



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**Aislamiento, clonación y caracterización de la ATP-citrato liasa de
*Phaffia rhodozyma***

Tesis que presenta

M.C. Cipriano Chávez Cabrera

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de Tesis: **Dr. Luis Bernardo Flores Cotera**

México, D.F.

Octubre del 2016

La presente investigación se realizó en el **laboratorio** de **Metabolismo Secundario de Microorganismos** del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la dirección del **Dr. Luis Bernardo Flores Coterá** y con la asesoría especial de los doctores:

Dr. Juan Carlos Cancino Díaz, Investigador Titular B del Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN.

Dr. Sergio Sánchez Esquivel, Investigador Titular "C" T.C. del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Dra. Ma. Eugenia Hidalgo Lara, Investigador Titular 3C del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Cinvestav-IPN.

Dr. Rodolfo Marsch Moreno, Investigador Titular 3B del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Cinvestav-IPN.

Agradecimientos

Deseo expresar mi infinito agradecimiento a Dios, a mis padres **Cipriano Chávez Moreno** y **Ma del Carmen Cabrera Isais**, a mi esposa **Yaneth Bartolo Aguilar**, a mis hijos **Julieta Janeth**, **Carlos David** y **Luis Martín**, y a mis hermanos, por su respaldo y comprensión que siempre me han mostrado.

Expreso mi agradecimiento especialmente al **Dr. Luis Bernardo Flores Coterá**, por su inducción en la ciencia y por haber confiado en mí para formar parte de su grupo de trabajo. Así como, a los miembros de mi comité tutorial: **Dr. Sergio Sánchez Esquivel**, **Dr. Juan Carlos Cancino Díaz**, **Dra. María Eugenia Hidalgo Lara** y al **Dr. Rodolfo Marsch Moreno**, por su objetividad y sentido común que me permitió simplificar y mejorar este estudio. Además, agradezco a los auxiliares de investigación **Dra. Zoila Rosa Flores-Bustamante**, **Q. Fernando Maldonado García**, **M.C Alejandro Santiago-Hernández**, **M.C. Calixto Ortega Moreno** y al **Ing. Juan Sánchez Labrada** por su asesoría científica y apoyo técnico durante la realización de este trabajo. Así como a los técnicos: **Humberto Morales Romero** y **David Flores Rojas**.

Agradezco la oportunidad que me brinda al Colegio de Estudios Científicos y Tecnológicos del Estado de Michoacán (**CECyTE Michoacán**), por otorgarme una licencia para la realización de mis estudios y por brindarme una licencia con goce de sueldo de cuatro meses para la realización de la presente tesis doctoral.

Finalmente agradezco a la Dirección de Planeación y Operación de Becas del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**), por la beca otorgada durante los estudios de doctorado, con el número de registro **203639**.

Contenido

Figuras	6
Tablas	7
1. Abstract	8
1. RESUMEN	9
2. INTRODUCCIÓN	10
2.1 Función de los carotenoides	11
2.1.1 La astaxantina.....	13
2.1.2 <i>Phaffia rhodozyma</i>	13
2.1.3 Caracterización genómica de <i>P. rhodozyma</i>	14
2.2 Biosíntesis de carotenoides y astaxantina	15
2.2.1 Genes implicados en la biosíntesis de astaxantina	16
2.3 Rutas de biosíntesis de acetil-CoA	18
2.3.1 Acetil-CoA.....	18
2.3.2 ATP citrato liasa.....	20
2.4 Factores que afectan la inducción de astaxantina	22
2.5 Justificación	27
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO	28
3.1 Objetivo general.....	28
3.1.1 Objetivos particulares	28
3.1.2 Estrategia experimental	29
4 METODOLOGÍA	30
4.1 Materiales y métodos	30
4.1.1 Cepas y medios de cultivo	30
4.1.2 Extracción de DNA genómico y RNA total.....	31
4.1.3 Aislamiento del gen <i>acl</i> de <i>P. rhodozyma</i>	31
4.1.4 Clonación del gen	33
4.1.5 Clonación del cDNA del gen <i>acl</i>	34
4.1.6 Subclonación del <i>acl</i> -cDNA en el vector de expresión.....	35
4.1.7 Recombinación homóloga del <i>acl</i> -cDNA en <i>P. pastoris</i>	35
4.1.8 Ensamble y análisis bioinformático del gen <i>acl</i>	36
4.1.9 Expresión de la enzima ACL recombinante	37

4.1.10	Extracción de proteína soluble.....	37
4.1.11	Purificación de ACL recombinante	38
4.1.12	Análisis de western blotting y MALDI-TOF-TOF MS	38
4.1.13	Actividad ACL.....	39
5.	RESULTADOS	41
5.1	Clonación del gen <i>acl</i> de <i>P. rhodozyma</i>	41
5.2	Clonación del <i>acl</i> -cDNA	46
5.3	RACE (Rapid amplification of cDNA ends).....	47
5.4	Subclonación del <i>acl</i> -cDNA en el vector pPICZB	47
5.5	Expresión y purificación de la ACL 6XHis-tagged	50
5.6	Caracterización bioquímica de la ACL recombinante.....	53
5.7	Análisis de MALDI-TOF/TOF-MS.....	55
5.8	Análisis filogenético de la ACL de <i>P.rhodozyma</i>	59
6	DISCUSIÓN	61
7	CONCLUSIONES	67
8	PERSPECTIVAS	68
9	BIBLIOGRAFIA	69
10	ANEXOS	79
A.1	Secuencia nucleotídica del gen <i>acl</i> KM503045 de <i>P. rhodozyma</i>	79
A.2	Secuencia nucleotídica del gen <i>acl</i> KM510496 de <i>P. rhodozyma</i>	83
A.3	Secuencia nucleotídica del <i>acl</i> -cDNA (KM510486) de <i>P. rhodozyma</i>	86
A.4	Secuencia de aminoácidos de ACL 6XHis-tagged.....	89
A.5	Localización de los nucleótidos corriente arriba de los genes <i>acl</i>	90
A.6	Secuencia corriente arriba del gen <i>acl</i> (KM503045 y KM510496).....	93
A.7	Secuencia corriente debajo de los genes (KM503045 y KM510496).	93
A.8	Promotores de la ACL.....	94
A.9	Expresión de la ACL 6XHis-tagged a 120 rpm	95

Figuras

Figura 1. Astaxantina.....	13
Figura 2. Biosíntesis de astaxantina vía mevalonato por <i>P. rhodozyma</i>	18
Figura 3. Síntesis de acetil-CoA de diferentes organismos.	20
Figura 4. Características estructurales del monómero de las ATP citrato liasas.....	21
Figura 5. Estrategia experimental.	29
Figura 6. Diagrama esquemático de la PCR inversa usada para obtener los amplicones de los extremos de <i>acl</i> de <i>P. rhodozyma</i>	42
Figura 7. Secuencias nucleotídicas de los extremos del gen <i>acl</i>	43
Figura 8. Análisis electroforético del amplicón del gen <i>acl</i>	45
Figura 9. Diagrama esquemático de <i>acl</i> de <i>P. rhodozyma</i>	45
Figura 10. Esquema de las características generales de la enzima ACL de <i>P. rhodozyma</i>	45
Figura 11. Análisis electroforético del amplicón completo <i>acl</i> -cDNA obtenido mediante RT-PCR.....	47
Figura 12. Vector de expresión pPICZ B.	48
Figura 13. Mapa de secuenciación del <i>acl</i> -cDNA que incluye la fusión de la secuencia codificante y cola de histidinas	49
Figura 14. Análisis electroforético (10% SDS-PAGE) del perfil de proteínas en las diferentes etapas de purificación de ACL 6XHis-tagged mediante cromatografía de afinidad a níquel.....	51
Figura 15. Western blot de la ACL 6XHis-tagged.....	52
Figura 16. Temperatura óptima y pH óptimo de la ACL 6XHis-tagged	53
Figura 18. Espectro de masas del péptido 735-YPGTSFIDHLLR-746 correspondiente a la ACL 6XHis-tagged.....	58
Figura A.1.1 Traducción del gen <i>acl</i> de <i>P. rhodozyma</i> (número de acceso al Gen Bank KM503045).	82
Figura A.2.1 Traducción del gen <i>acl</i> de <i>P. rhodozyma</i> (número de acceso al GenBank KM510496).	85
Figura A.3.1 Traducción de la región codificante <i>acl</i> -cDNA de <i>P. rhodozyma</i> (número de acceso al GenBank KM510486).	88
Figura A.5.1. Alineamiento de secuencias nucleotídicas corriente arriba del gen <i>acl</i>	90
Figura A.5.2. Alineamiento de la secuencia corriente arriba del gen KM503045.....	91

Figura A.5.3. Alineamiento reverso de la secuencia corriente abajo del gen KM510496.	92
Figura A.8.1. Localización de sitios de unión a factores de transcripción en la secuencia corriente arriba del gen KM503045 de <i>P. rhodozyma</i>	94
Figura A.9.1. Análisis electroforético (10% SDS-PAGE) de la expresión de ACL 6XHis-tagged por <i>Pichia</i> -ACL1 cultivada a baja agitación.....	95

Tablas

Tabla 1. Iniciadores usados en este estudio.....	32
Tabla 2: Purificación de la ACL 6XHis-tagged de <i>P. rhodozyma</i> expresada en <i>Pichia</i> -ACL1.....	54
Tabla 3. Parámetros cinéticos de la ACL 6XHis-tagged de <i>P. rhodozyma</i>	55
Tabla 4. Péptidos identificados por MALDI-TOF/TOF-MS de la ACL 6XHis-tagged expresada por <i>Pichia</i> -ACL1.....	57
Tabla 5. Similitud de aminoácidos (en gris) e identidad (en blanco) entre ACLs de varios organismos.....	60

1. Abstract

ATP citrate lyase (ACL) is a cytoplasmic enzyme, which catalyzes the incision of citrate to acetyl CoA and oxaloacetate. Acetyl-CoA is the basic unit for the biosyntheses of fatty acids and carotenoids in yeasts. A molecular study of *Phaffia rhodozyma* ACL could help to understand the mechanisms that differentially regulate the biosyntheses of carotenoids and fatty acids in basidiomycetes. Thus in this study, the *acl* gene of *P. rhodozyma* was cloned and expressed in *Pichia pastoris*, the recombinant ACL was purified and their kinetic parameters were evaluated. Three homologous DNA sequences encoding ACLs in *P. rhodozyma* were isolated, *i.e.*, two genes and one cDNA. These sequences show several single and double-nucleotide polymorphisms. The two *acl* have seven exons and six introns. The coding sequences of the two genes and the cDNA (*acl*-cDNA) have a size of 3450-bp encoding identical 120 kDa polypeptides. Full-length amino acid sequences show the two multidomains, PLN02235 and PLN02522, which are necessary for ACL activity. The *in silico* translated ACL sequences show 82–87% similarity to putative ACLs from other basidiomycetes and 71% similarity to human ACL. The *acl*-cDNA sequence was used to heterologously express ACL 6XHis-tagged identified by MALDI-TOF-MS. The sequenced peptides with 42% coverage showed 100% identity to the sequence generated *in silico*. The ACL 6XHis-tagged expressed at 300 rpm and purified to homogeneity, showing an activity of 2 U. Furthermore, three different sequences up stream of 542, 41 and 39 bp had being found, suggesting differential regulation at the transcriptional level. The upstream sequence of 542 bp has three consensus sites binding to transcription factors, SP1 (Specificity Protein 1), ICSBP (Interferon Consensus Sequence Binding Protein) and NF-KappaB (nuclear factor kappa-light-chain- enhancer of activated B cells). The activation of ACL 6XHis-tagged occurred at under oxidative conditions, *i.e.*, similar conditions in which the induction of carotenogenesis in *P. rhodozyma* occurs. Thus, the contribution of this study was the identification of a sequence of ACL, the biochemical characterization of a recombinant ACL and the first molecular evidence of transcriptional regulation of carotenogenic yeast.

1. RESUMEN

La ATP-citrato liasa (ACL) es una enzima citoplasmática que cataliza la incisión de citrato a acetil-CoA y oxaloacetato. El acetil-CoA es la unidad básica para la biosíntesis de ácidos grasos y para la biosíntesis de carotenoides en levaduras. Un estudio molecular de la ACL en *Phaffia rhodozyma* ayudaría a comprender los mecanismos que regulan diferencialmente la biosíntesis de carotenoides y ácidos grasos en basidiomicetos. Así, en este estudio, se clonó y expresó el gen *acl* de *P. rhodozyma* en *Pichia pastoris* y la ACL recombinante se purificó y se evaluaron sus parámetros cinéticos. Se obtuvieron tres secuencias de DNA homólogas del gen *acl* que codifican la ACL en *P. rhodozyma*, *i.e.*, dos genes y un cDNA. Estas secuencias muestran polimorfismos de simple y doble nucleótido entre ellas. Los dos genes *acl* tienen siete exones y seis intrones. Las secuencias codificantes de los genes y el cDNA del gen *acl* (*acl*-cDNA) tienen, en todos los casos, 3450 pb y codifican polipéptidos idénticos de 120 kDa. La secuencia de aminoácidos tiene los multidominios PLN02235 y PLN02522, necesarios para la actividad ACL. La ACL de *P. rhodozyma* tiene 82-87% de similitud con las ACLs putativas de otros basidiomicetos y 71% de similitud con la ACL humana. La secuencia *acl*-cDNA se utilizó para expresar heterológamente la ACL 6XHis-tagged, y ésta se identificó por MALDI-TOF-MS. Los péptidos secuenciados con cobertura de 42% mostraron 100% de identidad con la secuencia generada *in silico*. La ACL 6XHis-tagged se expresó y se purificó, mostrando una actividad de 2 U. Por otro lado, se encontraron tres secuencias diferentes corriente arriba de *acl*, de 542, 41 y 39 pb, lo que sugiere una regulación diferencial a nivel transcripcional. La secuencia de 542 pb tiene tres sitios consenso de unión a factores de transcripción, SP1, ICSBP y NF-KappaB. La activación de la ACL 6XHis-tagged se produjo en condiciones oxidativas, *i.e.*, condiciones similares en las que se produce la inducción de la carotenogénesis en *P. rhodozyma*. Así, la contribución de este estudio fue la identificación de una secuencia de ACL recombinante, su caracterización bioquímica y la generación de la primera evidencia molecular de la regulación transcripcional en una levadura carotenogénica.

2. INTRODUCCIÓN

La astaxantina (3,3'-dihidroxy- β , β -caroteno-4,4'-diona) es el principal pigmento carotenoide sintetizado por la levadura basidiomiceta *P. rhodozyma*. Las primeras etapas de la biosíntesis de astaxantina en *P. rhodozyma* se llevan a cabo por la vía del mevalonato que genera pirofosfato de isopentenilo (IPP) a partir de acetil-CoA citosólico. El IPP es el precursor de todos los isoprenoides, incluyendo carotenoides, esteroides, quinonas, entre otros compuestos (Schmidt y col., 2011; Alcaíno y col., 2014; Hara y col., 2014). La biosíntesis de carotenoides, como la biosíntesis de ácidos grasos y esteroides, requieren acetil-CoA como bloque de construcción inicial, además de ATP, NADPH y oxígeno molecular (Miao y col., 2010; 2011). Se ha sugerido que un reservorio de acetil-CoA citosólico provisto por la ATP citrato liasa (ACL; EC 2.3.3.8) puede ser utilizado para la biosíntesis de lípidos, esteroides y carotenoides (Flores-Cotera y col., 2001; Chávez-Cabrera y col., 2010; Miao y col., 2010; 2011; Loto y col., 2012). En levaduras oleaginosas, la ACL es la fuente principal de acetil-CoA para la biosíntesis de ácidos grasos (Ratledge 2002; Ratledge y Wynn, 2002).

En *P. rhodozyma*, las biosíntesis de lípidos y de carotenoides son estimuladas por las condiciones de limitación de nitrógeno (Yamane y col., 1997a; Flores-Cotera y col., 2001). Chávez-Cabrera y col., (2010) observaron un aumento de la actividad ACL al agotarse el amonio (24 h de cultivo) en cultivos en lote de la levadura, esto aun cuando el oxígeno disuelto (OD) estuvo por debajo del 20% de saturación. Aunque, este aumento de actividad ACL estimuló la biosíntesis de ácidos grasos, sólo tuvo un efecto marginal sobre la acumulación de carotenoides. En contraste, una rápida acumulación de carotenoides se produjo sólo después de agotarse los azúcares (3 h después del agotamiento de amonio), e iniciarse la reasimilación del etanol producido en la etapa inicial del crecimiento. Al mismo tiempo, se produjo un aumento adicional de la actividad ACL (2 veces), junto con el aumento en OD por arriba del 20% de saturación. Un aumento en la actividad ACL con los niveles de OD por arriba del 20%, provocó la acumulación de carotenoides y lípidos. Por otra parte, la actividad ACL también aumentó una vez agotado el azúcar en presencia de suficiente

amonio (en >20% OD). Este aumento fue comparable al observado después del agotamiento de los azúcares en condiciones de limitación de nitrógeno. Estos resultados sugirieron que en *P. rhodozyma*, la actividad ACL responde diferencialmente: (a) a OD por encima del 20% de saturación y (b) al agotamiento de amonio. La presencia de dos isoformas de ACL es desconocida hasta la fecha; sin embargo, la actividad ACL en respuesta al OD y el conocido papel de los carotenoides como antioxidantes, indican que una isoforma ACL podría proporcionar acetil-CoA para la biosíntesis de carotenoides. El mecanismo que regula la distribución de acetil-CoA para la biosíntesis de ácidos grasos y de carotenoides podría implicar una compleja regulación de ACL. Sin embargo, la información disponible sobre ACLs de levaduras carotenogénicas es limitada. Además, hasta ahora se han purificado y estudiado pocas ACLs en eucariotas. En diferentes plantas y mamíferos, el gen *acl* ha sido caracterizado funcionalmente; sin embargo, ninguna ACL recombinante de levadura carotenogénica ha sido purificada. La única ACL nativa purificada y caracterizada hasta la fecha es la del basidiomiceto *Rhodospodium toruloides* (*Rhodotorula gracilis*; Shashi, y col., 1990) que es una levadura oleaginosa y carotenogénica. La información es limitada sobre el papel bioquímico y la regulación de ACL, particularmente con respecto a la biosíntesis de carotenoides. Así, un estudio molecular de ACL de levaduras carotenogénicas podría ayudar a comprender los mecanismos que regulan diferencialmente las biosíntesis de carotenoides y de ácidos grasos en basidiomicetos. Para hacer frente a esto, el objetivo del presente estudio, fue clonar y expresar el gen *acl* de *P. rhodozyma* en *Pichia pastoris*, así como purificar la ACL recombinante expresada, y evaluar sus parámetros cinéticos.

2.1 Función de los carotenoides

Los carotenoides se encuentran principalmente en plantas, pero también pueden encontrarse en bacterias, algas, hongos y animales invertebrados, peces, y aves como el flamenco. Estos juegan una función biológica muy importante en los humanos y animales como precursores de la vitamina A, estimulantes de la respuesta inmune y en la prevención

del cáncer y otras enfermedades degenerativas (Bhosale y Bernstein, 2005). Además, es conocido que protegen a las células contra el daño oxidativo y fotooxidativo.

Los carotenoides que tienen en su estructura átomos de oxígeno se conocen como “xantofilas”. Una de las xantofilas de mayor importancia económica es la astaxantina, un antioxidante más potente que la vitamina E y el β -caroteno. En la naturaleza, la astaxantina se encuentra especialmente en ambientes marinos y es el principal pigmento en crustáceos, salmones y truchas arcoíris (Johnson, 2003). Los animales son incapaces de sintetizar astaxantina de *novo*, por lo que el pigmento debe ser adquirido a través de la dieta. En la acuicultura, la astaxantina se utiliza en dietas de trucha arcoíris y salmón, para generar el color naranja característico de ellos (Bhosale y Bernstein, 2005). Debido a sus propiedades antioxidantes, se ha sugerido que la astaxantina previene varias enfermedades degenerativas, incluyendo el cáncer en los humanos (Jyonouchi y col., 1996; Bhosale y Bernstein 2005). En la industria farmacéutica y cosmética se usa como protector contra los efectos dañinos de la radiación ultravioleta (Kurashige y col., 1990; Nishino, 1998; Rodríguez-Saiz y col., 2010; Komaki y col., 2015).

La presencia de estos pigmentos en todos los organismos fotosintéticos y su amplia distribución entre las bacterias y hongos no fotosintéticos, se ha explicado por su capacidad para desactivar moléculas de oxígeno reactivas (MOR), como el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), H_2O_2 y otros radicales libres, que son subproductos de procesos metabólicos celulares y de contaminantes ambientales (Bhosale y Bernstein, 2005). Es conocido que las oxidasas producen una mayor cantidad de H_2O_2 durante el metabolismo de fuentes de carbono no fermentables, como alcoholes y aldehídos primarios (Andreyev y col., 2005). La fosforilación oxidativa mitocondrial que tiene lugar durante metabolismo aerobio de las células, es un importante y continuo generador de MOR (Andreyev y col., 2005).

La astaxantina es sintetizada en algunos pocos microorganismos, entre los que sobresalen el alga *Hematococcus pluvialis* (Lotan., 1995; Bhosale y Bernstein, 2005) y *P. rhodozyma* (Phaff & Miller., 1972). En *P. rhodozyma* se ha sugerido que la astaxantina inactiva al $^1\text{O}_2$, a los radicales peróxido generados en su habitat natural (flujo mucoide de abedules), y a las

MOR generadas durante su metabolismo intracelular (Johnson y Schroeder, 1995 a y b). Esta levadura tiene las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) mitocondrial y catalasa, pero su actividad es baja en relación a las mismas enzimas de *Saccharomyces cerevisiae*. Debido a que, *P. rhodozyma* carece de las SODs citosólicas se ha sugerido que la astaxantina podría estar compensando esta ausencia (Martínez-Moya y col., 2015).

2.1.1 La astaxantina

La astaxantina (3,3'-dihidroxi-β, β caroten-4,4'-diona) es un oxicarotenoide (C₄₀H₅₂O₄) con un peso molecular de 596.86 u.m.a., sus cristales son de color violeta oscuro, con punto de fusión de 217-219°C (Figura 1).

La capacidad antioxidante de la astaxantina es atribuida, en menor o mayor grado, no sólo a la combinación de sus dobles enlaces, sino a la presencia de grupos oxigenados como hidroxilos y grupos cetónicos en el anillo β-ionona (Miller y col., 1976; Schmidt y col., 2011).

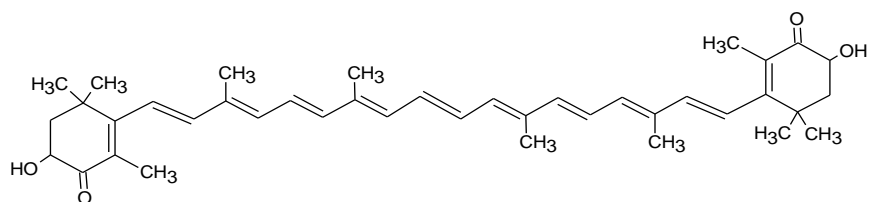


Figura 1. Astaxantina

2.1.2 *Phaffia rhodozyma*

Herman Phaff aisló a *P. rhodozyma* a finales de 1960, durante sus primeros estudios sobre ecología de levaduras. La levadura fue aislada de la flora asociada con árboles de las islas japonesas y la costa oeste de Norteamérica, pero posteriormente fue aislada en Rusia, Chile, Finlandia y Estados Unidos (Johnson, 2003). Las diferencias en su reproducción llevó

a reclasificar cada cepa como anamórfica “no formadora de basidios” *P. rhodozyma* y la telemórfica “formadora de basidios” *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Golubev, 1995). Desde su aislamiento, la levadura ha atraído un considerable interés, debido a su rápido crecimiento, fácil manejo, por su capacidad de fermentar azúcares (Johnson, 2003) y en especial por su capacidad de sintetizar astaxantina como principal pigmento carotenoide (Andrewes y col., 1976; Martínez-Moya y col., 2015). La producción de astaxantina ha sido la motivación de intensos esfuerzos en la investigación con este microorganismo, abarcando desde la caracterización de cepas (Phaff & Miller., 1972; Golubev, 1995), la obtención de mutantes hiperproductoras (An y col., 1989; Miao y col., 2010; Xiao y col., 2015), la optimización de medios de cultivo (Flores-Cotera y col., 2001a; 2001b), el estudio de la expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de astaxantina (Lodato y col., 2007; Marcoleta y col., 2011) y finalmente el análisis proteómico de la levadura (Martínez-Moya y col., 2011; 2015) entre otros.

2.1.3 Caracterización genómica de *P. rhodozyma*

Diferentes grados de ploidía se han puesto de manifiesto mediante estudios moleculares de la organización genómica de distintas cepas de la levadura. El número de cromosomas puede variar entre 8-13 en diferentes cepas, y el tamaño total del genoma puede oscilar entre 15-23.2 Mb (Andrio y col., 1995; Cifuentes y col., 1997; Nagy col., 1997; Kucsera y col., 1998).

Algunos investigadores han considerado que la levadura es poliploide debido a: a) la necesidad de utilizar 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina seguida del uso de técnicas de enriquecimiento, como única forma de obtener mutantes auxótrofas, b) la baja frecuencia con que aparecen mutantes, ante agentes mutagénicos, en comparación a levaduras haploides, c) la determinación del cariotipo electroforético, d) la complementación génica y la recombinación mitótica, y e) un contenido de DNA por célula ligeramente superior al de una cepa diploide de *S. cerevisiae* (Chun y col., 1992; Adrio y col., 1995; Cifuentes y col.,

1997; Hermosilla y col., 2003). En contraste, un estudio sobre la relación del aumento de tamaño de los cromosomas por fenómenos de integración múltiple en la región de los genes ribosomales, y la pérdida de las bandas correspondientes a los cromosomas originales, condujeron a Wery y col., 1998 a concluir que *X. dendrorhous* CBS 6938 es haploide. El genoma de *X. dendrorhous* CBS 6938, con el número de acceso al GenBank LN483157.1, tiene 19.50 Mb con 6385 genes que codifican proteínas (Sharma y col., 2015).

