg por g de levadura seca (Tabla 5). Sin embargo, se esperaba que la composición de esteroides en la cepa CBSTr estuviese afectada por la mutación del gen *crtR* que codifica a la CPR de *X. dendrorhous*, lo cual se confirmó al analizar la composición de esteroides mediante RP-HPLC. La Figura 7 muestra como ejemplo uno de los cromatogramas obtenidos a partir de las muestras de esteroides extraídos de cada uno de los cuatro tiempos de la curva de crecimiento analizados. Por un lado, los esteroides de la cepa silvestre CBS 6938 (Figura 7A) mostraron solo un pico con un tiempo de retención de 16 min correspondiente a ergosterol, lo cual se confirmó al co-inyectar la muestra con ergosterol estándar. Por otra parte, las muestras de la cepa CBSTr presentaron tres picos: uno a los 16 min de tiempo

de retención que corresponde a ergosterol (pico 1) y otros dos picos: a los 14 (pico 2) y 21 (pico 3) min de retención (Figura 7B). Al co-inyectar una muestra de esteroides extraídos desde CBSTr con una de la cepa *cyp61* (Loto y cols., 2012), se comprobó que los picos 2 y 3 son los mismos a los observados en los mutantes *cyp61*. Así, se confirmó que la cepa parental produce 100 % de ergosterol, mientras que la cepa CBSTr produce alrededor de un 73 % de ergosterol y un 10 y 17 % de los esteroides correspondientes al pico 2 y 3, respectivamente (Figura 8). La acumulación de los mismos esteroides en la cepa CBSTr que en la cepa *cyp61*, además de ergosterol, sugiere que la funcionalidad de la enzima CYP61 se encuentra parcialmente afectada en la cepa CBSTr.

Tabla 5. Producción de esteroides totales a lo largo de la curva de crecimiento de la cepa silvestre y mutante de *X. dendrorhous*.

Tiempo [h]	Esteroides Totales	
	[mg de esteroides/g peso seco de levadura]	
	CBS 6938	CBSTr
21	8,6 ± 0,3	7,9 ± 0,2
38	6,9 ± 0,3	5,2 ± 0,3
72	4,7 ± 0,2	4,9 ± 0,3
120	4,2 ± 0,2	4,4 ± 0,1

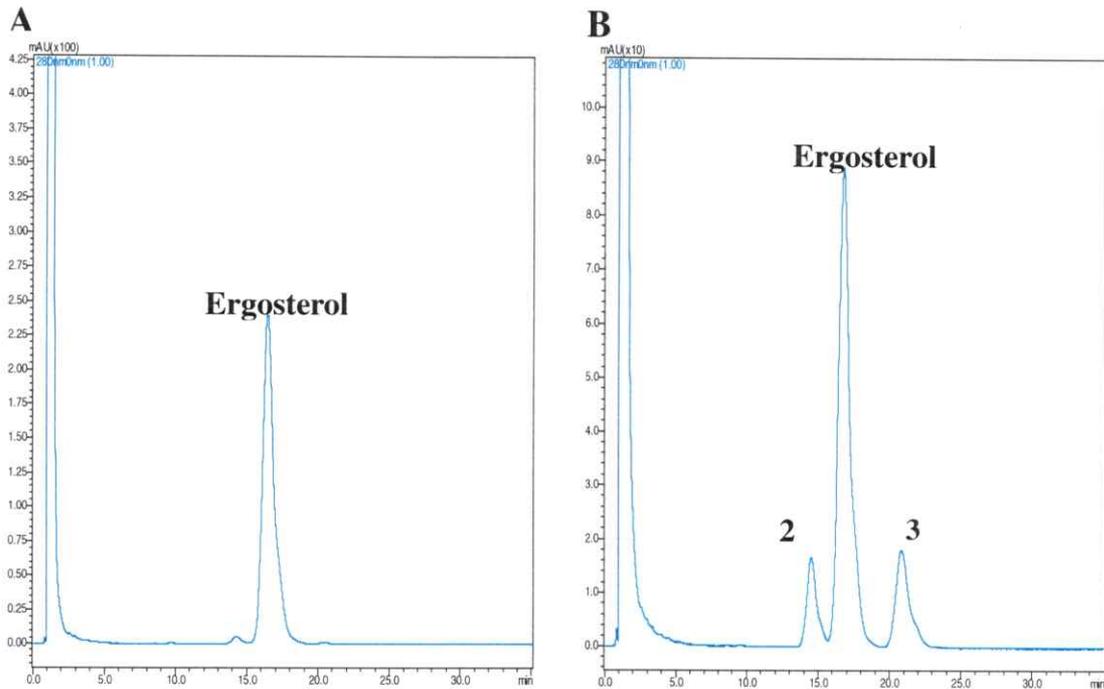


Figura 7. Cromatogramas representativos obtenidos mediante RP-HPLC a 280 nm de esteroides producidos por las cepas CBS 6938 y CBSTr. A) Cromatograma de la muestra de la cepa silvestre CBS 6938 (72 h de cultivo): presenta sólo un pico principal con un tiempo de retención de 16 min que corresponde a ergosterol. B) Cromatograma de la muestra de la cepa CBSTr (72 h de cultivo): presenta tres picos con 16 (ergosterol, pico 1), 14 (pico 2) y 21 (pico 3) min de tiempo de retención.

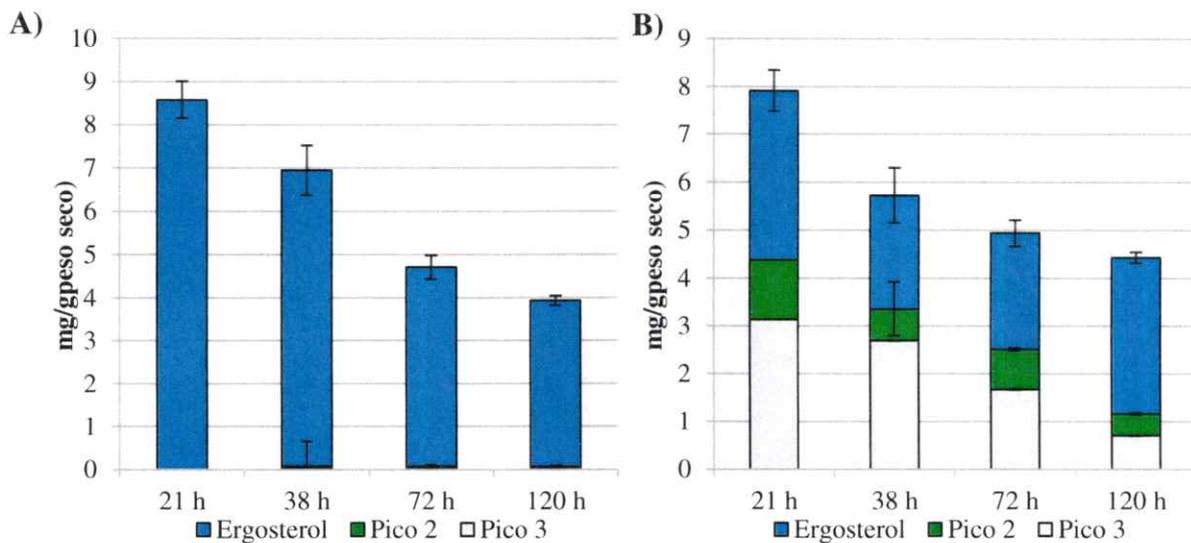


Figura 8. Producción y composición de esteroides en las cepas CBS 6938 y CBSTr de *X. dendrorhous* a lo largo de la curva de crecimiento. A) Cepa CBS 6938: en todas las muestras analizadas de todos los tiempos, la cepa CBS 6938 contiene alrededor de un 100 % de ergosterol. B) Cepa CBSTr: en todas las muestras analizadas de todos los tiempos, la cepa CBSTr contiene alrededor de un 73 % de ergosterol.

3.1.3. Crecimiento en medio de cultivo sólido con ácido benzoico.

En el genoma de la cepa silvestre se identificó otro gen que codifica una enzima P450 que, según su secuencia, probablemente participa en la descomposición de compuestos fenólicos tóxicos. Para evaluar esta posibilidad, se sembraron micro-gotas de diluciones seriadas de un cultivo en fase exponencial de crecimiento de la cepa parental y de CBSTr en placas con medio YM-agar (control) e YM-agar suplementado con ácido benzoico a 250 mg/mL (Figura 9 A) de modo de obtener colonias aisladas. Cualitativamente se observó que el ácido benzoico afecta el crecimiento en ambas cepas, teniendo un mayor efecto sobre la cepa CBSTr. Similares resultados se observaron al sembrar ambas cepas con un asa en ambos medios (Figura 9 B). Se observó que las colonias en presencia de ácido benzoico tienen un menor tamaño, lo que es aún más pronunciado en la cepa CBSTr. Estos resultados indican que la cepa CBSTr es más sensible al ácido benzoico, lo que hace suponer que la actividad de la enzima benzoato para-hidroxilasa en ésta cepa se encuentra disminuida por la mutación *crtR*.

