



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Cátedra de Biotecnología/ Instituto de
Nanobiotecnología



**Identificación y caracterización de genes
implicados en el metabolismo de esteroides en
Tetrahymena mediante análisis bioinformático,
expresión heteróloga y análisis transcriptómico**



Tesista: Bioq. Tomás Javier Poklépovich Caride

Directora: Dra. Berta Clara Nudel

Director adjunto: Dr. Alejandro David Nusblat

Año: 2015

Agradecimientos

A mis viejos que me dieron todo lo que me podían dar y más. A vos má que desde algún lugar, siempre muy presente, me ayudaste a llegar hasta acá cuando parecía muy difícil, que me enseñaste a hacer lo que me gusta por sobre otras cosas, que me enseñaste que el buen humor y una sonrisa son una forma mucho mejor de vivir. Te extraño aunque siento que estás siempre presente en cada momento. A vos viejo que siempre me diste lo mejor y nunca me privaste de nada, que te estás bancando un momento muy duro pero con una energía y una voluntad que expresan todo lo que sos, el mejor padre que pude tener.

A vos Santi que me acompañas en el “sentimiento científico” en casa, cuando nadie entiende nada de lo que hablamos, jaja. Aprovecho esta instancia para agradecerte todas las pilas que le pusiste al momento más duro que nos podía tocar.

También agradezco a mis abuelos, empezando por Delia que tengo la suerte de poder seguir viendo y aprender que no hay nada más fuerte que el cariño, que es el motor de la vida. A Toni, que me enseñó a disfrutar de buenos momentos y a tener la seriedad necesaria en otros, que me contagió la pasión por la música, “dirigiendo” algunas orquestas en la sala de su casa y además de alguna forma me transfirió su vocación por enseñar. A Luisa y Manuel, inseparables siempre, que me enseñaron que aun en los momentos más difíciles hay que tratar siempre de pensar para tomar decisiones, que me enseñaron a ser paciente y a poner siempre la mejor voluntad para las cosas y en particular a Manuel, que me enseñó todo lo que puede significar un abrazo, en ese último abrazo que nos dimos.

A mis tíos Daniel y Miguel Ángel que no se cansan de incomodarme contándome los orgullosos que están de mí. A mis primos Jero y Guido con quienes quedó demostrado que sin importar nada más, puedo contar con ellos. A mis primos un poco más lejanos Pablo y Renzo que a pesar de idas y venidas, siempre están ahí, sobre todo en los momentos difíciles, siempre tratando de que cada momento sea de la mejor forma posible.

Al resto de la familia, Eleonora, Nona, Gabriel “Maestro”, que siempre están al pie del cañón cuando hace falta.

A Lau, con quien compartí un tiempo muy lindo, y que aunque hoy ya no estemos juntos, quiero agradecerle porque marcó un momento en mi vida y fue muy importante contar con ella en un momento en que necesitaba alguien que me banque, un hombro y un abrazo incondicionales.

A mis amigos de la facultad Coda, Vicky, Ine, Pancho, Lucho, Sole, Vero, Cassa, Fede, Andy, Lute que me acompañaron durante la carrera y sobre todo después de la carrera, que estuvieron siempre, sin distinguir momentos, que ya cruzaron esa barrera de “amigos verdaderos” de la que se quejaban, y que por sobre todo me ayudaron siempre a ser mejor de lo que soy, y me mantienen en ese camino, gracias chicos, los quiero.

A mis amigos del secundario, Maxi, Javi, Coty, Dai, Caro, Jesu, Eze, Diego, Diega, Marce, Nico, Agus, Martin, Luis y Tede, a quienes tuve la suerte de conocer en un muy lindo momento de la vida y que también tengo la suerte de tener al lado desde entonces. Gracias por bancarme todo y por estar siempre, los quiero a todos

A mis amigos de la vida, Gonza, Ernu y Julia que conozco hace mil años, desde que éramos muy pequeños y que con idas y venidas, siempre estuvimos ahí, y en este último tiempo, me ayudaron mucho a pasar algunos malos momentos que tocaron.

A mi directora Clara, que me incorporó al gran grupo de trabajo “los nudels” y que me brindó todas las herramientas y posibilidades para poder llevar a cabo el doctorado de la mejor forma. A Ale por enseñarme de todo en la ciencia, pero especialmente por enseñarme que a pesar de creer lo contrario, siempre hay una forma simple y sencilla de ver las cosas, y que la mejor forma de encarar cualquier momento siempre es con el mayor optimismo, con la mejor voluntad, sin importar lo angustiante que pueda ser. A ambos, por bancarme en algunos momentos en que merecí algún “correctivo” y por ayudarme a afrontar algunos momentos malos.

A Rodri, por hacerme entender que todo se puede mejorar, y por estar para los momentos de delirio científico nerd. A Mauro por ayudarme con mis primeros pasos en el mundo *Tetrahymena* y por recibirme tan bien en el grupo. A Marie que a pesar de haber aclarado que “está todo bien con Tomás hasta que se demuestre lo contrario” fue muy importante durante todo el doctorado, aconsejándome y ayudándome con todo lo que se podía, incluso en desarrollos catárquicos como el “pique y ponga”. A Marian, que siempre con una sonrisa (a veces, entendiblemente, no tan grande) le puso la mejor onda a cada día, a pesar de los nubarrones que podían avvicinarse. A los nuevos del grupo Nico, Belu, Caro, Luz, Guada y Euge que me apoyaron mucho este ultimo tiempo y que tienen la difícil tarea de reemplazarme, jajaja.

A Ana, Casco, Walter, Victoria, Silvia Ca y Silvia Co, Susana, Cami, Silvana, Sole, Edy, Naty y Nico J que me trataron muy bien en la cátedra y siempre se mostraron con la mejor predisposición para ayudarme.

Al equipo de Fútbol de biotecnología, con el que tuvimos algunas diferencias y que creo que es momento de mostrarme humilde y reconocer que ESA no fue mi mejor actuación... Juan, Lucas sr y Lucas jr, a Nico, a Ariel, a Gus, a Julian, Lautá, con quienes tenemos un record más que aceptable, aunque para compensar mi muestra de humildad, conmigo en cancha jamás perdimos...

A, Emi, Alex, Ale C, Juli, Vitito, Fer, Fede, con quienes da gusto compartir el lugar de trabajo, pero también desayunos, almuerzos, meriendas, cenas y todas las comidas que hay entre esas, y por estar presentes cuando más los necesité (y cuando los necesité menos también).

A María y Nico por darme una mano en momentos difíciles, y por enseñarme todo lo que se sobre programas de imágenes, el Word, el prism, etc, jajaja. Mucho del diseño de esta tesis tiene que ver con ellos.

Al Ruso, Juan, Ger, Tomi, Nacho L que aportaron un poco de rusticidad a una cursada tan "fina" y que mantienen esa frescura y rusticidad a pesar de los años (algunos mas años que otros...).

A Karu, Ani, Ro, Tani, Chuchi, por bancarme (y joderme un poco también) en el final de la carrera y por esas jornadas intensas de "estudio".

A la cátedra de Física, con quienes comparto una buena parte de mi vida hace unos cuantos años, especialmente a Andrés, Kari, Pau, Gera, Fiore, Lucio, que me ayudaron y ayudan a crecer muchísimo y que me mantienen siempre consciente de la responsabilidad que tenemos los docentes.

A Nicolás Favale por su colaboración y buena predisposición.

A Ruben, Naty, Aldana, Dani y Silvina por su buen trato cuando necesité ir a la cátedra de inmunología.

A Marcela y Jimena por su disposición y sus consejos para el trabajo.

Al grupo de investigación del servicio de parasitología y Chagas del hospital Gutierrez, Héctor, Patricia y Romina por aceptarme en su grupo, por enseñarme a trabajar en ciencia y por bancarme cosas que, ahora a la distancia, eran para un "correctivo".

Por último quiero agradecer a todos los que me acompañaron durante todo el proceso del doctorado.

Todos, por más pequeña que fuera la participación, hicieron que hoy esté feliz de vivir este momento y haberlos conocido.

Parte de los resultados de esta tesis han sido publicados en:

- Poklepovich TJ, Urtasun N, Miranda M V., Nusblat AD, Nudel CB. **Expression and functional characterization of a C-7 cholesterol desaturase from *Tetrahymena thermophila* in an insect cell line.** Steroids 2015; 96; 132–139

- Tomazic ML, Poklepovich TJ, Nudel CB, Nusblat AD. **Incomplete sterols and hopanoids pathways in ciliates: gene loss and acquisition during evolution as a source of biosynthetic genes.** Mol Phylogenet Evol 2014;74:122–34.

- Poklepovich TJ, Rinaldi M a, Tomazic ML, Favale NO, Turkewitz AP, Nudel CB, Nusblat AD. **The cytochrome b_5 dependent C-5(6) sterol desaturase DES5A from the endoplasmic reticulum of *Tetrahymena thermophila* complements ergosterol biosynthesis mutants in *Saccharomyces cerevisiae*.** Steroids 2012;77:1313–20.

Resumen

Los triterpenoides policíclicos, principalmente esteroides y hopanoides, son componentes esenciales de la membrana plasmática de organismos eucariotas y algunos procariotas. Aunque en general se asume que los ciliados no sintetizan esteroides, y muchos de ellos son auxótrofos, el estudio de los genomas indicó que los ciliados analizados presentan genes putativos relacionados y ciertas actividades enzimáticas comprobadas.

En este trabajo se analizó mediante herramientas bioinformáticas la biosíntesis de triterpenoides policíclicos considerando tanto la etapa pre-escualeno, como una post-escualeno. Mientras la primera aparece largamente completa en la mayoría de los organismos investigados no auxotrófos, la segunda es incompleta y de carácter excepcional.

El estudio filogenético de las enzimas presentes en los ciliados indicó que al menos 3 genes que codifican para las enzimas de la vía pre-escualeno en *Tetrahymena* (HMG-CoA reductasa, escualeno sintasa y escualeno-hopano ciclasa) tendrían origen bacteriano, probablemente adquiridos por transferencia horizontal a un ancestro fagotrópico.

Respecto de la etapa post-escualeno, hemos comprobado la excepcionalidad de las actividades enzimáticas presentes en *Tetrahymena*. Dado que *T. thermophila* no sintetiza ni requiere esteroides para su crecimiento vegetativo, al momento no se conoce la función de los genes que codifican para C-5, C-7 y C-22 esteroles desaturadas, como tampoco del objetivo de la des-etilación de fitosteroides (C24 des-etilasa), pero sí se obtuvo evidencia de que son genes altamente conservados y por lo tanto sometidos a selección negativa. El análisis transcriptómico también reveló una regulación transcripcional significativa de los dos primeros, como respuesta a la presencia/ausencia de esteroides. En cambio no se identificó aun el gen codificante de la C22 esteroles desaturada y tampoco se verificó una regulación transcripcional por esteroides de C24 des-etilasa.

T. thermophila es capaz de transformar colesterol exógeno en provitamina D₃ (7-dehidrocolesterol) con una eficiencia considerable en una reacción catalizada por la mencionada C-7 esteroles desaturada. El análisis informático de la secuencia

aminoacídica traducida del gen codificante (TTHERM_00310640) revela que se trata de una oxigenasa tipo Rieske, con un dominio transmembrana y un sitio catalítico con un dominio de unión a hierro no hemínico. Según nuestro análisis bioinformático, estas características la engloban en el grupo II de las oxigenasas de tipo Rieske. La actividad catalítica de Des7p, así como también la secuencia y la topología estructural es similar a las de las proteínas de la familia Neverland/DAF-36, involucradas en la síntesis de hormonas esteroideas en insectos y nematodos, pues todas ellas catalizan la desaturación en la posición C-7 del colesterol que incorporan de la dieta. Dada la similitud estructural y funcional, se analizó la expresión heteróloga del gen DES7 de *T. thermophila*, debidamente acondicionado, en la línea celular Sf9 de *Spodoptera frugiperda*, identificando y cuantificando la transformación de colesterol en 7-dehidrocolesterol y analizando la localización subcelular. La expresión se realizó mediante el sistema baculovirus y las células infectadas con el baculovirus portadoras el gen DES7 acondicionado (DES7i) acumularon entre 16 y 40 veces más 7-dehidrocolesterol que las infectadas con baculovirus control, en las condiciones ensayadas. La proteína fue detectada en la fracción microsomal, coincidiendo con la localización en retículo endoplásmico reportada en *T. thermophila*.