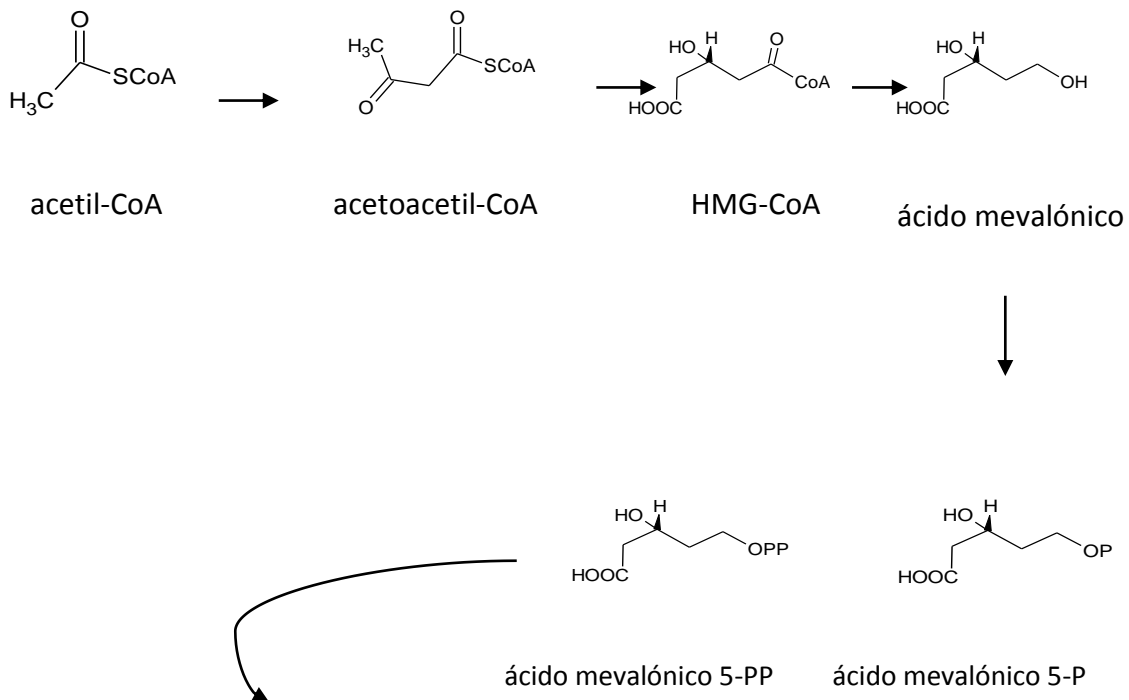
2.2 Biosíntesis de carotenoides y astaxantina

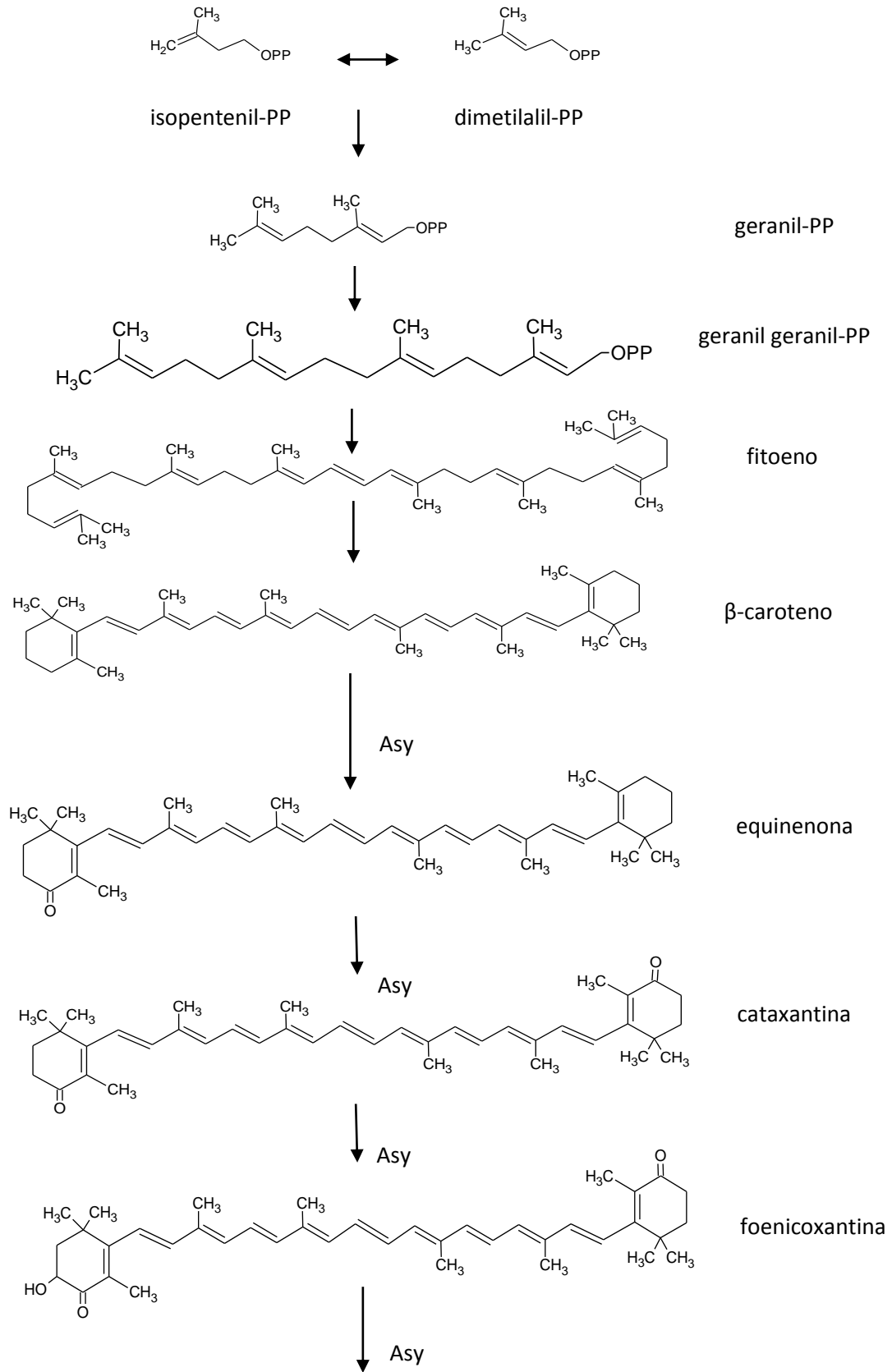
Las etapas tempranas de la biosíntesis de carotenoides en *P. rhodozyma*, como ocurre con la biosíntesis de ácidos grasos en otras levaduras oleaginosas, se lleva a cabo en el citoplasma. El citrato mitocondrial es considerado la fuente más importante de acetil-CoA para la biosíntesis de ácidos grasos en levaduras oleaginosas (Ratledge & Wynn, 2000), y también, la misma fuente opera para la biosíntesis de carotenoides en *P. rhodozyma* como se muestra en la Figura 3 (Chávez-Cabrera y col., 2010).

En *P. rhodozyma*, la astaxantina es sintetizada a partir de acetil-CoA, que es convertido secuencialmente en la vía del mevalonato hasta pirofosfato de isopentenilo (IPP), el precursor universal de todos los isoprenoides. La condensación secuencial de cuatro moléculas de IPP genera geranil-geranil pirofosfato (GGPP, C₂₀) y la condensación de dos moléculas de GGPP genera al fitoeno, un carotenoide incoloro. Mediante reacciones de deshidrogenación y ciclación en los extremos, el fitoeno se transforma en β -caroteno, el cual por oxidaciones secuenciales se transforma en astaxantina (Schmidt y col., 2011). El β -caroteno ha sido localizado en glóbulos lipídicos en el citoplasma de *P. rhodozyma*, en donde se cree que se localizan las actividades de ciclasas y desaturasas (Johnson y Schroeder 1996). Así, la astaxantina es formada a partir del β -caroteno después de la incorporación de grupos cetónicos en los carbonos C₄ y C_{4'} e hidroxilos en los carbonos C₃ y C_{3'} en el anillo β -ionona (Ojima y col., 2006; Martínez-Moya y col., 2015). La ruta biosintética de la astaxantina en *P. rhodozyma* se muestra en la Figura 2.

2.2.1 Genes implicados en la biosíntesis de astaxantina

En *P. rhodozyma* se identificó primero el gen *idi* que codifica para la enzima IPP sintasa (Verdoes y van Ooyen, 1999). A partir de GGPP, la biosíntesis de astaxantina requiere cuatro actividades enzimáticas. Los genes que codifican para estas enzimas son *crtE* que codifica la GGPP sintasa, *crtYB* que codifica la fitoeno sintasa/licopeno ciclasa, *crtI* codifica la fitoeno desaturasa y *asy* (antes *crtS*) codifica la astaxantina sintasa (Verdoes y col., 1999; Ojima y col., 2006; Lodato y col., 2007; Schmidt y col., 2011; Chi y col., 2015). Las enzimas codificadas en los genes *crtYB* y *asy* son bifuncionales. La enzima codificada por el gen *crtYB* cataliza la formación de fitoeno y licopeno. La enzima codificada por *asy*, perteneciente a las oxigenasas de la superfamilia tres del citocromo P450, tiene las características enzimáticas de 3,3'-hidroxilasa y 4,4'-cetolasa que participan en la inserción de los grupos oxigenados en el anillo β -ionona del β -caroteno, (Ojima y col., 2006). Recientemente, en el análisis proteómico de la levadura, se encontraron las huellas peptídicas de las enzimas involucradas en la biosíntesis de astaxantina: la fitoeno sintasa/licopeno ciclasa, la fitoeno desaturasa y la astaxantina sintasa (Mártinez-Moya y col., 2015).





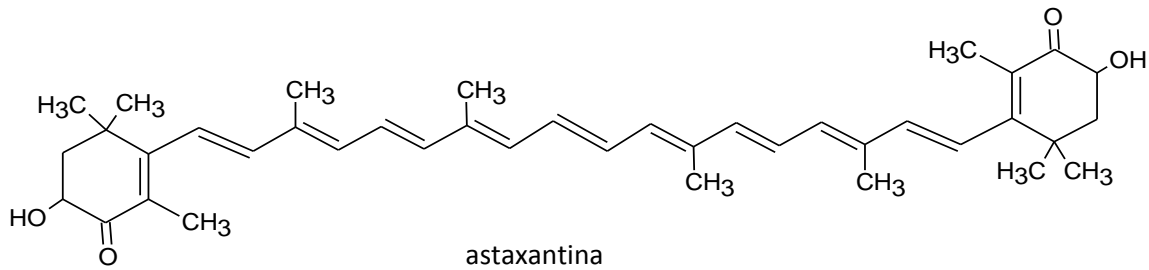


Figura 2. Biosíntesis de astaxantina vía mevalonato por *P. rhodozyma* (Schmidt y col., 2011). Asy, astaxantina sintasa.

2.3 Rutas de biosíntesis de acetil-CoA

2.3.1 Acetil-CoA

El acetil-CoA es un intermediario central del metabolismo primario y secundario en procariontes y eucariontes, y a la vez, es una fuente de grupos acetilo para decenas de procesos celulares, por ejemplo las biosíntesis de ácidos grasos y carotenoides. Las levaduras utilizan principalmente sustratos mitocondriales como citrato, acetil-carnitina y acetato para producir acetil-CoA citosólico (Palmieri y col., 1999; Franken y col., 2008) (Figura 3). En virtud de que la membrana interna no es permeable a citrato y acetil-carnitina, generalmente se requieren lanzaderas que tienen la función de exportarlos al citosol. Por ejemplo, la acetil-carnitina transferasa (ACT) es un transportador de la acetil-carnitina al citosol, ésta última es hidrolizada hasta acetil-CoA por la acetil-carnitina hidrolasa (ACH; Franken y col., 2008). La lanzadera citrato/malato transporta el citrato de la mitocondria al citosol, donde es escindido a acetil-CoA y oxalacetato mediante la ATP citrato liasa. Por otro lado, el acetil-CoA intramitocondrial es hidrolizado (por la actividad reversa de la acetil-CoA sintasa, ACS mitocondrial) para generar acetato, el cual puede ser difundido a través de la membrana mitocondrial al citosol, donde ACS citosólica puede activar el acetato en acetil-CoA (Figura 3).

La ACL humana es una fosfoproteína que cataliza la escisión del citrato en el citosol para producir acetil-CoA y oxalacetato (Chypre y col., 2012). En plantas se ha propuesto que el

acetato y citrato mitocondriales son las principales fuentes proveedoras de acetil-CoA citosólico (Fatland y col., 2002). En hongos oleaginosos se sabe que el citrato es la fuente principal de aprovisionamiento de acetil-CoA citosólico para la biosíntesis de ácidos grasos (Ratledge & Winn, 2002). La acetil-carnitina, puede ser una fuente de acetil-CoA, sin embargo, la actividad de acetil-carnitina transferasa (ACS) es relativamente baja. En la levadura no oleaginosa *S. cerevisiae*, se ha sugerido que el acetato y la acetil-carnitina son las fuentes de acetil-CoA citosólico, pero en cambio no se ha encontrado actividad ACL, ni la presencia del gen *acl*.

Un análisis proteómico de *P. rhodozyma* identificó las huellas peptídicas de acetil-CoA sintasa (ACS) y la ATP-citrato liasa (ACL), lo que indica que el acetato y el citrato son los únicos precursores de acetil-CoA en esta levadura (Martínez-Moya y col., 2011; 2015).

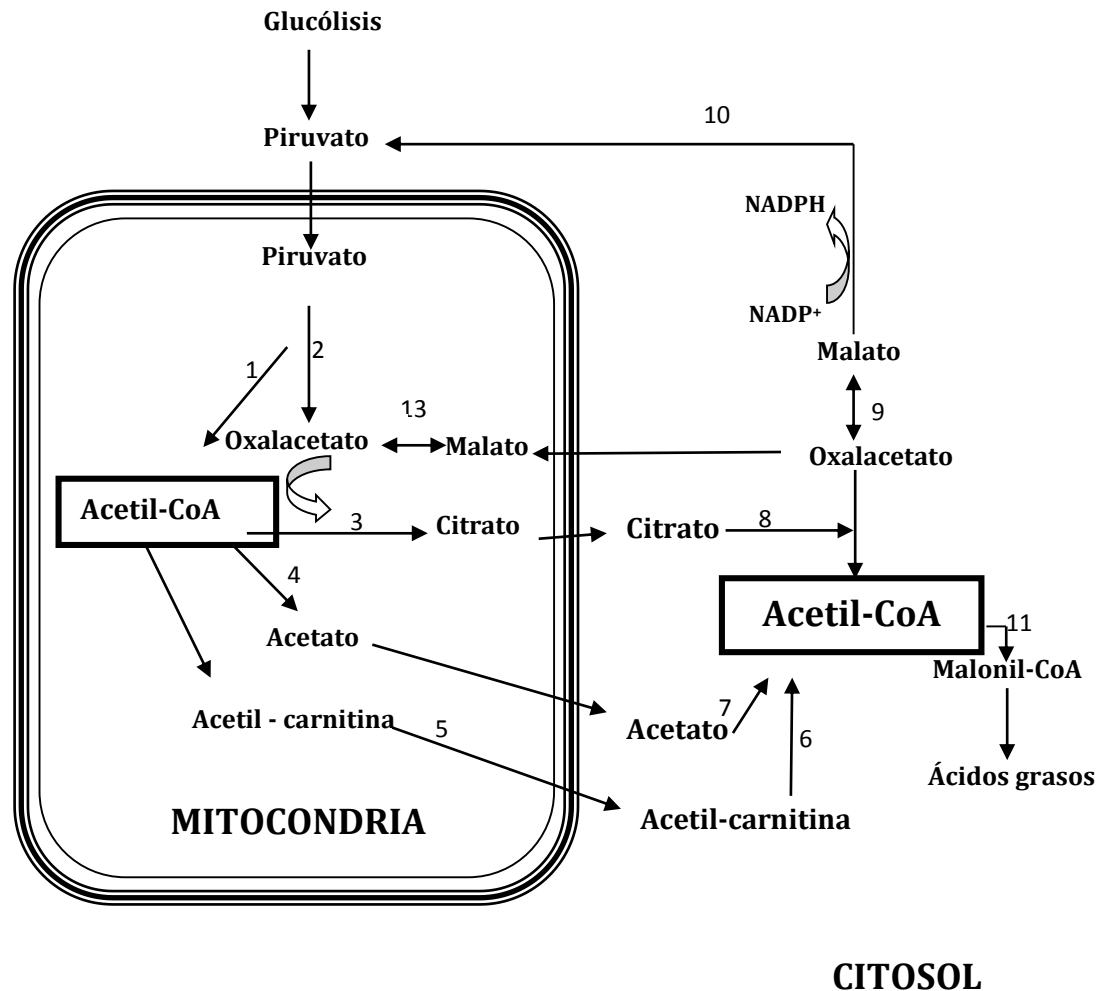


Figura 3. Síntesis de acetil-CoA de diferentes organismos.

1. Piruvato deshidrogenasa; 2. Piruvato carboxilasa; 3. Citrato sintasa; 4. Acetil-CoA hidrolasa; 5. Acetil-carnitina transferasa; 6. acetil-carnitina hidrolasa; 7. Acetil-CoA sintasa; 8. ATP citrato liasa; 9. Malato deshidrogenasa; 10. Enzima málica; 11. Complejo para biosíntesis de ácidos grasos.

2.3.2 ATP citrato liasa

La ATP citrato liasa (ACL; EC 2.3.3.8) es una fosfoproteína que requiere ATP y que cataliza la escisión de citrato en el citosol para formar acetil-CoA y oxaloacetato.

En células de mamífero, la ACL está involucrada en varios procesos celulares, en los que se incluyen la lipogénesis, colesterogénesis y algunas modificaciones postraduccionales de proteínas, tales como la acetilación y prenilación (Wellen y col., 2009; Chypre y col., 2012).

En células vegetales, la ACL está involucrada en varios procesos celulares que afectan el desarrollo celular como: lipogénesis, carotenogénesis y producción de ácidos orgánicos (Oliver y col., 2009; Fatland y col., 2002). En hongos filamentosos, la ACL es requerida para acumular lípidos por arriba del 10% en peso, para el desarrollo sexual y como precursor de varios metabolitos como pigmentos y micotoxinas (Nowrousian y col., 2000; Adams y col., 2002; Guenther y col., 2009).

En levaduras oleaginosas y especialmente *P. rhodozyma*, la ACL provee la fuente principal de acetil-CoA que alimenta a las rutas biosintéticas de ácidos grasos, esteroides y carotenoides (Miao y col., 2010; 2011; Chávez-Cabrera y col., 2010). En *Cryptococcus neoformans*, la ACL es indispensable para el crecimiento celular y el desarrollo del factor de virulencia (Griffiths y col., 2012). Una mutante del basidiomiceto carotenogénico y oleaginoso *R. gracilis*, con baja actividad de ACL, mostró una reducida acumulación de lípidos y de carotenoides (Venkateswaran y col., 1992).

2.3.2.1. Características estructurales de ACL

El monómero de ACL contiene dos multidominios PFAM denominados PLN02235 y PLN02522, que integran a cuatro super-familias. El multidominio PLN02235 incluye la superfamilia ATP-grasp_2 y el multidominio PLN02522 incluye las tres superfamilias citrato sintasa-citril coenzima liasa en el extremo C-terminal de la ACL (CS-CCL-ACL-C), ligase_CoA y CoA_binding. Adicionalmente, el multidominio PLN02522 tiene sitios de unión a citril-CoA, CoA y oxalacetato (Figura 4).

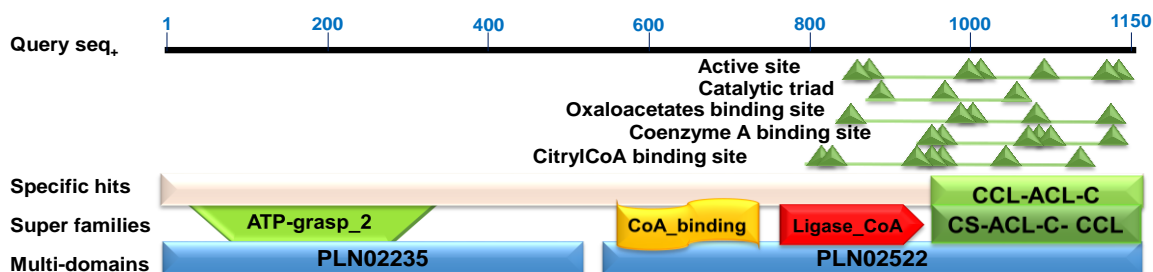


Figura 4. Características estructurales del monómero de las ATP citrato liasas. Abreviatura: ACL, el ATP citrato liasa; los multidominios PLN02235 y PLN02522 característicos de las ACLs.

La enzima ACL de mamíferos es homotetramérica, con subunidades de 110-120 kDa, codificada en un único gen (Elshourbagy y col., 1990, 1992). En *Sordaria macrospora*, la ACL es una proteína heterooctamérica formada por dos tipos de subunidades, en relación equimolar, las cuales tienen un peso molecular de 73 kDa y 52 kDa y son codificadas por los genes *acl1* y *acl2*. Estos péptidos son muy similares a la subunidad de ACL de mamíferos en el extremo C-terminal y en el extremo N-terminal respectivamente (Nowrousian y col., 2000). De igual forma, la ACL de *Arabidopsis thaliana* es una proteína octamérica formada por dos tipos de subunidades, de 65 kDa y 45 kDa (Fatland y col., 2002). Los genes *acl* de estos organismos han sido secuenciados, clonados, expresados heterológamente y se ha probado su funcionalidad enzimática. Por otro lado, varias secuencias nucleotídicas de los genes *acl* putativos de basidiomicetos, se pueden encontrar en la base de datos del GenBank; sin embargo, ninguno de estos se ha expresado, ni probado su funcionalidad enzimática. La única ACL nativa de un basidiomiceto que ha sido purificada y caracterizada es la de *R. gracilis*. Se trata de una enzima homotetramérica con un peso molecular de 520 kDa y subunidades de 120 kDa (Shashi y col., 1990). El gen *acl* putativo que codifica para cada subunidad de esta enzima tiene un tamaño de 4427 pb con una región codificante de 3471 pb, conforme al genoma *R. gracilis* (Zhu y col., 2012). En *P. rhodozyma* se ha estudiado el comportamiento de la actividad ACL y se ha sugerido la existencia de dos isoformas codificadas por un único gen o bien, la existencia de dos genes *acl* regulados diferencialmente (Chávez-Cabrera y col., 2010). Sin embargo, el gen *acl* de esta levadura no ha sido secuenciado, clonado o expresado heterológamente.

2.4 Factores que afectan la inducción de astaxantina

La proporción de los diferentes carotenoides producidos por *P. rhodozyma*, así como la cantidad de astaxantina en las células pueden alterarse por cambios en la composición del medio de cultivo y por otros factores ambientales.

Varios estudios han mostrado que la biosíntesis de carotenoides se induce a niveles por encima de 15-20% de saturación de oxígeno (OD) (Flores-Cotera, 2001; Chávez-Cabrera y

col., 2010), sin embargo, para una óptima producción de astaxantina se ha recomendado que los cultivos de *P. rhodozyma* se mantengan entre 55-60% OD (Yamane y col., 1997a). La biosíntesis de astaxantina se reduce drásticamente en condiciones microaerófilas (Johnson, 2003; Flores-Cotera y col., 2001) ya que se requiere oxígeno molecular para formar los grupos oxigenados del pigmento. Consistente con lo anterior, Lodato y col., (2007) encontraron mayor expresión de genes carotenogénicos a altas concentraciones de OD en *X. dendrorhous*.

El metabolismo de etanol es otro factor que activa la biosíntesis de astaxantina en *P. rhodozyma* (Yamane y col., 1997a, Chávez-Cabrera y col., 2010; Marcoleta y col., 2011). Se ha reportado que la levadura cultivada por lote-alimentado con etanol, como única fuente de carbono, aumenta de 2-3 veces la acumulación celular de astaxantina (Yamane y col., 1997b). Dicha acumulación fue asociada al incremento en actividad de la hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMGR), enzima clave para la formación de mevalonato, un precursor de carotenoides (Gu & Johnson, 1997). Estudios a nivel molecular indican que la regulación de la transcripción de los genes *acl* y *HMGR* en los mamíferos, son regulados por factores transcripcionales que se unen a la secuencia TCAGGCTAG que corresponden al Sterol Regulatory Element-Binding Proteins (SREBPs) presentes en ambos promotores (Sato y col., 2000). En *P. rhodozyma*, las evidencias indirectas sugieren que estos genes tienen los mismos reguladores transcripcionales. En mutantes hiperproductoras de astaxantina, la actividad de HMGR y la biosíntesis de carotenoides, ocurre simultáneamente en cultivos realimentados con etanol como única fuente de carbono (Gu y col., 1997). A partir de estas evidencias indirectas, se podría inferir que los genes *acl* y *HMGR* en *P. rhodozyma* son regulados por un mismo tipo de promotor, tal como ocurre en mamíferos (Sato y col., 2000). En cultivos en lote de *P. rhodozyma* es común la acumulación de etanol durante la fase temprana de crecimiento, en presencia de concentraciones altas de azúcares y/o de limitación de oxígeno (Yamane y col., 1997a). En una fase tardía de crecimiento, a bajas concentraciones de azúcares y al aumentar el oxígeno, *P. rhodozyma* es capaz de reutilizar el etanol producido inicialmente, al igual que otras levaduras (Yamane y col., 1997b). En cultivos en lote de esta levadura, la biosíntesis de carotenoides tiene lugar durante la

reasimilación de etanol, y en paralelo con un incremento en actividad de la ACL, (Chávez-Cabrera y col., 2010). El etanol generalmente es oxidado vía acetaldehído hasta acetato y de acetato hasta acetil-CoA para alimentar el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) (Jones, 1989). La conversión de etanol a acetaldehído es mediada por la enzima alcohol deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ (NAD-ADH) lo que podría promover un aumento de la relación NADH/NAD⁺ y la consecuente inhibición del CAT. La transformación del acetato hasta acetil-CoA es mediada por la ACS dependiente de AMP (AMP-ACS) (Jones, 1989), lo que promueve también la inhibición del CAT. En condiciones oxidativas el CAT es la principal fuente de esqueletos carbonados y ATP, para la biosíntesis de aminoácidos, ácidos nucleicos y para la gluconeogénesis (Jones, 1989). La inhibición del CAT bloquea la división y replicación celular, y en consecuencia se presenta una mayor disponibilidad de esqueletos carbonados para la biosíntesis de carotenoides, tal como el citrato (Gu y col., 1997; Yamane y col., 1997b; Miao y col., 2010; Martínez-Moya y col., 2015; Xiao y col., 2015).

Otros factores que estimulan la biosíntesis de astaxantina son el uso de inhibidores de la cadena respiratoria como la antimicina A y la limitación de cobre (An y col., 1989; Flores & Sánchez, 2001). En estas condiciones, la biosíntesis de ATP está disminuida debido a una reducción en la oxidación del NADH, lo cual conduciría a una biosíntesis de proteínas lenta y generaría mayor disponibilidad de sustratos para otras vías de biosíntesis (Flores & Sánchez, 2001; Xiao y col., 2015).