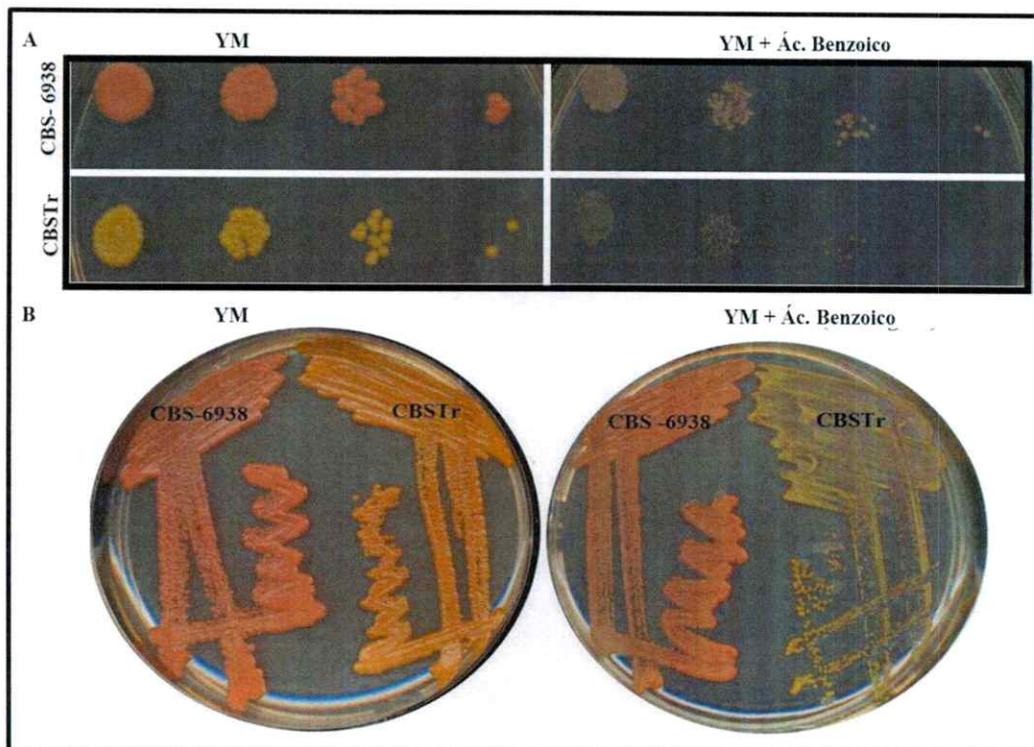


Figura 9. Cultivo de las cepas CBS 6938 y CBSTr en medio YM-agar en ausencia o presencia de ácido benzoico. A) Sembrado de micro-gotas de diluciones seriadas de cultivos en fase exponencial de crecimiento en YM-agar e YM-agar suplementado con ácido benzoico a 250 mg/mL. **B)** Sembrado de ambas cepas con un asa en medio YM-agar sin y con la suplementación de ácido benzoico 250 mg/mL.

3.2. Identificación en el genoma de *X. dendrorhous* y caracterización de los posibles genes *CBR* y *CYB5* que codifican donadores de electrones alternativos a CrtR.

Para identificar los posibles genes de donadores alternativos de electrones (*CBR* y *CYB5*), se analizó la base de datos del genoma y transcriptoma de la cepa UCD 67-385 de *X. dendrorhous* disponibles en nuestro laboratorio. Mediante una búsqueda bioinformática utilizando la herramienta BLAST del programa CLC Genomics Workbench 5, se comparó la base de datos de *X. dendrorhous* con secuencias nucleotídicas homólogas de cada gen disponibles en la base de datos GenBank. De esta manera, se logró identificar la secuencia génica y de cDNA de ambos genes, y se

determinó su estructura. Además se realizó un análisis de la secuencia traducida *in silico* con los softwares PredicProtein e InterProScan disponibles libremente en línea.

Se identificaron dos genes que posiblemente codificarían a CBR, que llamamos *CBR-1* y *CBR-2*. El gen *CBR-1* posee un tamaño de 1.472 pb con siete exones (Figura 10 A) que forman un ORF de 883 pb. La traducción *in silico* de este ORF genera una proteína de 289 aminoácidos con 31,48 KDa de peso molecular (Figura 11 A). El gen *CBR-2* tiene un tamaño de 1.951 pb con nueve exones (Figura 10 B) y un ORF de 993 pb. Su traducción *in silico* indicó que el gen *CBR-2* codificaría una proteína de 330 aminoácidos con un peso molecular de 35,35 KDa (Figura 11 B). El análisis con PredictProtein arrojó los tres dominios característicos de estas flavoproteínas: i) de unión a NADH, ii) de unión a FAD y iii) trans-membrana en el N-terminal. Al utilizar la herramienta PSORT, la cual se basa en el método de McGeoch's (Nakay y Horton, 1996) y predice la localización sub-celular de proteínas, encontramos que *CBR-1* probablemente se localiza en el retículo endoplasmático, mientras que *CBR-2* se localizaría en la membrana mitocondrial. Por otra parte, el análisis filogenético de las proteínas *CBR-1* y *CBR-2* de *X. dendrorhous* traducidas *in silico* en conjunto con otras CBRs de hongos disponibles en la base de datos UniProtKB, agrupó a *CBR-1* junto con CBRs descritas como microsómicas y a *CBR-2*, con las mitocondriales (Figura 11 C). Por esta razón, lo más probable que *CBR-1* (y no *CBR-2*) estaría participando en los sistemas P450 de clase II de *X. dendrorhous*. Por otro lado, se encontró un gen de 1.091 pb con seis exones, que codificaría a *CYB5*, el cual denominamos *CYB5-1* (Figura 12 A). Este gen forma un ORF de 444 pb y su traducción *in silico* resulta en una proteína de 148 aminoácidos con un peso molecular calculado de 16,07 KDa. La secuencia

traducida presentó los dominios característicos de la familia CYB5: i) de unión a membrana en el N-terminal y ii) de unión al grupo hemo que según la nomenclatura usada en la base de datos PROSITE, su patrón es [FY]-[LIVMK]-{I}-{Q}-H-P-[GA]-G (nomenclatura según PROSITE, cada “-” indica la posición de cada aminoácido, entre [] se indican los aminoácidos aceptables y entre { } los que no deben ir en esa posición) (De Castro y cols., 2006) (Figura 12 B). Los porcentajes de identidad de CYB5-1 con otras CYB5 de hongos es entre un 24 a 41 %, siendo la región de unión al grupo hemo la más conservada (Figura 12 C).

En el trabajo de Alcaíno y cols. (2008) se determinó la presencia de un solo gen de CPR, pero dado que a la fecha se cuenta con el genoma y transcriptoma de la levadura, se realizó el mismo análisis bioinformático con la intención de encontrar otros genes que codificarían CPRs. Esto permitió comprobar que no existen otras secuencias que codificarían CPRs que compensen y confieran redundancia funcional. Sin embargo, en este trabajo se logró identificar un gen que codificaría una reductasa del tipo CrtR, cuyo producto génico carece del dominio de trans-membrana característico de éstas flavoproteínas que permite su anclaje en la membrana del retículo endoplásmico. Este nuevo gen se llamó *NRI* (Novel Reductase 1), tiene un tamaño 2.570 pb con 9 exones, un ORF de 1.896 pb (Figura 13 A) y que codificaría una proteína de 631 aminoácidos cuyo peso molecular sería de 71,15 KDa (Figura 13 B).