Si bien el sistema redox dador de electrones para Des7p, y para las enzimas de la familia Neverland/DAF-36, es desconocido, estas proteínas presentan una similitud considerable con la proteína KshA de *Rhodococcus sp.* (una hidroxilasa de esteroides) y probablemente con su sistema dador de electrones, que consiste en una reductasa denominada KshB. A partir de esta similitud entre Des7p y KshA, se realizó una búsqueda en el genoma de *T. thermophila* identificándose un total de 11 proteínas con centro Rieske, de las cuales dos poseen los motivos típicos de unión a NAD(P)H, el de unión a FAD y el centro [2Fe-2S]. Entre ellas, 2 proteínas (Q24D68 y Q241B3) con baja similitud a KshB, pero con los dominios característicos de KshB, serían los candidatos más probables para investigar.

La enzima C-5 esterol desaturasa de *T. thermophila* (Des5Ap) es una proteína microsomal que requiere citocromo *b*₅/citocromo *b*₅ reductasa, oxígeno y NAD(P)H para su actividad y cuyo gen fuera identificado (TTHERM_01194720). En el curso de este trabajo se ensayó su expresión en un sistema heterólogo consistente en una cepa mutante de *S. cerevisiae*, sin actividad C-5 esterol desaturasa (gen *ERG3*). La expresión

resultó satisfactoria, y se analizó la funcionalidad del gen expresado por complementación y recuperación de la capacidad de síntesis de ergosterol (que requiere la desaturación en la posición C-5).

También se analizó la localización subcelular de la enzima en *T. thermophila* y de la enzima expresada en forma heteróloga en *S. cerevisiae*, fusionando las proteínas a GFP. El resultado obtenido por microscopía de fluorescencia indica que la localización es en el retículo endoplásmico, en ambos organismos.

De esta forma se concluye que la función y la localización de esta enzima están conservadas entre *T. thermophila* y *S. cerevisiae*, a pesar de la gran distancia evolutiva entre estos dos organismos. Del mismo modo, la expresión funcional de la C-7 esteroil desaturasa de *T. thermophila* en la línea celular de *S. frugiperda* indica que existe una conservación funcional en el sistema dador de electrones. Se demuestra de este modo que resulta posible la expresión activa de genes de localización en retículo endoplásmico tanto en *S. cerevisiae*, como en la línea celular *Sf9*.

“Aunque mi madre no sabía nada de ciencia, también ejerció sobre mí una gran influencia. Tenía, en particular, un maravilloso sentido del humor, y aprendí de ella que las más altas formas de comprensión que podemos alcanzar son la risa y la compasión humana.”

Richard Feynman

“El motor de la ciencia es la curiosidad con las preguntas constantes: ¿Y eso cómo es? ¿En qué consiste? ¿Cómo funciona? Y lo más fascinante es que cada respuesta trae consigo nuevas preguntas.”

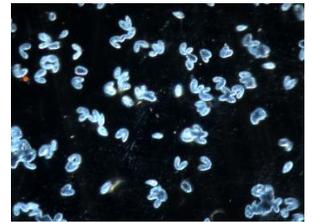
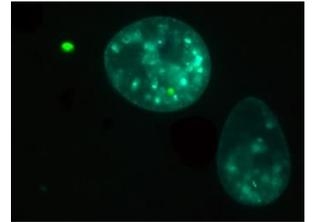
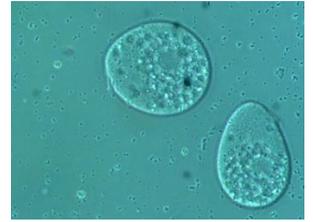
César Milstein

Índice de contenidos

Introducción	12
1. Esteroles y hopanoides: fósiles moleculares.....	13
2. Síntesis y biotransformación de esteroles	17
2.1 Etapa pre-escualeno.....	17
2.2 Etapa post-escualeno	19
3. <i>Tetrahymena</i>	22
3.1 Taxonomía.....	22
3.2 Modelo eucariota	25
3.3 Triterpenoides en <i>Tetrahymena</i>	28
Objetivos generales	33
Materiales y métodos	35
1. Cultivos de microorganismos	35
1.1 <i>Tetrahymena thermophila</i>	35
1.1.1 Cepa.....	35
1.1.2 Crecimiento	35
1.1.3 Conservación	35
1.2 <i>Escherichia coli</i>	36
1.2.1 Cepas	36
1.2.2 Crecimiento	36
1.2.3 Conservación	36
1.2.4 Preparación de ultracompetentes	36
1.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
1.3.1 Cepas	37
1.3.2 Crecimiento	37
1.3.3 Conservación	37
1.3.4 Preparación de electrocompetentes.....	37
1.4 <i>Spodoptera frugiperda (Sf9)</i>	38
1.4.1 Línea celular y crecimiento.....	38
1.5 Recuento celular.....	38
2. Técnicas de biología molecular	38
2.1 Síntesis de genes	38
2.2 Diseño de construcciones para localización subcelular	39
2.3 Análisis en geles de agarosa	40
2.4 Extracción de ADN plasmídico de bacterias	41
2.5 Extracción de ADN genómico total de <i>Tetrahymena</i>	41
2.6 Introducción de material genético	41
2.6.1 Transformación de <i>E. coli</i>	41
2.6.2 Electroporación de <i>S. cerevisiae</i>	42
2.6.3 Bombardeo biolístico de <i>T. thermophila</i>	42
2.6.4 Infección Baculovirus.....	42
2.6.4.1 Obtención de baculovirus recombinantes.....	42
2.6.4.2 Amplificación de baculovirus recombinantes.....	43
2.6.4.3 Determinación del título viral: método dilución a punto final	44
2.6.4.4 Infección de células <i>Sf9</i>	44
2.7 Extracción de ARN de <i>T. thermophila</i>	44

2.8	Secuenciación del transcriptoma de <i>T. thermophila</i>	45
3.	Análisis de secuencias y filogenia.....	45
3.1	Análisis filogenético de HMG-CoA reductasas	45
3.2	Análisis filogenético de escualeno sintasas.....	46
3.3	Análisis filogenético de escualeno-hopano ciclasas.....	47
3.4	Búsqueda de ortólogos del metabolismo del tetrahymanol.....	48
3.5	Búsqueda de ortólogos del metabolismo de esteroides.....	48
3.6	Análisis de presión selectiva (Ka/Ks)	48
3.7	Análisis filogenético de citocromos <i>b₅</i> de <i>T. thermophila</i>	49
3.8	Análisis del transcriptoma	50
4.	Técnicas de microscopía.....	50
4.1	Preparación de muestras para microscopia de fluorescencia	50
4.1.1	Localización subcelular de DES5A en <i>T. thermophila</i>	50
4.1.2	Localización subcelular de DES5Alev en <i>S. cerevisiae</i>	51
5.	Técnicas analíticas.....	51
5.1	Extracción de esteroides	51
5.1.1	Células <i>Sf9</i>	51
5.1.2	<i>S. cerevisiae</i>	52
6.	Técnicas cromatográficas.....	52
6.1	Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)	52
6.2	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masa (CG-MS)	52
7.	Electroforesis de proteínas	53
7.1	Preparación de microsomas y homogenatos.....	53
7.2	<i>Western blot</i>	53
	Resultados	54
	Capítulo 1	
	Análisis de la vía metabólica de triterpenoides cíclicos en ciliados	55
1.	Introducción	56
2.	Objetivos específicos.....	58
3.	Resultados y discusión	59
3.1	Biosíntesis de tetrahymanol.....	59
3.2	Metabolismo de esteroides.....	66
3.3	Análisis de la expresión génica.....	69
3.4	Análisis de la presión selectiva	75
4.	Conclusiones	77
	Capítulo 2	
	Expresión de C-7 esteroide desaturasa de <i>T. thermophila</i> en células de insecto <i>Sf9</i>.	78
1.	Introducción	79
2.	Objetivos específicos.....	91
3.	Resultados y Discusión	92
4.	Conclusiones	104
	Capítulo 3	
	Expresión de C-5 esteroide desaturasa (Des5Ap) de <i>T. thermophila</i> en <i>S. cerevisiae</i>.	105
1.	Introducción	106

2.	Objetivos específicos.....	110
3.	Resultados y discusión	111
4.	Conclusiones	121
	Conclusiones generales.....	122
	Referencias	126



Introducción

1. Esteroles y hopanoides: fósiles moleculares

Los lípidos son un gran grupo de moléculas que cumplen con la característica de ser solubles en solventes orgánicos y no en agua. Dicho de otro modo los lípidos son moléculas hidrofóbicas y anfipáticas que tienen su origen total o en parte en condensaciones de tioésteres basadas en carbanión o condensaciones de unidades isoprénicas basadas en carbocatión. Dentro de los lípidos de interés biológico se pueden trazar 8 categorías según estructura y condensación que los origina: los acilos grasos, los glicerolípidos, los glicerofosfolípidos, los esfingolípidos, los glucolípidos y los policétidos derivan de la condensación de subunidades de cetoacilos. Los esteroles y los prenoles derivan de la condensación de isoprenos.

Los esteroles son triterpenos policíclicos. Históricamente, la regla general ha sido que los esteroles se encuentran en los organismos eucariotas, aunque ya ha sido demostrado que es posible encontrar también esteroles en procariotas.

Estos compuestos son esenciales para el desarrollo celular y desempeñan variadas funciones en la célula eucariota. Son los lípidos no polares mayoritarios en las membranas celulares y en asociación con otros lípidos (fosfolípidos, esfingolípidos) participan en la organización de la membrana, dándole una estructura ordenada y regulando su fluidez y permeabilidad [1,2]. Por otro lado, los esteroles son precursores de sales biliares necesarias para la digestión intestinal y de las llamadas hormonas esteroideas involucradas en una amplia gama de procesos biológicos como el crecimiento, la diferenciación, la reproducción y la regulación del ciclo celular, entre otros. Ejemplos de hormonas esteroideas en diversos taxones eucariotas son los brassinoesteroides en plantas [3], anteridiol y oogoniol en hongos acuáticos [4]; ecdisteroides en artrópodos [5] y ácidos dafacrónicos en nematodos [6]. Otra función de los esteroles, relacionada con la membrana plasmática es la participación de éstos, junto a otros lípidos como los esfingolípidos, en la formación de las llamadas “balsas lipídicas”, un microdominio especializado, localizado en la membrana, que tiene funciones relacionadas con la señalización celular y con los procesos de tráfico de vesículas [7].

Los organismos eucariotas, en general, producen sus propios esteroides (protótrofos). Sin embargo, existen organismos auxótrofos, que deben incorporarlos de su dieta, como los insectos.

Como regla general, las bacterias no sintetizan esteroides ni los requieren para el crecimiento ni la reproducción. Sin embargo, se han encontrado bacterias que sintetizan triterpenoides pentacíclicos; pertenecen a los géneros *Gemmata*, *Methylosphaera* y *Methylococcus*, como así también algunas *Myxobacterias* (*Myxococcales*) y pueden producir derivados del lanosterol, mono o dimetilados en la posición C-4 [8–10]. En estos casos, las enzimas involucradas en su síntesis parecen provenir de una transferencia horizontal de genes (HGT) de eucariotas, por ejemplo se han encontrado la escualeno monooxigenasa y la oxidoescualeno ciclasa en *Methylococcus capsulatus*, en *Gemmata obscuriglobus* y en otros organismos, siendo ambas enzimas muy relacionadas, en secuencia aminoacídica, a las enzimas eucariotas [10–12]. De cualquier manera, aun no se ha asignado una función a los esteroides en estas bacterias, dado que pruebas de noqueo de estos genes en bacterias no evidencian un cambio en el fenotipo [9].

En algunas bacterias, en particular cianobacterias, bacterias metanotróficas y bacterias termoacidófilas, se ha descrito la presencia de una clase de triterpenoides cíclicos llamados hopanoides, clasificados dentro de la categoría de prenoles [13]. Se asume que los hopanoides tienen un rol similar al de los esteroides, por ejemplo, controlar la fluidez de la membrana [14,15]. Sin embargo, pueden también tener funciones distintivas, como aumentar la tolerancia a altas temperaturas y a bajos pH, y en la protección contra el oxígeno del complejo nitrogenasa en bacterias fijadoras de nitrógeno [16]. En la Figura 1 se observa la estructura de los esteroides y los hopanoides, y algunas de sus posibles variantes.