En varias investigaciones, se ha encontrado que el uso de relaciones altas de C/N en cultivos de *P. rhodozyma*, promueven la biosíntesis de lípidos y de carotenoides, pero a costa de una menor acumulación de proteínas (Yamane y col., 1997a; Flores-Cotera y col., 2001a; Chávez-Cabrera y col., 2010; Xiao y col., 2015). Esto último podría deberse a una reducida trasaminación del α -cetoglutarato (α -KG) para la formación del glutamato, debida a una baja disponibilidad de amonio para la formación de aminoácidos. En algunas mutantes hiperproductoras de astaxantina de crecimiento lento, se ha sugerido que tienen una disfunción mitocondrial que provoca la baja asimilación de nitrógeno (An y col., 1989). La mayor producción de carotenoides parece ser una respuesta para canalizar el exceso de carbono y energía, debidos a una limitación del crecimiento y de biosíntesis de proteínas,

ocasionadas por la deficiencia de nitrógeno. En general, la producción de astaxantina en cepas mutantes hiperproductoras, está asociada al crecimiento y es atribuida a su lento crecimiento (Johnson, 2003; Ukibe y col., 2008). En contraste, en cepas nativas es común un aumento del contenido de astaxantina de las células en las fases tardías de cultivo, cuando baja su velocidad de crecimiento (Chávez-Cabrera y col., 2010). Además, al suplir diferentes fuentes de nitrógeno y de carbono para la producción de astaxantina, frecuentemente se han seleccionado aminoácidos (metionina y valina) y carbohidratos (celobiosa) de lenta asimilación, resultando ambos en un lento crecimiento (Johnson, 2003; Ukibe y col., 2008). Lo anterior sugiere que un impedimento metabólico que inhibe el crecimiento celular, induce la biosíntesis de astaxantina. Esto está en concordancia con varias investigaciones sobre levaduras oleaginosas que señalan, que una alta relación de C/N induce la producción de lípidos (Ratledge & Winn, 2000; Ratledge, 2002) y se ha propuesto que el efecto principal de relaciones altas de C/N es la reducción en la concentración intracelular de AMP, por activación de la enzima AMP desaminasa que libera el grupo amino por hidrólisis, con la finalidad de suplir temporalmente la necesidad de amonio. La disponibilidad disminuida de AMP afecta varias enzimas del CAT que son dependientes de AMP, provocando la reducción de actividad del CAT. El principal nodo de regulación del CAT, que favorece la producción de lípidos es la NAD-isocitrato deshidrogenasa (NAD-ICD), que depende de AMP para su activación alostérica (Ratledge & Winn, 2000). La baja actividad de la NAD-ICD conduce a la acumulación de isocitrato, que rápidamente es transformado en citrato mediante la aconitasa. El citrato mitocondrial es traslocado al citosol e incidido por la ACL, para proveer acetyl-CoA para la biosíntesis de lípidos. En concordancia se ha observado que la actividad ACL aumenta a relaciones altas de C/N en levaduras oleaginosas (Ratledge, 2002). En *P. rhodozyma*, la escisión de citrato por la ACL produce el reservorio de acetyl-CoA que se ha sugerido como precursor no sólo para la biosíntesis de lípidos, sino también para la biosíntesis de carotenoides, ya que, al adicionar citrato al medio de cultivo, se favorece la acumulación de carotenoides (Flores-Cotera y col., 2001a). Inhibidores de la ruta de biosíntesis de lípidos ha promovido la acumulación de carotenoides en cepas silvestres y, además, se han obtenido mutantes

hiperproductoras de astaxantina que muestran una acumulación reducida de lípidos. Estos resultados indican que el contenido de astaxantina se correlaciona negativamente con el contenido de ácidos grasos en *P. rhodozyma* (Miao y col., 2010; Chávez-Cabrera y col., 2010; Flores-Cotera y col., 2001a; Domínguez-Bocanegra y Torres-Muñoz, 2004). Además, Chávez-Cabrera y col., (2010) encontraron que en relación alta de C/N se induce la acumulación de lípidos y carotenoides, aunada a un marcado incremento en la actividad de ACL, sugiriendo que el mecanismo de regulación de biosíntesis de lípidos y carotenoides en *P. rhodozyma*, es similar al mecanismo de regulación de biosíntesis de lípidos en levaduras oleaginosas.

En resumen, los resultados obtenidos en muy diversas condiciones estudiadas convergen en que la biosíntesis de astaxantina en *P. rhodozyma*, es activada en niveles de oxígeno disuelto (OD) por encima del 20% de saturación y en presencia de una fuente de carbono asimilable. Los eventos que conducen a estas condiciones incluyen: (a) crecimiento celular en limitación de nitrógeno (Flores-Cotera y col., 2001); (b) crecimiento celular lento promovido por el metabolismo de fuentes de carbono más reducidas que la glucosa (*e.g.*, etanol; Chávez-Cabrera y col., 2010; Marcoleta y col., 2011); y (c) presencia de inhibidores de la cadena respiratoria en el medio de cultivo (Johnson y Schroeder 1996). Además, las mutantes de *P. rhodozyma* que hiperproducen astaxantina comúnmente crecen más lentamente que las cepas de tipo silvestre. En varios casos, este crecimiento lento se atribuye a disfunciones mitocondriales (*e.g.*, baja respiración o baja actividad del ciclo de Krebs) o el metabolismo del nitrógeno disminuido (Johnson y Lewis 1979; Ukibe y col., 2008). En general, estos datos sugieren que la biosíntesis de carotenoides y su acumulación en *P. rhodozyma* es asociada con un crecimiento celular lento.

2.5 Justificación

La ACL de *P. rhodozyma* provee acetyl-CoA para las biosíntesis de ácidos grasos y de carotenoides. Sin embargo, la información sobre el papel bioquímico y la regulación de ACLs, en particular de las implicadas en la biosíntesis de carotenoides en levaduras es muy limitada. Así, estudios moleculares de la ACL de *P. rhodozyma* ayudarían a comprender los mecanismos que regulan diferencialmente la biosíntesis de carotenoides y ácidos grasos en basidiomicetos. Con la finalidad de tener un primer acercamiento a esto, en el presente estudio, se planteó clonar y expresar el gen *acl* de *P. rhodozyma* en *P. pastoris*, así como, purificar la ACL recombinante expresada y evaluar sus parámetros cinéticos.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

P. rhodozyma tiene al menos, dos genes que codifican para diferentes subunidades de la enzima ACL, o dos isoformas de esta enzima, que proveen diferencialmente acetil-CoA para la biosíntesis de carotenoides y ácidos grasos.

3.1 Objetivo general

Clonar y expresar uno de los genes de *acl* de *P. rhodozyma* en *P. pastoris*, purificar la ACL recombinante expresada y evaluar sus parámetros cinéticos.

3.1.1 Objetivos particulares

1. Aislar él o los genes que codifican la enzima ACL de *P. rhodozyma*.
2. Clonar él o los genes *acl* en *P. pastoris*.
3. Purificar y caracterizar bioquímicamente la enzima ACL recombinante codificada por alguno de estos genes.

3.1.2 Estrategia experimental

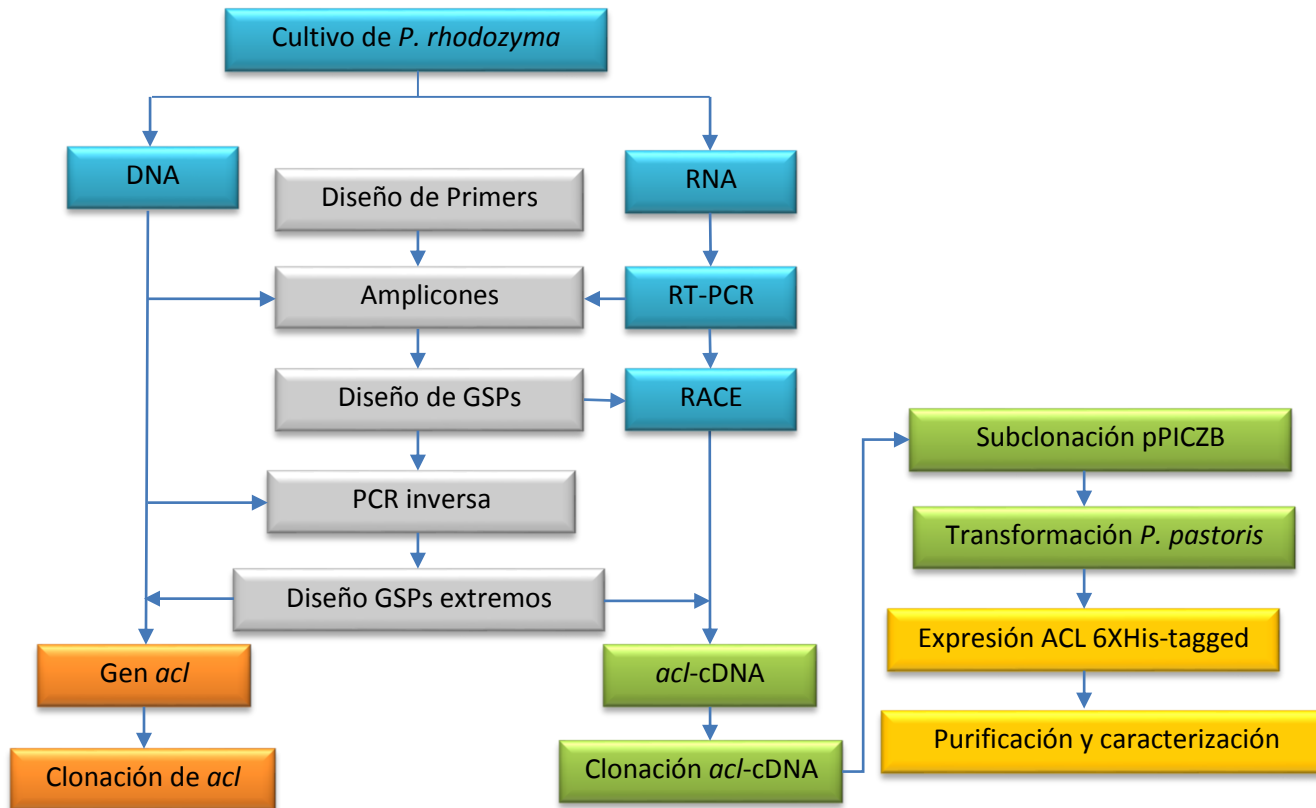


Figura 5. Estrategia experimental. GSP, por sus siglas en inglés Gene Specific Primer

4 METODOLOGÍA

4.1 Materiales y métodos

4.1.1 Cepas y medios de cultivo

Phaffia rhodozyma NRRL Y-10922 (estado sexual *Xanthophyllomyces dendrorhous*) fue usada para obtener la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la ACL, y para obtener la secuencia del mRNA que sirvió para delimitar la región codificante del mismo gen. *P. rhodozyma* fue crecida en un cultivo en lote con limitación de nitrógeno durante 30 h, 120 rpm y 22 °C, como se describió previamente (Chávez-Cabrera, y col., 2010). El tiempo de cosecha de las células fue 7 h después del agotamiento de amonio en el medio de cultivo, es decir 3 h después, de que ocurrieron simultáneamente el agotamiento de los azúcares, el aumento de la tensión de oxígeno y la inducción de la biosíntesis carotenoides (Chávez-Cabrera y col., 2010).

E. coli TOP 10 fue usada para la conservación y propagación de todas las moléculas de DNA recombinante construidas. Esta cepa fue crecida en medio Luria Bertani (LB) suplementado con ampicilina (100µg/mL), independientemente del vector de clonación usado para la construcción (pGEM 3Z, Promega, Madison, WI, USA; pJET 1.2, Fermentas, Waltham, MA, USA). Para la propagación de las recombinantes derivadas del vector de expresión pPICZB (diseñado para la expresión en *P. pastoris*), *E. coli* TOP 10 fue crecida en medio LB con zeocina (30 µg/mL; Sigma, Saint Louis, MO, USA).

Pichia pastoris X-33 fue usada como hospedero para la expresión de la ACL recombinante. La levadura fue incubada en matraces bafleados de 250 mL (Sigma, USA) con 32 mL de medio YPD a 28 °C, 120 rpm por 20 h. En todos los casos, la incubadora fue una agitadora orbital New Brunswick modelo Innova 43 (New Brunswick Scientific, NJ, USA).

4.1.2 Extracción de DNA genómico y RNA total

La extracción de DNA genómico fue realizada usando el DNeasy® Blood & Tissue Kit de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Qiagen, Valencia, CA, USA). La extracción de RNA total fue realizada usando Trizol® Reagent de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). En ambos casos, la lisis celular se hizo en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL cuyo contenido se sometió a tres ciclos de congelación con nitrógeno líquido/maceración por 1 min usando un pistilo. En todos los casos en los que se usó un kit comercial se siguieron las instrucciones del fabricante a menos que se indique lo contrario.

4.1.3 Aislamiento del gen *acl* de *P. rhodozyma*

Se diseñaron oligonucleótidos iniciadores a partir de regiones nucleotídicas conservadas de genes *acl* de basidiomicetos y ascomicetos. El alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas utilizadas (AE017350.1, XM_003193989.1, XM_752059.1, XM_007851697.1, XM_001839699.2, XM_002376465; AJ243817.1) se realizó mediante el software Clustal X 2.0 (Thompson y col., 1997). Las regiones conservadas del alineamiento múltiple se usaron para generar iniciadores mediante el programa Primer-Blast del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Estos iniciadores, fueron editados manualmente para obtener los iniciadores mostrados en la Tabla 1 y que fueron usados para amplificar por PCR diferentes fragmentos del gen *acl* de *P. rhodozyma*. Con base en la secuencia nucleotídica de los amplicones obtenidos con los iniciadores marcados con el superíndice (^{a,b y c}) en la Tabla 1, se diseñó un segundo conjunto de iniciadores específicos marcados en el superíndice con (^d) en la Tabla 1. Este segundo grupo de iniciadores se usó para generar amplicones de las regiones internas del gen *acl*.

Para identificar los extremos del gen *acl* se usó el método de la PCR inversa. Para ello, se realizó una digestión completa a 37 °C, por toda la noche, de DNA genómico (10 µg), usando la endonucleasa *EcoRI* (5 U) en un volumen total de 20 µl. Los fragmentos de DNA, de la mezcla de reacción, se purificaron como en todos los casos descritos de aquí en adelante,

mediante el QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, USA) y después (0.3-0.5µg del DNA) fueron circularizados a 22 °C por 16 h en 100 µL de una mezcla de ligación conteniendo 2 U de T4 DNA ligasa (Promega, USA). Para la primera reacción de la PCR anidada se usaron 2 µL de la mezcla de ligación como molde de DNA junto con los iniciadores GSP1-F300 y GSP1-R700, con un tiempo de amplificación de 10 min. Para la segunda reacción de PCR anidada se usó como molde de DNA, una dilución 1:1000 del producto de la primera reacción y los iniciadores GSP2-F300 y GSP2-R700, con un tiempo de amplificación de 10 min.

Los iniciadores DNA-F y DNA-R fueron diseñados a partir de las secuencias de los extremos del gen, adicionándoles secuencias nucleotídicas de algunos sitios de restricción. El amplicón completo del gen se obtuvo por PCR usando DNA genómico como molde y los iniciadores antes mencionados. El inicio y el final de la traducción, es decir, los extremos del gen fueron localizados mediante el programa New Genscan Web Server at MIT (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>).

Todas las reacciones de PCR, a menos que se indiquen otras condiciones, se llevaron a cabo con 35 ciclos: 94 °C por 7 minutos, temperatura de hibridación 5 °C por debajo de la Tm menor por 1 minuto, y amplificación a 68 °C (una kb por minuto) usando High Fidelity Polymerase (Invitrogen, USA), conforme al protocolo del fabricante. La Tabla 1 muestra los iniciadores usados en este estudio. Las secuenciación de las construcciones y amplicones obtenidos en este trabajo se realizaron en Macrogen Inn, Korea. En todos los casos los iniciadores fueron sintetizados por Sigma, USA.

Tabla 1. Iniciadores usados en este estudio

Iniciador	Secuencia
ACLcry-F2680 ^a	CCGGCAAGGACCTCATCT
ACLcry-R3180 ^a	GGGTTTTGTGGTTGGGGAAG
ACLba_ACL2-F ^b	TTCGCCTACCTGGAGATCAA
ACLba_ACL2-R ^b	CTTGAGACCCTCCTGGTAGTT
ACL1-F ^c	GGTAAYACTGGTGGTATGATG
ACL1-R ^c	GTWCCAATRGCCCAAGCAA
GSP1-F300 ^d	GCGAAAGGCCAACAAGCTC
GSP2-F300 ^d	AAGTCCAAGACGAACCCTGA
GSP1-R700 ^d	CTTGAAGGTGGCGGCAACGT

GSP1-DNAR700	GAACTTCCACCGCCGTTGCA
GSP2-R700 ^d	CCCTGGGGGTTGACATCTCCT
GSP4-R700 ^d	TCGAGCTTAGCGCCATGT
DNA-F ^{d, e}	gaattcggcccagccggccggcctttccatcATGTCTTCCAAAG
DNA-R ^{d, e}	gaattctctagagcggccgctTCTTGGGCTGGACGACG
cDNA-F ^f	aggagaattccacgtgATGTCTTCCAAAGCTATCCGAG
GSP-F1900 ^d	CCACCTTCAAGGGTATCATC
GSP-R2600 ^d	ATACCAGGAGCCATCTCGCT
GSP-R3280 ^d	TAGGTCTGTCCCTCAGTAGG
GSP-F2449 ^d	GTCCTCGTCAACTTCTCGTC
GSP-F2390 ^d	GTTCTACTGGGGTACAAAGGA
GSP-R3470 ^d	AGCTGGAGGACCATCTCGAT

Las secuencias nucleotídicas de los iniciadores ^{a, b y c} se diseñaron a partir de regiones conservadas, localizadas mediante alineamiento múltiple, de genes putativos *acl* de *Cryptococcus*^a; basidiomicetos ^b y ascomicetos ^c. Los iniciadores ^d se diseñaron a partir de secuencias nucleotídicas parciales del gen *acl* de *P. rhodozyma*, es decir, secuencias generadas durante el desarrollo de este trabajo. Los iniciadores ^e corresponden a secuencias nucleotídicas de los extremos del gen *acl*, obtenidas mediante PCR inversa. El iniciador ^f corresponde al extremo 5' del *acl*-cDNA generado *in silico* a partir del gen *acl* de *P. rhodozyma* usando The GENSCAN program web Server at MIT. Las secuencias de nucleótidos de los iniciadores que se muestran en letras minúsculas indican sitios de restricción fusionados en los extremos del gen *acl*, o *acl*-cDNA, de la siguiente manera: El iniciador DNA-F tiene los sitios de restricción EcoRI-SfiI-SacII; El iniciador DNA-R tienen los sitios de restricción EcoRI-XbaI-NotI, mientras que el iniciador cDNA-F tiene los sitios de restricción EcoRI-PmlI.

4.1.4 Clonación del gen

El amplicón completo del gen fue clonado en los vectores pGEM 3Z (Promega, USA) y pJET1.2/blunt (Fermentas, USA), para generar las construcciones *acl*/pGEM3Z y *acl*/pJET1.2. Para ello, el plásmido pGEM 3Z y el amplicón completo del gen *acl* se digieren completamente por separado con la endonucleasa EcoRI, conforme al protocolo del fabricante (New England Biolabs, Ipswich, MA). Los productos de ambas digestiones se purificaron y se ligaron con T4 DNA Ligasa, para obtener la construcción *acl*/pGEM3Z. Por otro lado, la construcción *acl*/pJET1.2 se obtuvo mediante el CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas, USA), usando el amplicón completo del gen *acl* y de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Cada una de las dos mezclas de ligación, se usó por separado para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* TOP10. La clona con la construcción

acl/pGEM3Z fue identificada por su incapacidad de hidrolizar el X-Gal, generando colonias blancas. La clona que incorporó la construcción *acl*/pJET1.2 fue identificada por “Colony blot” (hibridación en colonia) como se describe en Sambrook & Russell (2001). Finalmente, en ambas construcciones se verificó la incorporación del inserto del gen *acl* a través de Colony PCR, usando los iniciadores DNA-F y DNA-R, conforme al protocolo del fabricante del CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas, USA) y por análisis de la secuencia del DNA.

4.1.5 Clonación del cDNA del gen *acl*

El cDNA del gen *acl* de *P. rhodozyma* fue obtenido a partir del RNA total (de un cultivo de 30 h) usando el SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR, conforme al protocolo del fabricante (Invitrogen, USA). La región codificante fue amplificada por PCR usando los iniciadores cDNA-F y DNA-R con la High Fidelity Polymerase (Invitrogen, USA). El amplicón completo correspondiente a la región codificante del gen *acl* (*acl*-cDNA), fue analizado por electroforesis en gel de agarosa 0.8% y purificado. El *acl*-cDNA purificado y el vector pGEM 3Z fueron digeridos por separado en una mezcla de reacción (20 µL) con 2 U de las endonucleasas EcoRI y XbaI. Los productos digeridos en una relación molar inserto/vector de 10:1, fueron ligados (22 °C por 16 h) con T4 DNA ligasa (5 U), conforme el protocolo del fabricante (Promega, USA). Una alícuota (5 µL) de la mezcla de ligación conteniendo la construcción *acl*-cDNA/pGEM3Z, se usó para transformar células quimio-competentes de *E. coli* TOP10. Las clonas transformadas fueron identificadas y seleccionadas por su incapacidad de hidrolizar X-Gal (colonias blancas). La incorporación del *acl*-cDNA completo se verificó usando el método de Colony PCR con los iniciadores cDNA-F y DNA-R. Finalmente, la construcción fue secuenciada completamente usando los iniciadores indicados en la Tabla 1.

4.1.6 Subclonación del *acl*-cDNA en el vector de expresión

La secuencia codificante del gen *acl* contenida en la construcción *acl*-cDNA/pGEM3Z fue subclonada en el vector de expresión pPICZB, diseñado para *P. pastoris*. La construcción purificada de *acl*-cDNA/pGEM3Z y el vector de expresión pPICZB fueron digeridos por separado con las endonucleasas EcoRI y XbaI, y después purificados mediante QIAquick® Gel Extraction Kit. Los productos purificados fueron ligados para obtener la construcción *acl*-cDNA/pPICZB, que generaría la ACL recombinante con una fusión 6XHis-tagged. Los detalles de la digestión, purificación, ligación y la transformación de células quimio-competentes de *E. coli* TOP10 se describieron en el párrafo precedente. La clona transformada de *E. coli* TOP10 con la construcción *acl*-cDNA/pPICZB se identificó mediante Colony blot. La transferencia de colonias a una membrana de Nylon y su posterior lisis celular se llevó a cabo conforme a lo descrito en Sambrook & Russell (2001), con excepción del marcaje de la sonda (*acl*-cDNA) e inmuno-detección que fueron realizadas con el DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche, San Francisco, CA). Las colonias con signos de hibridación (tonalidad azul) se sometieron a Colony PCR (usando los iniciadores cDNA-F y DNA-R), el tamaño del inserto se verificó por electroforesis en geles de agarosa. El DNA plasmídico se extrajo de clonas con insertos del tamaño esperado mediante el QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, USA) y se secuenció el inserto completo. La secuencia nucleotídica de la construcción *acl*-cDNA/pPICZB se analizó *in silico* para verificar: i) la ausencia de codones de paro a lo largo de la secuencia codificante insertada, ii) que la secuencia estuviera en fase, *i.e.*, que la traducción iniciará en la primer metionina de nuestra proteína y que terminará después de incorporar la cola de histidinas, correspondientes a una sección de la secuencia del vector de expresión pPICZB (The Gene Construction Kit® (GCK) program 2.5.13, USA), para asegurar la expresión de la ACL-6XHis tagged.

4.1.7 Recombinación homóloga del *acl*-cDNA en *P. pastoris*

Una de las clonas de *E. coli* TOP10 (*acl*-cDNA/pPICZB) se propagó para obtener su DNA plasmídico (10 µg), el cual se linearizó con la endonucleasa PmlI y se purificó con el

QIAquick® Gel Extraction Kit. Este casete lineal de expresión se usó para electroporar células electro-competentes de *P. pastoris* X-33 en un electroporador Bio-Rad Micropulser. La electroporación se realizó en celdas de 0.2 cm de amplitud de ranura (Sigma, USA) con 80 µL de la mezcla de células y DNA linealizado, usando el programa configurado para electroporar *P. pastoris*. Las clonas transformadas fueron seleccionadas después de crecerlas en placas de agar YPDS con zeocina (500 µg/mL), conforme al protocolo EasySelect™ Pichia Expression Kit (Invitrogen, CA, USA). La recombinación del *acl*-cDNA en el genoma de *P. pastoris*, fue verificada por electroforesis del amplicón obtenido por Colony PCR. La Colony PCR fue realizada tal como se mencionó anteriormente, pero con un tiempo de desnaturalización de 12 minutos.

4.1.8 Ensamble y análisis bioinformático del gen *acl*

Las secuencias nucleotídicas de los insertos de las construcciones *acl*/pGEM3Z, *acl*/pJET1.2, *acl*-cDNA/pGEM3Z y *acl*-cDNA/pPICZB, obtenidas en este trabajo, fueron secuenciadas, ensambladas por separado y editadas usando el programa ChromasPro (version 1.7.4, Technelysium Pty Ltd., Australia). La estructura del gen *acl* se determinó a partir de los ensamblajes (*acl*/pGEM3Z y *acl*/pJET1.2) usando el programa New Genscan Web Server at MIT (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>). La localización de sitios potenciales de unión a factores de transcripción se realizó mediante el programa AliBaba2.1 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>). Por otra parte, para el análisis filogenético de ACLs, se usó BlastN para realizar un muestreo de ACLs codificadas por un solo gen conforme al GenBank del NCBI. Las secuencias representativas del muestreo junto con la secuencia codificada a partir de las construcciones *acl*-cDNA/pGEM3Z y *acl*-cDNA/pPICZB, se alinearon con el programa Clustal X 2.0 y se editaron con el programa SeaView versión 4: Multiple Alignment Editor para eliminar gaps (Gouy y col., 2010). La matriz de similitud e identidad fue construida a partir del alineamiento resultante mediante el Software MatGat 2.01 (Campanella y col., 2003). El árbol filogenético de la ACL fue construido por máxima verosimilitud usando el programa PhyML

<http://atgc.lirmm.fr/phym1/> (Guindon y col., 2010). La estimación estadística de cada nodo fue determinada por 1000 réplicas de bootstrap.

4.1.9 Expresión de la enzima ACL recombinante

Una asada de colonia de *P. pastoris* X-33 con la construcción *acl*-cDNA/pPICZB (*Pichia*-ACL1) con una edad de cultivo en placa no mayor a cinco días, se propagó en un matraz de 250 mL con 32 mL de medio YPD a 28 °C, 160 rpm por 20 h en una agitadora orbital (New Brunswick Scientific, USA). El paquete celular obtenido por centrifugación del cultivo (3000 rpm, 10 min, temperatura ambiente), se resuspendió en 20 mL de medio de inducción (Buffered metanol médium (BMM) con 0.5% (v/v) de metanol) en un matraz de 250 mL hasta una DO₆₀₀ de 0.8-1.0. La inducción de la expresión de la ACL 6XHis-tagged se realizó a 25 °C, 300 rpm, durante 72 h, con realimentación de 200 µl metanol cada 24 h, conforme al protocolo del fabricante del *EasySelect™ Pichia Expression Kit* (Invitrogen, USA). El cultivo inducido se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga (SORVALL® Type SS-1, USA) y el paquete celular se usó para obtener la proteína soluble como se describe a continuación.

4.1.10 Extracción de proteína soluble

El paquete celular del cultivo inducido se resuspendió en regulador de lisis (20 mM Tris-HCL, pH 7.5, con una tableta de SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets, EDTA free, por cada 50 mL), a una relación paquete celular:regulador de lisis 2:1 (v/v). La lisis celular se realizó en un tubo de ensayo con perlas de vidrio de 400-500 µm (suspensión celular:perlas de vidrio 1:1 (v/v)), en siete ciclos de agitación en un agitador vortex y enfriamiento en hielo, por 30 s cada uno. Los restos celulares fueron removidos por centrifugación (10,000×g, 15 min, 4°C). El sobrenadante conteniendo la proteína soluble fue separado y conservado a -20°C hasta su análisis (proteínas por SDS-PAGE, actividad ACL), o su uso para la purificación de la ACL recombinante. El análisis de proteína fue realizado por SDS-PAGE

al 10%, en un sistema Mini Protean III (BioRad, USA). El peso molecular de la subunidad de ACL fue estimado con el marcador de peso molecular de proteína de amplio rango, 30 a 250 kDa (New England BioLabs, USA). La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976), usando albumina de suero bovino como estándar (Sigma, USA).