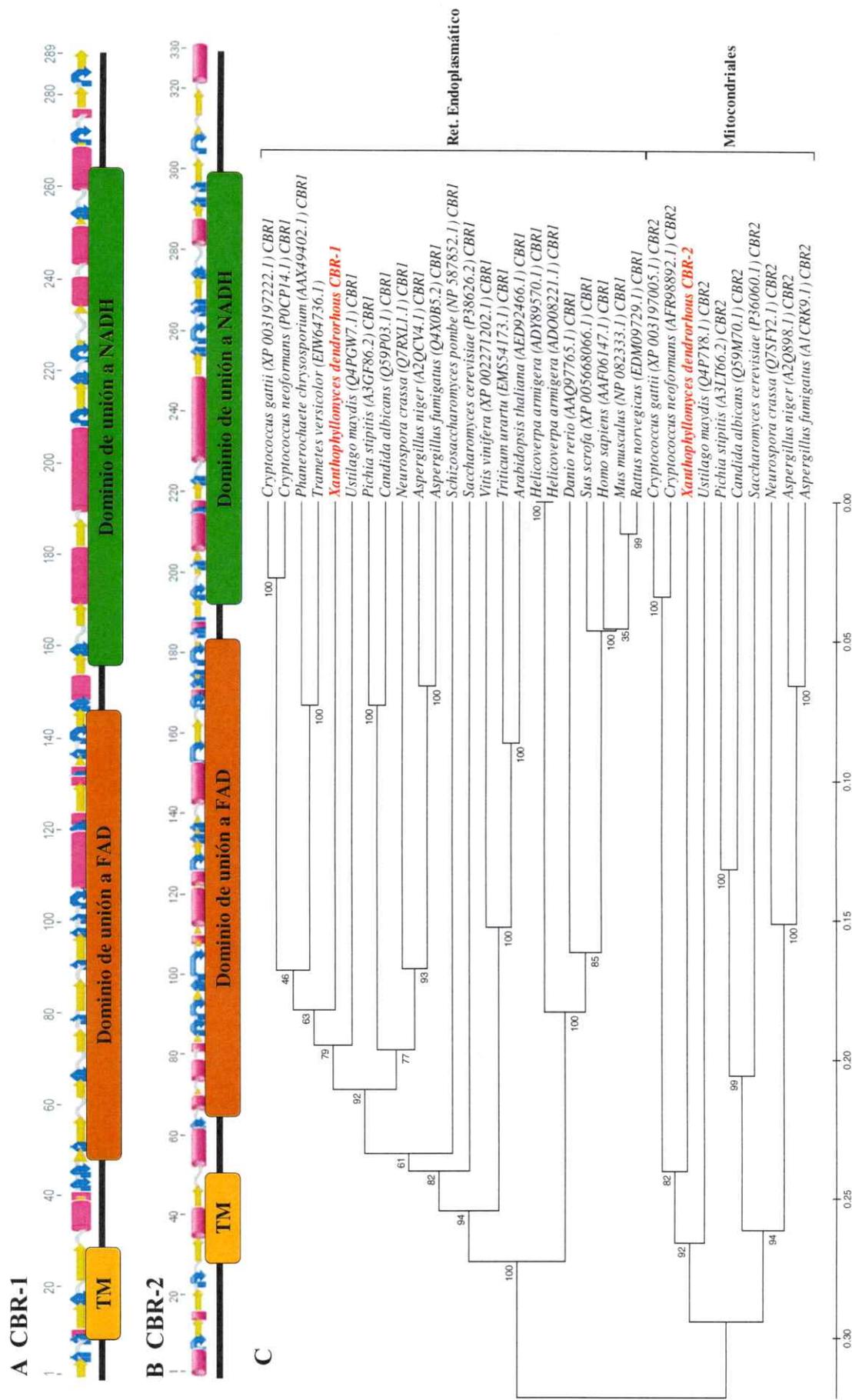
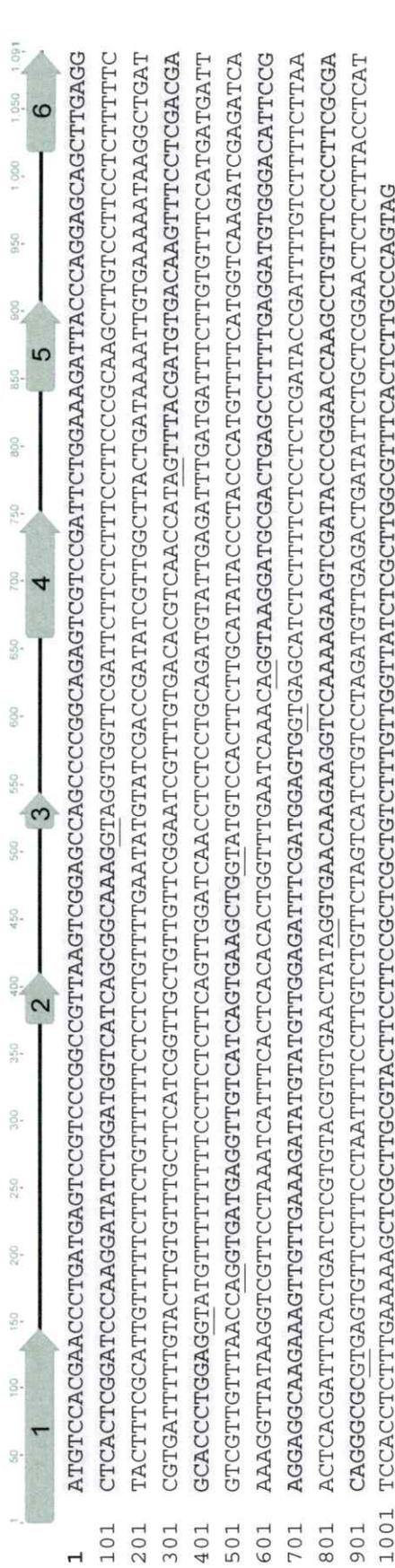


Figura 11. Estructura secundaria de CBRs traducidas *in silico* con sus dominios característicos y análisis filogenético A) Estructura secundaria de CBR-1. B) Estructura secundaria de CBR-2. En amarillo se muestra el dominio trans-membrana, en naranja y verde el dominio de unión a FAD y NADH, respectivamente C) Análisis filogenético con CBRs de otros hongos y su localización sub-celular, entre paréntesis se indica su número de acceso a UniProtKB y en cada nodo se indica el valor de *Bootstrap* de 1000 iteraciones.

A CYB5-1



B



C

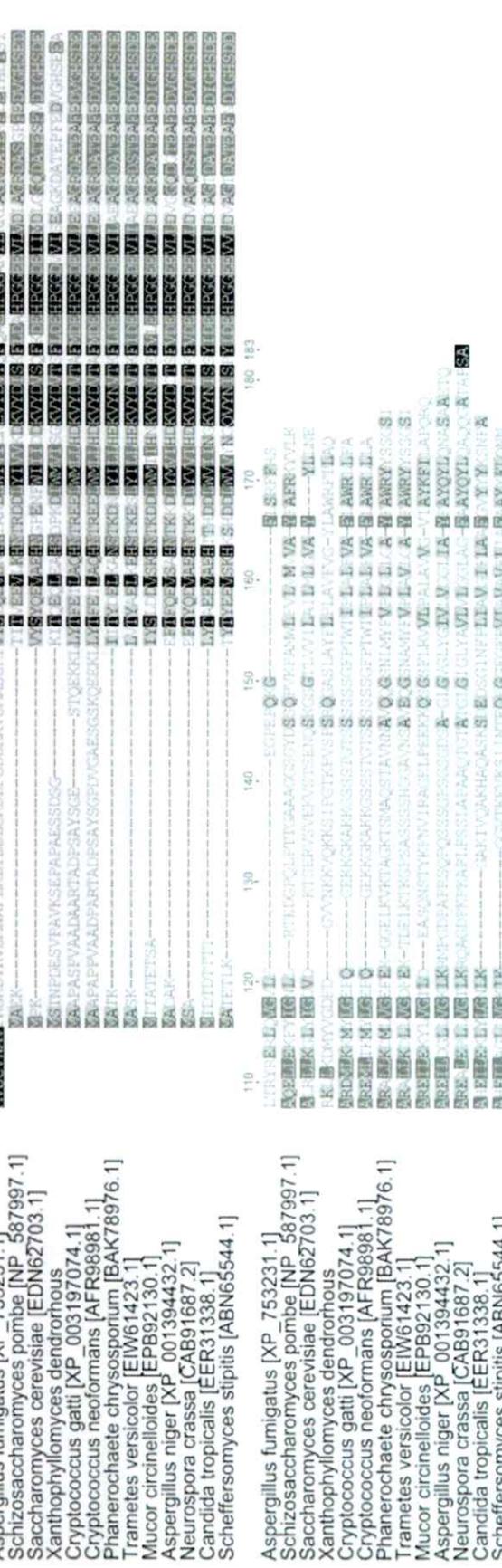


Figura 12. Esquema y secuencia del gen CYB5-1 de X. dendrorhous. A) Secuencia nucleotídica y estructura génica del gen *CYB5-1*, en gris se destacan los seis y subrayado se encuentran los sitios dadores y aceptores de empalme en cada intrón. B) Estructura secundaria de la proteína traducida *in silico* con los dominios conservados de la familia CYB5. En amarillo y café se muestran los dominios trans-membrana y de unión al grupo hemo. C) Alineamiento mediante MUSCLE de CYB5-1 de *X. dendrorhous* con CYB5 de otros hongos, la escala de grises indica el grado de similitud y entre paréntesis se indica el número de acceso a GeneBank.