En 1985, Brown y Goldstein se refirieron al colesterol como “la molécula pequeña mas adornada en la biología” en su presentación en la ceremonia de los premios Nobel. Con esto se referían a la gran diversidad de compuestos similares al colesterol, que conforman el “esteroloma” integrado por más de 1000 productos naturales distintos, todos ellos con la estructura básica característica del sistema de anillos ciclopentano-perhidrofenantreno [17].

Esta diversidad de compuestos implica la existencia de una variedad de vías metabólicas que sintetizan dichos compuestos. Se han encontrado vías metabólicas en todos los dominios de la naturaleza, resultando en una enorme diversidad de esteroides diferentes. Existen algunos grupos taxonómicos, como los vertebrados, en los cuales se encuentra en general, la misma variedad de esteroides, siendo los mayoritarios los mismos para todas las especies. En otros casos, por ejemplo en esponjas (*Porifera*) y algas (los organismos incluidos en el término “algas” son muy diversos y pertenecen a varios taxones, inclusive en diferentes reinos), la variedad encontrada entre los organismos es mucho mayor. Así por ejemplo es posible encontrar esteroides que incluyen variadas insaturaciones, alquilaciones, incluyendo la presencia de un anillo ciclopropano en la cadena lateral [18]. La gran diversidad llevó a pensar en los esteroides como una herramienta en la quimiotaxonomía, es decir, en la sistemática a partir de compuestos químicos presentes en los diferentes taxones. Como ejemplos de esto, existen numerosos trabajos en los cuales se analiza la composición de esteroides y esteranos (esteroides totalmente saturados y sin grupo hidroxilo) a partir de los cuales se obtiene información sobre posibles criterios taxonómicos en esponjas, en algas, en plantas y en otros [18–21].

Ourisson & Nakatani [22] proponen una hipótesis de filogenia molecular, desde los terpenos a los esteroides, donde una serie de cambios mínimos en unos pocos sistemas enzimáticos puede explicar toda la serie de compuestos similares al colesterol, aunque 2 de los intermediarios planteados (triclohexaprenol e isoarborinol) no se han encontrado en organismos vivos, pero sí en sedimentos fósiles.

Los esteroides (en realidad esteranos) y los hopanos han sido ampliamente utilizados como biomarcadores evolutivos [23–25]. La teoría detrás del uso de esteroides y hopanoides como biomarcadores radica en la gran diversidad de vías metabólicas, y por lo tanto de derivados de estos compuestos, que presentan un buen criterio para acompañar la taxonomía de organismos de los 3 dominios de la naturaleza. La ventaja para su uso como marcadores geológicos se debe a la especificidad que presentan respecto de los 3 dominios (Eukarya, Bacteria y Archaea) y también debido a la resistencia a la biodegradación de sus esqueletos de carbono recalcitrantes, lo que permitió su conservación [23]. Para tener una idea del grado de conservación de estos biomarcadores, puede mencionarse que algunos de estos

compuestos (2-metil-hopanoides, por ejemplo) se han logrado detectar en sedimentos de entre 2,7 y 2,4 miles de millones de años, aún cuando los fósiles morfológicos de las cianobacterias y eucariotas más viejos encontrados hasta ahora datan de alrededor de 2 y 1,5 miles de millones de años atrás respectivamente [26].

Hasta hace poco tiempo, los 2-metil-hopanoides eran considerados marcadores específicos de cianobacterias. Hoy en día, está en discusión, dado que hay otras bacterias que son capaces de producir este tipo de compuestos [27]. La existencia de estos organismos en ese período está relacionada con las hipótesis sobre la composición de la atmósfera en ese período. La aparición de oxígeno, al menos en niveles aproximados de 2% en la atmósfera, se trata de explicar mediante la hipótesis de las cianobacterias, bacterias fotosintéticas que producen oxígeno. En los inicios, el oxígeno era rápidamente captado por el océano y por metales como el hierro o el cromo, manteniendo la condición anaeróbica. Los organismos anaeróbicos que supuestamente habitaban la Tierra eran sensibles al oxígeno, al igual que los organismos anaeróbicos actuales, y la presencia de esta molécula reactiva revestía un riesgo grande. En determinado momento, el oxígeno comenzó a acumularse en la atmósfera, en niveles considerables. Ha sido propuesto el surgimiento de los esteroides como una protección frente al estrés oxidativo, así como también reguladores de la entrada de oxígeno a la célula [28]. La relación entre los esteroides y el oxígeno ha sido muy estudiada en términos de la aparición de los esteroides, de la función inicial de los esteroides y de la evolución de las estructuras de los esteroides.

Debe tenerse en cuenta que la presencia de un biomarcador proporciona información sobre la existencia de una determinada vía metabólica, y no debe confundirse con la presencia de algún grupo de organismos [29]. Sin embargo la síntesis de estos compuestos se puede relacionar con un origen biológico e indirectamente con las condiciones ambientales.

En este marco, el estudio del metabolismo de esteroides y hopanoides en los diferentes dominios puede aportar información, por un lado sobre la filogenia de los organismos, y por otro lado, permite obtener criterios para analizar los sedimentos geológicos.

2. Síntesis y biotransformación de esteroides

Desde el punto de vista evolutivo, la síntesis de los esteroides se puede dividir en dos etapas: una etapa pre-escualeno y una post-escualeno.

2.1 Etapa pre-escualeno

Los esteroides y los hopanoides se forman por la ciclación del oxidosqualeno o del escualeno por acción de ciclasas diversas, como se indica en la (Figura 1). Estas ciclasas, a pesar de su diferencia en la especificidad por el sustrato, estarían relacionadas evolutivamente [30].

En efecto, tanto los esteroides como los hopanoides se sintetizan a partir de isopentenil difosfato (IPP), un precursor universal presente en los 3 dominios de la vida. Sin embargo el IPP puede tener distintas vías de síntesis, con una evidente preferencia de la vía del 2-c-metil-D-eritritol-4-fosfato/1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (MEP/DOXP) en bacterias, la vía del mevalonato (MVA) en eucariotas y la vía MVA alternativa en archaeas (Figura 1).

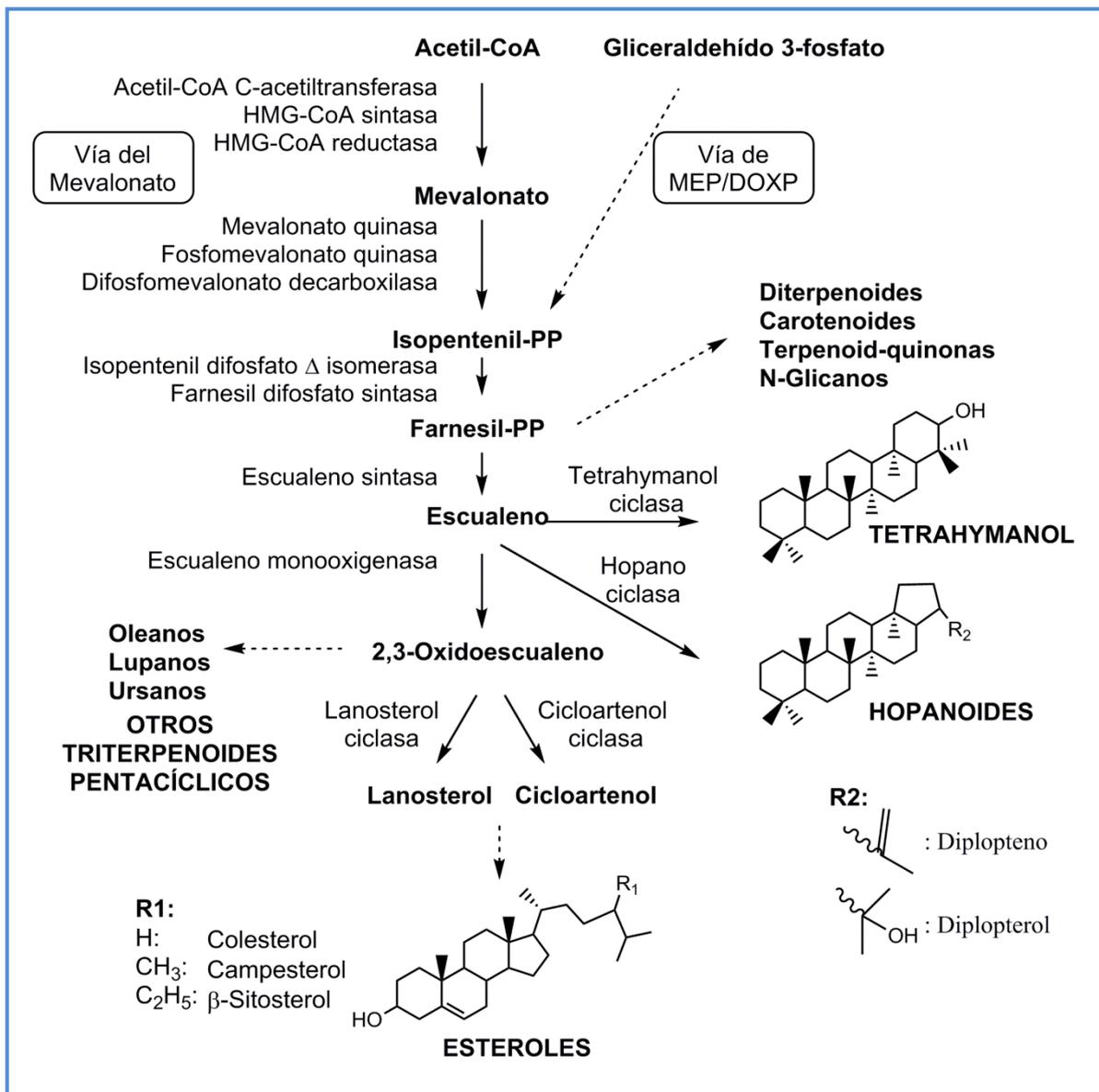


Figura 1. Vía canónica de síntesis de triterpenos policíclicos. Producto final: hopanoides en bacterias, tetrahymanol en ciliados, esteroides en la mayoría de los organismos eucariotas, y oleanos, lupanos y ursanos en plantas. La biosíntesis de isopentenil-PP se muestra como la vía del mevalonato, presente en eucariotas y archaeas; y la vía MEP/DOCP presente en bacterias y muchos eucariotas fotosintéticos.

De cualquier manera, se conocen excepciones a esta regla, por ejemplo, algunas bacterias emplean la vía del MVA, algo que comúnmente se explica por la transferencia horizontal de genes (HGT) de dadores pertenecientes a los dominios archaea o eucariotas [31]. Alternativamente, plantas y otros eucariotas fotosintéticos, como microalgas y el grupo apicomplexa (un grupo de protistas parásitos que derivan de un ancestro fotosintético), emplean la vía MEP además de la MVA. Estos grupos eucariotas poseen plástidos, lo cual sugiere que pueden haber obtenido la vía MEP gracias a la transferencia de genes desde una cianobacteria endosimbionte que originó

los plástidos. Finalmente, la mayoría de las especies de archaea carecen de las últimas enzimas de la vía MVA clásica [11,32].

Los análisis filogenéticos [32] sugieren que cada una de las 3 vías metabólicas es ancestral a cada dominio, pero no hay datos suficientes para saber si estas vías estuvieron presentes en el último ancestro común de todos los organismos o no.

2.2 Etapa post-escualeno

La siguiente etapa crucial en la biosíntesis de hopanoides y esteroides proviene de la elección entre ciclar u oxidar el escualeno. En el caso de los hopanoides, el escualeno se cicla directamente por acción de una escualeno-hopano ciclasa (SHC) en un proceso que no requiere oxígeno. Los hopanoides, en particular el C30 diplopterol y el diplopteno, así como los C35 bacteriohopanos (bacteriohopanotetrol y aminobacteriohopanotriol) son los compuestos comúnmente sintetizados en procariotas, encontrándose en cianobacterias, bacterias metanotróficas y bacterias termoacidófilas, como se mencionó antes [13].