4.1.11 Purificación de ACL recombinante

La ACL 6XHis-tagged fue purificada mediante cromatografía de afinidad a níquel, usando el Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen, USA). El extracto soluble fue mezclado con el regulador de unión nativo en una relación (1:5 v/v) y pasado a través de la columna de afinidad, de conformidad al *QIAexpress Ni-NTA Fast Start Handbook* (Qiagen, USA). La proteína fue eluida en tres etapas usando regulador de elución nativo con diferentes concentraciones de imidazol: la primera 25 mL con el 20 mM de imidazol, la segunda 25 mL con el 60 mM de imidazol, y la tercera 10 mL con el 160 mM de imidazol.

4.1.12 Análisis de western blotting y MALDI-TOF-TOF MS

El extracto soluble conteniendo la ACL 6XHis-tagged, fue purificado por cromatografía de afinidad a níquel y analizado por SDS-PAGE al 10%. Para el análisis western blotting, las proteínas del gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, enseguida la membrana fue bloqueada con leche descremada al 5% por 1 h a temperatura ambiente. Entonces fue incubada toda la noche a 4 °C con una dilución en leche (1:5000) de Penta His Antibody (Qiagen, USA) e incubada con rabbit anti-mouse IgG-AP (sc-358921; Santa Cruz Biotechnologies, USA). La membrana fue lavada con regulador TBST (TBS tritón) y tratada durante 5-10 min con NTB/BCIP, (Roche, USA). La actividad de la fosfatasa alcalina sobre el NTB/BCIP nos permitió visualizar las bandas que corresponden a la proteína ACL 6XHis-tagged.

Por otro lado, la banda observada después de teñir con azul de Coomassie, *i.e.*, de 120 kDa, fue extirpada y analizada por MALDI TOF/TOF, por el servicio de identificación de proteínas del Instituto Nacional de Medicina Genómica, México, D.F. Con los espectros MS/MS obtenidos se realizó una búsqueda, considerando la masa de la huella peptídica para la identificación de la proteína, usando el algoritmo Paragon del software ProteinPilot con un porcentaje de confianza del 66%, en las bases de datos UniProt (<http://www.uniprot.org>) y el NCBI.

4.1.13 Actividad ACL

La actividad de la enzima ACL se determinó con base en la reacción acoplada a la enzima malato deshidrogenasa (MDH) dependiente de NADH (Sreré, 1959). La enzima ACL cataliza la ruptura de citrato en acetil-CoA y oxalacetato, este último, es el sustrato para la enzima malato deshidrogenasa que requiere de NADH. El consumo de NADH se detecta espectrofotométricamente en la región de UV (340 nm). Por estequiometría se sabe que, una mol de NADH consumido es igual a una mol de citrato escindido.

La mezcla para determinar la actividad ACL contenía; muestra de proteína (4.4 µg de proteína), 225 µl de la solución A y 12.5 µl de ATP 0.4 M. La solución A para 10 ensayos de ACL contiene; 1955 µl de Tris-HCl 0.1 M a pH 8.5, 125 µl de CoA-SH 4 mM, 25 µl de NADH 10 mM, 62.5 µl de MgCl₂ 0.4 M, 2.5 µl de β-mercaptoetanol, 62.5 µl de citrato de sodio 0.8 M, 42.5 µl MDH 10 U. Transcurridos cinco minutos después de realizada la mezcla de la solución A con la proteína se lee la Absorbencia a 340 nm (Abs1; control) y en seguida se agrega el ATP. Transcurridos cinco minutos, se detiene la reacción adicionando 20 µl de EDTA 250 mM, y se lee nuevamente la Absorbencia (Abs2).

La disminución neta (Abs1-Abs2) se utilizó para determinar el NADH oxidado por la MDH, la cantidad de citrato escindido por la enzima ACL se determina de acuerdo a:

$$\frac{\mu\text{mol} \cdot \text{NADH}}{\text{mg} \cdot \text{min}} = \frac{(\text{Abs1} - \text{Abs2})}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot t \cdot P \cdot V_m}$$

Dónde:

$E_{1cm}^{1\%}$ Coeficiente de extinción (6.2 $\mu\text{mol NADH}/\text{cm}^2$).

t Tiempo de reacción con ATP (min)

P Concentración de proteína (mg/mL)

V_m Volumen de reacción (cm^3)

Una unidad enzimática de ACL es definida como la cantidad de enzima (mg) que cataliza la conversión de una μmol de citrato por minuto

Todos los ensayos de actividad ACL (excepto durante la selección de la clona transformada *Pichia*-ACL1) se realizaron en un equipo Eppendorf ThermoStat Plus (Eppendorf, Hauppauge, NY) a temperatura y pH óptimo (21 °C, pH 8.5 y 300 rpm). Las condiciones de temperatura óptima y pH óptimo, se identificaron mediante un barrido de temperatura de 10 °C hasta 30 °C y uno de pH de 6.5 hasta 9.5. Las lecturas de Absorbancia en todos los casos se realizaron en un espectrofotómetro WPA Biowave II a 340 nm.

La determinación de los parámetros cinéticos de la 6XHis-tagged se realizó mediante los métodos de Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf y Eadie-Hofstee.

5. RESULTADOS

5.1 Clonación del gen *acl* de *P. rhodozyma*.

Fueron aisladas dos secuencias de DNA homólogas que codifican ACLs en *P. rhodozyma* y depositadas en la base de datos del GenBank (con los números de acceso KM510496 y KM503045). Las dos secuencias muestran polimorfismos de simple y doble nucleótido a lo largo de sus secuencias. Estas secuencias son multiintrónicas y contienen secuencias codificantes del mismo tamaño (3450 pb) que codifican polipéptidos idénticos de 1150 aminoácidos con un peso molecular de 120.1 kDa.

La Tabla 1 muestra los iniciadores usados en este estudio. Mediante PCR, utilizando los iniciadores^a, se obtuvieron amplicones cuya secuencia nucleotídica fue homóloga a genes *acl* reportados para otros organismos. Estas primeras secuencias fueron la base para el diseño de iniciadores específicos (GSPs) del gen *acl* de *P. rhodozyma*. Con la finalidad de obtener los extremos 5' y 3' del gen, se llevó a cabo una PCR inversa usando los iniciadores GSPs y el DNA genómico de *P. rhodozyma* digerido con EcoR1 y recircularizado. La Figura 6, muestra un diagrama esquemático de la PCR inversa, junto al análisis electroforético de los productos de la PCR inversa. Se obtuvieron dos amplicones de aproximadamente 1300 y 400 pb, correspondientes al extremo 5 (atribuyéndose esto al posible efecto estrella de la endonucleasa EcoRI). Ambos amplicones mostraron secuencias nucleotídicas homólogas a genes de *acl* de basidiomicetos pero únicamente la secuencia obtenida del amplicón de 1300 pb mostró el codón de inicio (Figura 7; A). Por otro lado, se obtuvo un amplicón correspondiente al extremo 3' de alrededor de 350 pb. La secuencia nucleotídica también fue homóloga a los genes de *acl* de basidiomicetos y contenía el codón de paro (Figura 7; B). La Figura 7 muestra las secuencias nucleotídicas de los amplicones con sus correspondientes traducciones, además se resalta el codón de inicio y el codón de paro. Las secuencias nucleotídicas de los amplicones permitieron diseñar los iniciadores correspondientes a los extremos del gen, *i.e.*, DNA-F y DNA-R.

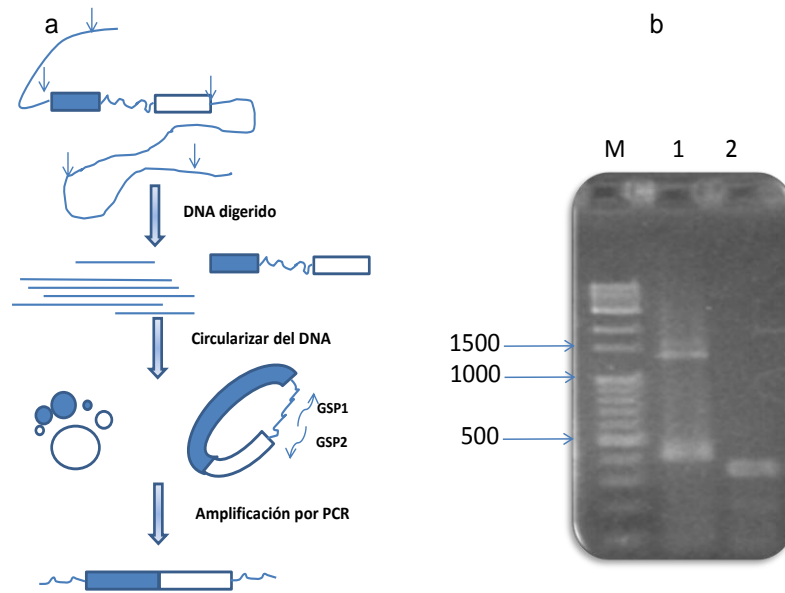


Figura 6. Diagrama esquemático de la PCR inversa usada para obtener los amplicones de los extremos de *acl* de *P. rhodozyma*. a) diagrama esquemático de la PCR inversa. Los rectángulos blancos y azules indican secuencias nucleotídicas adyacentes al gen de *acl* y b) Análisis electroforético de los productos de la PCR inversa. M es el marcador de peso molecular, 1 es producto de la segunda PCR anidada del extremo 5', y 2 es el producto de la segunda PCR anidada del extremo 3'. El DNA genómico de *P. rhodozyma* fue digerido con endonucleasa EcoR1 y circularizado con T4 DNA ligasa.

3'5' Frame 1

A

```
ggccacgcgtcgactagtagtaccctgggggttgacatctcctagatctttccatcatgtct  
G H A S T S T P G G - H L L D L S I M S  
cccaaacggttagtcgtaggctcttgtttgaggagtgtttcacaccggatcatctctc  
S K G - S L G S C L W E C F T P G S S L  
tgtgggtgctttgtggcgatggagtagagtgcaagcgagagagagatatcttgttcttcat  
C G A L W R W S R V Q A R E R Y L V L H  
tcacatctcacctttggcttctctcttcccctgtctcaactctcaactgactggatcatc  
S H L T F G F S L P L S Q L S T D W I I  
tcatcctttttgcagctatccgagagtagcagcgccaagctccttctttcccaccggcttc  
S S F L Q L S E S T T P S S F F P T G F  
ctctcatcaagactcccgctctcgacctcgggtccttcaaccgcttctaacgtccgggtcg  
L S S R L P S R P R V L Q P L L T S G S
```

5'3' Frame 1

B

```
ttccccgccactgccacccttgactacgctatcgggtgttgaggccggttacctccgcaaaa  
F P A T A T L D Y A I G V E A V T S A K  
aaggattctctcatcttgaatgtcgaaggagccattgccgcgcggttctgtgatcttctc  
K D S L I L N V D G A I A A A F C D L L  
aactgctccgggtgcattcaccagaggaggccgagtagcttaaggtcggaaacccta  
N C S G A F T Q E E A A E Y L K V G T L  
aacggattgttcggttcttggtcgatccatcgggttctcgtcacttcatcgaccagaag  
N G L F V L G R S I G F I G H F I D Q K  
atgctcaagcagcccctgtaccgacaccgctccgacgatttctacatctcgttcgccgat  
M L K Q P L Y R H P S D D F Y I S F A D  
cacagccgagtcgctcgtccagcccaagaagtaaattgtgtccatcga  
H S R V V V Q P K K - I V S I
```

Figura 7. Secuencias nucleotídicas de los extremos del gen acl. A) En la secuencia del extremo 5' (3'5' Frame 1) se resalta con un recuadro el codón de inicio (atg). B) En la secuencia del extremo 3' (5'3' Frame 1) se subraya el codón de paro (taa). La traducción del DNA fue realizada con el programa en línea ExPasy-Translate tool. La localización del codón de inicio primeramente fue determinado mediante el modelo GT/TG, y finalmente confirmado mediante el programa en línea New Genscan Web Server at MIT (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>).

El amplicón completo del gen *acl* fue generado mediante PCR, usando DNA genómico como molde y los iniciadores DNA-F y DNA-R, la Figura 8, muestra el análisis electroforético correspondiente. Al clonar el amplicón se obtuvieron las construcciones *acl*/pGEM3Z y *acl*/pJET1.2. El análisis de las secuencias obtenidas a partir de las construcciones *acl*/pGEM3Z y *acl*/pJET1.2, reveló dos secuencias nucleotídicas diferentes (con los números de acceso al GenBank, KM510496 y KM503045), ambas homólogas a genes de *acl* de otros organismos. Ambas secuencias nucleotídicas mostraron idéntica estructura (figura 9), *i.e.*, 4086 pb, siete exones y seis intrones, pero difieren en 72 bases entre ellas (anexo A.1 y A.2). Las secuencias muestran una mayor frecuencia de intrones en el extremo 5', como ocurre con genes *acl* de otros organismos. Los exones, en cada caso integran una secuencia codificante de 3450 bases, pero difieren en 39 bases entre las dos secuencias codificantes (anexo A.3). No obstante, las secuencias codificantes generan péptidos idénticos de 1150 aminoácidos, con peso molecular de 120 kDa (anexo A.4), un punto isoeléctrico de 8.41 y con los dos multidominios PNL02235 y PLN02522, que son necesarios para la función enzimática de las ACLs (Fatland y col., 2002; Griffiths y col., 2012). La Figura 10 muestra un diagrama esquemático de las características de la ACL de *P. rhodozyma*.

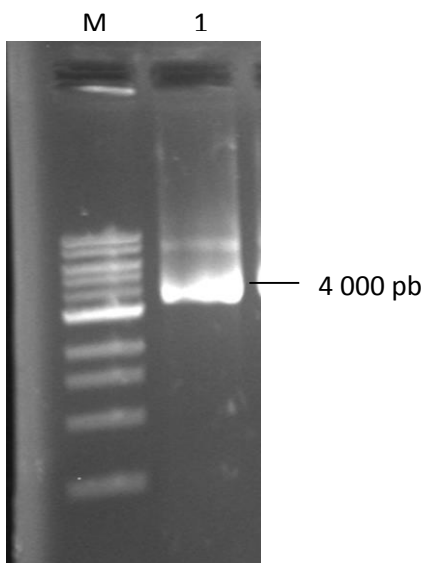


Figura 8. Análisis electroforético del amplicón del gen *acl* de *P. rhodozyma*. Carril M: muestra el marcador de tamaño molecular (1 kb Ladder, Fermentas, USA); Carril 1: muestra el producto de PCR correspondiente al amplicón completo. La electroforesis se realizó en gel de agarosa (0.8%) y fue teñido con bromuro de etidio.

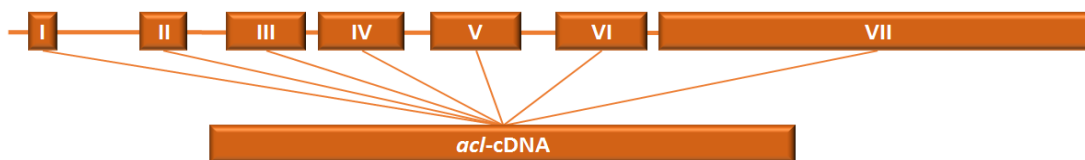


Figura 9. Diagrama esquemático de *acl* de *P. rhodozyma*. El gen *acl* tiene 4086 pb y una secuencia codificante de 3450 bases. Los exones e intrones son mostrados tal como se generaron por el GENSCAN Web Server at MIT. Los exones están determinados por los siguientes nucleótidos: 1-13, 200-317, 414-609, 713-887, 974-1108, 1208-1672 y 1736-4086.

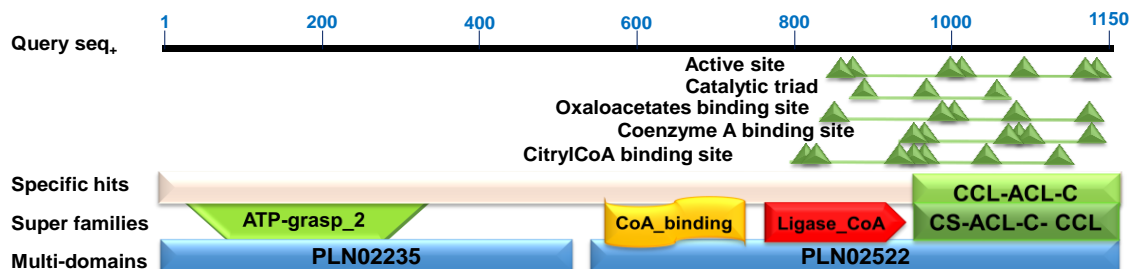


Figura 10. Esquema de las características generales de la enzima ACL de *P. rhodozyma*, identificadas a través del Conserved Domains Program of NCBI. El péptido tiene 1150 aminoácidos y contiene los multidominios PLN02235 y PLN02522 reportados para las ACLs.

Con la finalidad de obtener secuencias de las regiones promotoras, se realizaron otras dos PCR inversas en las que se usó el DNA genómico digerido con endonucleasas (XbaI o PmlI) y después circularizados. La PCR inversa en la que se usó DNA digerido con XbaI generó dos amplicones de alrededor de 2500 y 3000 pb, y que ambos contienen 200 pb de los extremos 5' y 3' de los genes KM510496 y KM503045. La secuenciación se llevó a cabo a partir de una clona y de un producto de PCR, respectivamente. La secuencia nucleotídica del amplicón de 2500 pb contiene 41 bases corriente arriba de KM510496 (41-TCTAGAAAGATCCGCTTAATCGTCTCCTAGATCTTTCCATC-1). Al comparar las primeras 100 bases corriente abajo del codón de inicio (ATG), encontramos 100% de identidad con KM510496. La secuencia nucleotídica del amplicón de 3000 pb contiene 39 bases (39-TCTAGAAAGATTCGGCCCAGCCGGCCGGCTTTCCATC-1, anexo A.5) corriente arriba de KM503045. Sin embargo, al comparar las primeras 100-pb corriente abajo del codón de inicio (ATG), encontramos una diferencia de 2 bases. Por otro lado, la PCR inversa en la que se usó DNA digerido con PmlI, generó un amplicón de alrededor de 3000 pb con una secuencia de 542 bases corriente arriba de KM503045 (anexo A.5 y A.7). Al comparar las primeras 100 pb corriente abajo del codón de inicio, encontramos 100% de identidad con KM503045. La secuencia corriente arriba fue secuenciada cuatro veces a partir de clones distintas. Esta secuencia (542 bases) tiene una identidad del 95% en relación con la secuencia correspondiente del genoma de *X. dendrorhous* CBS 6938, recientemente liberado.

5.2 Clonación del *acl*-cDNA

La región codificante del gen *acl*, *i.e.*, *acl*-cDNA, se amplificó mediante RT-PCR usando como molde el RNA total de un cultivo (edad 30 h) con limitación de nitrógeno. El análisis electroforético del producto de la RT-PCR (Figura 11) mostró una banda única de aproximadamente 3500 pb, que una vez purificada, fue clonada en el vector de clonación pGEM 3Z. El inserto completo de *acl*-cDNA, de una clona recombinante fue secuenciado a partir del DNA plasmídico. La secuencia codificante obtenida (con número de acceso al

GenBank KM510486) es de 3450 bases, y codifica un péptido de 1150 aminoácidos con un peso molecular de 120 kDa. El tamaño molecular y el péptido codificado por el *acl*-cDNA son iguales a los de los genes KM510496 y KM503045.

M 1 2

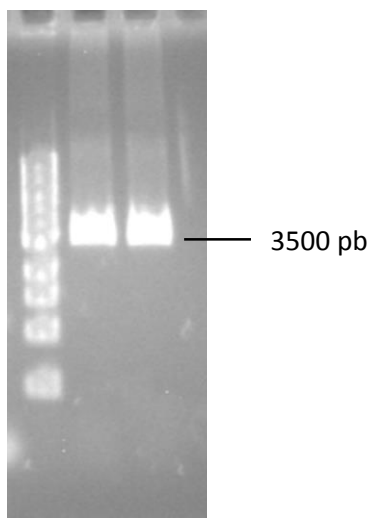


Figura 11. Análisis electroforético del amplicón completo *acl*-cDNA obtenido mediante RT-PCR. Carril M: marcador de tamaño molecular (1 kb Ladder, Fermentas, USA); Carriles 1 y 2: productos de RT-PCR (*acl*-cDNA). La electroforesis se realizó en gel de agarosa (1.5%), el cual fue teñido con bromuro de etidio.

5.3 RACE (Rapid amplification of cDNA ends)

Con el propósito de buscar posibles transcritos diferentes del gen *acl* en *P. rhodozyma*, realizamos el RACE del extremo 5' del cDNA. Secuencias nucleotídicas del extremo 5' del cDNA (700 pb) fueron amplificadas mediante RACE y clonadas en el vector pJET 1.2. Los insertos *acl*-cDNA700 de 15 clonas recombinantes con la construcción *acl*-cDNA700/pJET 1.2 mostraron en todos los casos una secuencia nucleotídica idéntica, sugiriendo que los transcritos se originaron de un solo gen *acl*, al menos en las condiciones de muestreo (limitación de amonio), y que no ocurrió empalme alternativo.

5.4 Subclonación del *acl*-cDNA en el vector pPICZB

El vector de expresión pPICZB es diseñado para el sistema de expresión de la levadura *P. pastoris*, que puede expresar una proteína recombinante con la fusión 6XHis-tagged (Figura 12). La construcción *acl*-cDNA/pGEM3Z se subclonó en el vector de expresión pPICZB, y con la construcción resultante, *acl*-cDNA/pPICZB, se transformaron células quimio-competentes

de *E. coli* Top 10. En una de las clonas transformadas, *E. coli/acl*-cDNA/pPICZB, se verificó el tamaño y la secuencia nucleotídica del inserto mediante Colony PCR y el análisis de secuenciación del DNA. La Figura 13 muestra el mapa de secuenciación del inserto de la construcción *acl*-cDNA/pPICZB, generado mediante el programa ChromasPro 1.7.4. La secuencia nucleotídica del *acl*-cDNA se muestra en el anexo A.3. Para asegurar la expresión de la ACL recombinante con la fusión de la cola de histidinas (ACL 6XHis-tagged), se verificó que el inserto estuviera en fase, *i.e.*, que la traducción de la secuencia codificante empiece desde la primera metionina y termine con la fusión de la cola de histidinas en la ACL recombinante (The Gene Construction Kit® (GCK) program 2.5.13, USA). Además, se verificó que la secuencia nucleotídica del inserto, no mostrara sitios anticipados de término de la traducción para *P. pastoris*, esto conforme a las secuencias nucleotídicas reportadas en el manual de *EasySelect™ Pichia Expression Kit* (Invitrogen, USA).

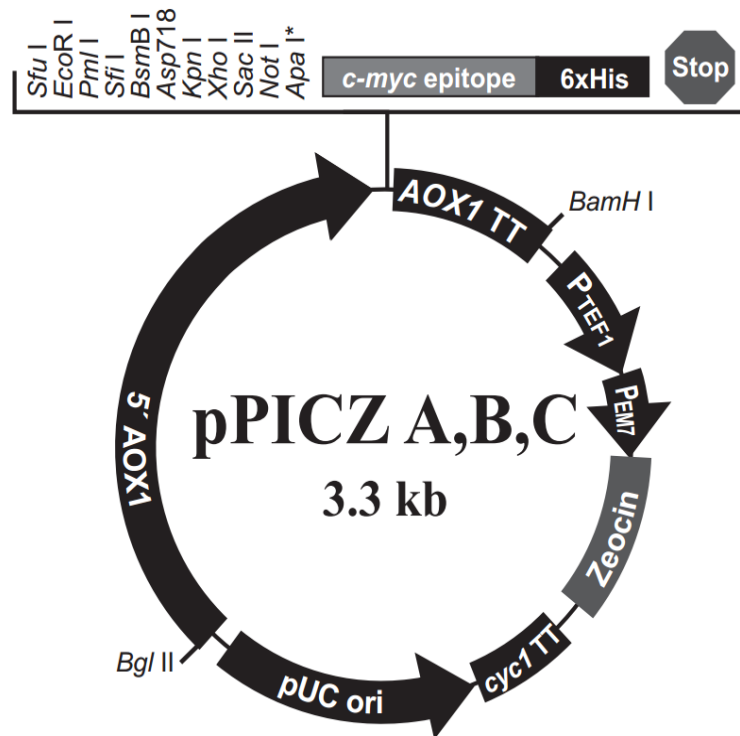


Figura 12. Vector de expresión pPICZ B. 5'AOX1, región promotora; sitio múltiple de clonación_c-myc epitope_6xHis_Stop; AOX1 TT, región terminadora; PTEF1, región promotora; PEM7, región promotora; Zeocin, marcador de selección; CYC1 TT, región terminadora; pUC ori, origen de replicación.

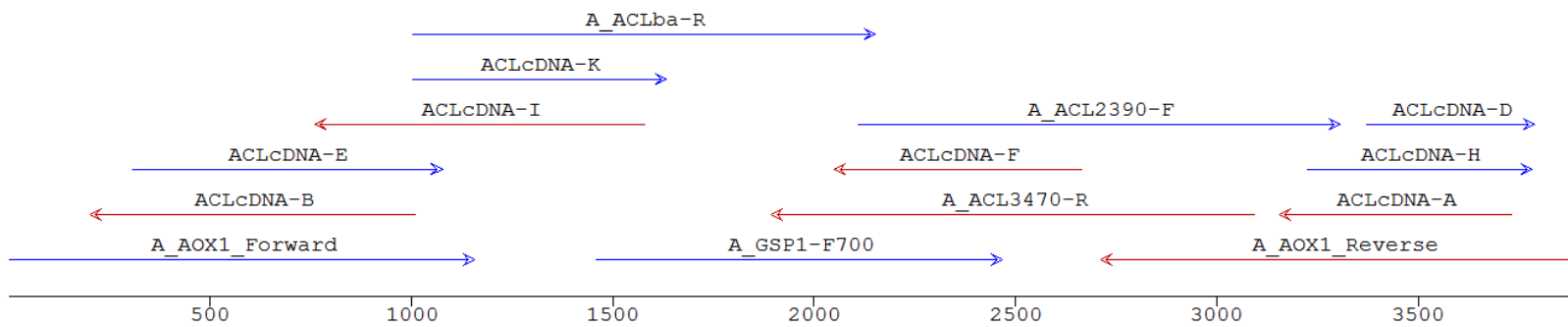
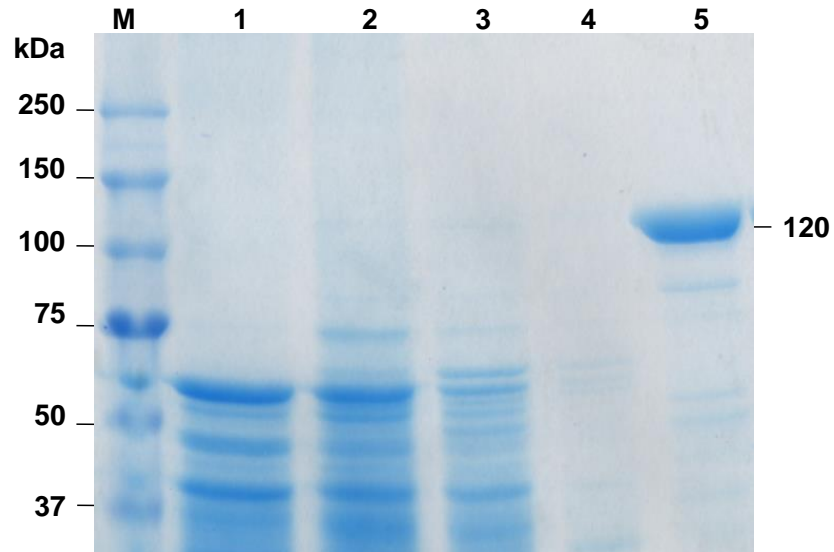


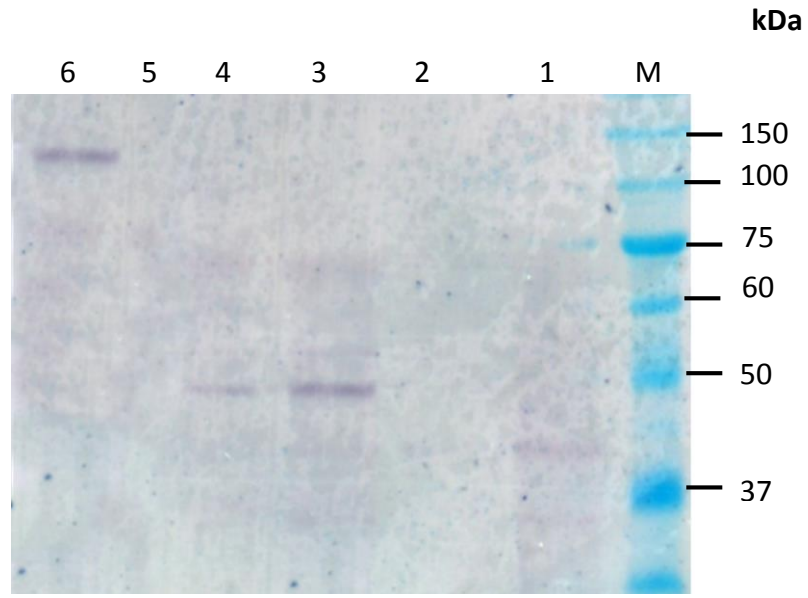
Figura 13. Mapa de secuenciación del *acl*-cDNA que incluye la fusión de la secuencia codificante y cola de histidinas, generado mediante el programa ChromasPro 1.7.4.