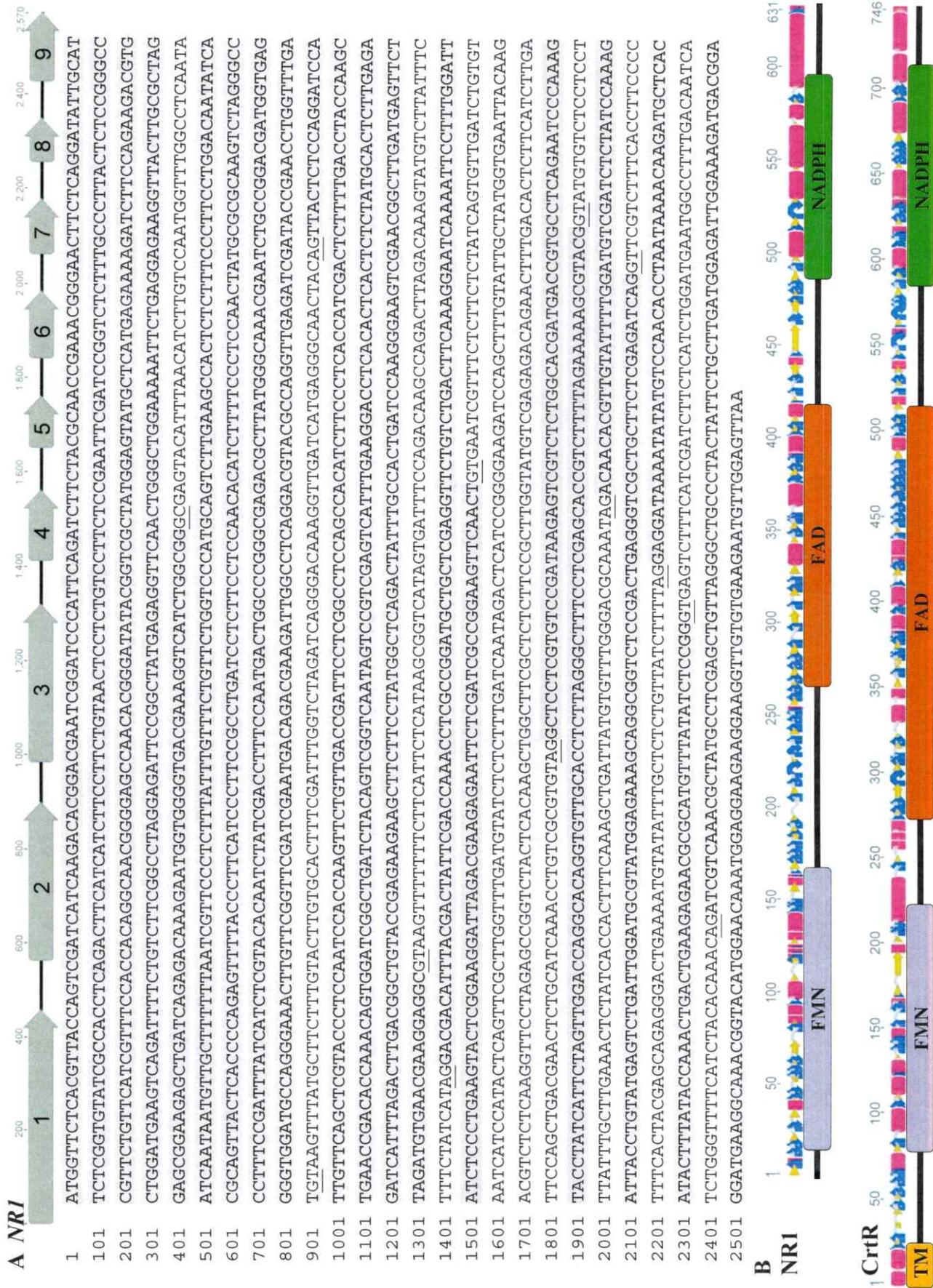


Figura 13. Análisis bioinformático del gen *NRI* de *X. dendrorhous*. **A)** Secuencia nucleotídica y estructura génica del gen *NRI*, en gris se destacan los seis y subrayado se encuentran los sitios donadores y aceptores de empalme en cada intrón. **B)** Estructura secundaria de la proteína *NRI* y *crtr* traducida *in silico*, se muestran los dominios conservados de cada una. En amarillo, lila, naranja y verde se muestran los dominios trans-membrana, de unión a FMN, FAD y NADPH, respectivamente.

3.3. Implementación y optimización de la metodología para la obtención de la fracción microsómica con proteínas activas de *X. dendrorhous*.

Las proteínas CPR, CBR y CYB5 son proteínas ancladas al retículo endoplasmático (von Jagow y Sebald, 1980; van de Brink y cols., 1996). Por ello, como una aproximación para evaluar la funcionalidad de éstas enzimas, se determinó la actividad citocromo c reductasa de extractos microsómicos. En primer lugar fue necesario implementar un método eficiente de obtención de la fracción microsómica de *X. dendrorhous*. La actividad enzimática se determinó por medio del ensayo citocromo c reductasa, el cual utiliza como sustrato artificial a la proteína citocromo c (cit c) en presencia de un cofactor (NADPH o NADH). La cinética de reacción se midió espectrofotométricamente a 550 nm ya que cit c presenta un pico de absorbancia en estado reducido a ésta longitud de onda. La unidad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima que puede catalizar la reducción de 1 μmol de cit c en presencia de 100 μM de NAD(P)H por min a pH de 7,8 a 22 ± 1 ° C de acuerdo a lo indicado por el proveedor del kit. Para la optimización de la obtención de proteínas microsómicas se realizó la extracción de proteínas de un cultivo de la cepa UCD 67- 385 en fase exponencial de crecimiento (48 h) en medio YM con agitación constante a 22 °C. Una vez colectadas las células, se probaron 3 métodos de ruptura celular de acuerdo a la Tabla 3. En cada caso se evaluó en los extractos proteicos obtenidos: la cantidad de proteínas extraídas (por el método de Bradford), el porcentaje de ruptura celular (por conteo celular pre- y post- ruptura) y la actividad citocromo c reductasa en presencia de NADPH. Cada medición se realizó por triplicado técnico para tres muestras biológicas. La Tabla 6 resume los resultados de actividad obtenidos. Si bien la ruptura celular con prensa fría arrojó los mejores resultados, ésta requiere ser enfriada a -78 °C por 12 h previ6 al procesamiento de cada muestra lo cual limita su uso. Sin embargo, la ruptura por el por método de sonicación, arrojó resultados similares a los obtenidos por ruptura con prensa fría. Por este motivo, la metodología más apropiada para la ruptura celular para luego medir la actividad citocromo c reductasa resulta ser mediante sonicación tanto por la factibilidad técnica, ya que permite el procesamiento de una mayor cantidad

de muestras en un día, como por el porcentaje de ruptura celular que permite obtener una alta cantidad de proteína activa para los ensayos enzimáticos posteriores.

Tabla 6. Evaluación de diferentes métodos de ruptura celular para obtener la fracción microsómica con proteínas activas.

Método de Ruptura celular	Proteínas [$\mu\text{g/ml}$]	Porcentaje de ruptura* [%]	Actividad enzimática [U/mg prot]
Homogenizador	960 \pm 70	22 \pm 7,8	7,4 \pm 1,3
Prensa Fría	2810 \pm 150	51 \pm 6,4	8,7 \pm 1,0
Sonicador	2410 \pm 90	47 \pm 5,7	9,9 \pm 1,5

*El porcentaje de ruptura celular se determinó de dos formas: i) conteo de células totales y ii) midiendo la DO_{600} de la muestra antes y después del tratamiento.

3.4. Determinación de la expresión a nivel de transcrito de los genes *CBR*, *CYB5*, *NRI* y *crtR*; y actividad citocromo c reductasa a lo largo de la curva de crecimiento de la cepa silvestre y la mutante *crtR*⁻ de *X. dendrorhous*.

Con el objetivo de obtener una aproximación de la funcionalidad de los genes de las enzimas identificadas en este trabajo que podrían estar relacionados con las diferencias fenotípicas encontradas entre las cepas CBS 6938 (parental silvestre) y CBSTr (*crtR*⁻), se determinó los niveles expresión de los genes *CBR-1*, *CYB5-1*, *NRI* y *crtR*. Además se evaluó la actividad citocromo c reductasa en estas cepas. Los niveles de transcritos de los genes *crtR*, *CBR-1*, *CYB5-1* y *NRI*, se cuantificaron mediante RT-qPCR y los valores obtenidos fueron normalizados empleando el gen de actina [GenBank X89898.1] como referencia. Se puede observar que los niveles de transcritos del gen *CBR-1* son significativamente mayores en la cepa CBSTr respecto a la cepa silvestre. La diferencia se observó principalmente en las primeras etapas de crecimiento (21, 38 y 72 h) alcanzando de 2 a 3 veces más en CBSTr. Sin embargo, los niveles de este gen en etapa estacionaria tardía de crecimiento es similar en ambas cepas (Figura 14 A). Por otro

lado, la expresión del gen *CYB5-1* fue entre 2 a 5 veces mayor en la cepa CBSTr respecto a la cepa parental en las fases exponencial y estacionaria temprana de crecimiento (21, 38 y 72 h de cultivo). Al igual que en el caso anterior, no se observó una diferencia significativa en la expresión de *CYB5-1* entre ambas cepas en la fase estacionaria tardía de crecimiento (120 h de cultivo) (Figura 14 B). Además, se determinaron los niveles de expresión del gen *CBR-2*, la cual según los análisis bioinformáticos codificaría una CBR mitocondrial. En este caso, la mayor diferencia entre ambas cepas se observó a las 21 y 72 h de cultivo, siendo aproximadamente 2 veces mayor en la cepa CBSTr que en la cepa silvestre, sin encontrar diferencias significativas de expresión luego de 38 y 120 h de cultivo (datos no mostrados). La expresión del gen *NR1*, que codificaría una enzima tipo CPR citoplasmática ya que carece del dominio de trans-membrana, no presentó diferencias significativas en su expresión entre ambas cepas durante las primeras etapas de crecimiento; sin embargo, luego de 120 h se observó un incremento en la cepa silvestre (Figura 14 C).