En la biosíntesis de los esteroides, en cambio, el escualeno es primero oxidado por una escualeno epoxidasa (o monooxigenasa), transformándose en 2,3-oxidoescualeno (Figura 1), y luego es ciclado en una segunda etapa a lanosterol o cicloartenol por enzimas homólogas a SHC (Figura 2).

Los pasos siguientes en la vía metabólica de esteroides incluyen diversas reacciones de demetilación, reducción, desaturación, isomerización y metilación (Figura 2). La gran distribución de esteroides en el dominio eucariota lleva a la hipótesis de que el último ancestro común eucariota sintetizaba ya esteroides. El origen de las enzimas de esta vía metabólica no fue aclarado completamente, las enzimas pudieron ser reclutadas de enzimas preexistentes homólogas bacterianas o pueden haber surgido en el propio linaje eucariota [11]. De cualquier manera, debido a la gran correlación entre estas actividades enzimáticas y la disponibilidad de oxígeno, la hipótesis con mayor aceptación indica que la aparición de esta vía metabólica ocurrió luego de la aparición del oxígeno en la atmósfera, probablemente generado por la fotosíntesis de las cianobacterias en el eón Proterozoico (alrededor de 2,5 miles de millones años atrás) [33–35]. Precisamente se ha propuesto que la función inicial de esteroides en eucariotas pudo haber sido la protección contra el estrés oxidativo,

relacionado al aumento progresivo de los niveles de oxígeno [28]. Es probable que la vía metabólica ancestral sintetizara cicloartenol como producto final de la oxigenación del escualeno para su posterior ciclación [22]. Ahora bien, si bien el cicloartenol tiene la capacidad de reforzar la membrana, es en sí poco estable frente al oxígeno. El aumento de la concentración de oxígeno en la atmósfera actuó de esta forma como presión selectiva conduciendo a la evolución molecular de los esteroides y hacia la síntesis de esteroides más complejos, en cuya síntesis interviene abundantemente el oxígeno y que hoy encontramos comúnmente en la naturaleza (colesterol, ergosterol, fitosteroides).

Precisamente a partir de la conclusión sobre la necesidad de abundante oxígeno para la síntesis de esteroides, es posible trazar una distinción entre los hopanoides y los esteroides como biomarcadores. La presencia de esteranos implica un proceso de diagénesis a través del cual los esteroides/esteroides se transforman, en determinadas condiciones de temperatura y presión, en moléculas saturadas más estables. El hecho de encontrar esteranos, evidencia indirecta de esteroides, implicaría reconocer la necesidad de oxígeno para su síntesis, por lo cual los sedimentos que contienen esteranos requieren ser evaluados en términos de presencia de oxígeno en la atmósfera, a diferencia de los hopanoides.

Los organismos eucariotas que pueden sintetizar esteroides son los animales, hongos, plantas y numerosos protistas [29]. Los esteroides principales que acumulan los eucariotas son variados: Los animales sintetizan colesterol, los hongos sintetizan en general ergosterol, las plantas producen fitosteroides (C29 esteroides) que incluyen predominantemente β -sitosterol, estigmasterol y campesterol (Figura 1 y Figura 2). Las microalgas eucariotas sintetizan una gran diversidad de esteroides, dependiendo de la clase, familia, género e incluso de la especie que estemos analizando. Estos esteroides poseen en general un grupo etilo en la posición C-24, y algunas insaturaciones poco usuales en varias posiciones [18] aunque también es posible encontrar ergosterol y otros esteroides demetilados en la posición C-4 (Figura 2).

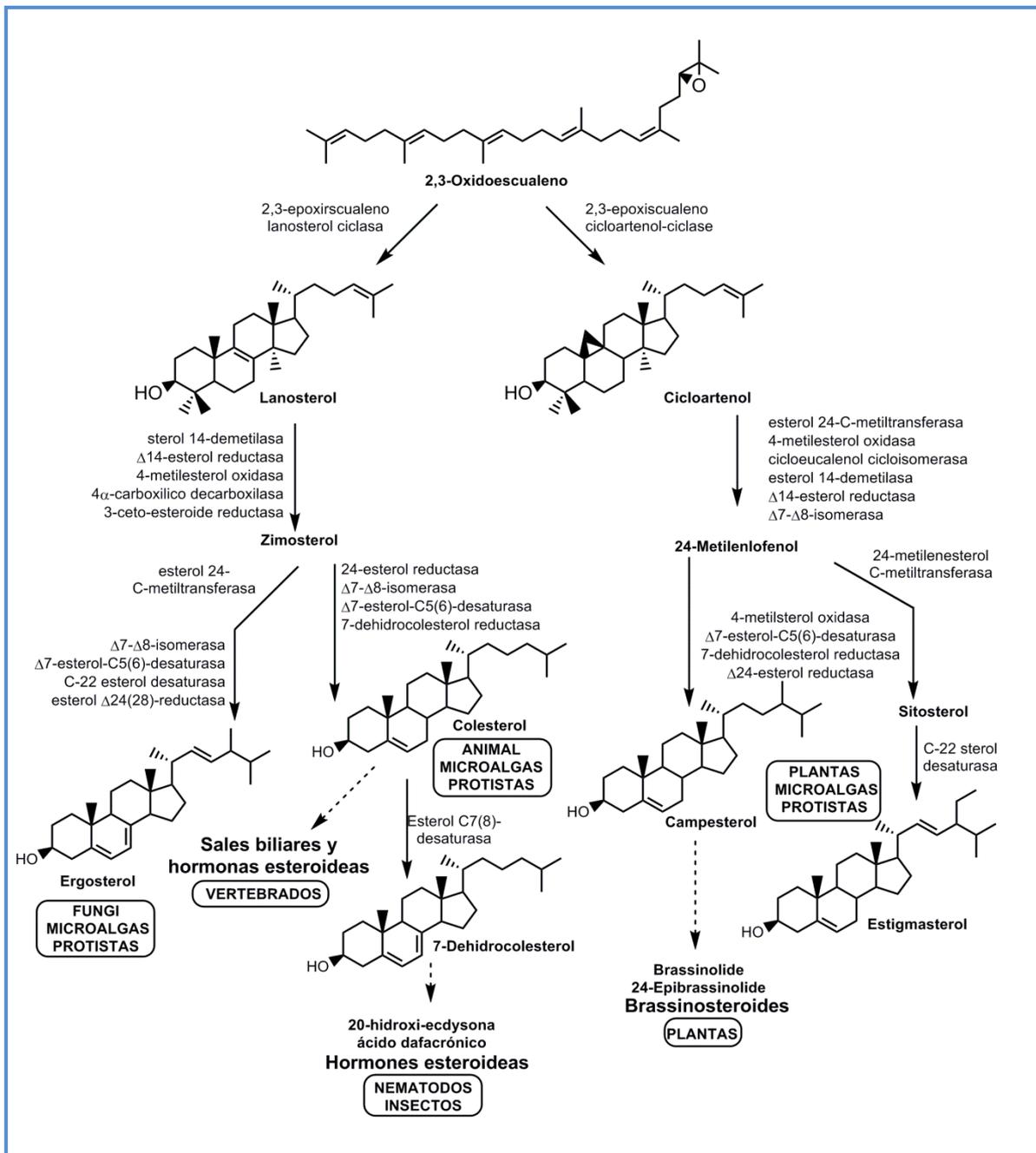


Figura 2 Vía de síntesis post-escualeno en diferentes organismos. Se muestran también, hormonas esteroideas en vertebrados, nematodos, insectos y plantas (brassinosteroides).

Como se mencionó previamente, la síntesis de esteroides no está restringida a eucariotas, sino que ha sido demostrada la presencia de esteroides en determinadas bacterias. En contraste con esto, algunos organismos eucariotas no pueden sintetizar esteroides y deben incorporarlos en la dieta (auxótrofos). Entre estos organismos están los nematodos, los artrópodos [36]; algunos ciliados y los apicomplexa, por ejemplo *Paramecium tetraurelia* [37] y *Plasmodium falciparum* [11] respectivamente; y parásitos flagelados como *Giardia intestinalis* y *Trichomonas vaginalis* [38]. La hipótesis

sobre la presencia de la vía de síntesis de esteroides en el último ancestro común eucariota parece no ajustarse a estos organismos auxótrofos. Sin embargo, se ha planteado una nueva hipótesis que propone para estos organismos una evolución basada en la pérdida de ciertos genes y la incorporación de otros (probablemente por transferencia horizontal) [11].

3. *Tetrahymena*

3.1 Taxonomía

Los ciliados pertenecen al grupo SAR (Stramenopila–Alveolata–Rhizaria), el más grande de los eucariotas [33] (Figura 3).

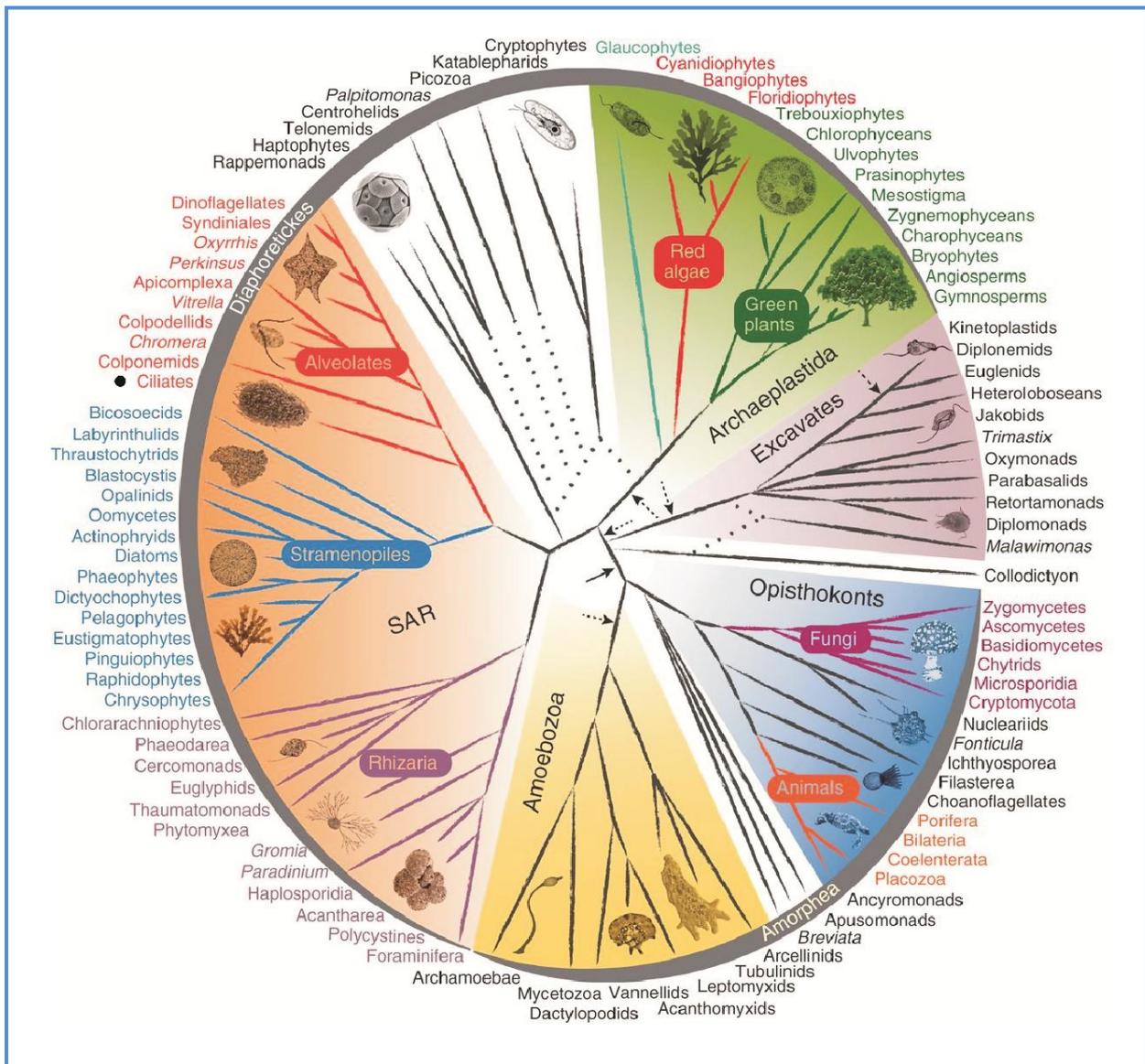


Figura 3. Árbol de los Eucariotas. Tomado de Burki, 2014 [39]. El punto negro indica los ciliados.