5.5 Expresión y purificación de la ACL 6XHis-tagged

El modulo lineal de expresión obtenido a partir de la construcción *acl*-cDNA/pPICZB se usó para transformar células electrocompetentes de *P. pastoris* X-33. Se seleccionó la clona con mayor actividad ACL, a la que se le nombró *Pichia*-ACL1, y se utilizó para la expresión y purificación de ACL. Esta clona se obtuvo después del análisis de diez clonas recombinantes (*P. pastoris* X-33/*acl*-cDNA/pPICZB), cuyos extractos proteicos solubles mostraron actividad ACL aumentada, en relación a extractos obtenidos de *P. pastoris* X-33 transformada con el vector pPICZB vacío. El extracto proteico soluble de *Pichia*-ACL1 mostró cuatro veces más actividad ACL que el extracto proveniente de *P. pastoris* X-33 con el vector pPICZB vacío. La ACL 6XHis-tagged se purificó a homogeneidad mediante cromatografía de afinidad a níquel a partir de un cultivo de expresión de *Pichia*-ACL1. La Figura 14, muestra un gel de poliacrilamida desnaturalizante (10% SDS-PAGE) en el que se pueden ver los perfiles de proteínas en diferentes etapas de la purificación. Aun cuando en el extracto soluble no se distingue una proteína del tamaño esperado (120 kDa), al concentrarse la ACL 6XHis-tagged se observa una banda de proteína con peso molecular 120 kDa. La ACL 6XHis-tagged fue concentrada 56 veces con un rendimiento del 70% con respecto al extracto crudo como se muestra en la Tabla 2. La identificación preliminar de la ACL 6XHis-tagged se realizó mediante Western blot; ya que esta proteína tiene el epítotope 6XHis-tagged (Figura 15). La secuencia peptídica se corroboró por análisis MALDI-TOF/TOF-MS (Tabla 4).



*Figura 14. Análisis electroforético (10% SDS-PAGE) del perfil de proteínas en las diferentes etapas de purificación de ACL 6XHis-tagged mediante cromatografía de afinidad a níquel. Carril M: marcador de proteína de amplio rango (BioLabs, USA); carril 1: extracto de proteína soluble; carril 2: proteínas no retenidas en la columna de níquel; carril 3: proteínas de la primera elución con 40 mM de imidazol; carril 4: proteínas de la segunda elución con 60 mM de imidazol; y el carril 5: tercera elución con 160 mM de imidazol, *i.e.*, la ACL 6XHis-tagged purificada a homogeneidad.*



*Figura 15. Western blot de la ACL 6XHis-tagged. Carril M: marcador de proteína de amplio rango (BioLabs, USA); carril 1: extracto de proteína soluble; carril 2: proteínas no retenidas en la columna de níquel; carril 3: proteínas de la primera elución con 40 mM de imidazol; carril 4: proteínas de la segunda elución con 60 mM de imidazol; carril 5: espacio vacío; y el carril 6: tercera elución con 160 mM de imidazol, *i.e.*, la ACL 6XHis-tagged purificada a homogeneidad.*

5.6 Caracterización bioquímica de la ACL recombinante

La enzima ACL recombinante purificada a partir del extracto soluble de *Pichia-ACL1*, tuvo máxima actividad ACL a pH 8.5 y a una temperatura de 21 °C (Figura 16). La actividad de la enzima mostró el comportamiento típico de la cinética de Michaelis-Menten con las concentraciones de citrato, CoA o ATP, manteniendo constantes las concentraciones de dos de ellos. Asimismo, los parámetros cinéticos, fueron determinados a través de la regresión líneal de la ecuación Lineawer-Burk, para citrato, CoA y ATP fueron K_m 70.2, 0.064 y 1.6 mM, respectivamente; mientras que para el citrato, la V_{max} fue de 2.02 $\mu\text{moles (mg}^{-1}\text{min}^{-1})$. La Tabla 3 muestra los valores de los parámetros cinéticos de la ACL 6XHis-tagged calculados mediante las regresiones lineales de las ecuaciones de Hanes-Woolf y Eadie-Hofstee.

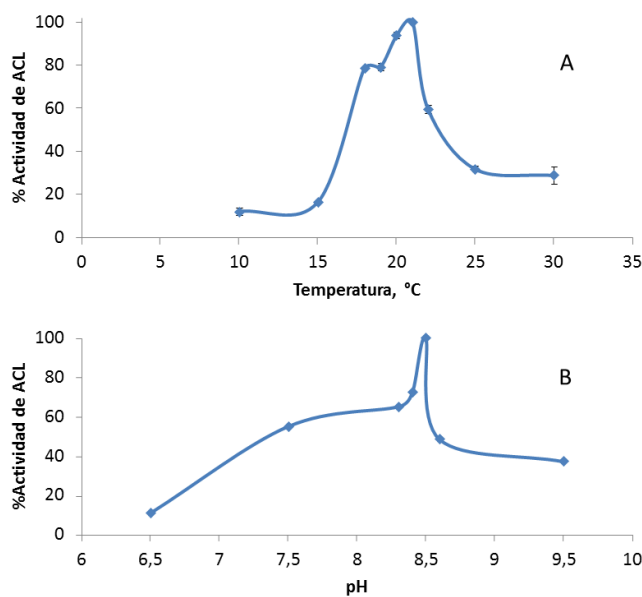


Figura 16. Temperatura óptima y pH óptimo de la ACL 6XHis-tagged. Perfil de actividad de la ACL A) en función de la temperatura y B) en función del pH. Se puede apreciar una temperatura óptima en 21°C y un pH óptimo en 8.5.

Tabla 2: Purificación de la ACL 6XHis-tagged de *P. rhodozyma* expresada en *Pichia*-ACL1.

<i>Fracción</i>	<i>Volumen (mL)</i>	<i>Proteína total (mg)</i>	<i>Actividad específica (μmol/mg min)</i>	<i>Unidades totales (μmol/min)</i>	<i>Rendimiento de actividad (%)</i>	<i>Purificación (x-fold)</i>	<i>Rendimiento de proteína (%)</i>
Extracto soluble	4.8	35.1	0.036	1.26	100	1	100
Proteína no retenida	25	27	0.01	0.29	23	0	75.3
Elución 1	25	6.7	0	0	0	0	19.1
Elución 2	25	1.5	0.057	0.09	7	0	4.3
Elución 3 ACL 6XHis-tagged purificada	9	0.44	2	0.88	70	56	1.3

Tabla 3. Parámetros cinéticos de la ACL 6XHis-tagged de *P. rhodozyma*.

Parametro cinético	Ecuación		
	<i>Lineweaver-Burk</i>	<i>Hanes-Woolf</i>	<i>Eadie-Hofstee</i>
Citrato			
V _{max} μmoles (mg ⁻¹ min ⁻¹)	70.24	72.51	70.56
K _m (mM)	2.02	2.08	2.03
K _m para ATP (mM)	1.57	2.08	1.65
K _m para CoA (mM)	0.064	0.064	0.063

5.7 Análisis de MALDI-TOF/TOF-MS

La banda de aproximadamente 120 kDa correspondiente a la ACL 6XHis-tagged fue extirpada del gel para su identificación. Los espectros de masas y la huella peptídica fueron obtenidas y analizadas por MALDI-TOF/TOF-MS. Los treinta péptidos identificados tienen 42.2% de cobertura respecto a la secuencia de aminoácidos de la ACL 6XHis-tagged generada *in silico*. Veinte péptidos diferentes mostraron coincidencia exacta en su masa, correspondiendo a 333 aminoácidos que equivalen al 28% de cobertura (Tabla 4); mientras que 10 péptidos mostraron variación en su masa, correspondiendo a 163 aminoácidos que equivalen al 14% de cobertura. Estos últimos péptidos podrían presentar modificaciones postraduccionales (metilación, fosforilación, glicosilación) o hasta presentar la modificación de un aminoácido (Chick y col., 2015). Como un ejemplo, la Figura 18 muestra el espectro de masas, donde se observa el ion precursor, la evidencia de fragmentación y la hipótesis de identificación del péptido 135-YPGTSFIDHLLR-146. Este péptido corresponde a una fracción de la subunidad de ACL de *P. rhodozyma*, que tiene coincidencia exacta en su masa. Esta información fue usada, por el algoritmo de búsqueda Paragón del software ProteinPilot del MALDI-TOF/TOF-MS, para identificar la huella peptídica que corresponde al péptido YPGTSFIDHLLR.

Al comparar los péptidos identificados con la secuencia de *Cryptococcus gattii* WM276 (número de acceso en el GenBank de XP003194037), se localizaron péptidos idénticos a la subunidad 1 de la ATP citrato sintasa (ATP-citrate (pro-S-)-lyase) con una cobertura del 18.1%.

Tabla 4. Péptidos identificados por MALDI-TOF/TOF-MS de la ACL 6XHis-tagged expresada por *Pichia-ACL1*.

Cantidad	Péptidos con una coincidencia exacta	Región	Longitud
1	TPISTGSPSTASNVR	24-38	14
2	GLPDWVFTEK	60-69	10
3	AGDEILFTHEGGVDVGDVDAK	143-163	21
4	LLIPVGEDFPTR	167-178	12
5	KDVLADFLIR	194-203	10
6	GPPMVWPAPFGR	277-288	12
7	LTVLNQEGR	309-318	9
8	TILSLITR	366-373	8
9	VLIIGGGIANFTNVAATFK	382-400	19
10	SLVFGLQPR	542-550	9
11	HADADVLVNFSSRSVYSSTLDAFNYPQIKAIALIAEGVPER	606-647	42
12	VLIIGPATVGGIKPGCFR	661-678	18
13	YPGTSFIDHLLR	735-746	12
14	MLVLLGEVGGIEEYR	755-769	15
15	AAGFIVPDTFEELPDVLK	824-841	18
16	WAQELGMIR	870-878	9
17	GQELLYAGMR	892-901	10
18	DLVSSLAAGLLTIGDRFGGALDGAAANFTSALNSGQTPREFVDSMR	962- 1007	46
19	VGTLNGLFVLGRSIGFIGHFIDQK	1097- 1120	24
20	HPSDDFYISFADHSR	1129- 1143	15
Total de aminoácidos			333

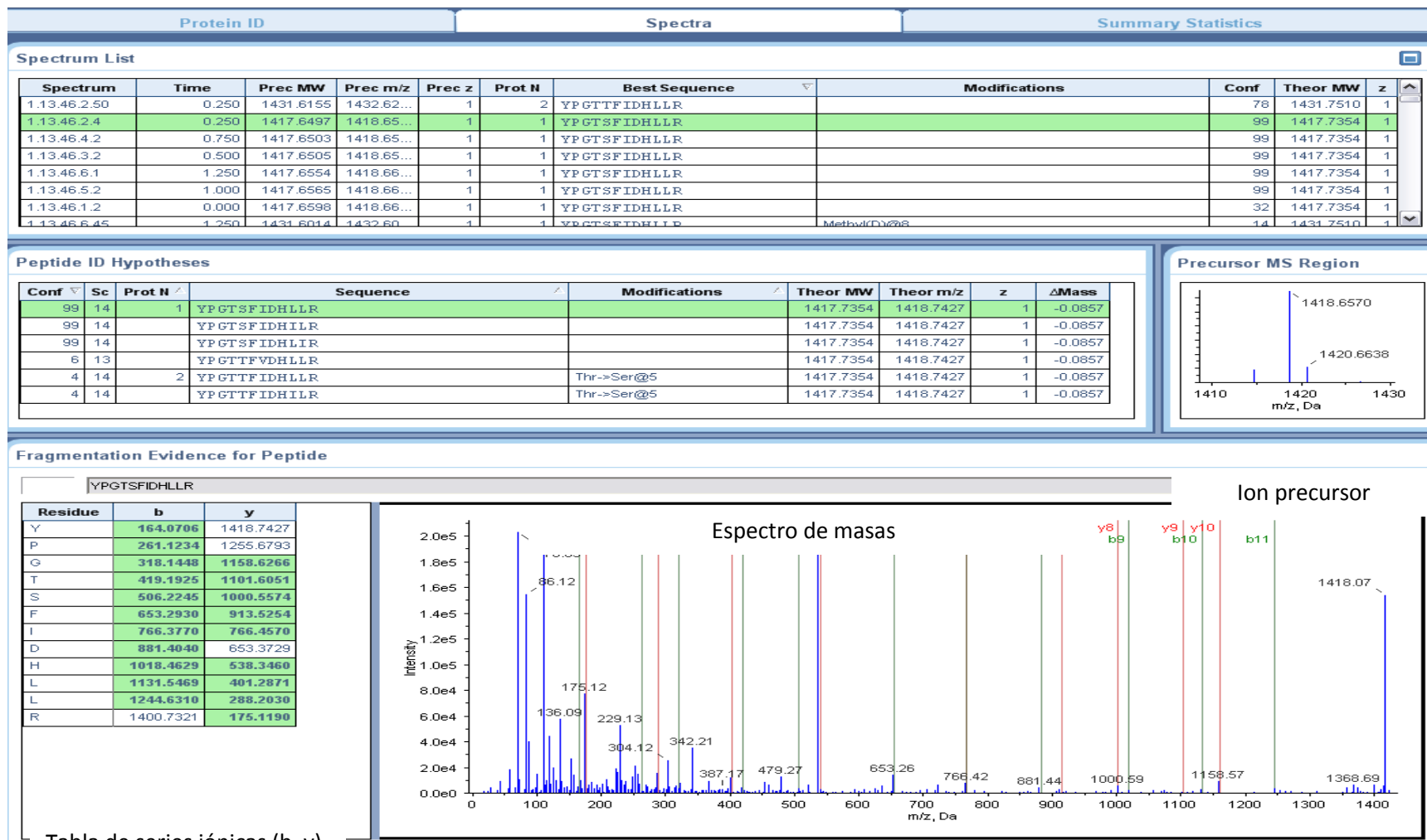
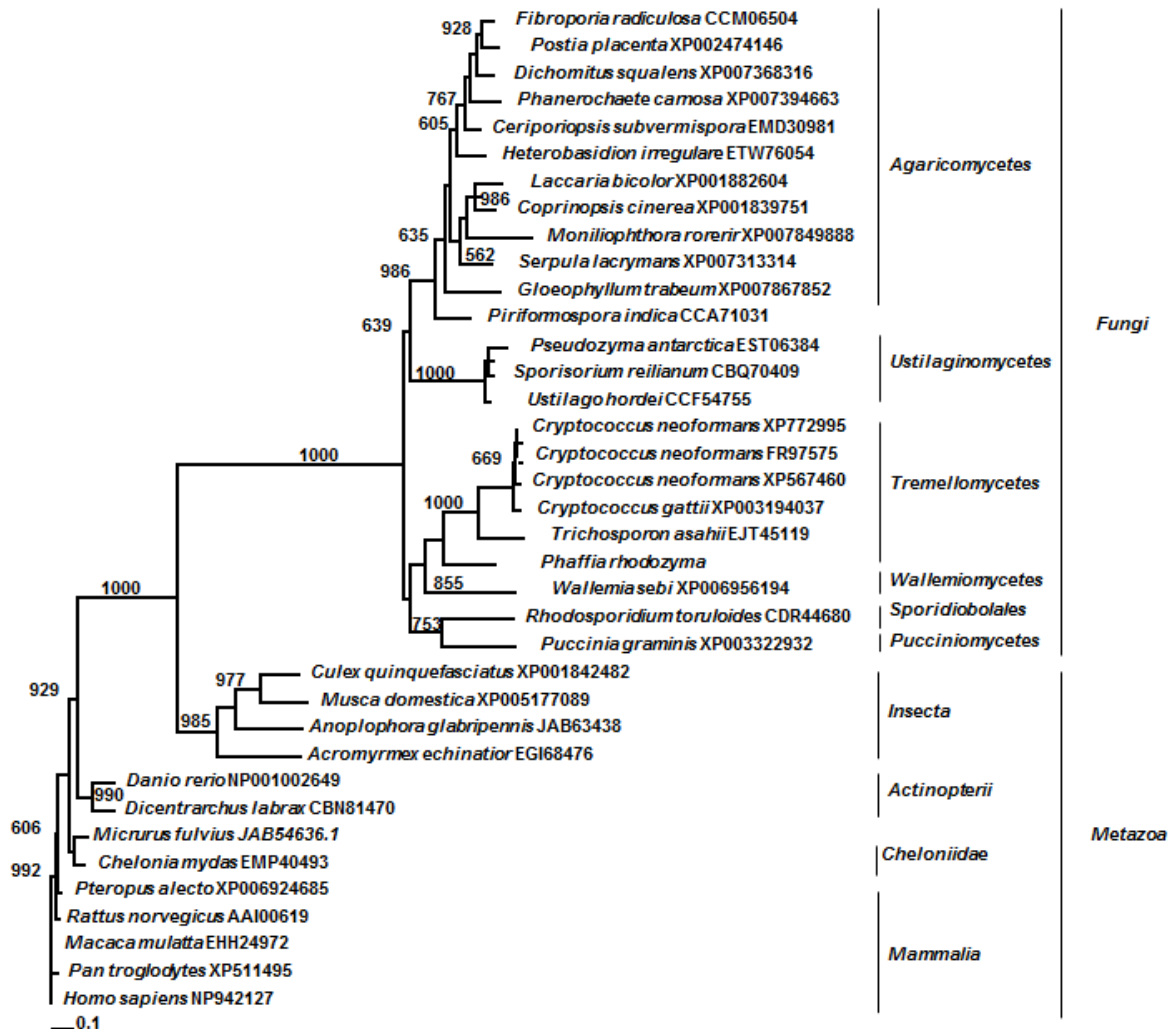


Figura 18. Espectro de masas del péptido 735- YPGTSFIDHLLR-746 correspondiente a la ACL 6XHis-tagged.

5.8 Análisis filogenético de la ACL de *P. rhodozyma*

La Figura 19 muestra la relación filogenética entre los péptidos de subunidades de ACLs de diferentes organismos. La ACL de *P. rhodozyma*, identificada en este trabajo, se agrupa en un clado bien soportado que contiene las ACLs de basidiomicetos, particularmente las ACLs de levaduras de varias especies de *Cryptococcus*. La Tabla 5 muestra que la subunidad completa de ACL de *P. rhodozyma* tiene similitud de 87% con la enzima putativa de *Cryptococcus gattii*, 87% con la enzima putativa de *Cryptococcus neoformans*, y 71% con la isoforma de la ACL humana (ACLY).



La Figura 19. Árbol filogenético de subunidades de ACL codificados por un único gen *acl* (obtenido mediante el programa en línea PhyML). Las estimaciones de confianza fueron determinadas por 1000 réplicas de bootstrap.

Tabla 5. Similitud de aminoácidos (en gris) e identidad (en blanco) entre ACLs de varios organismos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. <i>Phaffia rhodozyma</i> _ACL		78	78	73	75	75	74	74	73	75	73	55	51	55	55
2. <i>Cryptococcus gattii</i> _XP_003194037.1	87		98	72	74	74	73	73	71	72	72	55	51	55	55
3. <i>Cryptococcus neoformans</i> _XP_772995.1	87	99		72	74	74	72	73	71	72	72	55	50	55	55
4. <i>Puccinia graminis</i> _XP_003322932.1	82	82	81		73	74	73	73	75	73	71	55	51	55	55
5. <i>Postia placenta</i> _XP_002474146.1	84	83	83	84		86	76	86	73	86	82	57	51	56	56
6. <i>Coprinopsis cinerea</i> _XP_001839751.2	84	83	83	84	91		76	90	74	86	82	57	52	57	56
7. <i>Ustilago hordei</i> _CCF54755.1	83	81	81	83	86	85		76	73	76	74	56	51	56	56
8. <i>Laccaria bicolor</i> _XP_001882604.1	84	83	83	83	91	95	85		74	87	82	56	52	56	56
9. <i>Rhodospodium toruloides</i> _CDR44680.1	82	81	81	85	83	83	83	83		73	72	55	52	55	54
10. <i>Serpula lacrymans</i> _XP_007313314.1	84	82	82	84	92	92	86	92	84		82	56	51	56	56
11. <i>Moniliophthora roreri</i> _XP_007849888.1	82	81	82	82	88	90	84	89	82	89		56	51	56	55
12. <i>Homo sapiens</i> _NP_942127.1	71	70	70	71	72	73	71	72	71	72	71		93	99	97
13. <i>Pan troglodytes</i> _XP_511495.3	66	65	65	66	67	68	66	67	67	68	67	93		92	91
14. <i>Macaca mulatta</i> _EHH24972.1	71	70	70	71	72	72	71	71	71	73	71	10	93		98
15. <i>Rattus norvegicus</i> _AAI00619.1	70	70	70	71	72	72	71	71	71	73	71	99	93	99	

6 DISCUSIÓN

En este estudio, se identificaron dos genes (números de acceso al GenBank KM503045 y KM510496) de *acl* en *P. rhodozyma*. El análisis *in silico* mostró que ambos genes tienen 4086 pb e idéntica estructura, conformada por siete exones y seis intrones (Figura 9), y secuencias codificantes de 3450 bases. Estos genes de *P. rhodozyma* muestran cinco intrones en las primeras 1108 bases. La estructura del gen *acl* de *P. rhodozyma* concuerda con la estructura correspondiente de *C. gattii* WM276 (número de acceso NC_014941.1). Sin embargo, el gen de *P. rhodozyma* es 236 pb más largo que el de *C. gattii* WM276.

Los genes *acl* de eucariontes, incluidos microorganismos y mamíferos, son genes relativamente complejos. El gen de la rata (número de acceso al GenBank NC_005109.3) es de 51638 pb, y contiene 30 exones y una secuencia codificante de 3276 bases. El gen *acl* humano (número de acceso al GenBank NC_000017.11) es de 63626 pb y contiene 30 exones y una región codificante de 3468 pb. Al analizar los genes de *acl* de diferentes especies, encontramos una mayor frecuencia de intrones en el extremo 5' que en el extremo 3'. Lo anterior es consistente con lo reportado por Lord y col., (1997), quienes reportaron que la isoforma de ACL humana (ACLY) es generada por empalme alternativo de exones del extremo 5', modificando el extremo N-terminal de la subunidad de ACLY. La mayor frecuencia de intrones en el extremo 5' de los genes *acl* de *P. rhodozyma*, sugiere la posibilidad de empalmes alternativos. Si es que existieran isoformas de ACL en *P. rhodozyma*, éstas deberían generarse a partir de un empalme alternativo en la región del extremo 5'. Un estudio previo de Chávez-Cabrera y col., (2010) sugirió la posible existencia de isoformas de ACL de *P. rhodozyma*, en virtud de que se observaron incrementos diferenciales de actividad al agotarse el amonio y al incrementarse el oxígeno disuelto. Sin embargo, en cultivos de *P. rhodozyma* con limitación de amonio (este trabajo) los transcritos maduros correspondieron con los siete exones del gen *acl*, es decir, no se observaron empalmes alternativos, por lo menos en las condiciones de muestreo.

Por otro lado, los dos genes (KM503045 y KM510496) codifican péptidos idénticos a pesar de tener 72 diferencias nucleotídicas entre ellos. Las dos regiones codificantes son de 3450 pb pero difieren en 39 nucleótidos entre ellas. El tamaño de las regiones codificantes fue consistente con el tamaño obtenido a partir del cDNA (*acl*-cDNA, 3450 pb) obtenido de *P. rhodozyma* (KM510486). Sin embargo, KM510486 difiere en 73 bases y 36 bases, de las regiones codificantes generadas a partir de KM503045 y KM510496 respectivamente. No obstante, KM510486, KM503045 y KM510496 codifican péptidos idénticos y en todos los casos contienen los dos multidominios, PLN02522 y PLN02235, requeridos para la actividad enzimática de una ACL. El análisis *in silico* de genes *acl* de diferentes especies (NCBI) mostró que los basidiomicetos y animales, codifican péptidos que contienen los dos multidominios PLN02522 y PLN02235 característicos de las ACLs. Por el contrario, en las ACLs de otros hongos, plantas y bacterias, cada multidominio es expresado por genes diferentes (Fatland y col., 2002; Kim & Tabita, 2006; Son y col., 2011; Griffiths y col., 2012). Por ejemplo, en hongos de los géneros *Sordaria* y *Fusarium*, generalmente con genes *acl* menos evolucionados que los de basidiomicetos, los multidominios están codificados en dos diferentes genes *acl1* y *acl2*, *i.e.*, la ACL1 tiene similitud con el extremo C-terminal y la ACL2 tiene similitud con el extremo N-terminal de las ACLs de mamíferos y basidiomicetos (Fatland y col., 2002; Nowrousian y col., 2000; Son y col., 2011; Griffiths y col., 2012).

El péptido codificado en el gen *acl* de *P. rhodozyma* tiene entre el 82% y el 87% de similitud con las subunidades putativas de ACLs de otros basidiomicetos (Tabla 5), 71% de similitud con la ACL humana y 82% de similitud con la ACL de *R. torulooides*, la única ACL nativa purificada y caracterizada en basidiomicetos. La marcada similitud entre las ACLs de levaduras con las de eucariontes superiores, nos sugiere un papel metabólico central que es funcionalmente conservado en todos estos organismos.

Se obtuvieron tres secuencias nucleotídicas diferentes correspondientes a corriente arriba de *acl*, *i.e.*, 41 bases corriente arriba de KM510496, 542 bases corriente arriba de KM503045 y 39 bases corriente arriba de un gen *acl* no definido. Esto sugiere una posible regulación diferencial de ACL a nivel transcripcional.