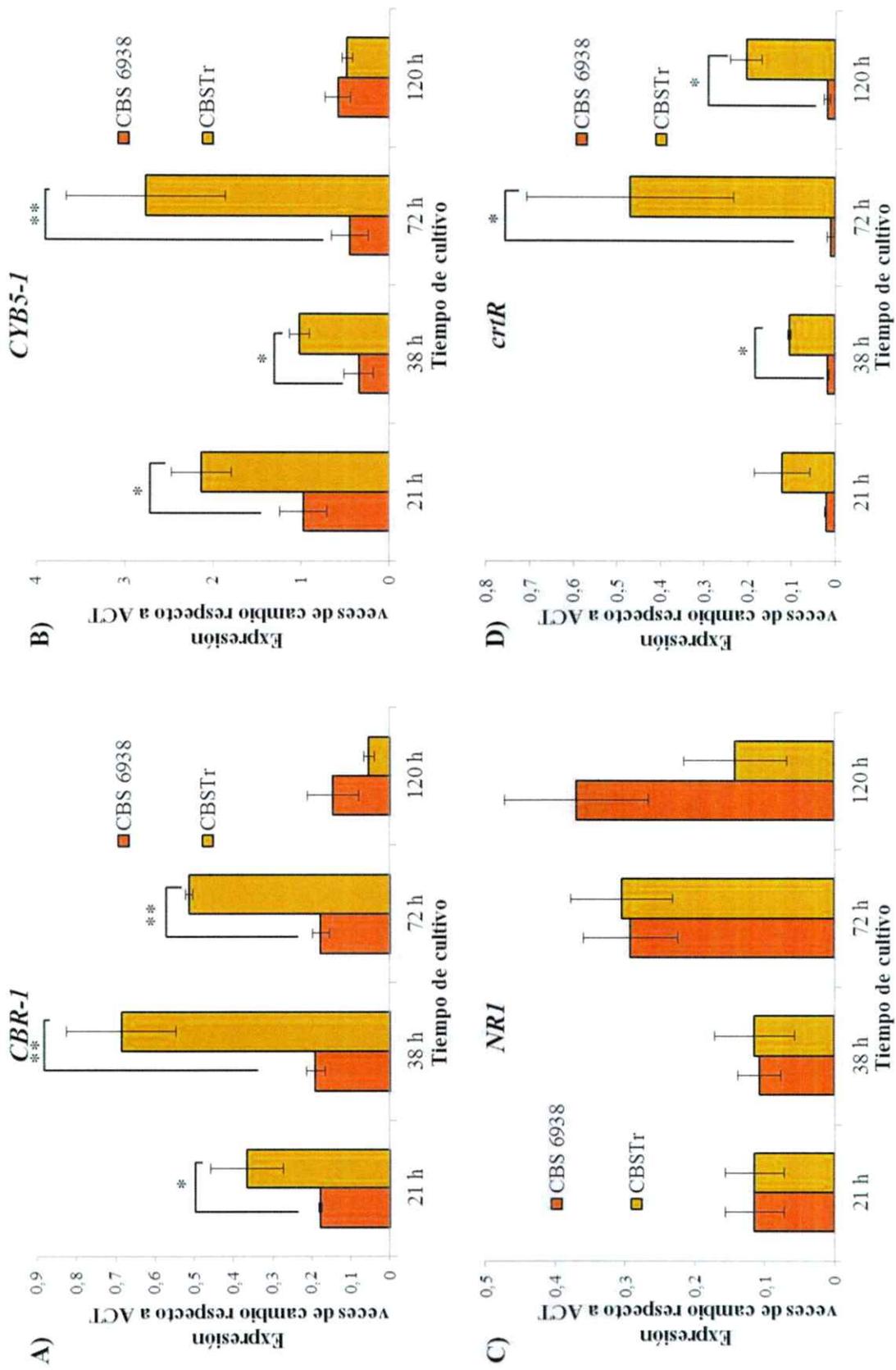


Figura 14. Niveles de expresión de los genes en estudio por RT-qPCR a lo largo de la curva de crecimiento de las cepas CBS 6938 (silvestre) y CBSTr (mutante *crtR*). Nivel de expresión relativo del gen A) *CBR-1*, B) *CYB5-1*, C) *NRI* y D) *crtR*. Los niveles de expresión se normalizaron con respecto al gen de actina (*ACT*) como referencia. Los resultados corresponden al promedio de tres muestras. Prueba t-Student: * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$

Por último, se determinó los niveles de expresión del gen *crtR*. Este gen en la cepa CBSTr está interrumpido por un módulo que confiere resistencia a higromicina B, lo que impide la síntesis de una proteína funcional. Sin embargo, se podrían generar transcritos interrumpidos (truncos) por el módulo mencionado, por esto se diseñaron oligonucleótidos que permitieran detectar este transcrito trunco. Se observó que la expresión de *crtR* durante la curva de crecimiento de la cepa CBSTr siempre fue mayor (4-5 veces) que en la silvestre, siendo a las 72 h de cultivo el mayor nivel de expresión alcanzado (Figura 14 D). La expresión de *crtR* en la cepa silvestre se mantuvo en un nivel bajo y constante durante el crecimiento, como fue reportado anteriormente (Alcaíno y cols., 2008).

Con el objetivo de evaluar la funcionalidad de las enzimas reductasas dependientes de NADH (vía CBR-CYB5) o NADPH (CrtR) en las cepas CBS 6938 y CBSTr, se obtuvo la fracción microsómica de ambas cepas luego de 21, 38, 72 y 120 h de cultivo para determinar la actividad citocromo c reductasa. Dichas muestras se tomaron junto con las muestras desde las cuales se extrajo carotenoides, esteroides y RNA para los análisis en los objetivos anteriores. El pellet de células obtenido de las muestras, se sometió a un proceso de ruptura mediante sonicador bajo las condiciones previamente optimizadas para obtener proteínas activas. Luego, mediante centrifugación diferencial se obtuvo el pellet de 100.000 x g, denominado fracción microsómica que contiene las proteínas ancladas a membrana del retículo endoplasmático y al Golgi. Luego, se realizaron los ensayos enzimáticos de actividad citocromo c reductasa y con la intención de evaluar la preferencia de cofactor, los ensayos se realizaron con los

cofactores NADH o NADPH lo que estaría relacionado con la vía de donación de electrones (CBR-CYB5 o CrtR, respectivamente) que estaría participando en la correspondiente fracción microsómica de *X. dendrorhous*. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 7. Las fracciones microsómicas de las muestras obtenidas luego de 21, 38, 72 y 120 h de cultivo de la cepa silvestre presentaron actividad citocromo c reductasa con ambos cofactores, la que fue similar en todas las muestras. Sin embargo, se observó diferencias entre los cofactores utilizados. La actividad enzimática fue de 2 a 4 veces mayor en presencia de NADPH en comparación con NADH en todas las muestras analizadas. Por otro lado, las fracciones microsómicas de la cepa CBSTr, mutante *crtR*, presentaron una mayor actividad citocromo c reductasa cuando se utilizó NADH como cofactor. Al igual que en la cepa silvestre, no se observaron grandes diferencias en las actividades enzimáticas al utilizar microsomas de distintos tiempos de la curva de crecimiento. Al comparar los resultados de los ensayos enzimáticos entre los microsomas de ambas cepas, se observó que la cepa CBSTr presentó alrededor de 3 veces menos actividad citocromo c reductasa con NADPH, en cambio con NADH la actividad fue casi 3 veces mayor en comparación con la cepa silvestre.

Tabla 7. Actividad citocromo c reductasa de la cepa CBS 6938 y CBSTr.

Tiempo Cultivo [h]	Cepa	Actividad citocromo c reductasa [U/mg prot]	
		NADPH	NADH
21	CBS 6938	6,36 ± 0,42	2,87 ± 0,80
	CBSTr	3,12 ± 0,94	6,12 ± 0,45
38	CBS 6938	4,20 ± 0,57	3,74 ± 0,89
	CBSTr	2,14 ± 0,83	8,04 ± 0,37
72	CBS 6938	7,11 ± 0,42	2,51 ± 0,33
	CBSTr	1,24 ± 0,59	5,78 ± 0,88
120	CBS 6938	8,69 ± 0,78	3,27 ± 0,51
	CBSTr	1,57 ± 0,96	7,24 ± 0,62

4. DISCUSIÓN

En el trabajo de Alcaíno y cols. (2008) se identificó y caracterizó un gen que codifica a una CPR y se demostró que era dispensable para la viabilidad de la célula pero esencial en la producción de astaxantina en *X. dendrorhous* (Alcaíno y cols., 2008). Dicho trabajo dio el primer indicio de la existencia de una vía donadora de electrones para P450s alternativa a CPR en *X. dendrorhous*. En este trabajo, los análisis fenotípicos se realizaron en una cepa silvestre (CBS 6938) y en una mutante que posee una interrupción del gen *crtR* (CBSTr) de *X. dendrorhous*. En primera instancia se realizó una curva de crecimiento de ambas cepas y se colectaron muestras a 24, 38, 72 y 120 h para el análisis de la producción carotenoides y ergosterol. En cuanto a la producción de carotenoides se determinó que ambas cepas producen un máximo de carotenoides a las 120 h, lo cual fue previamente reportado en varios estudios de *X. dendrorhous* (Verdoes y cols., 2003; Liu y Ju, 2007; Ukibe y cols., 2008). Por otro lado, la cepa CBSTr produce un 64 % más carotenoides que la cepa silvestre y se corroboró que la cepa CBSTr no produce astaxantina acumulando β -caroteno como carotenoide principal. Esto indica que la vía donadora de electrones independiente de CPR, probablemente la vía CBR-CYB5, no es capaz de sostener el flujo de electrones a la enzima P450 astaxantina sintasa (CrtS).

Se esperaba que en la cepa CBSTr, la ruta de biosíntesis de esteroides estuviese afectada dado que en ella participan dos enzimas P450: CYP51 y CYP61 (Loto y cols., 2012). Si bien se determinó que la cepa parental y la mutante CBSTr producen niveles equivalentes de esteroides a lo largo de la curva de crecimiento, siendo el principal de

ellos el ergosterol, la cepa CBSTr produce un 25 % menos ergosterol que la silvestre. Similar fue lo determinado en una cepa mutante del gen de CPR en *S. cerevisiae*, en la cual disminuyó en 4 veces la producción de ergosterol respecto a su parental (Venkateswarlu y cols., 1998). Interesantemente, el análisis de esteroides por RP-HPLC reveló la acumulación de los mismos intermediarios acumulados por el mutante *cyp61* además de ergosterol. Estos resultados indican que efectivamente en *X. dendrorhous* existe una vía donadora de electrones alternativa a CPR que puede sostener la síntesis de ergosterol en CBSTr, aunque con menor eficiencia que CPR. Esto es contrario a lo observado en *S. cerevisiae*, ya que la cepa mutante de CPR no presenta acumulación de intermediarios de la ruta de síntesis de ergosterol (Venkateswarlu y cols., 1998). También se demostró que en el hongo *Cochliobolus heterostrophus*, el cual posee dos genes que codifican CPRs, CPR1 transfiere los electrones a las P450s involucradas en la ruta de síntesis de ergosterol; sin embargo, en mutantes *CPR1* su función la complementa la vía CBR-CYB5 y no la otra CPR (CPR2) presente en este organismo (Lah y cols., 2011). En *S. cerevisiae*, otras evidencias revelan la importancia de la vía CBR-CYB5; por ejemplo, el doble mutante de *cyb5* y *cpr* es letal (Truan y cols., 1994) al igual que la escisión de los genes de CBR y CPR en conjunto, lo que fue demostrado con una cepa mutante condicional (Tiedje y cols., 2007). La capacidad de la cepa CBSTr de producir ergosterol revela la intercambiabilidad en el sistema dador de electrones en *X. dendrorhous* para las P450s involucradas en la síntesis de esteroides, no así para CrtS en la biosíntesis de astaxantina. Además, los resultados sugieren que la vía CBR-CYB5 tendría mayor afinidad por algunas P450s. Esto es apoyado por lo observado en ensayos *in vitro* de actividad CYP51 realizados con CBR-CYB5 y CPR de *S. cerevisiae* en los

cuales se determinó que CYP51 presenta una actividad equivalente al utilizar ambos donadores de electrones (Lamb y cols., 1999).