Los ciliados se agrupan en un linaje monofilético, junto a los apicomplexa, dinoflagelados, oxryrhis, perkinsids y algunos flagelados como Colpodella. Este linaje se denomina Alveolata [40] y se cree que ha evolucionado hace alrededor de 1,3 millones de años atrás [33]. Actualmente se encuentra en discusión el término chromalveolados que engloba a los grupos Alveolata, Stramenopila, y a otros grupos que hoy en día están considerados fuera del SAR, como los haptophytes y cryptophytes. De acuerdo a la hipótesis de los chromalveolados, los ciliados son el resultado de una única endosimbiosis secundaria entre una línea descendiente de bikont (Archaeplastida + Excavata + SAR) y un alga roja [41].

Dentro de los alveolados, los géneros más estudiados, debido a su patogenicidad, pertenecen al filo Apicomplexa, como por ejemplo *Plasmodium* (agente causal de la malaria) y *Toxoplasma* (agente causal de la toxoplasmosis).

Los ciliados son una numerosa clase de organismos unicelulares complejos, que han colonizado diversos nichos ecológicos e incluyen a más de 8000 especies divididas en 2 subfilos y 11 clases (Figura 4). Se caracterizan por su dualismo nuclear, por el arreglo de estructuras en su región superficial (cortex) que incluye ciliias y además comparten la conjugación como proceso de intercambio sexual.

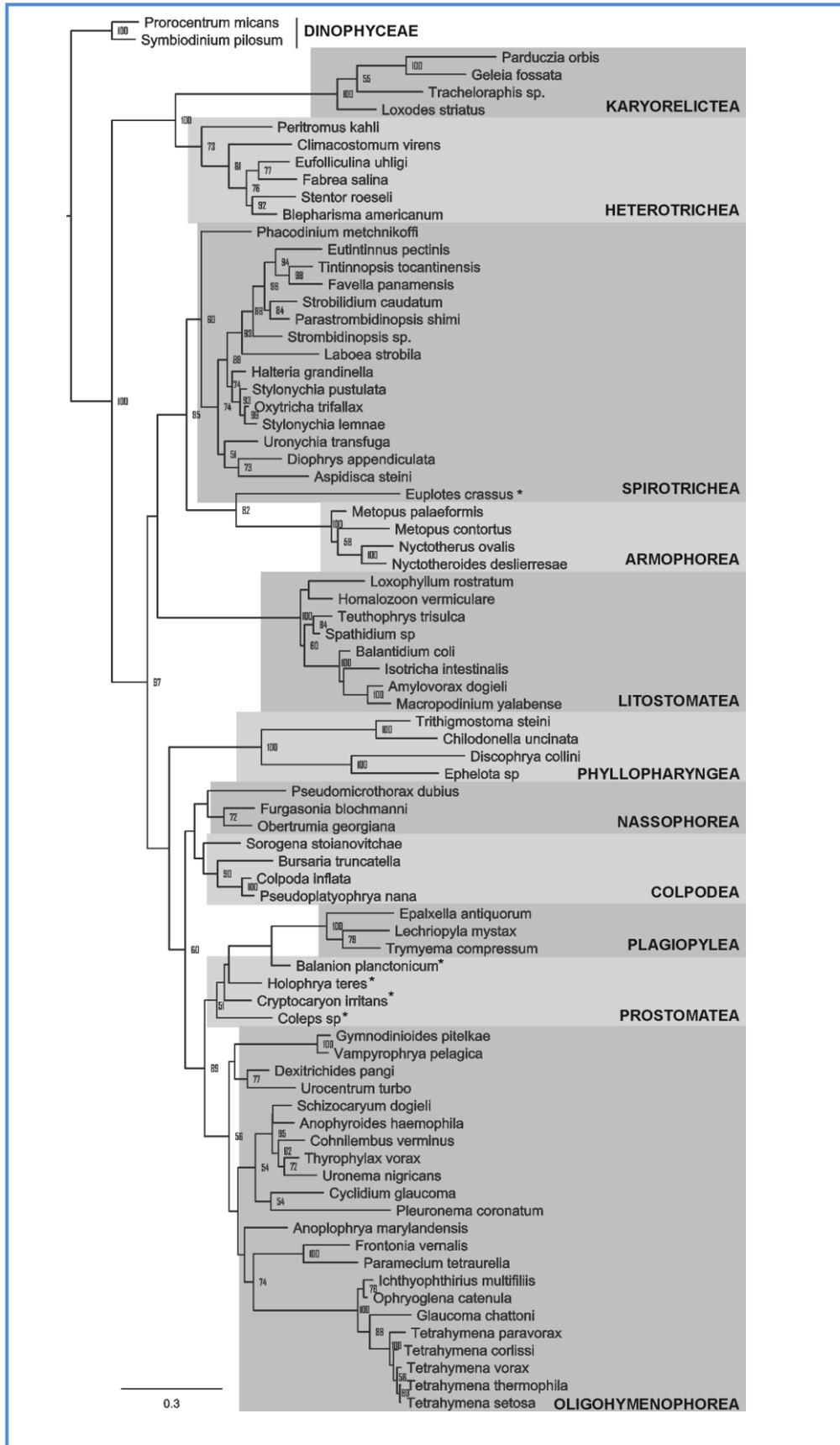


Figura 4. Filo Ciliophora. El árbol fue construido con 88 secuencias de la subunidad pequeña de ARNr mediante el método de máxima similitud con 100 remuestros (*bootstrap*) con el programa PhyML [42]. El árbol se basa en la filogenia molecular de ciliados de Lynn [43]. Se muestran las 11 clases de ciliados y la clase Dinophyceae, perteneciente al filo Dinoflagellata, empleada como *outgroup*. Las barras indican porcentaje de sustituciones.

Tetrahymena comparte junto a los ciliados *Paramecium* e *Ichthyophthirius multifiliis*, (agente causal de la enfermedad de los puntos blancos en peces) la clase Oligohymenophorea (Figura 4). Fuera de esta clase, pero siempre dentro de los ciliados, *Oxytricha trifallax* perteneciente a la clase Spirotrichea, es otro organismo bastante estudiado, cuyo genoma ha sido secuenciado completamente. El único ciliado patógeno para humanos encontrado hasta ahora es *Balantidium coli*, perteneciente a la clase Listotomatea.

3.2 Modelo eucariota

Tetrahymena es un ciliado no patógeno que habita ríos, lagos y estanques y puede encontrarse en una amplia variedad de climas. Posee un tamaño de 40-50 μm de largo y 20 μm de ancho. A pesar de ser un organismo unicelular, posee muchos procesos básicos conservados de diversos eucariotas, incluidos los humanos, que no se encuentran en otros sistemas unicelulares modelo, como por ejemplo las levaduras [44].

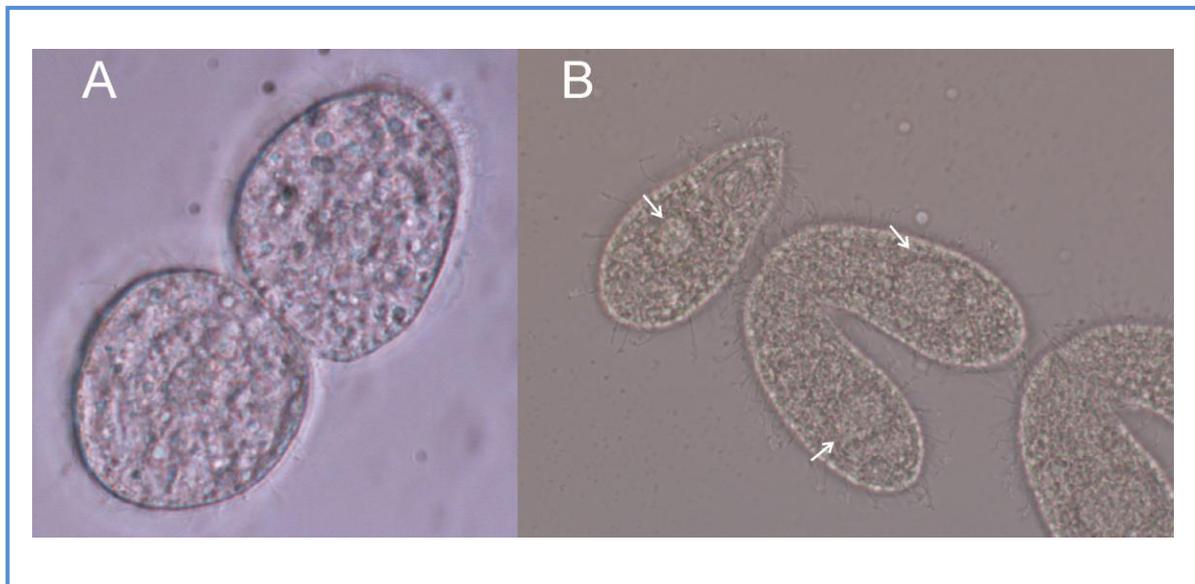


Figura 5. *Tetrahymena thermophila*. En el panel A se observa una célula a punto de dividirse. En el panel B se observa una célula, y además una pareja en conjugación. Las flechas blancas indican el macronúcleo.

Como todos los ciliados, presentan dualismo nuclear, ya que posee un micronúcleo y un macronúcleo con características y funciones muy distintas. El micronúcleo es diploide, contiene 5 pares de cromosomas, se divide mitóticamente y

no se expresa. Su función es almacenar la información genética que se pone en juego en la reproducción sexual, durante la conjugación los micronúcleos del par conjugante desarrollan meiosis e intercambio genético, luego mitosis, dando lugar a 4 micronúcleos. Uno de ellos da origen al nuevo macronúcleo que reemplaza al anterior que se degrada. Luego de la separación del par conjugante, un micronúcleo se degrada. El macronúcleo tiene su origen en el micronúcleo, es poliploide con entre 45 y 50 copias de los cromosomas y se expresa durante el crecimiento vegetativo. Sin embargo, los cromosomas son acentroméricos y su división es amitótica, es decir que los cromosomas segregan al azar. Esto permite la segregación fenotípica o *phenotypic assortment*, que es la obtención de organismos homocigotas a partir de heterocigotas, ya que a través de sucesivas divisiones algunas células perderán uno de los dos alelos para un gen [45].

Como se mencionó, *Tetrahymena* tiene un estadio vegetativo y uno sexual (Figura 5). En el estadio vegetativo (asexual) las células se dividen por fisión binaria por duplicación de todas sus estructuras. Esta reproducción ocurre siempre y cuando las células se encuentren en un medio rico en nutrientes. En un medio deprivado, o en una solución salina, es decir en un medio de “hambre”, se induce la conjugación. Para ello, las células forman pares (conjugantes) entre miembros con distinto *mating type* (hay 7 distintos) y combinan su material genético por recombinación entre cromosomas homólogos, dando origen a una progenie con una composición distinta a la de cada progenitor. El pool genético que permite los diferentes *mating types* existen en todas las células y la forma en que la célula define su *mating type* consiste en un rearrreglo de ADN en el núcleo somático mediante el cual ensambla un par de genes de un *mating type* y deletiona el resto [46]. Una célula expresa uno de siete *mating types*, y la progenie derivada de un evento de conjugación puede no tener el mismo *mating type* de las células originales.

Tetrahymena se ha vuelto un organismo modelo eucariota, objeto de variadas investigaciones, basadas en las siguientes características: El tamaño relativamente grande de la célula permite estudiar cómodamente estructuras subcelulares, inyectar compuestos y conectar electrodos. Además, *Tetrahymena* presenta condiciones de cultivo muy ventajosas respecto a otros organismos eucariotas de complejidad semejante, con un tiempo de duplicación de alrededor 2 horas a 37°C y de 3 horas a

30°C y la posibilidad de alcanzar densidades celulares de 10^6 células por mililitro de cultivo, en medios ricos económicos. El dualismo nuclear, con un micronúcleo germinal y un macronúcleo somático la vuelve de especial interés para estudios genéticos y de la reproducción (asexual o conjugación) [47].