Un análisis del promotor del gen *acl* en el genoma de *X. dendrorous* (Sharma y col., 2015), no mostró la presencia de la secuencia de unión (TCAGGCTAG) Sterol Regulatory Element-Binding Proteins (SREBPs), como sí ocurre en el gen *acl* humano. La secuencia de 542 bases corriente arriba de KM503045 de *P. rhodozyma* tiene 95% de identidad con la secuencia correspondiente de *X. dendrorous*, entonces se puede inferir que KM503045 no tiene la secuencia de unión SREBPs.

Por otro lado, el análisis del promotor de ACL de *X. dendrorous* y la secuencia de *P. rhodozyma* de 542 bases corriente arriba de KM503045, revelan tres secuencias consenso para la unión de factores de transcripción, *i.e.*, SP1 (Specificity Protein 1), ICSBP (Interferon Consensus Sequence Binding Protein) y NF-KappaB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (anexo A.9). Sin embargo, el análisis del promotor del gen *acl* en *C. gattii* WM276, solamente reveló la presencia de SP1 y en *R. gracilis* sólo SP1 y ICSBP (programa AliBaba2.1). La presencia de tres sitios de unión a los factores de transcripción en el gen *acl* de *P. rhodozyma*, podría implicar una regulación diferencial de *acl*, en respuesta a distintos estímulos tales como el metabolismo de etanol o la elevación de la tensión de oxígeno disuelto (Chávez-Cabrera y col., 2010). La secuencia corriente arriba (41 bases) de KM510496, así como la secuencia corriente arriba (39 bases) del gen no identificado, son fragmentos muy pequeños para identificar en ellas secuencias consenso para la unión de factores de transcripción (programa AliBaba2.1; <http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>).

En varias especies de *Cryptococcus*, el factor de transcripción Sp1 está involucrado con la adaptación a hipoxia (Moranova y col., 2014). Pero en mamíferos, SP1 se ha relacionado con la expresión constitutiva de genes (Im-Sook y col., 2008). El factor de transcripción ICSBP pertenece al grupo de factores reguladores del interferón (IRF), el cual es inducido durante el consumo de etanol en humanos (Zhao y col., 2007). El factor de transcripción NF-kappa B se encuentra en casi todos los tipos de células animales y está implicado en las respuestas celulares a estrés, radicales libres y radiación ultravioleta (Cohen y col., 1998). Las secuencias de *acl* encontradas, KM510486, KM503045 y KM510496, así como las tres secuencias correspondientes corriente arriba indican que *P. rhodozyma* tiene por lo menos

tres variantes del gen *acl*. Es posible que esta variabilidad se deba a la conocida poliploidía de algunas cepas de *P. rhodozyma* (Adrio y col., 1995; Cifuentes y col., 1997). Esto contrasta con la presencia del único gen *acl* reportado en la cepa haploide de *X. dendrorous* CBS 6938, pero también en especies de *Cryptococcus* (con los números de acceso al GenBank NC_014941.1, NC_006679.1, NC_009186.1, NC_009182.1 y NC_009180.1) y en otros basidiomicetos (con los números de acceso al GenBank NW_001889882.1 y LK052937.1).

La actividad ACL del extracto soluble obtenido a partir de un cultivo de la clona *Pichia*-ACL1, fue cuatro veces mayor comparado con la del extracto de la clona *P. pastoris* X-33 con el vector pPICZB vacío. Se sabe que el ensamble de varios monómeros es usualmente necesario para activar enzimas oligoméricas (Milam and Clark, 2009), como ocurre en los homotetrámeros de ACL de basidiomicetos y animales (Figura 19). Lo anterior sugiere que el sistema de expresión de *Pichia*-ACL1 realiza el ensamble correcto de los monómeros de ACL, y/o modificaciones postraduccionales para activar la ACL.

Se ha sugerido que ACL es regulada por modificaciones postraduccionales en *R. toruloides*, ya que el análisis de su transcriptoma mostró que la expresión del gen *acl* es constitutiva, en un cultivo con una relación alta de C/N, (Zhu y col., 2012). Es conocido que las ACLs de mamíferos son activadas por fosforilación en cualquiera de los residuos Thr446, Ser450, Ser454 y His760. Los tres primeros residuos son activados por cinasas y el His760 es autofosforilable (Benjamin y col., 1994; Potapova y col., 2000; Ramakrishna y col., 1990). Además, las ACLs pueden ser alostéricamente activadas por fructosa-6-fosfato (Ramakrishna y col., 1990; Benjamin y col., 1994; Potapova y col., 2000). Los espectros de masas de la ACL 6XHis-tagged muestra que 10 de las 30 huellas peptídicas tienen variación en su masa, sugiriendo que estas presentan modificaciones postraduccionales (e.g., metilación, fosforilación, glicosilación) o hasta presentar la modificación de un aminoácido (Chick y col., 2015). Las secuencias de aminoácidos de las ACLs de *P. rhodozyma* y la humana comparten el sitio de auto-fosforilación (His803 y His760, respectivamente) y un sitio de fosforilación vía cinasas (Thr491 y Th446, respectivamente) (Zhu y col., 2012). La conservación de estos sitios sugiere que la ACL de *P. rhodozyma* es también activada, al igual que la ACLY humana, por fosforilación. Se sabe que la fosforilación reversible de

proteínas es un mecanismo regulatorio importante de la traducción de señales intracelulares, que regulan el ciclo celular (François-Michel y col., 2007). Es conocido que las cinasas realizan la fosforilación de proteínas en presencia de ATP al ser activadas mediante MOR como el H₂O₂. Por otro lado, las fosfatasa, antagónicas de las cinasas, son inhibidas parcialmente por fosforilación e inactivadas por oxidación de la cisteína catalítica del sitio activo (François-Michel y col., 2007). En cultivos de la recombinante *Pichia*-ACL1 llevados a cabo con baja agitación (120 rpm), se observó abundante expresión de ACL 6XHis-tagged, pero una baja actividad, *i.e.*, igual al control (ver A.9). Por el contrario, en cultivos a 300 rpm observamos una escasa expresión de ACL 6XHis-tagged, pero la actividad ACL fue cuatro veces (4X) la obtenida en el control (Figura 14). Esto indica que la activación de ACL 6XHis-tagged ocurre en las condiciones oxidativas promovidas por el cultivo a 300 rpm, pero no en el cultivo a 120 rpm. Lo anterior sugiere que la inactivación de fosfatasa en condiciones oxidativas permitiría una mayor fosforilación de ACL mediada por cinasas y la activación de la enzima. En concordancia, Chávez-Cabrera y col., 2010 observaron un notable incremento de la actividad ACL nativa de *P. rhodozyma*, al presentarse condiciones oxidativas después del agotamiento de azúcares en el medio de cultivo. Este comportamiento, podría sugerir la activación de cinasas y/o la inactivación de fosfatasa, lo que produciría la activación de la ACL nativa por fosforilación, en concordancia con lo observado en cultivos de la recombinante *Pichia*-ACL1.

La ACL 6XHis-tagged purificada a partir de la clona *Pichia*-ACL1 (cultivada a 300 rpm), mostró una actividad específica de 2 U (Tabla 2) y curiosamente, tiene la misma actividad específica que la ACLY humana (2 U) expresada en *E. coli*, después de la activación a través de fosforilación (Potapova y col., 2000). Todo lo anterior sugiere la posible activación de la ACL 6XHis-tagged mediante fosforilación u otras modificaciones postraduccionales. La ACL 6XHis-tagged tiene una actividad del mismo orden de magnitud que la actividad específica de la ACL de *R. gracilis* 5.8 U (Shashi y col., 1990) y de la ACLY humana.

De forma similar, dos sitios de acetilación están conservados en la ACL de *P. rhodozyma* y la ACLY humana (Lys583 y Lys540; Lys589 y Lys546). La acetilación en los residuos Lys540, Lys546 y Lys554 en la ACLY humana incrementan su estabilidad, evitando la ubiquitinación

y la degradación de la enzima (Wellen y col., 2009; Lin y col., 2013). Es conocido que la acetilación de proteínas regula la expresión génica, la reparación del DNA y la continuidad del ciclo celular (Galdieri y col., 2014). La acetilación es regulada mediante el balance de las acetiltransferasas (KATs) y las sirtuinas (SIRT) dependientes de NAD⁺ (Teng y col., 2015). La ausencia de los sitios de fosforilación Ser450 y Ser454, y del sitio de acetilación Lys554, en la ACL de *P. rhodozyma* comparada con la ACLY humana, sugiere algunas similitudes, pero también diferencias en su activación y estabilidad.

En suma, los datos obtenidos en el presente estudio sugieren que *Pichia*-ACL1 fue capaz de realizar al menos alguna o algunas de las siguientes funciones: a) el plegado funcional de la ACL recombinante, b) el ensamblado de homotetrámeros y, c) modificaciones postraduccionales que activaron la ACL recombinante (*Pichia* Expression Kit EasySelect™; Potapova y col., 2000). Además, en virtud de las tres diferentes secuencias correspondientes corriente arriba de *acl* identificadas en el presente estudio, y a que en una de ellas (la de 542 bases) se localizaron tres secuencias consenso diferentes de unión a factores de transcripción, inferimos que la ACL de *P. rhodozyma* puede ser regulada a nivel transcripcional. Adicionalmente, considerando que la actividad ACL se incrementa notablemente en condiciones oxidativas, tanto en *P. rhodozyma* como en la recombinante *Pichia*-ACL1 podemos inferir que la actividad ACL es también regulada vía modificaciones postraduccionales, posiblemente por fosforilación y acetilación.

Así, la contribución de este estudio fue la identificación de una secuencia de ACL, la caracterización bioquímica de una ACL recombinante y la primera evidencia molecular tanto de la regulación transcripcional como post-traduccionales, en una levadura carotenogénica.

7 CONCLUSIONES

1. Se identificaron tres genes *acl* que codifican péptidos idénticos, sin embargo, no se identificaron isoformas de la ACL de *P. rhodozyma*, al menos en las condiciones estudiadas.
2. Se identificaron tres secuencias nucleotídicas diferentes que corresponden corriente arriba del gen *acl*. Una de las secuencias tiene sitios de unión a los factores de transcripción SP1, ICSBP y NF-Kappa B que son inducidos en condiciones de estrés.
3. La ACL 6XHis-tagged expresada en *Pichia*-ACL1 se activa en condiciones oxidativas, tal como ocurre en la ACL nativa de *P. rhodozyma*.
4. La cromatografía de afinidad a níquel se usó para purificar la ACL 6XHis-tagged (ACL con una fusión de histidinas en el extremo carboxilo), sin proteólisis y sin pérdida de actividad.

8 PERSPECTIVAS

Este estudio provee una base fundamental para que en futuros estudios se evalúen:

- a) la posible ocurrencia de empalme alternativo del gen *acl* en diferentes condiciones a las usadas.
- b) la identificación de secuencias promotoras del gen *acl* y la realización de estudios comparativos con las regiones promotoras de genes carotenogénicos en levaduras.
- c) el papel de la ACL en la regulación diferencial de la biosíntesis de carotenoides y ácidos grasos; así como los mecanismos implicados.
- d) el redireccionamiento de mayor “flux de carbono” hacia la biosíntesis de carotenoides.
- e) la ACL 6XHis-tagged purificada mediante cromatografía de afinidad a níquel mantiene la actividad ACL, lo que provee una base fundamental para la cristalización y la elucidación de la primera estructura secundaria y terciaria completa de una ACL, ya que no han sido reportadas en algún organismo (Sun y col., 2010).

9 BIBLIOGRAFIA

Adams IP, Darck S, Dickinson FM, Ratledge C. (2002) The distinctiveness of ATP:citrate lyase from *Aspergillus nidulans*. **Biochim Biophys Acta**. 1597:36-41.

Adrio JL, Lopez M, Casqueiro J, et al. (1995) Electrophoretic karyotype of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. **Curr Genet**. 27:447-450.

Alcaíno J, Barahona S, Carmona M, Lozano C, Marcoleta A, Niklitschek M, Sepúlveda D, Baeza M, Cifuentes V (2008) Cloning of the cytochrome P450 reductase (crtR) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **BMC Microbiol**. 8:169.

Alcaíno J, Romero I, Niklitschek M, et al. (2014) Functional characterization of the *Xanthophyllomyces dendrorhous* farnesyl pyrophosphate synthase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase encoding genes that are involved in the synthesis of isoprenoid precursors. **PLoS One**. 9: Art No. e96626

An GH, Schuman DB & Johnson EA (1989) Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. **Appl Environ Microbiol**. 55:116-124

Andrewes AG, Phaff HJ, Starr MP (1976) Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red pigmented fermenting yeast. **Phytochemistry**. 15:10003- 10007.

Andreyev A, Kushnareva Y, Starkov A (2005) Mitochondrial Metabolism of Reactive Oxygen Species. **Biochemistry (Moscow)**. 70:200-214

Benjamin, WB; Pentylala, SN; Woodgett, JR; Hod, Y; Marshak, D (1994) ATP Citrate-Lyase and glycogen-synthase kinase-3-beta in 3t3-l1 cells during differentiation into adipocytes **biochem j**. 300: 477-482 Subdivisión: 2

Bhosale P, Bernstein PS (2005) Microbial xanthophylls. **Appl Microbiol Biotechnol**. 68: 445-455.

Campanella JJ, Bitincka L, Smalley J (2003) MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. **BMC Bioinformatics**. 4:29.

Chávez-Cabrera C, Flores-Bustamante Z, Marsch R, Montes M, Sánchez S, Cancino-Díaz J, Flores-Cotera L (2010) ATP-citrate lyase activity and carotenoid production in batch cultures of *Phaffia rhodozyma* under nitrogen-limited and nonlimited conditions. **Appl Microbiol Biotechnol**. 85:1953–1960.

Chi S, He Y, Ren J, Su Q, Liu X, Chen Z, Wang M, Li Y, Li J (2015) Overexpression of a bifunctional enzyme, CrtS, enhances astaxanthin synthesis through two pathways in *Phaffia rhodozyma*. **Microb Cell Fact**. doi: 10.1186/s12934-015-0279-4.

Chick JM, Kolippakkam D, Nusinow DP, Zhai B, Rad R, Huttlin EL, Gygi SP (2015) A mass-tolerant database search identifies a large proportion of unassigned spectra in shotgun proteomics as modified peptides. **Nat Biotechnol**. 33(7):743-9.

Chun SB, Chin JE, Bai S, An GH (1992) Strain improvement of *Phaffia rhodozyma* by protoplast fusion. **FEMS Microbiol Lett**. 93:221-226

Chypre M, Zaidi N, Smans K (2012) ATP-citrate lyase: A mini-review. **Biochem Biophys Res Commun**. 422:1-4

Cifuentes V, Hermosilla G, Martínez C, Leon R, Pincheira G, Jiménez A (1997) Genetics and electrophoretic karyotyping of wild-type and astaxanthin mutant strains of *Phaffia rhodozyma*. **Antonie van Leeuwenhoek**. 72:111-117

Cohen H, Azriel A, Levi BZ (1998) Identification of interacting factors with ICSBP using yeast two hybrid screens. **Eur Cytokine Netw**. 9(3): 479-479

Elshourbagy NA, Near JC, Kmetz PI, Sathe GM, C, Strickler JE, Gross M, Young IF, Wells TNC, Groot PHE (1990) Rat atp citrate-lyase - molecular-cloning and sequence-analysis of a full-length cDNA and messenger-RNA abundance as a function of diet, organ, and age. **Eur j biochem**. 265:1430-1435

Elshourbagy NA, Near JC, Kmetz PJ, Wells TNC, Groot PHE, Saxty BA, Hughes SA, Franklin M, Gloger IS (1992) Cloning and expression of a human atp-citrate lyase cDNA. **Eur j biochem.** 204:491-499

Fatland BL, Ke J, Anderson MD, Mentzen WI, Cui LW, Allred CC, Johnston JL, Nikolau BJ, Wurtele ES (2002) Molecular characterization of a heteromeric ATP-citrate lyase that generates cytosolic acetyl-coenzyme A in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.** 130(2):740-56.

Flores-Cotera LB, Martín R, Sánchez S (2001a) Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium. **Appl Microbiol Biotechnol.** 55:341-347.

Flores-Cotera L, Sánchez S (2001b) Copper but not iron limitation increases astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in a chemically defined medium. **Biotechnology Letters.** 23: 793–797, 2001

François-Michel B, Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI (2007) The multifunctional nucleolus. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 8: 574-585.

Franken J, Kroppenstedt S, Swiegers JH, Bauer FF (2008) Carnitine and carnitine acetyltransferases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a role for carnitine in stress protection. **Curr Genet.** 53(6):347-60.

Galdieri L, Zhang TT, Rogerson D, Lleshi R, Vancura A (2014) Protein Acetylation and Acetyl Coenzyme A Metabolism in Budding Yeast. **Eukaryot Cell.** 13(12): 1472-1483.

Goldstein JL, Brown MS (1990) Regulation of the mevalonate pathway. **Nature.** 343: 425-430.

Golubev WI (1995) Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). **Yeast.** 11:101-110.

Griffiths EJ, Hu G, Fries B, (2012) A defect in ATP-citrate lyase links acetyl-CoA production, virulence factor elaboration and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol.** 86: 1404–23.

Gu WL, An GH, Johnson EA (1997) Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*. **J Ind Microbiol Biotechnol.** 19:114-117.

Guenther JC, Hallen-Adams HE, Bücking H, Shachar-Hill Y, Trail F (2009) Triacylglyceride metabolism by *Fusarium graminearum* during colonization and sexual development on wheat. **Mol Plant Microbe Interact.** 22(12):1492-503.

Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Syst Biol.** 59: 307–21.

Hara KY, Morita T, Mochizuki M, Yamamoto K, Ogino C, Araki M, Kondo A (2014) Development of a multi-gene expression system in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Microb Cell Fact.** 13:175. doi: 10.1186/s12934-014-0175-3.

Hermosilla G, Martínez C, Retamales P, León R, Cifuentes V (2003) Genetic determination of ploidy level in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Antonie Van Leeuwenhoek.** 84(4):279-87.

Hoshino TK, Ojima KF, Setoguchi VF (2004) Process for producing carotenoids and biological materials useful therefor. **US 6,696,293 B2**

Im-Sook S, Helen HWC, Isamu A, Anwar H, Zheng DL, Leo WJK, and Macus T K (2008) Transcription Factor Sp1 Plays an Important Role in the Regulation of Copper Homeostasis in Mammalian Cells. **Mol Pharmacol.** 74(3): 705–713.

Johnson EA, Schroeder WA (1995) Microbial carotenoids. **Adv Biochem Eng Biotechnol.** 53:119-178.

Johnson EA, Schroeder WA (1995b) Astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma* **Studies Mycology.** 38:81-90.

Johnson EA, Schroeder WA (1996) Biotechnology of astaxanthin production in *Phaffia rhodozyma*. En: Takeoka GR, Teranishi R, Williams PJ, Kobayashi A (eds) **Biotechnology for improved foods and flavors**, pp 39-50. American Chemical Society, Washington DC.

Johnson, E.A., 2003. *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. **Int. Microbiol.** 6, 169–174.

Jyonouchi H, Sun S, Mizokami M and Gross M.D. (1996). Effects of various carotenoids on cloned, effector-stage T-helper cell activity. **Nutr Cancer.** 26: 313-324.

Kim W, Tabita FR (2006) Both subunit of ATP-Citrate Lyase from *Chlorobium tepidum* Contribute to Catalytic Activity. **J. Bacteriol.** 188:6544-6552.

Komaki A, Karimi AS, Salehi I, Sarihi A, Shahidi S, Zarei M (2015) The treatment combination of vitamins E and C and astaxanthin prevents high-fat diet induced memory deficits in rats. **Pharmacol Biochem Behav.** 131:98-103.

Konz JO, King J, Cooney CL (1998) Effects of oxygen on recombinant protein expression. **Biotechnol Prog.** 14:393-409.

Kucsera J, Pfeiffer I, Ferenczy L (1998) Homothallic life cycle in the diploid red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). **Antonie Van Leeuwenhoek.** 73(2):163-8.

Kurashige M, Okimasu E, Inoue M and Utsumi K (1990) Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. **Physiol Chem Phys & Med NMR.** 22:27-38.

Lin R, Tao R, Gao X, Li T, Zhou X, Guan KL, Xiong Y, Lei QY (2013) Acetylation stabilizes ATP-citrate lyase to promote lipid biosynthesis and tumor growth. **Mol Cell.** 51(4):506-18.

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

Lohr M, Schwender J, Polle JE (2012) Isoprenoid biosynthesis in eukaryotic phototrophs: a spotlight on algae. **Plant Sci.** 185-186:9-22.

Lotan T, Hirschberg J (1995) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding β -C-4-oxygenase, that converts β -carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis*. **FEBS Lett.** 364:125-128.

Loto I, Gutierrez MS, Barahona S, Sepulveda D, Martinez-Moya P, Baeza M, Cifuentes V, Alcaíno J (2012) Enhancement of carotenoid production by disrupting the C22-sterol desaturase gene (CYP61) in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **BMC Microbiology.** 12:235-248.

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

Martínez-Moya P, Watt SA, Niehaus K, Alcaíno J, Baeza M, Cifuentes V (2011) Proteomic analysis of the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **BMC Microbiol.** 11:131.

Martínez-Moya P, Niehaus K, Alcaíno J, Baeza M, Cifuentes V (2015) Proteomic and metabolomic analysis of the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* using different carbon sources. **BMC Genomics.** 16:289.

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

Miao L1, Chi S, Tang Y, Su Z, Yin T, Guan G, Li Y (2011) Astaxanthin biosynthesis is enhanced by high carotenogenic gene expression and decrease of fatty acids and ergosterol in a *Phaffia rhodozyma* mutant strain. **FEMS Yeast Res.** 11(2):192-201.

Milam SL, Clark AC (2009) Folding and assembly kinetics of procaspase-3. **Protein Sci.** 18:2500-17.

Miller MW, Yoneyama M, Soneda M (1976) *Phaffia*, a new yeast genus in the Deuteromycotina (Blastomycetes). **Intl J System Bacteriol.** 26:286-291.

Moranova Z, Virtudazo E, Hricova K (2014) The CRZ1/SP1-like gene links survival under limited aeration, cell integrity and biofilm formation in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. **Biomed Pap-Olomouc.** 158 (2): 212-220.

Nagy A, Palágyi Z, Ferenczy L, Vágvölgyi C (1997) Radiation-induced chromosomal rearrangement as an aid to analysis of the genetic constitution of *Phaffia rhodozyma*. **FEMS Microbiol Lett.** 152(2):249-54.

Nishino, H (1998) Cancer prevention by carotenoids. **Mutat Res.** 18:159-63.

Nowrousian M, Kuck U, Loser K, Weltring KM (2000) The fungal *ac1* and *ac2* genes encode two polypeptides with homology to the N- and C-terminal parts of the animal ATP citrate lyase polypeptide. **Curr Genet.** 37:189-193

Ojima K, Breitenbach J, Visser H, Setoguchi Y, Tabata K, Hoshino T, Berg J, Sandmann G (2006) Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a β -carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. **Mol Gen Genomics.** 275: 148–158

Oliver DJ, Nikolau B, Wurtele ES (2009) Acetyl-CoA-Life at the metabolic nexus. **Plant Sci.** 176(5):597-601.

Palmieri L, Vozza A, Honlinger A, Dietmeier K, Palmisano A, Zara V, Palmieri F (1999) The mitochondrial dicarboxylate carrier is essential for the growth of *Saccharomyces cerevisiae* on ethanol or acetate as the sole carbon source. **Mol microbial.** 31: 569-577

Phaff HJ, Miller MW, Yoneyama M, Soneda M (1972) A comparative study of the yeast flora associated with trees on the Japanese islands and on the west coast of north America. Proc. IV IFS: Fermentation Technology Today, Tokyo. Society of Fermentation Technology, Osaka. pp 759-774.

Potapova IA, El-Maghrabi MR, Doronin SV, Benjamin WB. (2000) Phosphorylation of recombinant human ATP: citrate lyase by cAMP-dependent protein kinase abolishes homotropic allosteric regulation of the enzyme by citrate and increases the enzyme activity.

Allosteric activation of ATP: citrate lyase by phosphorylated sugars. **Biochemistry**. 39: 1169-79.

Ramakrishna S, D'Angelo G, Benjamin WB (1990) Sequence of sites on ATP-citrate lyase and phosphatase inhibitor 2 phosphorylated by multifunctional protein kinase (a glycogen synthase kinase 3 like kinase). **Biochemistry**. 29:7617-24.

Ratledge C, Wynn JP (2000) Understanding microbial obesity. **SIM**. 50(4): 181-185.

Ratledge, C., Wynn, J. (2002) The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. **Adv Appl Microbiol**. 51:1–51.

Ratledge, C.A. (2002) Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. **Bioquim Soc Trans**. 30: 6.

Rodríguez-Sáiz M, de la Fuente JL, Barredo JL (2010) *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. **Appl Microbiol Biotechnol**. 88(3):645-58.

Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: Laboratory Manual, 3rd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 16.33–6 pp.

Sato R, Okamoto A, Inoue J, Miyamoto W, Sakai Y, Emoto N, Shimano H, Maeda M. (2000) Transcriptional regulation of the ATP citrate-lyase gene by sterol regulatory element-binding proteins. **J Biol Chem**. 275(17): 12497-502.

Schmidt I, Schewe H, Gassel S, Jin C, Buckingham J, Hümbelin M, Sandmann G, Schrader J. (2011) Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma*/*Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Appl Microbiol Biotechnol**. 89: 555–571.

Sharma R, Gassel S, Steiger S, Xia X, Bauer R, Sandmann G, Thines M (2015) The genome of the basal agaricomycete *Xanthophyllomyces dendrorhous* provides insights into the organization of its acetyl-CoA derived pathways and the evolution of Agaricomycotina. **BMC Genomics**. 16:233.

Shashi K, Bachyhawat AK, Joseph R (1990) ATP-citrate lyase of *Rhodotorula-gracilis* - purification and properties. **Biochim Biophys Acta.** 1033:23-30.

Son H, Lee J, Park AR, Lee YW (2011) ATP citrate lyase is required for normal sexual and asexual development in *Gibberella zeae*. **Fungal Genet Biol.** 48 (4): 408–17.

Sreré PA (1959). The citrate cleavage enzyme. I Distribution and purification. **J Biological Chem.** 234:10.

Sun T, Hayakawa K, Bateman KS, Fraser ME (2010) Identification of the citrate-binding site of human ATP-citrate lyase using X-ray crystallography. **J Biol Chem.** 285:27418–28.

Teng, Y, Jing, H, Aramsangtienchai, P, Bin H, Saba K, Jing H, Hening L, Quan H (2015) Efficient Demyristoylase Activity of SIRT2 Revealed by Kinetic and Structural Studies. **Scientific reports.** 5:8529.

Ukibe K , Katsuragi T , Tani Y, Takagi H (2008) Efficient screening for astaxanthin-overproducing mutants of the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* by flow cytometry. **FEBS Lett.** 286:241-248

Venkateswaran G, Shashi K, Joseph R (1992) Influence of nitrogen status and mutation on the fatty-acid profile of *Rhodotorula-gracilis*. **Current Science.** 62:580-583

Verdoes JC, Krubasik P, Sandmann G, Vanooyen A.J.J. (1999) Isolation and functional characterization of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Mol Gen Genet.** 262: 453-461.