Por otro lado, se determinó el efecto del benzoato en ambas cepas (silvestre y mutante CBSTr) dado que este compuesto es degradado por la enzima P450 benzoato para-hidroxilasa en otros organismos (Lah y cols., 2011; Faber y cols., 2001; van de Brink y cols., 1996). Se observó que tanto la cepa silvestre como CBSTr son sensibles al benzoato, pero las colonias de la cepa mutante son más pequeñas al mismo tiempo de incubación, como se observa en la Figura 9 A. Estos resultados son similares a lo observado previamente en una cepa mutante *cpr⁻* de *S. cerevisiae*, la cual presenta un crecimiento reducido en presencia de benzoato y una restauración de su capacidad de crecimiento al complementar la mutación con el gen *CPR* silvestre (Lah y cols., 2011). Similarmente, una cepa mutante *knock-out* del gen de CPR en *G. fujikuroi* fue mucho más sensible al benzoato que la cepa silvestre debido a la pérdida de actividad de la P450 benzoato para-hidroxilasa (Malonek y cols., 2004). En general, los análisis fenotípicos de la cepa mutante *crtR⁻* presentan los primeros antecedentes de la presencia de una vía donadora de electrones alternativa a las enzimas P450s, probablemente la vía CBR-CYB5, en *X. dendrorhous*.

Por los motivos anteriores, se analizó el genoma y transcriptoma de *X. dendrorhous*, para encontrar y caracterizar los genes de la vía CBR-CYB5. De esta manera se identificó dos secuencias génicas que codificarían CBRs: *CBR-1* y *CBR-2*, que según análisis bioinformáticos, sus productos génicos contienen los tres dominios característicos de esta familia de proteínas: i) de unión a NADH, ii) unión a FAD y iii)

trans-membrana en el N- terminal (Karplus y cols., 1991) (Figura 11 A-B). Sin embargo, al predecir la localización sub-celular se encontró que CBR-1 se localizaría en el retículo endoplasmático y CBR-2 en la membrana mitocondrial. Similares resultados se encontraron al construir árboles filogenéticos donde CBR-1 se agrupó junto con CBRs microsómicas y por otro lado, CBR-2 junto a CBRs mitocondriales (Figura 11 C). Esto sugiere que probablemente CBR-1 sería parte de la vía alternativa transportadora de electrones a las P450 de clase II en *X. dendrorhous*. Por otro lado, también se encontró la secuencia nucleotídica de un posible gen CYB5 que llamamos *CYB5-1*. La proteína deducida sólo tiene 148 aminoácidos, lo que coincide con CYB5 de otros hongos que van desde 120 a 158 aminoácidos (Ichinose y Wariishi, 2012; Nierman y cols., 2005; Malmström y cols., 2007). Además, encontramos en *CYB5-1* la presencia de residuos conservados que han sido descritos (Vergeres y Waskell, 1995), particularmente el dominio de unión al grupo hemo que se localiza entre los aminoácidos 55 al 62 y la región de trans-membrana en el carboxilo terminal.

Previamente, se había reportado la presencia de un solo gen que codifica una P450 reductasa, *crtR*, en *X. dendrorhous* (Alcaíno y cols., 2008). Dado que actualmente se cuenta con el genoma y transcriptoma de la levadura, se realizó una búsqueda bioinformática con la intención de encontrar otros genes que codificarían CPRs. Esto permitió identificar una secuencia nucleotídica que codificaría una reductasa del tipo CPR, ya que la proteína deducida presenta los dominios conservados en CPR, de unión a FMN, FAD y NADPH, pero carece del dominio trans-membrana característico que le permite el anclaje al retículo endoplasmático a éstas flavoproteínas. Este gen se

denominó *NRI* (Novel Reductase 1). Similarmente, se han identificado otras enzimas del tipo CPR pero sin el dominio trans-membrana en células humanas e invertebrados (Kwasnicka-Crawford y Vincent, 2005; Paine y cols., 2005). Si bien se conoce la función de CPR en los sistemas P450s, el rol que podrían cumplir estas enzimas reductasas NR1 aún no está claro (Kwasnicka-Crawford y cols., 2003).

Interesantemente, la determinación de los niveles de expresión de los genes *CBR-1*, *CYB5-1*, *NRI* y *crtR* en las cepas silvestre y CBSTr, brindó una aproximación de la funcionalidad de las enzimas que codifican. Se observó que los niveles de expresión de *CBR-1* en la cepa CBSTr fue mayor que en la cepa silvestre durante la etapa exponencial y estacionaria temprana (Figura 14 A). Por otro lado, el gen *CYB5-1* tuvo una expresión muy elevada, siendo aproximadamente 4 veces mayor en las tres primeras etapas de crecimiento en la cepa CBSTr comparado con la cepa silvestre. En cambio, no se observaron diferencias significativas de expresión en la etapa estacionaria tardía de crecimiento en ninguno de los dos genes. Lamentablemente escasa información hay respecto a los niveles de expresión de *CBR* en hongos, los estudios se han centrado en expresarlas y realizar ensayos *in vitro* (Ichinose y Wariishi, 2012). Sin embargo, los mayores niveles de expresión de *CBR-1* y *CYB5-1* se podrían explicar como un mecanismo de compensación a la pérdida de función de *CrtR* en la cepa CBSTr. Para poder comprender esto, sería necesario analizar si el mayor nivel de sus transcritos efectivamente conlleva una mayor cantidad de la proteína respectiva. Sin embargo, no contamos con anticuerpos contra estas proteínas, por lo que como una aproximación alternativa evaluamos la actividad citocromo c reductasa con distintos cofactores (ver

más adelante). Por otro lado, la expresión del gen *NR1*, que codificaría una enzima tipo CPR pero citoplasmática ya que carece del dominio de unión a membrana, presentó niveles altos de expresión con un pico a las 72 h, pero éstos se mantuvieron equivalentes entre ambas cepas. El no observar diferencias en la expresión de *NR1* entre la cepa mutante *crtR* y silvestre sugiere que la función de NR1 sería independiente de CrtR. Si bien NR1 podría tener la capacidad de reducir a una P450, su posible localización citoplasmática sería una limitante para la interacción entre ellas. Por otra parte, se determinaron los niveles de transcritos *crtR* en ambas cepas. La cepa CBSTr posee el gen *crtR* interrumpido por un módulo que confiere resistencia a higromicina B lo que impediría la síntesis de una proteína silvestre; sin embargo, de igual forma se podrían generar los transcritos, aunque interrumpidos. Dado esto se diseñaron oligonucleótidos que reconocieran estos transcritos. Se observó de 2 a 3 veces mayor expresión de *crtR* en la cepa CBSTr en comparación con la silvestre. Varios estudios demuestran un mecanismo de co-regulación de la expresión génica de CPR y P450 característico en hongos (Baillie, 1993; Bhatagnar y cols., 1982). Se ha visto que enzimas P450 son inducibles por sustrato, es decir, al aumentar la concentración de su sustrato se ve incrementada de gran manera su expresión génica lo que además conlleva a un aumento en la expresión génica de su *partner redox* CPR (Lah y cols., 2011; van der Brink y cols., 1996; Sutter y cols., 1990; Ghosh y cols., 1983). Esto hace pensar que el aumento en la expresión de *crtR* en la cepa CBSTr podría ser por una co-regulación de la expresión del sistema P450 (CPR-P450) dada la acumulación del sustrato β -caroteno, lo cual podría ser confirmado al medir los niveles de expresión del gen *crtS*. Por otro lado,

la cepa silvestre presenta niveles de expresión bajos y constantes; similares patrones fueron los observados por Alcaíno y cols. (2008).

Finalmente, se determinó la actividad citocromo c reductasa en la fracción microsómica de las cepas CBSTr y silvestre. Para ello, fue necesario previamente implementar la metodología de obtención de la fracción microsómica con proteínas activas, resultando ser la sonicación el método más óptimo para la ruptura celular tanto por su factibilidad de operación como por el porcentaje de ruptura celular, cantidad de proteína y actividad citocromo c reductasa obtenida. Los resultados de los ensayos de actividad citocromo c reductasa realizados con la fracción microsómica de las cepas silvestre y mutante *crtR* a lo largo de la curva de crecimiento demuestran la funcionalidad de las vías dependientes de NADPH (probablemente CrtR) y NADH (probablemente la vía CBR-CYB5). Se determinó que la cepa silvestre presenta una mayor actividad citocromo c reductasa dependiente de NADPH, en cambio la cepa CBSTr (*crtR*), tiene mayor actividad al utilizar NADH como cofactor (Tabla 7). Cabe mencionar que, si bien se ha demostrado que CBRs de eucariontes superiores requieren de CYB5 para reducir cit c (Arinc y Cakir, 1999; Strittmatter y Velick, 1957), también CBR es capaz de reducirlo directamente (Bagnaresi y cols., 1997; Kitajima y cols., 1981). Por lo tanto, el ensayo citocromo c reductasa podría no demostrar una funcionalidad completa de la vía CBR–CYB5.