Tetrahymena thermophila es un organismo unicelular muy desarrollado, perteneciente a un linaje celular antiguo, pero que su complejidad es comparable con la alta diferenciación de células de tejidos. Esta complejidad también la posiciona como organismo de elección para el estudio de algunas características de los metazoos, que no están presentes en otros eucariotas más simples. Ejemplos de esto son el estudio de la diferenciación germinal o somática, los rearrreglos programados de ADN, la distribución de los cromosomas en la mitosis, la modificación de histonas, la diversidad y modificaciones de la tubulina y los microtúbulos, la duplicación del cuerpo basal, la fagocitosis y la secreción de polipéptidos. Además, las investigaciones en este organismo han llevado a dos premios Nobel, uno por los estudios sobre el ARN autocatalítico (1989) y otro sobre los estudios en la dinámica de los telómeros y la telomerasa (2009) [47,48].

Por otra parte, el genoma de *T. thermophila* ha sido secuenciado completamente, como así también los genomas de otras especies del género (*Tetrahymena borealis*, *Tetrahymena ellioti* y *Tetrahymena malaccensis*). Asimismo, ya se han desarrollado estudios de expresión génica por técnicas de microarray [49] y secuenciación de ARN [50] en diferentes estadios del ciclo celular.

La genética de *Tetrahymena* presenta algunas características especiales: i) el genoma es rico en bases A-T constituyendo un total de 76% del mismo. ii) Las regiones no codificantes son ricas en A-T, mientras que las regiones codificantes contienen una mayor proporción de bases G-C. iii) el uso de codones de los ciliados es distintivo. Así, de los tres codones de terminación del código genético universal solo UGA codifica como stop, mientras los otros dos, UAA y UAG, codifican para el aminoácido glutamina [51].

3.3 Triterpenoides en *Tetrahymena*

Es generalmente aceptado que los ciliados no sintetizan esteroides [11]. En cambio, sintetizan hopanoides o bien son auxótrofos para esteroides, por lo cual, los esteroides que acumulan son el resultado de la dieta y/o su posterior metabolismo.

Algunos miembros de la clase oligohymenophorea sintetizan tetrahymanol como triterpeno pentacíclico principal, y en menor medida algunos hopanoides como diplopterol y otros análogos [52] (Figura 1). Tetrahymanol es un gammaceran-alcohol pentacíclico que cumple el rol de estabilizar las membranas. Mallory *et al.* [53] aisló por primera vez el tetrahymanol de *Tetrahymena pyriformis*; desde ese momento la presencia de tetrahymanol fue reportada en muchas especies del género *Tetrahymena*, como *T. thermophila*, *T. setosa*, *T. vorax*, *T. patula*, *T. corlissi*, *T. paravorax* y *T. limacis* [54] así como también en algunos ciliados marinos scuticociliatia, que incluyen a *Pleuronema sp.*, *Parauronema acutum*, *Uronema nigricans*, *Anophryoides soldoi* y *Cyclidium sp.* [55–57]. También se aisló tetrahymanol en otros organismos eucariotas no relacionados como el helecho *Oleandra wallichii* [58], el hongo anaeróbico del rumen, *Piromonas communis* [59] y el protista anaeróbico de vida libre *Andalucia incarcerata* [60].

Es interesante resaltar que se ha encontrado tetrahymanol también en procariontas incluyendo la alfa-proteobacteria fototrófica *Rhodospseudomonas palustris* [61] y la bacteria fijadora de nitrógeno *Bradyrhizobium japonicum* [62].

En ciliados, el tetrahymanol es sintetizado a partir de isopentenil difosfato (IPP) por la vía del mevalonato (MVA) y el último paso es catalizado por la escualeno-tetrahymanol ciclasa (STC). Esta enzima cataliza la ciclación del escualeno, a través de una reacción no oxidativa iniciada por protón [63] (Figura 1).

Los ciliados pueden incorporar esteroides del medio e inhibir simultáneamente la síntesis de tetrahymanol. Los esteroides se incorporan a la membrana en forma directa, como en el caso del ergosterol o previa modificación química. Por ejemplo *T. thermophila* y *T. pyriformis* toman ergosterol del medio y lo incorporan directamente en la membrana, interrumpiendo la síntesis de tetrahymanol. En el caso de C27 y C29 esteroides, pueden también desaturar en las posiciones C-5(6), C-7(8), y C-22(23) (Figura

6), y remover el grupo etilo de la posición C-24 de esteroides C29 (fitosteroides) (Figura 7) [64]. Las enzimas responsables de estos procesos son las desaturasas (C-5, C-7 y C-22) y una des-etilasa (C-24). Sin embargo no todos los ciliados poseen todas estas actividades. A diferencia de *Tetrahymena* en *P. tetraurelia* solo se detectaron las actividades de C-5(6) y C-7(8) esteroides desaturasas [65].

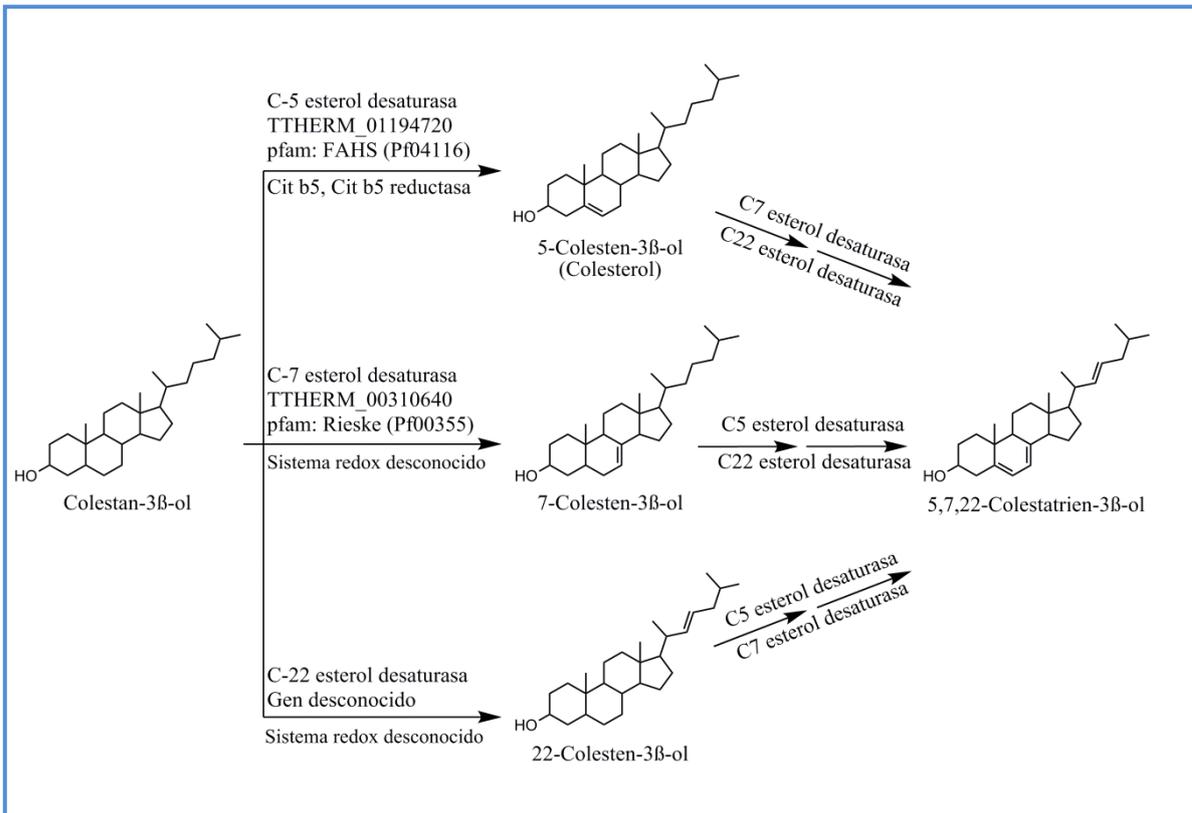


Figura 6. Actividades desaturasas presentes en *T. thermophila*. Se indica el gen, el dominio característico de pfam [66] y el sistema redox de transferencia de electrones. La acción de estas 3 enzimas no tiene un orden preestablecido. Se han encontrado los intermediarios con todas las combinaciones posibles.

De todas ellas, en particular la actividad C-7(8) esteroides desaturasa presenta particular interés, ya que permitiría transformar colesterol exógeno en provitamina D3 (7-dehidrocolesterol) con una considerable eficiencia en una reacción de un solo paso enzimático. Este proceso de conversión puede aplicarse tanto a la reducción de colesterol en alimentos con el consecuente enriquecimiento en provitamina D₃ [67,68], como a un método alternativo a la síntesis industrial química de vitamina D₃, [69–71]. El desarrollo de estas aplicaciones industriales requiere de una producción en gran escala de las enzimas en huéspedes robustos y con un entorno metabólico óptimo para su actividad.

Dado que *Tetrahymena* presenta las 3 actividades enzimáticas antes mencionadas, resulta imposible por el momento, plantear un proceso de síntesis de provitamina D₃ a partir de colesterol con la cepa salvaje, ya que el producto final obtenido sería el 7,22-dehidrocolesterol (Figura 6). El gen que codifica para la enzima C-22 esterol desaturasa no ha sido identificado, por éste motivo es necesario expresar la enzima de interés (C-7 esterol desaturasa) en otros sistemas biológicos.

El gen codificante de la C-7 esterol desaturasa en *Tetrahymena thermophila* fue recientemente identificado mediante noqueo somático y ARN de interferencia (*DES7*; THERM_00310640) [72]. La proteína codificada resultó ser una monooxigenasa de tipo Rieske, altamente conservada en animales del grupo protostoma e involucrada en el primer paso de la biosíntesis de hormonas esteroideas en insectos y nematodos. Un análisis bioinformático reveló la existencia de secuencias ortólogas en *T. malaccensis*, *T. ellioti* y *T. borealis*, así como también 6 parálogos en el genoma de *P. tetraurelia*. La presencia de más de un parálogo de un gen particular en *P. tetraurelia* no es sorprendente dado que presenta una historia evolutiva que incluye al menos tres duplicaciones enteras del genoma [73]. Otra secuencia de un ortólogo del mismo gen se encontró en *Capsaspora owczarzaki*, un organismo unicelular coanoflagelado (opisthokonta). En cambio no se encontraron ortólogos en otros alveolados, fuera de *Tetrahymena* y *Paramecium*, sugiriendo un evento probable de transferencia horizontal a un ciliado fagotrópico ancestral. La cepa de *T. thermophila* noqueada en dicho gen (*T. thermophila, DES7KO*) no mostró ninguna diferencia significativa en su crecimiento, ni morfología comparándola con la cepa salvaje, sugiriendo que *DES7* no sería un gen esencial. Si bien el gen codificante de C-7 esterol desaturasa forma parte de la vía de biosíntesis de hormonas esteroideas en insectos y nematodos, su rol en los ciliados no es evidente, dado que no hay reportes sobre hormonas esteroideas en *Tetrahymena*.

En cuanto a la enzima C-5 esterol desaturasa de *T. thermophila* fue identificada por análisis de fenotipo de una mutante delecionada en el gen *DES5A* (THERM_01194720) [74]. La proteína codificada pertenece a la superfamilia de hidroxilasas de ácidos grasos. La mutante noqueada en dicho gen también resultó completamente viable y sin cambios morfológicos perceptibles. El análisis de los esteroides acumulados en la mutante mostró que la actividad C-5 esterol desaturasa era

nula, mientras que las actividades C-7(8) y la C-22(23) esteroles desaturasa permanecieron inalteradas.

Como se mencionó más arriba, *Tetrahymena* puede desaturar los esteroides en la posición C-22. Sin embargo, no se han encontrado en el genoma ortólogos para una enzima de tipo citocromo P450, típica de todas las C-22 esteroles desaturasa conocidas hasta ahora [75]. La ausencia de un ortólogo evidente de citocromo P450, sumado a la insensibilidad a inhibidores de citocromos P450 [76], puede indicar que esta actividad enzimática, reportada en numerosos trabajos, represente una nueva clase de C-22 esteroles desaturasa todavía no identificada [77,78].