Verdoes JC, van Ooyen AJJ (1999) Isolation of the isopentenyl diphosphate isomerase encoding gene of *Phaffia rhodozyma*; improved carotenoid production in *Escherichia coli*. **Acta Bot Gallica.** 146(1) 43-53.

Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB (2009) ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. **Science.** 324(5930):1076-80.

Wery J, Verdoes JC, van Ooyen AJJ (1998) Efficient transformation of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. **Biotechnol Tech.** 12(5) 399-405.

Xiao AF, Jiang XL, Ni H, Yang QM, Cai, HN (2015) Study on the relationship between intracellular metabolites and astaxanthin accumulation during *Phaffia rhodozyma* fermentation. **Electron J Biotechn.** 18(3) 148-153.

Yamane Y, Higashida K, Nakashimada Y, Kakizono T, Nishio N (1997a) Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis. **Appl Environ Microbiol.** 63:4471-4478.

Yamane Y, Higashida K, Nakashimada Y, Kakizono T, Nishio N (1997b) Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* enhanced in fed-batch culture with glucose and ethanol feeding. **Biotechnol Lett** 19:1109-111.

Zhao XJ, Dong Q, Kolls JK (2007) Role of IRF-3 and AP-1 in enhanced TNF-alpha transcription induced by chronic ethanol. **Alcoholism (NY).** 31(6): 12A

Zhu Z, Zhang S, Liu H, Shen H, Lin X, Yang F, Zhou YJ, Jin G, Ye M, Zou M, Zhao ZK (2012) A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*. **Nat Commun.** 29(4): 1930.

10 ANEXOS

A.1 Secuencia nucleotídica del gen *acl* KM503045 de *P. rhodozyma*

Secuencia Upstream

```
TCCACTCCCCTCGCCCCCACCSCCAAAAGAGAGAACGAAAGAACATAGATGCATATCACGTTT
GACGAATTCATCTAATCTTGATCAATACAGTCGTCGCGTCCGATTGAAATTTGTATATACATCTG
TCTCTTCCTTTCATCCCAACGGCCCACTCTCTGTGCGGTGCGCGCGCGCAGGGAGGCGAAA
CCACCAACTCGGGCGTCAGGACACTACCCCAACCTGTCCTTGCTGCGCATTGAGCCTGGTCATAA
TATTGGGCGAGCCTCTGCTAAGCCTGACATTCAATCACACCCCTTTGGTTGGGGTTTCCCTTCTC
TCTTTTTTTTTCTCTCGTTCGTCGGAAAGCAAGAAGAAAGAAAAGGTCCATCTCGTTCGATTC
CATCTTTCGTTCTTGCCCCATCTGAACATCAACCACCATCTCCCTCCCACTCACCACCGATAA
ATCCAAGCTCTCTCTTTCTCTTTTGGGTTTTTCTTTCTTTTTTTTTGTTTGTCTGTCCCGCTTAA
TCATCTCCTAGATCTTCCATC
```

```
atgtcttccaaagSTTAGTTCGTTAGGCTCTTGTGTTGTGGGAGTGTTTCACACCCGGATCATCTCT
M S S K
CTGTGGTGCTTTGTGGCGATGGAGTAGAGTGCAAGCGAGAGAGAGATATCTTGTTCCTTCATTAC
ATCTCACCTTTGGCTTCTCTCTTCCCTCTGTCTCAACTCTCAACTGACTGGATCATCTCATCCTTT
TTGCAGctatccgagagtaacgacgccaagctccttcttcccactggcttcctctcatcaagact
A I R E Y D A K L L L S H W L P L I K T
ccatctcgacctcgggtccttcaaccgcttctaacgtccgggtcgtcaggttcagtgSTAGGT
P I S T S G P S T A S N V R V A Q V Q
CTCCTTCATTCGATCTGCAGAGCGGCTTCTGACCCAGCGCAACCATCCAAGACCTGTTCTCTAAC
CCTTCTTCTTGCTCCTTCCTCAGggaccctcgaccaacacccttgctcctccgattgagccgg
W D P S T N T L V P P I E P
aaagggtcttctgattgggtcttcaccgagaagctcgtagccaagcctgatcagctcatcaagc
G K G L P D W V F T E K L V A K P D Q L I K
gacgaggaaaggcaggtctgctttgccttaacaaggactggcaggtcgcagccgagtgatgagcaag
R R G K A G L L C L N K D W Q V A A E W I K
gagcgagcaggaaagcccgttcagSTGAGTTTATGATTTCTTTTTCTCAGGTAAACAAACAGCTG
E R A G K P V Q
TCTGAACGATTTTATCTTCTCCTTTTTTCGGTCGAAAACATAAAATTAACCTCATGAAATCSTgtc
V
gagaagactaccggtaccctcaacaccttcatcatcgagcctttccttccctcatccttccaacac
E K T T G T L N T F I I E P F L P H P S N
cgagtactacgtctgcatcaactctaccgagccgggtgatgagatcctcttaccatgaggggtg
T E Y Y V C I N S T R A G D E I L F T H E G
gtgtcgatggttgagatgtcgatgctaaggccttgaagcttcSTGAGTCACTTCCCTTCCCTTTC
G V D V G D V D A K A L K L
TGGATTATAGAGCCCTACGCTGAGACCTGGTCTCCTTGTTCATCTTCGTACCTCTTTTSTg
L
atccccgctcggagaggacttccctaccagggagaccggttgctcttcccttttgaccacggttcc
I P V G E D F P T R E T V V S S L L T H V
```

ggccgagaagaaggacgttctcgctgacttcctcatccgactctacgccgtctacgaagacctc
P A E K K D V L A D F L I R L Y A V Y E D L
cactGTACGTCTCCTCTCTTCGTTTTTCAGTCTGTTTCAGTCAAGCACATGTCAATCTGTCTGTCT
H
AAACTTATCACATCCTGATTTTACTTACCACTCTTCCAGcagcctatctcgagatcaaccgct
Y A Y L E I N P
catctgccttgacgggtgtgaacggaaacccccctacgatcgagtacctcgacatggccgctaag
L I C L D G V N G N P P T I E Y L D M A A K
ctcgatcagaccgccgacttcctctgtggggccaagtggggccatcgctagagatacctcgctcgt
L D Q T A D F L C G P K W A I A R D T S S
cttccgccgtcagttcggccgctcaaggctgaccgaggaccccccatggtttggcccgctcc
S S A V S S A A V K A D R G P P M V W P A
cttcggctcgagatcttaccaaggaggagcctacatccagaagtggacgcctcgaccgggtgct
P F G R D L T K E E A Y I Q K L D A S T G A
tcggtgaagcttactggttcttaaccaggagggtcgagctctggaccatggctcgccggaggagggtg
S L K L T V L N Q E G R V W T M V A G G G
cctccggtggttactctgatgccattgccgctgccggtttcggccacgagcttgctaactacgg
A S V V Y S D A I A A A G F A H E L A N Y
agagtactctggagctcctactgagggacagacctacgagtagccaagaccattcGAAGTAA
G E Y S G A P T E G Q T Y E Y A K T I
TTGTCCTTCCTTGCTTGTACGCTCGACCACCTGACTGACCATCTCGATCACACAGctctcgctca
L S L
tcactcgaggagatgtcaacccccagggtgaaggctcctcatcatcggtggaggatattgccaactt
I T R G D V N P Q G K V L I I G G G I A N
caccaacgttgccgccaccttcaagggtatcatccgagccctcaaagagttcaagcagggtctc
F T N V A A T F K G I I R A L K E F K Q G L
agccagcacaagggtcaagatctttgtccgacgaggagggtcccaactaccaggagggtctcaagg
S Q H K V K I F V R R G G P N Y Q E G L K
ccatgcgattgcttgagaggtctctcgggtgtcgagatccaggctcttcggaccgagaccacat
A M R L L G E S L G V E I Q V F G P E T H
taccgagatcgttcccctcgccctcggtgtcgccaagaaggctcctaccctctgcctgcgttc
I T E I V P L A L G V A K K A P T P L P A F
tcggtgcccgctcgatcgagccgatacccctgcccaccatcgctgagcagccggctgctc
S V P A S I G A D T P A A T I A E Q P A A
ccagctcggtgagatcaacaaggacggttcgcgagaacaggccaacgacaacattgtccgatt
P Q L G E I N K D G S R E Q A N D N I V R
cgataccaccggtggacctgtctccggtcgaccgtcttaccgacccttcgacgagaccaccga
F D T T G G P V S G R P S Y R P F D E T T R
tcctcgtggttcgggtctccagccccgagccattcagggcatgctcgacttcgacttcgcctgtg
S L V F G L Q P R A I Q G M L D F D F A C
gccgaaagacccccgtccgctcgcgccatgatctacccttcgggtggacaccacatccagaagtt
G R K T P S V A A M I Y P F G G H H I Q K
ctactgggggtacaaaggagaccctcctcccagctctacacctcggttggcgaggctgtcaagaag
F Y W G T K E T L L P V Y T S V G E A V K K
cacgccgacgccgacgtcctcgtcaacttctcgtcctctcgatccgtctactcttccactctcg
H A D A D V L V N F S S S R S V Y S S T L
atgctttcaactaccgcagatcaaggccatcgccctcatcgccgaggaggattcctgagcgaca

D A F N Y P Q I K A I A L I A E G V P E R
cgccccgagagctcctccacctcgctgagaagaagaaggtgctcatcatcggtccggcgaccgctc
H A R E L L H L A E K K K V L I I G P A T V
ggtggtatcaagcccggatgcttccgaatcggaaactctggaggaatgatggacaacatccttt
G G I K P G C F R I G N S G G M M D N I L
cttccaagctctaccgagccgggttccggttgatacgtctccaagtccggaggaatgtccaacga
S S K L Y R A G S V G Y V S K S G G M S N
gcttaacaacatcctcaacatctttaccaacggaacttacgaggggaatcgccattggtggtgac
E L N N I L N I F T N G T Y E G I A I G G D
cgataccctggtacatctttcatcgatcacttgctccgatacagcagggatcctgagtgcaaga
R Y P G T S F I D H L L R Y E Q D P E C K
tgctcgtcctcctcggagaggtcgggtggaatcgaagagtaccgagtgatcgaggccgtcaagaa
M L V L L G E V G G I E E Y R V I E A V K
cggaacgatcaagaagcccacatcgttgcctgggcccacatcggaacgtgcgccaagatgttcaccacc
N G T I K K P I V A W A I G T C A K M F T T
gaggtccaattcgggtcacgcccgttccatggcaaactctgacctcgagaccgctgatgccaaga
E V Q F G H A G S M A N S D L E T A D A K
acaaggccatgaaggccgcccggattcatcgctccccgataccttcgaggagcttccccgacgtcct
N K A M K A A G F I V P D T F E E L P D V
caagcagacctacgacgccctcgtcaacaacggaaccatcgttgtcaagaaggagaccgagccc
L K Q T Y D A L V N N G T I V V K K E T E P
ccgctcatccctatggactacaagtgggcccaggagctcggcatgatccgaaagcctgcccgtt
P L I P M D Y K W A Q E L G M I R K P A A
tcatctcgtcgatctctgacgagcggagacaggagctcttgtagcgggtatgcaatttcgga
F I S S I S D E R G Q E L L Y A G M R I S
tgtcttcaaggaggagatcggaatcgggtggtgctctcctcctctggttcaagcgacgactt
D V F K E E I G I G G V L S L L W F K R R L
cctgactatgcctgcaagttcatcgagatggtcctccagcttactgccgatcatggaccggccg
P D Y A C K F I E M V L Q L T A D H G P A
tgtccggagcgatgaacaccatcatcaccgcccagcgggcaaggaccttgtctcctcgtcgc
V S G A M N T I I T A R A G K D L V S S L
cgccggtttgctcaccatcggtgaccgattcgggtggagcgcctcgacggagccgcccgtaacttc
A A G L L T I G D R F G G A L D G A A A N F
accagcgccttgaactctggacagacccccgagagtttgctgactcgatgcaaaaggccaaca
T S A L N S G Q T P R E F V D S M R K A N
agctcatccccggatcggacacaaggtcaagtccaagacgaaccctgatctccgagtagagct
K L I P G I G H K V K S K T N P D L R V E
cgtcaaggactttgtcaagtcgaccttccccgccactgccacccttgactatgccatcggtgct
L V K D F V K S T F P A T A T L D Y A I G V
gaggccggttacctccgccaagaaggattctctcatcttgaacgtcgacggagcgattgccgccc
E A V T S A K K D S L I L N V D G A I A A
cgttctgtgatctcctcaactgctccggtgcattcaccaggaggaggccgcccgagtaccttaa
A F C D L L N C S G A F T Q E E A A E Y L
ggtcggaaacctcaacggattgttcggttcttggtcgatccatcggtttcatcggtcacttcac
K V G T L N G L F V L G R S I G F I G H F I
gaccagaagatgctcaagcagccccttgtagccacaccgctccgacgatttctacatctcgttcc
D Q K M L K Q P L Y R H P S D D F Y I S F

ccgatcacagccgagtcgctcgtccagcccaagaagtaa
A D H S R V V V Q P K K -

*Figura A.1.1 Traducción del gen *acl* de *P. rhodozyma* (número de acceso al Gen Bank KM503045). La secuencia nucleotídica marcada con verde corresponde a la región upstream del gen y los pares de nucleótidos GT/AG marcados con rojo, indican la delimitación del intrón.*

A.2 Secuencia nucleotídica del gen *acl* KM510496 de *P. rhodozyma*

Secuencia Upstream

TCTAGAAAGATCCGCTTAATCGTCTCCTAGATCTTCCATC

atgtcttccaaagSTTAGTTCGTTATGCTCTTGTGTTTGTGAGAGTGTTCACACCCGGATCATCTC
M S S K
TATGGTGCTTTGTGGCGATGGAACAAAGTGCAAGCGAGAGAGATACCTTTTTCTTTATTCTCAT
CTCACCTTTGGGTTCTCTCTTCTCTGTCTCAACTCTCAACTGATTGAATCATCTCATCCTTTT
TACAGctatccgagagtagcagcgaagctacttcttctcactggcttcctctcatcaagact
A I R E Y D A K L L L S H W L P L I K T
ccatctcgacctcgggtccttcaaccgcttctaacgttcgggtcgcctcaggttcagtgSTAGG
P I S T S G P S T A S N V R V A Q V Q
TCTCCTCATTCAATCTGCAGAGCGGCTTCTGACCCAGCGCAACCATCTAAAGCCTTTGTTTAC
CAACCCTTCTTCTTGCTCCTTTCTCSTGGaccctcgaccaacacccttgctcctccgattgag
W D P S T N T L V P P I E
cccggaaagggcttctcctgattgggttttaccgagaagctcgtggccaagcccgatcagctca
P G K G L P D W V F T E K L V A K P D Q L
tcaagcgacgaggaaagggcaggcctgcttgccttaacaaggactggcaggtcgcagccgagtg
I K R R G K A G L L C L N K D W Q V A A E
gatcaaggagcgagcaggaaagcccgttcagSTGAGTTTATGAACCTTTTTTCTAAGGTAAACA
W I K E R A G K P V Q
AAAAGCTGTCTGAACGATTTTATCTTCTCCTTTTTTCGGCCGAAAACGCAAATTAATCTATGA
AATCSTgctcgagaagactaccggtaccctcaacaccttcatcatcgagcctttccttctcatc
V E K T T G T L N T F I I E P F L P H
cttccaacaccgagtactacgtctgcatcaactctaccgagccgggtgatgagatcctcctcac
P S N T E Y Y V C I N S T R A G D E I L F
ccatgaggggtggtgctgatggttgagatgctgatgctaaggccttgaagcttctSTGAGTCACTT
T H E G G V D V G D V D A K A L K L
CCTCTTCTTTCTGGATTATAGAGCCCTACGCTGAGACCTGGTCTCCTTGTGTTTCTCATCTTCGT
ACCTCTTTTSTgatccccgtcggagaggacttccctaccaggagaccggttgctctctccctt
L I P V G E D F P T R E T V V S S L
ttgaccacggttccggccgagaagaaggacgttctcgtgacttccctcatccgactctacgccg
L T H V P A E K K D V L A D F L I R L Y A
tctacgaagacctccactSTACGTCTCCTCTTTCGTTTTTCAGTCTGTTTCAAGCACATGT
V Y E D L H
CAATCTGTCTGTCTAAACTTATCACATCCTGATTTTACTTACCACTCTTCCSTaccgctatctc
Y A Y L
gagatcaaccgctcatctgccttgacgggtgtgaacggaacccccctacgatcgagtacctcg
E I N P L I C L D G V N G N P P T I E Y L
acatggccgctaagctcgatcagaccgccgacttccctctgtgggcccagtgggccatcgctag
D M A A K L D Q T A D F L C G P K W A I A
agatacctcgtcgtcttccgcccgtcagttcggcccgcgtcaaggctgaccgaggacccccatg
R D T S S S A V S S A A V K A D R G P P M
gtttggcccgtcccttcgggtcgagatcttaccgaaggaggcctacatccagaagttggagc
V W P A P F G R D L T K E E A Y I Q K L D

cctcgaccgggtgcttcggtgaagcttactggttcttaaccaggaggggtcgagtctggaccatggt
A S T G A S L K L T V L N Q E G R V W T M
cgccggaggaggtgcctccggtggttactctgatgccattgccgctgccggttccgccacgag
V A G G G A S V V Y S D A I A A A G F A H E
cttgctaactacggagagtactctggagctcctactgagggacagacctacgagtacgccaaga
L A N Y G E Y S G A P T E G Q T Y E Y A K
ccattc**CA**AAGTAATTGTCCTTCCTTGCTTGTACGCTCGACCACCTGACTGACCATCTCGATCA
T I
CAC**CA**ctctcgctcatcactcgaggagatgtcaacccccagggttaaggtcctcatcatcggtgga
L S L I T R G D V N P Q G K V L I I G G
ggtattgccaacttcaccaacggtgcccgcaccttcaagggtatcatccgagccctcaaagagt
G I A N F T N V A A T F K G I I R A L K E
tcaagcagggtctcagccagcacaagggtcaagatctttgtccgacgaggaggtcccaactacca
F K Q G L S Q H K V K I F V R R G G P N Y
ggaggggtctcaaggccatgctgattgcttggagagtctctcgggtgctcgagatccagggtcttcgga
Q E G L K A M R L L G E S L G V E I Q V F G
cccgagaccacattaccgagatcgttcccctcgccctcgggtgctcgccaagaagggtcctacc
P E T H I T E I V P L A L G V A K K A P T
ctctgcctgcttctccgtgcccgcctcgatcggagccgatacccctgcggccaccatcgctga
P L P A F S V P A S I G A D T P A A T I A
gcagccgggtgctccccagctcgggtgagatcaacaaggacgggttcgagagaacaggccaacgac
E Q P A A P Q L G E I N K D G S R E Q A N D
aacattgtccgattcgataaccaccgggtggacctgtctccgggtcgaccgtcttaccgacccttcg
N I V R F D T T G G P V S G R P S Y R P F
acgagaccaccgatccctcgtggttcggtctccagccccgagccattcagggtatgctcgactt
D E T T R S L V F G L Q P R A I Q G M L D
cgacttcgctgtggccgaaagaccccgtccgctcgcgccatgatctacccttcgggtggacac
F D F A C G R K T P S V A A M I Y P F G G H
cacatccagaagtttactggggtacaaaggagaccctcctcccagtctacacctcggttgggc
H I Q K F Y W G T K E T L L P V Y T S V G
aggctgtcaagaagcacgcccagcgcgacgtcctcgtcaacttctcgtcctctcgatccgtcta
E A V K K H A D A D V L V N F S S S R S V
ctcttccactctcgatgctttcaactaccgcagatcaaggccatcgccctcatcgccgagga
Y S S T L D A F N Y P Q I K A I A L I A E G
gttccctgagcgacacgcccgagagctcctccacctcgctgagaagaagaagggtgctcatcatcg
V P E R H A R E L L H L A E K K K V L I I
gtccggcgaccgtcgggtggtatcaagcccggatgcttccgaatcggaactccggaggaatgat
G P A T V G G I K P G C F R I G N S G G M
ggacaacatcctttcttccaagctctaccgagccgggttcggttgatacgtctccaagtccgga
M D N I L S S K L Y R A G S V G Y V S K S G
ggaatgtccaacgagcttaacaacatcctcaacatctttaccaacggaacttacgaggggaatcg
G M S N E L N N I L N I F T N G T Y E G I
ccattgggtggtgaccgataccccggtagctctttcatcgaccacttgctccgatacagagcaaga
A I G G D R Y P G T S F I D H L L R Y E Q
tcccagatgcaagatgctcgtcctcctcggagaggttggtggaatcgaagagtaccgagtgatc
D P E C K M L V L L G E V G G I E E Y R V I
gaggccgtcaagaatggaacgatcaagaagccatcggtgcctgggcatcggaacgtgcgcca

E A V K N G T I K K P I V A W A I G T C A
 agatgttcaccactgaggtccaatttcggtcacgcccggttccatggcaaactctgacctcgagac
 K M F T T E V Q F G H A G S M A N S D L E
 cgctgacgccaagaacaaggccatgaaggccgcccggattcatcgtccccgataccttcgaggag
 T A D A K N K A M K A A G F I V P D T F E E
 ctccccgacgtcctcaagcagacctacgatgccctcgtcaacaacggaaccatcgttgtcaaga
 L P D V L K Q T Y D A L V N N G T I V V K
 aagagaccgagcccccgctcatccccatggattacaagtgggctcaggagctcggcatgatccg
 K E T E P P L I P M D Y K W A Q E L G M I
 aaagcctgccgctttcatctcgtcgtatctctgacgagcgaggacaggagctcttgtagccgggt
 R K P A A F I S S I S D E R G Q E L L Y A G
 atgcgaatttcggatgtcttcaaggaggagatcggaatcgggtgggtgtgctctccctcctctggt
 M R I S D V F K E E I G I G G V L S L L W
 tcaagcgcgacttccggactatgcctgcaagttcatcgagatggctcctccagcttactgccga
 F K R R L P D Y A C K F I E M V L Q L T A
 tcacggggccggccgtgtccggagcgatgaataccatcatcaccgcccagccggcaaggacctt
 D H G P A V S G A M N T I I T A R A G K D L
 gtctcctcgtcgcgcccgggttggctcaccatcgggtgaccgatttggtggagcgcctcgacggag
 V S S L A A G L L T I G D R F G G A L D G
 ccgcccgtacttaccagcgccttgaactctggacagaccctcgcagaggtttgtcgcactcgat
 A A A N F T S A L N S G Q T P R E F V D S
 gcgaaaggccaacaagctcatccccggatcggacacaaggtcaagtccaagacgaaccctgat
 M R K A N K L I P G I G H K V K S K T N P D
 ctccgagtgaggcttgtcaaggactttgtcaagtgcacttccccgccactgccacccttgact
 L R V E L V K D F V K S T F P A T A T L D
 acgctatcgggtgttgaggccgttacctccgcaaaaaggattctctcatcttgaatgtcgcagg
 Y A I G V E A V T S A K K D S L I L N V D
 agccattgccgcccgcgttctgtgatcttctcaactgctccgggtgcattcaccaggaggaggcc
 G A I A A A F C D L L N C S G A F T Q E E A
 gccgagtaccttaaggtcggaaaccctaaacggattggttcggttcttggtcgcacccatcggtttca
 A E Y L K V G T L N G L F V L G R S I G F
 tcggtcacttcatcgaccagaagatgctcaagcagcccttgtagccgacaccgcgaccgacgattt
 I G H F I D Q K M L K Q P L Y R H P S D D
 ctacatctcgttcgcccgatcacagcccagtcgctcgtccagcccaagaagtaa
 F Y I S F A D H S R V V V Q P K K -

Figura A.2.1 Traducción del gen *acl* de *P. rhodozyma* (número de acceso al GenBank KM510496). La secuencia nucleotídica marcada con verde corresponde a la región upstream del gen y los pares de nucleótidos GT/AG marcados con rojo, indican la delimitación del intrón.