En conjunto, los resultados de expresión que muestran un aumento en los niveles de *CBR-1* y *CYB5-1* y la mayor actividad citocromo c reductasa dependiente de NADH en la cepa CBSTr, sugieren que en ausencia de la citocromo P450 reductasa CrtR, la

actividad de la vía donadora de electrones CBR-CYB5 se podría ver incrementada de manera de compensar la pérdida de actividad reductora de CrtR en *X. dendrorhous*.

5. CONCLUSIONES

Con los resultados de este trabajo se puede concluir que la enzima CrtR participa en la biosíntesis de astaxantina y de ergosterol en *X. dendrorhous*, donde hay enzimas P450s involucradas. Sin embargo, existe una vía alternativa a CPR de donación de electrones capaz de complementar la mutación del gen *crtR* en la síntesis de ergosterol (aunque con menor eficiencia), no así en la síntesis de astaxantina.

La metodología implementada en este trabajo para la obtención de la fracción microsómica en *X. dendrorhous* fue óptima y eficaz para realizar ensayos de reducción de citocromo c, como aproximación para evaluar posibles vías de reducción de citocromos P450.

Por último, los resultados obtenidos a nivel de expresión génica y de actividad citocromo c reductasa sugieren fuertemente la participación de una vía dependiente de NADH, probablemente la vía CBR-CYB5, como vía alternativa de donación de electrones a las enzimas P450 en *X. dendrorhous*, cuya actividad se ve incrementada en ausencia de CrtR.

6. PROYECCIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, sería de gran interés seguir estudiando la participación de la vía CBR-CYB5 como donadora alternativa de electrones a las enzimas P450 en *X. dendrorhous*. Por un lado, la funcionalidad de los genes *CBR-1* y *CYB5-1* se podría determinar construyendo cepas mutantes de ambos genes y evaluando sus fenotipos. Además, para obtener información de la regulación de la expresión génica de los sistemas P450 se podría analizar las zonas promotoras de los genes *CBR-1*, *CYB5-1* y *crtR* así como también determinar los niveles de expresión de los genes de P450. Esto acompañado de ensayos que permitan determinar los niveles de proteínas presentes daría cuenta del nivel de regulación que poseen estos genes. Finalmente, para conocer específicamente a que enzimas P450 la vía CBR-CYB5 le donaría electrones sería necesario caracterizar funcionalmente otras enzimas P450 en la levadura y realizar ensayos enzimáticos *in vitro* con las proteínas P450, CBR y CYB5 purificadas.

7. BIBLIOGRAFIA

- Alcaíno J., Romero I, Niklitschek N., Sepúlveda D., Rojas M.C., Baeza M., Cifuentes V. (2014). Functional characterization of the Xanthophyllomyces dendrorhous farnesyl pyrophosphate synthase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase encoding genes that are involved in the synthesis of isoprenoid precursors. PlosOne (en prensa)
- Alcaíno, J. (2002). Organización estructural del gen de la fitoeno sintasa en el genoma de Xanthophyllomyces dendrorhous (Ex: Phaffia rhodozyma). Tesis para optar al título de Ingeniera en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile.
- Alcaíno, J., S. Barahona, M. Carmona, C. Lozano, A. Marcoleta, M. Niklitschek, D. Sepúlveda, M. Baeza y V. Cifuentes. 2008. "Cloning of the cytochrome P450 reductase (crtR) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of Xanthophyllomyces dendrorhous." BMC microbiology 8: 169.
- An, G. H., D. B. Schuman y E. A. Johnson. 1989. "Isolation of Phaffia rhodozyma mutants with increased astaxanthin content." Applied and environmental microbiology 55: 116.
- Andrewes, A. G., H. J. Phaff y M. P. Starr. (1976). Carotenoids of Phaffia rhodozyma, a red-pigmented fermenting yeast. Phytochemistry 15: 1003-1007.
- Arinc E and Cakir D (1999) Simultaneous purification of cytochrome b5 reductase and cytochrome b5 from sheep liver. Int J Biochem Cell Biol 31:345-362
- Bagnaresi P, Basso B, Pupillo P.(1997). The NADH-dependent Fe(3+)-chelate reductases of tomato roots. Planta.202(4):427-34.
- Baillie GS (1993) The characterization of cytochromes P450 from Aspergillus fumigatus. Thesis No. DX 176244, University of Kent, Canterbury, UK
- Bernhardt, R. (2006). Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. JBiotechnol.124: 128-145.
- Bernhardt R. (1996). Cytochrome P450: Structure, function, and generation of reactive oxygen species, Rev. Physiol., Biochem. Pharmacol. 127: 137-221
- Bhatnagar, R. K., Ahmed, S., Kohli, K. K., Mukerji, K. G., y Venkitasubramanian, T. A. (1982). Induction of polysubstrate monooxygenase and aflatoxin production by phenobarbitone in Aspergillus parasiticus. Biochem. Biophys. Res. Commun.104:1287-1292.
- Bravo N., Barahona S., Baeza M., Cifuentes V., Alcaíno J., (2012). Caracterización de los gene de citocromo P450 mono-oxigenasas (P450oma) de la levadura carotenogénica Xanthophyllomyces dendrorhous. SoMiCh 2012
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. The FASEB journal 9: 1551.
- Britton, G., S. Liaaen-Jensen y H. Pfander. (2004). pp 5-6. Carotenoids handbook..Birkhäuser, Berlín.
- Cheng B, Yuan Q, Sun X, Li W. (2010). Enhanced production of coenzyme Q10 by overexpressing HMG-CoA reductase and induction with arachidonic acid in Schizosaccharomyces pombe. Appl Biochem Biotechnol,160:523-531.

- Chomczynski P., Sacchi Y.N.(1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159
- Correia MA, Mannering GJ.(1973) DPNH synergism of TPNH dependent mixed function oxidase reactions. *DrugMetab Dispos* 1973;1:139-149.
- de Castro E., Sigrist C.J.A., Gattiker A., Bulliard V., Petra S. Langendijk-Genevaux P.S., Gasteiger E. Bairoch A., Hulo N(2006).ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins.*Nucleic Acids Res.* 34:W362-W365.
- de la Fuente, J. L., M. Rodríguez-Saiz, C. Schleissner, B. Diez, E. Peiro y J. L. Barredo. (2010). "High-titer production of astaxanthin by the semi-industrial fermentation of *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *Journal of biotechnology* 148: 144-146.
- Estabrook, R.W. (2003). A passion for p450s (Remembrances of the early history of research on cytochrome P450). *Drug Metab. Dispos.* 31: 1461-1473
- Faber, B.W., Van Gorcom, R.F.M., and Duine, J.A. (2001) Purification and characterization of benzoate-parahydroxylase, a cytochrome P450 (CYP53A1), from *Aspergillus niger*.*Arch Biochem Biophys*394:245-254.
- Fischer M., Thai Q.K., Grieb M., Pleiss J. (2006). DWARF - a data warehouse system for analyzing protein families. *BMC Bioinformatics* 7: 495-505
- Frengova, G. I. y Beshkova, D. M. (2009). Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 36, 163-180.
- Ghosh DK, Dutta D, Samanta TB, Mishra AK (1983) Microsomal benzo(a)pyrene hydroxylase TS: assay and characterization of the enzyme system. *Biochem Biophys Res Comm* 113: 497±505
- Golubev W. I. (1995). Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Yeast* 11: 101-110.
- Hannemann F., Bichet A., Ewen KM., Bernhardt R. (2007). Cytochrome P450 systems—biological variations of electron transport chains, *Biochimica et Biophysica Acta* 3:330-344,
- Hasemann C., Kurumbail R., Boddupalli S., Peterson J., Deisenhofer J. (1995). Structure and function of cytochromes P450:a comparative analysis of three crystal structures, *Structure* 3:41-62.
- Higuera-Ciapara I, Felix-Valenzuela L, Goycoolea FM: Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2006, 46:185-196.
- Ichinose H y Wariishi H. (2012).Heterologous expression and mechanistic investigation of a fungal cytochrome P450 (CYP5150A2): involvement of alternative redox partners. *Arch Biochem Biophys.* 518(1):8-15.
- Iyanagi T, Mason HS. (1973). Some properties of hepatic reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome c reductase. *Biochemistry* Jun 5;12(12):2297-308
- Kajiwarra, S., P. D. Fraser, K. Kondo y N. Misawa. 1997. "Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*."