El análisis bioinformático de genes putativos de la familia de las hidroxilasas de ácidos grasos presentes en el genoma de *Tetrahymena* reveló también 4 nuevas secuencias identificadas tentativamente como C-4 esteroles metil oxidasa. Sin embargo las mutantes nulas construidas a partir del noqueo de dichos genes no mostraron el fenotipo predicho, por lo cual permanece desconocida su función [79].

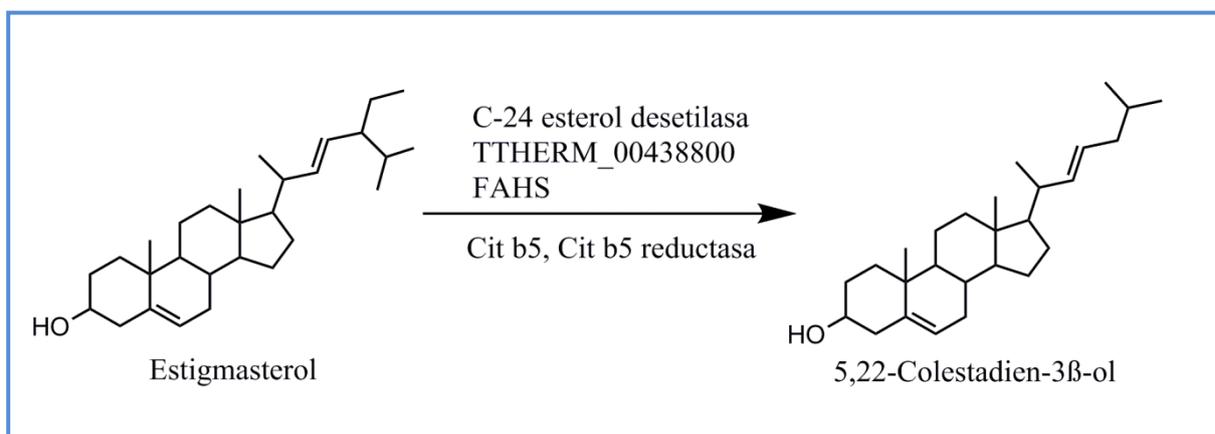


Figura 7. Enzima C-24 esteroles des-etilasa de *T. thermophila*. Pertenece a la superfamilia de las hidroxilasas de ácidos grasos (FAHS). No se ha comprobado experimentalmente que esta enzima requiera el sistema citocromo *b₅*/ citocromo *b₅* reductasa, sin embargo debido a la similitud con otras enzimas y la pertenencia a la FAHS indica que es un sistema redox muy probable.

Como se mencionó antes, los ciliados *T. thermophila* y *T. pyriformis* son capaces de desalquilar fitosteroides (C29 esteroides) exógenos, eliminando el grupo etilo de la posición C-24 del esteroles. Aunque la transformación y su mecanismo han sido muy bien descritos para organismos como nematodos, artrópodos e incluso esponjas, todavía no se han encontrado en ninguno de esos organismo el o los genes responsables de esta actividad [80,81]. En cambio, recientemente, fue identificado, mediante noqueo

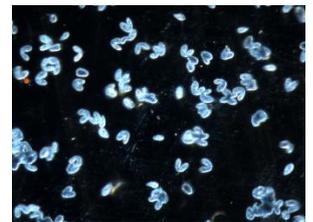
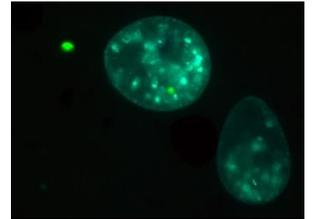
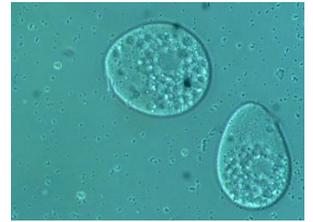
somático, un gen de este tipo en *T. thermophila* (*DES24*, THERM_00438800). De este modo, *DES24* es el primer gen involucrado en un proceso de desalquilación identificado [82].

El análisis de la secuencia de esta proteína, Des24p, indicó su pertenencia a la superfamilia de hidroxilasas de ácidos grasos, presente también en los genomas de *T. malaccensis*, *T. ellioti* y *T. borealis*, pero no de otros ciliados. Es interesante que no se hayan encontrado ortólogos de este gen en otros organismos eucariotas que también tienen la capacidad de des-etilar fitoesteroides en la posición C-24. En cambio, los análisis filogenéticos revelaron que Des24p agrupa junto a secuencias procariotas de función desconocida, sugiriendo una posible transferencia horizontal del gen [82].

Como era de esperarse, la cepa de *T. thermophila* mutante nula en *DES24* mostró una alta sensibilidad a fitosteroides, pero no así a C27 o C28 esteroides. En presencia de fitoesteroides mostró un crecimiento disminuido, una defectuosa regulación del metabolismo de tetrahimanol y variadas alteraciones morfológicas [82].

Objetivos generales

- Realizar un estudio evolutivo de la síntesis y el metabolismo de tetrahymanol y de la vía de esteroides en ciliados.
- Analizar la expresión diferencial de genes en respuesta al agregado de esteroides en el medio de cultivo de *T. thermophila*.
- Caracterizar la expresión heteróloga de las enzimas modificadoras de esteroides identificadas en *Tetrahymena* y los sistemas accesorios necesarios para su actividad.



Materialles y Métodos

Materiales y métodos

1. Cultivos de microorganismos

1.1 *Tetrahymena thermophila*

1.1.1 Ceba

La cepa de *T. thermophila* utilizada en este trabajo de investigación fue la cepa CU428.2 de genotipo *mpr1- 1/mpr1-1; mp-s, VII*, (Mutación en micronúcleo a 6-metilpurina, *mating type VII*) denominada en este trabajo como salvaje. Se obtuvo de *Tetrahymena stock center* (<https://tetrahymena.vet.cornell.edu/>).

1.1.2 Crecimiento

T. thermophila fue cultivada en erlenmeyers de 25 ml, 250 ml o 500 ml o en placas de 96 o 24 pocillos. El medio de cultivo utilizado fue el denominado PPYE (Peptona 10 g/L, Extracto de levadura 1 g/L, Glucosa 5 g/L, Citrato de hierro 30 mg/ml y Ajustado a pH = 7). Los inóculos se realizaron en diluciones 1:100 a partir de cultivos de entre 16 a 48 hs., según se indique. La temperatura de cultivo fue de 30 °C, y la agitación de 180 rpm, aunque en algunos casos los cultivos permanecieron sin agitación.

Los esteroides se agregaron al medio de cultivo desde una solución stock de concentración 5 mg/ml en etanol absoluto (Sintorgan). La concentración final utilizada fue 20 µg/ml. La solución stock se mantuvo a 60 °C, antes de ser agregada al medio.

1.1.3 Conservación

El stock de cepas se conservó a temperatura ambiente en tubos conteniendo 10 mL de agua destilada y un garbanzo [83], debidamente esterilizados. Las inoculaciones se hicieron en una relación 1:10 a partir de cultivos de 24 hs.

1.2 *Escherichia coli*

1.2.1 Cepas

Para la amplificación de los plásmidos y para el clonado se utilizó la cepa de *E. coli* TOP10 (Invitrogen).

1.2.2 Crecimiento

La cepa TOP10 fue cultivada en medio LB (Bacto-triptona 10 g/L, Extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, y Ajustado a pH = 7; para medio sólido: Agar 15 g/L)

1.2.3 Conservación

La conservación de todas las cepas *E. coli* utilizadas se realizó a partir de cultivos líquidos crecidos overnight en medio LB con agitación constante de 200 rpm a 37 °C. Se les agregó glicerol a una concentración final 15% v/v y las alícuotas fueron criopreservadas a -80 °C.

1.2.4 Preparación de ultracompetentes

Se siguió el protocolo de Sambrook y col. [84] con mínimas modificaciones. Las cepas de *E. coli* TOP10 se cultivaron en medio LB a 37 °C en Erlenmeyers de 250 ml, con agitación (250 rpm) durante 6 h. Este precultivo fue diluido en medio LB (dilución 1/50) y cultivado a 18 °C con agitación (200 rpm) durante 12- 15 h. Se monitoreó el cultivo midiendo la densidad óptica (DO) a 600 nm hasta que esta alcanzó una $DO_{600} \sim 0,55$. Se colocó el cultivo en un baño de hielo durante 10 min, luego se cosecharon las células por centrifugación a 4 °C a 2500 x g durante 15 min, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet dos veces con 16 ml de una solución de 250 mM de $CaCl_2$ en frío. Finalmente, las células se resuspendieron en 4 ml de solución buffer de transformación, se agregaron 300 μ l de DMSO y se incubaron en hielo durante 10 min. Las células preparadas se alicuotaron a volumen de 100 μ l en tubos *eppendorfs* estériles y se congelaron a -80 °C hasta su uso.

1.3 ***Saccharomyces cerevisiae***

1.3.1 **Cepas**

Se emplearon las siguientes cepas de levaduras: *S. cerevisiae* W303 (MATa/MATa {leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15} [phi+]) denominada salvaje y la cepa *S. cerevisiae* W303 isogénica mutante en *erg3* (MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112, trp1-1, ura3-1, can1, *erg3::TRP1 upc2::HIS3*) [85].

1.3.2 **Crecimiento**

Se hicieron cultivos aeróbicos (agitación a 200 rpm) en erlenmeyer o en tubo de cultivo, a 30°C tanto en medio YEPD conteniendo 2% glucosa (Merck), 1% extracto de levadura (Oxoid) y 2% peptona (Oxoid), o en medio mínimo compuesto de 0,67% de Base nitrogenada para levaduras (US Biological) y 2% de glucosa como fuente de carbono. En medio mínimo, la cepa salvaje fue cultivada con el agregado de His (20 mg/L), Leu (100 mg/L), Ade (10 mg/L), Met (20 mg/L), Trp (20mg/L) y Ura (20 mg/L). Análogamente, *erg3⁻* se cultivó en medio mínimo suplementado con: Ade (10 mg/L), Leu (100 mg/L), Met (20 mg/L) y Ura (20 mg/L). Tanto el medio YEPD como el medio mínimo pueden ser adicionados con Agar 15 g/L para placas de medio sólido.

Para el ensayo de sensibilidad a cicloheximida, al medio mínimo se adicionó cicloheximida en una concentración de 0,01 µg/ml, y se incubó durante 4 días a 28 °C.

1.3.3 **Conservación**

Todas las cepas utilizadas fueron criopreservadas a -80 °C a partir de cultivos líquidos crecidos durante la noche en medio YEPD o medio mínimo, con agitación constante de 200 rpm a 30 °C. A estos cultivos se les agregó glicerol a una concentración final de 10% v/v y se alícuotaron convenientemente para su preservación.

1.3.4 **Preparación de electrocompetentes**

La cepa *erg3* se cultivó durante 15 horas en 50 ml de YEPD. Luego se centrifugó a 1500rpm, se lavó el pellet 3 veces con 15 ml de agua fría, 2 veces con 10 ml de glicerol 10% frío, se resuspendió en 1 ml de glicerol 10% frío y se transfirió a un tubo

ependorf. Luego se alicuotó en tubos tipo *ependorf* de a 50 μ l y se conservaron a -80 °C.

1.4 ***Spodoptera frugiperda (Sf9)***

1.4.1 **Línea celular y crecimiento**

En todos los experimentos la línea celular *Sf9* (obtenida de Asociación Banco Argentino de Células, Pergamino, Buenos Aires, Argentina) fue cultivada en medio *Sf900 II* suplementado con 1% de suero fetal bovino (Internegocios S.A., Mercedes, Buenos Aires, Argentina), 1% de solución antibiótica-antimicótica (Invitrogen), a 27°C en forma de monocapa o en suspensión a 100rpm. Las células *Sf9* fueron cultivadas y luego diluidas a una concentración de 2×10^6 células/ml para los ensayos de infección.