A.3 Secuencia nucleotídica del *acl*-cDNA (KM510486) de *P. rhodozyma*

atgtcttccaaagctatccgagagtagcagcgccaagctacttctttctcactggcttctct
M S S K A I R E Y D A K L L L S H W L P
ctcatcaagactcccacatctcgacctcgggtccttcaaccgcttctaacggttcgggtcgcct
L I K T P I S T S G P S T A S N V R V A
caggttcagtgaggaccctcgaccaacacccttggtcctccgattgagcccgaaagggt
Q V Q W D P S T N T L V P P I E P G K G
cttccctgattgggttttcccgagaagctcgtggccaagcccgatcagctcatcaagcga
L P D W V F T E K L V A K P D Q L I K R
cgaggaaaggcaggcctgctttgccttaacaaggactggcagggtcgcagccgagtgatc
R G K A G L L C L N K D W Q V A A E W I
aaggagcagcagcaggaaagcccgttcagggtcgagaagactaccggtaccctcaacaccttc
K E R A G K P V Q V E K T T G T L N T F
atcatcgagcctttccttccctcatccttccaacaccgagtactacgtgtgcattaactct
I I E P F L P H P S N T E Y Y V C I N S
actcgagccggtgatgagatcctcttccacccatgagggtgggtgctgatgctcgagatgct
T R A G D E I L F T H E G G V D V G D V
gatgccaaggccttgaagcttctgatccccgttggggaggacttccctaccaggggagacc
D A K A L K L L I P V G E D F P T R E T
gttgtctcttcccttttgaccacggttccggccgagaagaaggacggttctcgctgacttc
V V S S L L T H V P A E K K D V L A D F
ctcatccgactttacgccgtctacgaagacctccactacgcctatctcgagatcaaccgg
L I R L Y A V Y E D L H Y A Y L E I N P
ctcatctgccttgacggtgtgaacggaaacccccctacgatcgagtacctcgacatggcc
L I C L D G V N G N P P T I E Y L D M A
gctaagcttgatcagaccgccgacttccctctgtgggtcccaagtgggccatcgctagagat
A K L D Q T A D F L C G P K W A I A R D
acctcgctcgtcttccgccgctcagttcggccgccgtcaaggctgaccgaggacccccgatg
T S S S S A V S S A A V K A D R G P P M
gtttggccccgctcccttcggtcgagatctcaccaaggaggaggcctacatccagaagttg
V W P A P F G R D L T K E E A Y I Q K L
gacgcctcgaccggtgcttccgttgaagcttaccggttcttaaccaggagggtcgagtctgg
D A S T G A S L K L T V L N Q E G R V W
accatggctcgccggaggagggtgcctccgtcgttactctgatgccattgccgctgccggt
T M V A G G G A S V V Y S D A I A A A G
ttcggcccacgagcttgctaactacggagagtactctggagctcctactgagggacaaacc
F A H E L A N Y G E Y S G A P T E G Q T
tacgagtacgccaagaccatcctctcgtcactcagaggagacgtcaatccccagggt
Y E Y A K T I L S L I T R G D V N P Q G
aaggctcctcatcatcggtggaggtattgccaaacttccaacgctcgccgccaccttcaag
K V L I I G G G I A N F T N V A A T F K
ggatcatccgagccctcaaagagttcaagcagggtcttagccagcacaagggtcaagatc
G I I R A L K E F K Q G L S Q H K V K I
tttgtccgacgaggaggtcctaactaccaggagggtctcaaggccatgagattgcttggga
F V R R G G P N Y Q E G L K A M R L L G
gagtcctcgggtgctgaaatccagggtcttcggacccgagaccacatcaccgagatcggt

E S L G V E I Q V F G P E T H I T E I V
ccctcgccctcgggtgctgccaagaaggctcctaccctctgcctgcgttctccgtgccc
P L A L G V A K K A P T P L P A F S V P
gcctcgatcggagccgatacccctgccgccaccatcgctgagcagccagctgccccccag
A S I G A D T P A A T I A E Q P A A P Q
ctcggtgagatcaacaaggacggttctcgagagcaggccaacgacaacattgtccgattc
L G E I N K D G S R E Q A N D N I V R F
gatactaccgggtggacctgtctccggctgacccgtcctaccgacccttcgacgagaccacc
D T T G G P V S G R P S Y R P F D E T T
cgatcccctcggttccggctctccagccccgagccattcagggcatgctcgactttgacttc
R S L V F G L Q P R A I Q G M L D F D F
gcctgtggccgaaagaccccgtccgtcgcggccatgatctacccttcgggtggacaccac
A C G R K T P S V A A M I Y P F G G H H
atccagaagttctactgggggtacaaaggagaccctcctcccgggtctacacctcggttggc
I Q K F Y W G T K E T L L P V Y T S V G
gaggctgtcaagaagcagccgacgcccagcgtcctcgtcaacttctcgtcctctcgatcc
E A V K K H A D A D V L V N F S S S R S
gtctactcttccactctcgatgctttcaactaccgcgagatcaaggccatcgccctcatc
V Y S S T L D A F N Y P Q I K A I A L I
gccgagggagttcctgagcgcacgcccgagagctcctccacctcgctgagaagaagaag
A E G V P E R H A R E L L H L A E K K K
gtgctcatcatcgggtccggcgaccgtcgggtggatcaagcccggatgcttccgaatcggg
V L I I G P A T V G G I K P G C F R I G
aactccggaggaatgatggacaacatcctttctccaagctctaccgagccgggttccggtt
N S G G M M D N I L S S K L Y R A G S V
ggatacgtctccaagtcgggaggaatgtccaacgagcttaacaacatcctcaacatcttt
G Y V S K S G G M S N E L N N I L N I F
accaacggaacctacgaggggaatcgccattgggtggtgaccgataccccggtagctctttc
T N G T Y E G I A I G G D R Y P G T S F
atcgaccacttgctccgatacgcagcaagatcccgagtgcaagatgctcgtcctcctcgga
I D H L L R Y E Q D P E C K M L V L L G
gaggttgggtggaatcgaagagtaccgagtgatcgaggccgtcaagaatggaacgatcaag
E V G G I E E Y R V I E A V K N G T I K
aagcccacggttgccctgggcccacggaacgtgcgccaagatggtcaccactgaggtccaa
K P I V A W A I G T C A K M F T T E V Q
ttcggtcacgcccggttccatggcaaactctgacctcgagaccgctgacgccaagaacaag
F G H A G S M A N S D L E T A D A K N K
gccatgaaggccgcccggattcatcgctccccgataccttcgaggagctccccgacgtcctc
A M K A A G F I V P D T F E E L P D V L
aagcagacctacgatgccctcgtcaacaacggaaccatcgttgtcaagaaagagaccgag
K Q T Y D A L V N N G T I V V K K E T E
ccccgctcatccccatggattacaagtgggctcaggagctcggcatgatccgaaagcct
P P L I P M D Y K W A Q E L G M I R K P
gccgctttcatctcgtcgcgatctctgacgagcgcaggacaggagctcttgtagccggatg
A A F I S S I S D E R G Q E L L Y A G M
cgaatctcggatgtcttcaaggaggagatcggaatcgggtgggtgtgctctccctcctctgg
R I S D V F K E E I G I G G V L S L L W

```

ttcaagcgacgacttccggactatgcctgcaagttcatcgagatggtcctccagcttact
  F K R R L P D Y A C K F I E M V L Q L T
gccgatcacgggcccggcgtgtccggagcgatgaataccatcatcaccgcccagccggc
  A D H G P A V S G A M N T I I T A R A G
aaggaccttgtctcctcgctcgccgcccggtttgctcaccatcgggtgaccgatttggtgga
  K D L V S S L A A G L L T I G D R F G G
gcgctcgacggagcccgcgctaacttcaccagcgccttgaactctggacagacccccga
  A L D G A A A N F T S A L N S G Q T P R
gagtttgtcgactcgatgcgaaaggccaacaagctcatccccgggtatcggacacaaggtc
  E F V D S M R K A N K L I P G I G H K V
aagtccaagacgaacctgatctccgagtgaggcttgtcaaggactttgtcaagtcgacc
  K S K T N P D L R V E L V K D F V K S T
ttccccgccactgccacccttgactacgctatcgggtgttgaggccggttacctccgccaaa
  F P A T A T L D Y A I G V E A V T S A K
aaggattctctcatcttgaatgtcgacggagccattgccgcccgcggttctgtgatcttctc
  K D S L I L N V D G A I A A A F C D L L
aactgctccgggtgcattcaccaggaggaggccgcccaggtaccttaagggtcggaaacctta
  N C S G A F T Q E E A A E Y L K V G T L
aacggattgttcgttcttgggtcgatccatcggtttcatcggtcacttcatcgaccagaag
  N G L F V L G R S I G F I G H F I D Q K
atgctcaagcagcccttgtaccgacacccgtccgacgatttctacatctcgttcgcccgat
  M L K Q P L Y R H P S D D F Y I S F A D
cacagccgagtcgtcgtccagcccaagaaggcggcccagcgtttctagaacaaaaactc
  H S R V V V Q P K K A A A S F L E Q K L
atctcagaagaggatctgaatagcggcgtcgaccatcatcatcatcatcattga
  I S E E D L N S A V D H H H H H H -

```

Figura A.3.1 Traducción de la región codificante acl-cDNA de P. rhodozyma (número de acceso al GenBank KM510486).

A.4 Secuencia de aminoácidos de ACL 6XHis-tagged

MSSKAIREYD AKLLLSHWLP LIKTPISTSG PSTASNVRVA QVQWDPSTNT LVPPIEPGKG
LPDWVFTEKL VAKPDQLIKR RGKAGLLCLN KDWQVAAEWI KERAGKPVQV EKTTGTLNTE
IIEPFLPHPS NTEYYVCINS TRAGDEILFT HEGGVDVGDV DAKALKLLIP VGEDFPTRET
VVSSLLTHVP AEKKDVLADF LIRLYAVYED LHYAYLEINP LICLDGVNGN PPTIEYLDMA
AKLDQTADFL CGPKWAIARD TSSSSAVSSA AVKADRGPPM VWPAPFGRDL TKEEAYIQKL
DASTGASLKL TVLNQEGRVW TMVAGGGASV VYSDAIAAAG FAHELANYGE YSGAPTEGQT
YEYAKTILSL ITRGDVNPQG KVLIIGGGIA NFTNVAATFK GIIRALKEFK QGLSQHKVKI
FVRRGGPNYQ EGLKAMRLLG ESLGVEIQVF GPETHITEIV PLALGVAKKA PTPLPAFSVP
ASIGADTPAA TIAEQPAAPQ LGEINKDGSR EQANDNIVRF DTTGGPVSGR PSYRPFDETT
RSLVFGLQPR AIQGMLDFDF ACGRKTPSVA AMIYPPFGHH IQKFYWGTFE TLLPVYTSVG
EAVKKHADAD VLVNFSSRS VYSSTLDAFN YPQIKAIALI AEGVPERHAR ELLHLAEKKK
VLIIGPATVG GIKPGCFRIG NSGMMDNIL SSKLYRAGSV GYVSKSGGMS NELNNILNIF
TNGTYEGIAI GGDRYPGTSF IDHLLRYEQD PECKMLVLLG EVGGIEEYRV IEAVKNGTIK
KPIVAWAIGT CAKMFTTEVQ FGHAGSMANS DLETADAKNK AMKAAGFIVP DTFEELPDVL
KQTYDALVNN GTIVVKKETE PPLIPMDYKW AQELGMIRKP AAFISSISDE RGQELLYAGM
RISDVFKEEI GIGGVLSSLW FKRRLPDYAC KFIEMVLQLT ADHGPAVSGA MNTIITARAG
KDLVSSLAAG LLTIGDRFGG ALDGAAANFT SALNSGQTPR EFVDSMRKAN KLIPGIGHKV
KSKTNPDLRV ELVKDFVKST FPATATLDYA IGVEAVTSAK KDSLILNVDG AIAAAFCDLL
NCSGAFTQEE AAAYLKVGTI NGLFVLGRSI GFIGHFIDQK MLKQPLYRHP SDDFYISFAD
HSRVVVQPKK AAASFLEQKL ISEEDLNSAV DHHHHHH

A.5 Localización de los nucleótidos corriente arriba de los genes *acl*.

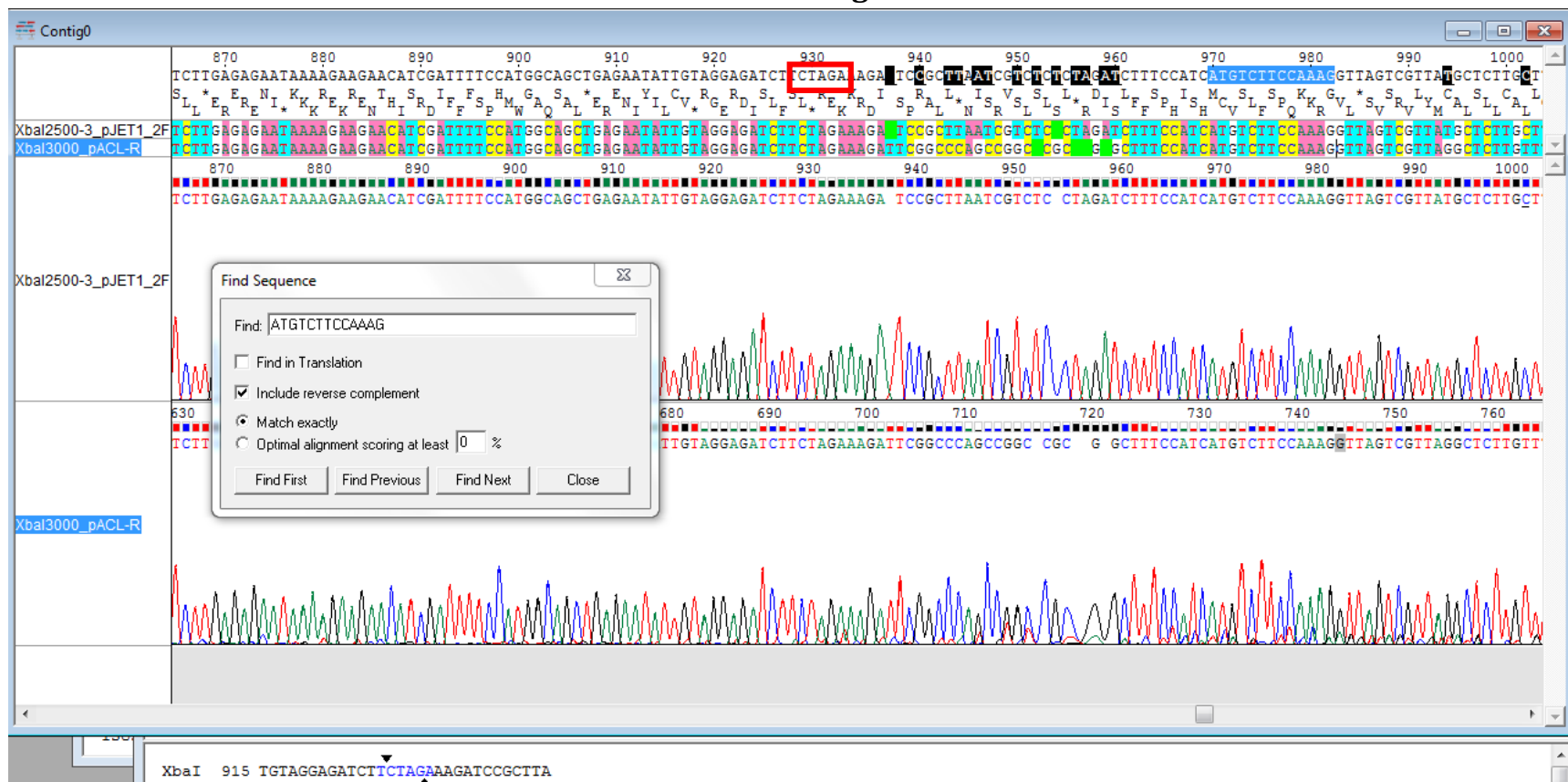


Figura A.5.1. Alineamiento de secuencias nucleotídicas corriente arriba del gen *acl*. Los alineamientos fueron generados mediante el software ChromasPro 1.7.4. Las secuencias se obtuvieron por PCR inversa usando DNA circularizado, el DNA genómico fue digerido con la endonucleasa XbaI y religado con la enzima T4 DNA ligasa. En ambos alineamientos, la posición 927 indica el sitio de corte XbaI (TCTAGA), el cual delimita la secuencia nucleotídica corriente arriba del gen (recuadro rojo) con respecto a la corriente abajo del gen. La secuencia nucleotídica sombreada en azul indica el inicio de la secuencia del gen *acl*. Las secuencias que están corriente arriba del gen son 41-TCTAGAAAGATCCGCTTAATCGTCTCCTAGATCTTTCCATC-1 y 39-TCTAGAAAGATTCGGCCAGCCGGCCGCGCTTTCCATC-1.

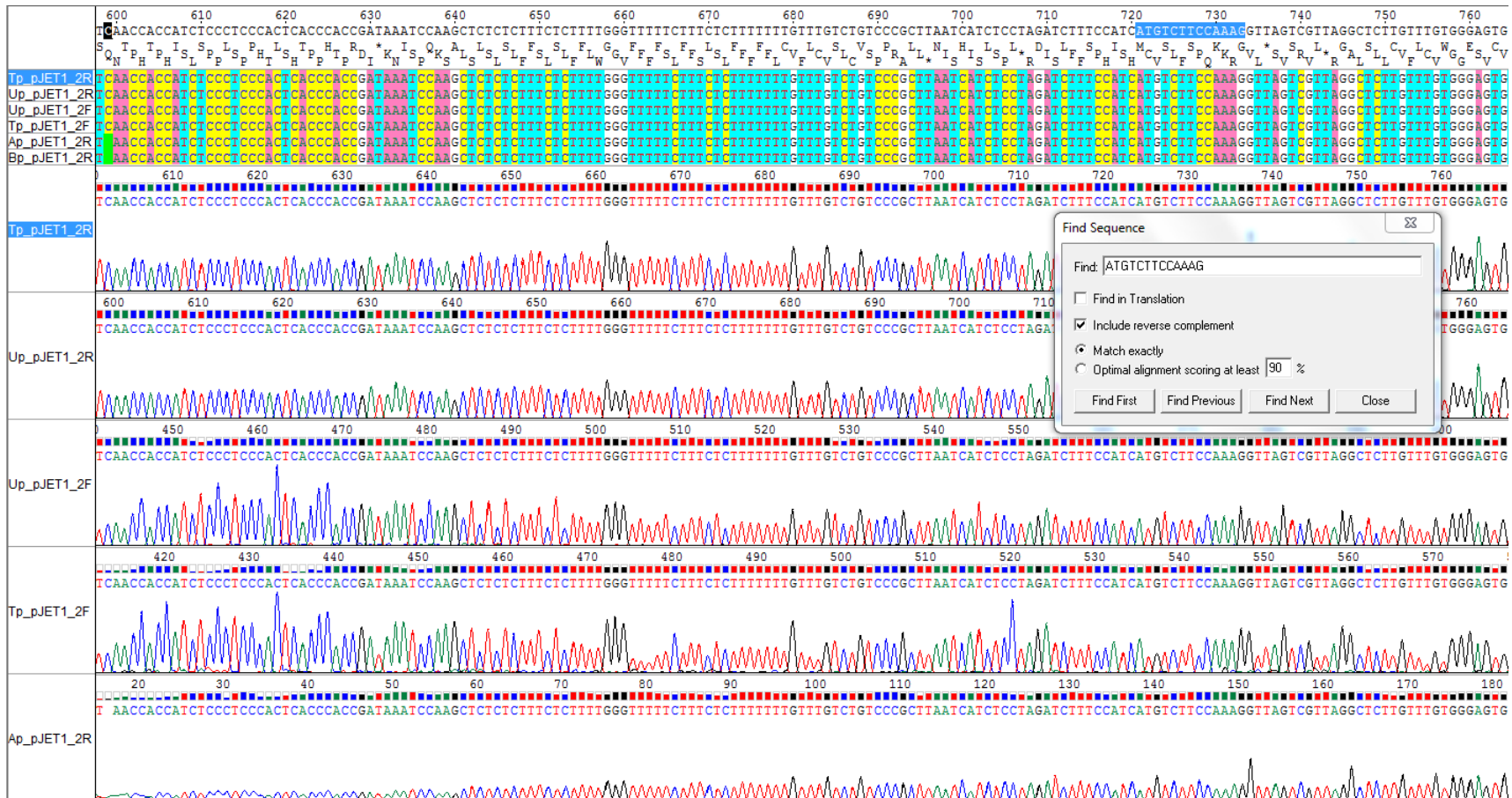


Figura A.5.2. Alineamiento de la secuencia corriente arriba del gen KM503045. Las secuencias se obtuvieron por PCR inversa usando DNA circularizado, el DNA genómico fue digerido con la endonucleasa PmlI y religado con la enzima T4 DNA ligasa. Los alineamientos se obtuvieron a partir de los electroferogramas de cuatro clones. La secuencia nucleotídica sombreada en azul indica el inicio de la secuencia del gen *acI*. En estos alineamientos, no se localizó el sitio de corte PmlI (TCTAGA), indicando que la secuencia corriente arriba del gen es de 542pb (anexo A.7).

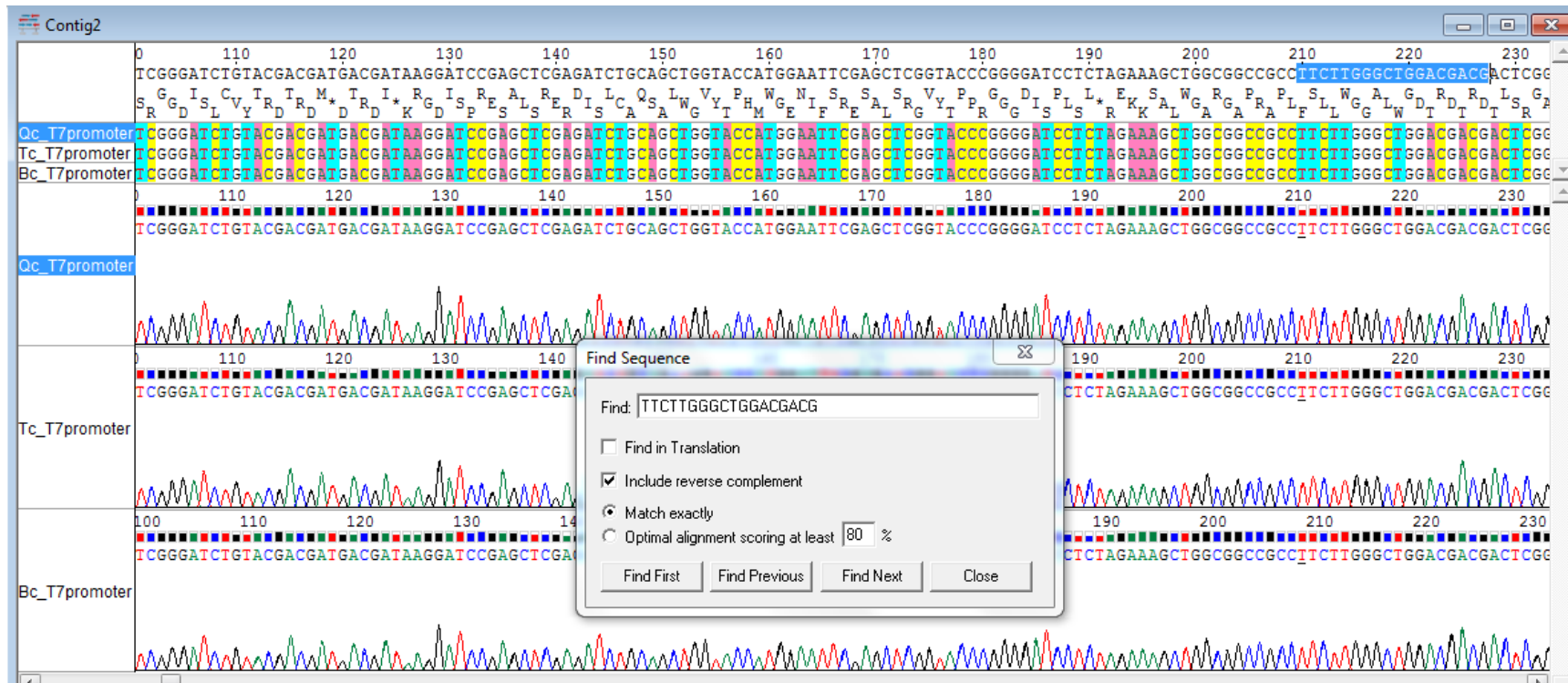


Figura A.5.3. Alineamiento reverso de la secuencia corriente abajo del gen KM510496. Se muestran tres electroferogramas de clonas diferentes. La secuencia corriente abajo es 1-GGGGTTTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTGGGATCTGTACGACGAT GACGAT AAGGATCCGAGCTCGAGATCTGCAGCTGGTACCATGGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGATCCTCTAGAAAAGCTGGCGGCCGCC-170

A.6 Secuencia corriente arriba del gen *acl* (KM503045 y KM510496).

Secuencia corriente arriba de *acl* (KM503045)

542-

TCCACTCCCCTCGCCCCCACCCCCAAAAGAGAGAACGAAAGAACATAGATGCATATCAC
GTTTGACGAATTCCATCTAATCTTGATCAATACAGTCGTCCGTCCGATTGAAATTTGTATA
TACATCTGTCTCTTCCCTTTCATCCCAACGGCCCACTCTCTGTGCGGTGCGCGCGCGCGC
AGGGAGGCGAAACCACCAACTCGGGCGTCAGGACACTACCCCAACCTGTCCTTGCTGCGCA
TTGAGCCTGGTCATAATATTGGGCGAGCCTCTGCTAAGCCTGACATTCAATCACACCCCTT
TGGTTGGGGTTTCCCTTCTCTCTTTTTTTTTTCTCTCGTTCGTCCGGAAAGCAAGAAGAAAG
AAAAAGGTCCATCTCGTTCGATTCCATCTTTCGTTCTTGCCCCATCTGAACATCAACCAC
CATCTCCCTCCCCTCACCACCGATAAATCCAAGCTCTCTCTTTCTCTTTTGGGTTTTTC
TTTCTCTTTTTTTGTTTGTCTGTCCCGCTTAATCATCTCCTAGATCTTTCCATC-1

Secuencia corriente arriba de *acl* (KM510496)

41-TCTAGAAAGATCCGCTTAATCGTCTCCTAGATCTTTCCATC-1

Secuencia corriente arriba de *acl* (aparentemente de KM503045)

39-TCTAGAAAGATTCGGCCCAGCCGGCCGCGGCTTTCCATC-1

A.7 Secuencia corriente debajo de los genes (KM503045 y KM510496).

Secuencia corriente abajo de *acl* (KM503045)

1-

GGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGG
TCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCGAGCTCGAGATCTGCAGCTGGTACCATG
GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAAAGCTGGCGGCCGCC-170

A.8 Promotores de la ACL

Sequence ACI-Phaffia



```
=====
seq( 0.. 59)      tccactcccctcgccccccacccccaaaagagagaaacgaaagaacatagatgcatatca
Segments:
2.3.1.0.2  8    22          =====Sp1=====
2.3.1.0.2  15   24          =====Sp1=====
=====
seq( 60.. 119)   cgtttgacgaattccatctaattgatcaatacagtcgctccgattgaaattgta
Segments:
=====
seq( 120.. 179)  tatacatctgtctctctttcatccaacggcccactctctgtcgcgtgcgcgcgcg
Segments:
=====
seq( 180.. 239)  cgcaggaggcgaaaccaccaactcgggcgtcaggacactacccaacctgtccttgctg
Segments:
2.3.1.0.2  182  191      ===Sp1===
=====
seq( 240.. 299)  cgcattgagcctggtcataatattggcgagcctctgtaagcctgacattcaatcacac
Segments:
=====
seq( 300.. 359)  ccctttggttgggtttcccttctctcttttttctctcgttcgctccgaaagcaaga
Segments:
4.1.1.0.3  310  319          =NF-kappaB
3.5.3.0.5  314  323          ===ICSBP===
=====
seq( 360.. 419)  agaaagaaaaaggtccatctcgttcgattccatctttcgttcttgcccccatctgaacat
Segments:
=====
seq( 420.. 479)  caaccaccatctccctcccactcaccaccgataaatccaagctctctctttctcttttg
Segments:
2.3.1.0.2  431  440          =====Sp1=====
=====
seq( 480.. 539)  ggtttttctttctcttttttgttctgtcccgttaatacatctcctagatctttcca
Segments:
=====
seq( 540.. 599)  tc
```

Figura A.8.1. Localización de sitios de unión a factores de transcripción en la secuencia corriente arriba del gen KM503045 de *P. rhodozyma*. Las secuencias nucleotídicas (nyCCnCCCAC) de unión al factor de transcripción Sp1 están localizadas en las posiciones 431...440, 182...192, 15...24 y 8...22; la del factor de transcripción ICSBP está en la posición 314...323; y la del factor de transcripción NF-KappaB está en la posición 310...319 (programa AliBaba2.1; <http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>).

A.9 Expresión de la ACL 6XHis-tagged a 120 rpm

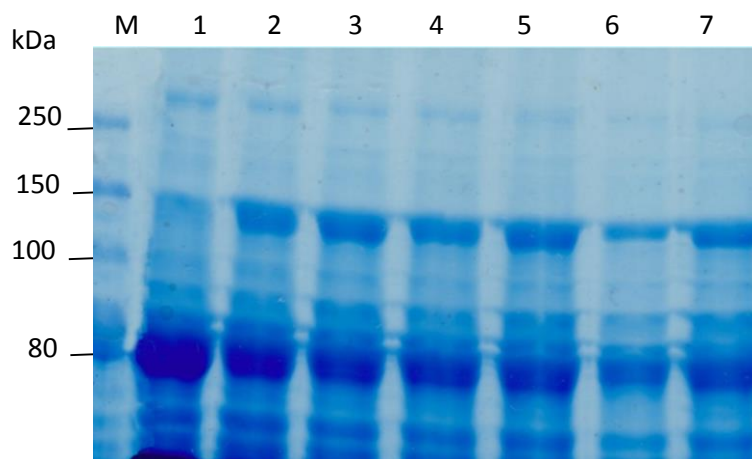


Figura A.9.1. Análisis electroforético (10% SDS-PAGE) de la expresión de ACL 6XHis-tagged por *Pichia-ACL1* cultivada a baja agitación. *Pichia-ACL1* cultivada a 25 °C, 120 rpm por 72 h produce una banda visible, de alrededor de 120 kDa, pero sin actividad ACL. Carril M: marcador de proteína de amplio rango (BioLabs, USA); carril 1: control; carril 2-7, extracto proteico soluble (ACL 6XHis-tagged) de seis clonas.