- Karplus PA, Daniels MJ, Harriot JR (1991) Atomic structure of ferredoxin-NADP+ reductase: prototype for a structurally novel flavoenzyme family. *Science* 251:60±66
- Khajamohiddin S., Chandramohan K., Thomas B. T., Jagjit S. Y. (2011). Cytochrome b5 reductase–cytochrome b5 as an active P450 redox enzyme system in *Phanerochaete chrysosporium*: Atypical properties and in vivo evidence of electron transfer capability to CYP63A2. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 509: 1, 26
- Kitajima S, Yasukochi Y, Minakami S. (1981). Purification and properties of human erythrocyte membrane NADH-cytochrome b5 reductase. *Arch Biochem Biophys*. (1):330-9.
- Kwasnicka-Crawford D.A., and Vincent S.R. (2005). Role of a novel dual flavin reductase (NR1) and an associated histidine triad protein (DCS-1) in menadione-induced cytotoxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 336(2):565-71.
- Lah L, Krasevec N, Trontelj P, Komel R. (2008). High diversity and complex evolution of fungal cytochrome P450 reductase: cytochrome P450 systems. *Fungal Genet Biol*. 45(4):446-58.
- Lah, L, Podobnik, B., Novak, M., Korošec, B., Berne S, Kraševc N, Zupanec N., Stojan J., Bohlmann J. y Komel R. (2011). The versatility of the fungal cytochrome P450 monooxygenase system is instrumental in xenobiotic detoxification. *Molecular Microbiology* 81(5), 1374–1389
- Lamb, D.C., Kelly, D.E., Manning, N.J., Kaderbhai, M.A., and Kelly, S.L. (1999). Biodiversity of the P450 catalytic cycle: yeast cytochrome b5/NADH cytochrome b5 reductase complex efficiently drives the entire sterol 14-demethylation (CYP51) reaction. *FEBS Lett* 462: 283–288.
- Libkind, D., Moliné, M., de García, V., Fontenla, S. y van Broock, M. (2008). Characterization of a novel South American population of the astaxanthin producing yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. 35, 151-158.
- Libkind, D., Ruffini, A., van Broock, M., Alves, L. y Sampaio, J. P. (2007). Biogeography, host specificity, and molecular phylogeny of the basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma* and its sexual form, *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied and environmental microbiology*. 73, 1120-1125.
- Liu YS, Wu JY. (2007) Perfusion culture process plus H2O2 stimulation for efficient astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnol Bioeng*, 97: 568-573
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25:402–408.
- Loto I, Gutiérrez MS, Barahona S, Sepúlveda D, Martínez-Moya P, Baeza M, Cifuentes V, Alcaíno J. (2012). Enhancement of carotenoid production by disrupting the C22-sterol desaturase gene (CYP61) in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiol*, 12:235.
- Lu, S. y Li, L. (2008). Carotenoid metabolism: biosynthesis, regulation, and beyond. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 778-785.

- Malmström L., (2007) Superfamily assignments for the yeast proteome through integration of structure prediction with the gene ontology. *PLoS Biol* 5(4): 76.
- Malonek, S. Rojas, MC, Hedden, P. Gaskin, P., Hopkins, P. y Tudzynski, B (2004). The NAD(P)H-cytochrome P450 reductase gene from *Gibberella fujikuroi* is essential for gibberellin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 279:25075-84
- Mansuy D. (1998) The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450, *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Pharmacol., Toxicol. Endocrinol.* 121 5–14.
- Maoka, T. (2011). Carotenoids in Marine Animals. *Marine Drugs* 9: 278-293
- Miki, W. 1991. "Biological functions and activities of animal carotenoids." *Pure Appl. Chem* 63: 141-146.
- Moktali V, Park J, Fedorova-Abrams ND, Park B, Choi J, Lee Y-H, Kang S. (2012). Fungal cytochrome P450 database 1.2, *BMC Genomics*, , 13:525
- Nakai K. y Horton P. (1996) .A Probabilistic Classification System for Predicting the Cellular Localization Sites of Proteins. *Intelligent Systems for Molecular Biology* 4: 109-115
- Nelson DR. (2009).The cytochrome p450 homepage. *Hum Genomics*, 4(1):59-65.
- Nierman,W., Wortman,J., Pain,A., Anderson,M.J., Arroya,J., Hall,N.,Barrell,B., Fraser,C. and Denning,D.W. (2005) Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus* *Nature* 438 (7071), 1151-1156
- Ojima, K., J. Breitenbach, H. Visser, Y. Setoguchi, K. Tabata, T. Hoshino y G. Sandmann. 2006. "Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a beta-carotene 3-hydroxylase/4-ketolase." *Molecular Genetics and Genomics* 275: 148-158.
- Paine, M.J.I., Scrutton, N.S., Munro, A.W., Gutierrez, A.,Roberts, G.C.K., and Wolf, C.R. (2005) Electron transfer partners of cytochrome P450. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Ortiz De Montellano, P. (ed.). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers,115–138.
- Phaff, H., M. Miller, M. Yoneyama y M. Soneda. (1972). A comparative study of the yeast floras associated with trees on the Japanese islands and on the west coast of North America. Gyoza Terui (ed.). pp 759-774. Fourth International Fermentation Symposium Proceedings: Fermentation Technology Today, Society of Fermentation Technology, Osaka.
- Podust L., Stojan J. , Poulos T., Waterman M. (2001). Substrate recognition sites in 14a-sterol demethylase from comparative analysis of amino acid sequences and X-ray structure of *Mycobacterium tuberculosis* CYP51. *Journal of Inorganic Biochemistry* 87:227–235
- Porter T.D. (2002).The roles of cytochrome b5 in cytochrome P450 reactions *J Biochem Mol Toxicol*, 16 , pp. 311–316
- Sambrook, J. y D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandmann, G. 2001. "Carotenoid biosynthesis and biotechnological application." *Archives of biochemistry and biophysics* 385: 4-12.



- Schomburg, D., Salzmann, M., & Stephan, D. (1994). Cytochrome-b5 reductase. In *Enzyme Handbook 7* (pp. 225-231). Springer Berlin Heidelberg.
- Schroeder, W. A. y E. Johnson. (1993). Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. *Microbiology* 139: 907-912.
- Shang F, Wen S, Wang X, Tan T. (2006). Effect of nitrogen limitation on the ergosterol production by fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol*,122:285-292.
- Strittmatter P, Rogers MJ, Spatz L. (1972). The binding of cytochrome b 5 to liver microsomes. *J Biol Chem*. 247(22):7188-7194
- Strittmatter P, Velick SF.(1957). The purification and properties of microsomal cytochrome reductase. *J Biol Chem Oct*;228(2):785-799
- Subramanian V, Doddapanemi H, Syed K y Yadav JS.(2010). P450 Redox Enzymes in the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Gene Transcription, Heterologous Expression, and Activity Analysis on the Purified Proteins. *Current Microbiol*. 61:306-314.
- Sutter TR, Sanglard D, Loper JC.(1990). Isolation and characterization of the alkane-inducible NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase gene from *Candida tropicalis*. Identification of invariant residues within similar amino acid sequences of divergent flavoproteins. *J Biol Chem*. 265(27):16428-36.
- Tiedje C., Holland D., Just U. y Höfken T. (2007).Proteins involved in sterol synthesis interact with Ste20 and regulate cell polarity *Journal of Cell Science* 120, 3613-3624
- Troncoso C, Cárcamo J, Hedden P, Tudzynski B, Rojas MC. (2008). Influence of electron transport proteins on the reactions catalyzed by *Fusarium fujikuroi* gibberellin monooxygenases. *Phytochemistry*. 69(3):672-83.
- Truan G., Epinat JC., Rougeulle C, Cullin C., Pompon D. (1994) Cloning and characterization of a yeast cytochrome b5-encoding gene which suppresses ketoconazole hypersensitivity in a NADPH-P-450 reductase-deficient strain. *Gene*,142:123-127
- Ukibe, K., K. Hashida, N. Yoshida y H. Takagi. (2008). "Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for astaxanthin production and oxidative stress tolerance." *Applied and environmental microbiology* 75: 7205-7211
- van den Brink, J.M., van den Hondel, C.A. y Punt, P.J. 1998. Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genet Biol*. 23:1-17
- Venkateswarlu K., Lamb D., Kelly D., Manning N. y Kelly S. (1998)The N-Terminal Membrane Domain of Yeast NADPH-Cytochrome P450 (CYP) Oxidoreductase Is Not Required for Catalytic Activity in Sterol Biosynthesis or in Reconstitution of CYP Activity. *J. Biol. Chem*. 273:4492-4496.
- Verdoes, J. C., N. Misawa y A. J. J. van Ooyen. 1999a. "Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*." *Biotechnology and bioengineering* 63: 750-755.
- Verdoes, J. C., Sandmann, G., Visser, H., Diaz, M., Mossel, M. V. y Van Ooyen, A. J. (2003). Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast

- Xanthophyllomyces dendrorhous (Phaffia rhodozyma). Applied and environmental microbiology, 69, 3728-3738.
- Verdoes, J., P. Krubasik, G. Sandmann y A. Van Ooyen. 1999b. "Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from Xanthophyllomyces dendrorhous." Molecular and General Genetics MGG 262: 453-461.
- Vergeres G, Waskell L. (1995) Cytochrome b5, its functions, structure and membrane topology. Biochimie. 77:604-620.
- Vergeres G, Waskell L. Cytochrome b5, its functions, structure and membrane topology. Biochimie 1995;77:604-620.
- Vermillion, J.L., and Coon, M.J. (1974). Highly purified detergent solubilized NADPH-Cytochrome P-450 reductase from Phenobarbital-induced rat liver microsomes. Biochem. Biophys. Res. Commun., 60, 1315-1322
- Wang M., Roberts D.L., Paschke R., Shea T.M., Masters B.S., Kim J.J. (1997). Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94 8411-8416.
- Weber, R. W. S., Becerra, J., Silva, M. J., y Davoli, P. (2008). An unusual Xanthophyllomyces strain from leaves of Eucalyptus globulus in Chile. Mycological research, 112, 861-867.
- Wery J, Dalderup MJM, Ter Linde J, Boekhout T, Van Ooyen AJJ. (1996). Structural and phylogenetic analysis of the actin gene from the yeast Phaffia rhodozyma. Yeast, 12:641-651.
- Zhang YQ, Rao R. (2010). Beyond ergosterol: linking pH to antifungal mechanisms. Virulence, 1:551-554