1.5 **Recuento celular**

El recuento celular se realizó en microscopio óptico (10X) en hemocitómetro o Cámara de Neubauer, tanto para las células de *T. thermophila*, como para la línea celular *Sf9*. Las células *Sf9*, fueron distinguidas entre células viables (incoloras, refringentes) y no viables (azules) mediante el agregado del colorante de exclusión azul de tripán 0,4%, agregado en una relación 1:25 a una alícuota de la suspensión celular.

2. **Técnicas de biología molecular**

2.1 **Síntesis de genes**

Los genes DES7i (THERM_00310640) y DES5Alev (THERM_01194720) fueron sintetizados cambiando el código genético del gen original y optimizando la frecuencia de uso de codones para su expresión en células de insecto (DES7i) y en *S. cerevisiae* (DES5Alev) usando el algoritmo *OptimumGene*TM(GenScript). Al gen DES7i se adaptó una etiqueta de 6xHis en el extremo carboxi-terminal (DES7i-6xHis). Los genes DES7i y DES7i-6xHis se clonaron en los sitios Pst1 y BamH1 del vector de transferencia pVL1392 (BD bioscience). El gen DES5Alev fue clonado en el vector p425-GPD(LabLifeTM), un vector lanzadera de expresión en levaduras con el promotor (constitutivo) de la gliceraldehido-3-fosfato-dehidrogenasa (GAPDH), el marcador de selección de resistencia a ampicilina y el de auxotrofia a Leucina (LEU2) en *S. cerevisiae* [86].

2.2 Diseño de construcciones para localización subcelular

Tabla 1. Lista de cebadores

Cebador	Uso	Secuencia (5'--> 3')
Y.EGFPfw	Localización DES5Alev en <i>S. cerevisiae</i>	ATGCGTACGCTGCAGGTC
Y.EGFPrv	Localización DES5Alev en <i>S. cerevisiae</i>	CCGCTCGAGCAGGTTAACCTGGCTTATC
DES5Alevfw	Localización DES5Alev en <i>S. cerevisiae</i>	CCCAAGCTTATGGTTTATTGGTTGATTGCTGAAC
DES5Alevrv	Localización DES5Alev en <i>S. cerevisiae</i>	GACCTGCAGCGTACGCATCAATTCTTCAGAAGATTATCTGG
DES5A.c-termfw	Localización DES5Alev en <i>T. thermophila</i>	ATGCGCTAGCGGATCTAGATGGCTCCACACCTTCC
DES5A.c-termrv	Localización DES5Alev en <i>T. thermophila</i>	TAGAAACCATGGATCATTCTTTTTTGTTTAATTTATTTGTTTAGTTC
DES5A.dwfw	Localización DES5Alev en <i>T. thermophila</i>	ATTCGATATCAAGCTTTTATCAGTCTTTTTCATGGGAATA
DES5A.dwrv	Localización DES5Alev en <i>T. thermophila</i>	CGGTATCGATAAGCTCCTGACCCTGAAAATGATCC

Para la expresión en *S. cerevisiae*, la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) fue clonada en los sitios HindIII/XhoI del plásmido p426-GPD (similar al p425, solo que posee como marcador de selección en *S. cerevisiae* al gen URA3) obteniéndose el plásmido denominado pGFP, usado como control. Para el constructo DES5Alev-GFP, la EGFP fue fusionada al extremo C-terminal del gen DES5Alev mediante PCR por solapamiento, y clonada en los sitios HindIII/XhoI, obteniéndose el constructo pDES5Alev-GFP.

El plásmido pOM40 [87] contiene el gen EGFP optimizado para *S. cerevisiae* y fue cedido gentilmente por la Dra. Cecilia D'Alessio.

La PCR por solapamiento consistió en la amplificación por un lado del gen EGFP con los cebadores Y.EGFPfw y Y.EGFPrv, obteniéndose el gen con el agregado del sitio de corte XhoI en el extremo 3'. Por otro lado, se amplificó el gen DES5Alev con los cebadores DES5Alevfw y DES5Alevrv, obteniéndose el gen DES5Alev con el agregado de un sitio de corte para HindIII en el extremo 5'. El solapamiento se hizo en una reacción

incluyendo ambos productos, con los cebadores Afw y Brv, obteniéndose el gen fusionado DES5lev-GFP, con los sitios de corte HindIII y XhoI.

Para la localización de la enzima Des5Ap en *T. thermophila* un fragmento de 791 pares de bases del extremo C-terminal del gen DES5A (quitando el codón de terminación) y una zona flanqueante río abajo de 910 pares de bases, fueron amplificadas por PCR, clonadas en los sitios BamHI y HindIII respectivamente del pmEGFP, usando técnicas de clonado direccional In-Fusion (Clontech).

La amplificación del fragmento de 791 pb se realizó con los cebadores DES5A.c-termfwy DES5A.c-termrv. Para amplificar el fragmento de 910pb se emplearon los cebadores DES5A.dfwfwy DES5A.dwrv.

El plásmido pmEGFP [88] contiene una variante monomérica de GFP (A206K) junto a un gen de resistencia a neomicina/paromomicina bajo el control del promotor de metalotioenina (MTT), inducible por cadmio (casete neo 4) [89]. El constructo DES5A-GFP fue luego liberado del vector con las enzimas de restricción NheI y XhoI, para luego transformar células de *T. thermophila* por bombardeo biolístico, e integrarse al genoma macronuclear en el mismo locus del gen nativo, seleccionado por las secuencias flanqueantes (Figura 29A).

2.3 Análisis en geles de agarosa

Se realizaron geles de agarosa de concentraciones entre 1% y 2%. Los geles se corrieron en solución buffer TAE a 5-10 V/cm a temperatura ambiente. Con el fin de visualizar las bandas de ADN se utilizó bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml de gel. Para sembrar las muestras se utilizó una solución de buffer de siembra de concentración 10X. Los geles fueron visualizados en un transiluminador y fotografiados.

Los marcadores de peso molecular que se emplearon fueron: fago λ EcoRI/HindIII (utilizados para la cuantificación de productos a ligar) (Promega) y Mass ruler (Fermentas).

2.4 Extracción de ADN plasmídico de bacterias

Todos los plásmidos fueron amplificados en *E. coli* para posteriormente transformar o transfectar las células de trabajo. Cultivos de 5 ml de *E. coli* transformadas con el plásmido de interés fueron crecidas a 37 °C durante la noche a 200 rpm en medio LB con el antibiótico ampicilina (100 µg/ml). Los plásmidos se aislaron utilizando el kit comercial (Wizard® Plus SV Minipreps, Promega). En todos los casos, se siguieron las indicaciones del fabricante.

2.5 Extracción de ADN genómico total de *Tetrahymena*

Las células cultivadas en 25 mL de medio PPYE durante 24-48 hs, fueron cosechadas por centrifugación (5 min. a 3,000 RPM). El pellet celular se resuspendió en 3,5 mL de buffer urea (42 % urea; 0,35 M NaCl, 0,01 M Tris (pH 7,4); 0,01 M EDTA; 1% SDS) y esta suspensión se transfirió a un tubo cónico de 1,5 mL y se homogenizó por agitación. El lisado se extrajo dos veces con igual volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1). Luego, se adicionó 1 mL de una solución 5 M NaCl para reducir el contenido de carbohidratos en la precipitación final. El ADN se precipitó con igual volumen de alcohol isopropílico, se lavó con etanol 70%, se secó en un desecador al vacío y se resuspendió en 600 µl de agua estéril o buffer TE (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA). Se agregó 1 µl de ARNsa A (10 mg/mL, Promega) y se incubó a 55°C toda la noche o al menos 3 hs. [113]. Las muestras se conservaron a -20 °C.

2.6 Introducción de material genético

2.6.1 Transformación de *E.coli*

Suspensiones de *E. coli* competentes se descongelaron y se mantuvieron en hielo por 10 min. Por cada 50 µl de suspensión de bacterias se agregó 5 µl del producto de las diferentes reacciones de ligado o plásmidos cerrados, se mezcló suavemente y se incubó en hielo por 30 min. Posteriormente se realizó un shock térmico a 42 °C por 90 s y se dejó en hielo por 2 min adicionales. Luego, se agregó 1 ml de medio LB, se incubó 1 h a 37 °C con agitación suave, se recuperaron las células por centrifugación y se plaquearon en medio LB sólido conteniendo ampicilina a una concentración final de

100 µg/ml. Las placas se incubaron a 37 °C overnight. Las colonias se picaron con tips estériles y se aislaron en nuevas placas de LB/ampicilina.

2.6.2 Electroporación de *S. cerevisiae*

La transformación se realizó por electroporación en un equipo BTX, modelo ECM600. Los parámetros utilizados fueron los usuales para levaduras: 2,5 V, 25 µF y 250 Ω. Las células tratadas se plaquearon las células resultantes en los medios de cultivo correspondientes y se seleccionaron las transformantes.

2.6.3 Bombardeo biolístico de *T. thermophila*

Para incorporar material genético en el macronúcleo de *T. thermophila* se usó 1 a 2 µg de DNA lineal de cada una de las construcciones realizadas, y se procedió según la técnica descrita por Cassidy-Hanley *et al.* [90]. Brevemente, alrededor de 1×10^7 células en fase exponencial temprana, se centrifugaron y resuspendieron en buffer 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) a 30 °C con agitación durante 15 horas. Al cabo de este periodo se lavaron nuevamente y se resuspendieron en 1 ml del mismo buffer. Las células se esparcieron sobre un papel de filtro y se bombardearon con partículas de oro recubiertas con el DNA lineal, a 900 p.s.i. usando el sistema de bombardeo *biolistic PDS-1000/He particle delivery system* (Bio-Rad). Las células bombardeadas se resuspendieron en 50 ml de medio PPYE, se cultivaron a 30 °C durante 4 horas para su recuperación, y luego se transfirieron a placas *multiwell* de 96 pocillos, donde se adicionó 120 µg/ml paromomicina y 1.0 µg/ml CdCl₂ y se incubó a 30 °C durante 3 días para seleccionar transformantes. Los pocillos que revelaron crecimiento fueron transferidos diariamente a concentraciones crecientes de paromomicina para la segregación fenotípica. Las diluciones empleadas aseguraron la presencia de una célula por pocillo y los clones así obtenidos fueron expandidos por 2 semanas hasta alcanzar 40 mg/ml de paromomicina.

2.6.4 Infección Baculovirus

2.6.4.1 Obtención de baculovirus recombinantes

Se obtuvieron baculovirus recombinantes por cotransfección con los plásmidos de transferencia pertinentes y el genoma viral linealizado BaculoGold Bright™

(*AcMNPV*) por el método de transfección con lípidos catiónicos (*Cellfectin*[®] de Invitrogen). Brevemente, se mezcló 1 µg de ADN de *BaculoGold Bright*TM con 5 µg de ADN plasmídico en 1 ml de medio *Sf900 II SFM* conteniendo 10 µl de *Cellfectin*, en un tubo de 1,5 ml. La mezcla se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y se agregó sobre un cultivo de células *Sf9* crecidas en forma de monocapa en placas de seis pocillos a una densidad de 1×10^6 células/pocillo. Las placas se incubaron durante 4 h a 27 °C, se removió el medio de transfección y se agregaron 3 ml de medio *SF900 II SFM* suplementado con 1 % de SFB. Tras 4 días de incubación a 27 °C se colectaron los sobrenadantes en forma estéril y se clarificaron por centrifugación a 1000 x g a 4 °C. La formación de partículas virales infectivas se evidenció por la presencia de fluorescencia en las células.

El genoma de *BaculoGold Bright*TM contiene el gen de la proteína fluorescente verde (GFP) bajo un promotor viral. Este gen permite evidenciar la correcta circularización y restauración de la capacidad infectiva y replicativa del virus recombinante. Se obtuvieron baculovirus DES7i (portador del gen DES7 optimizado para su expresión en células de insecto) y un baculovirus DES7i-6xHis (igual al anterior más una etiqueta de 6 histidinas). Además, para el denominado baculovirus control se clonó un gen codificante para un péptido corto, no relacionado con la actividad C-7 esterol desaturasa.

Se evaluó la correcta recombinación de las secuencias con el genoma del baculovirus mediante la extracción del ADN viral (Viral Nucleic Acid Extraction Kit, Real genomics) y posterior PCR con cebadores flanqueantes a la secuencia (Forward: 5' TCCGATTATTCATACCGTCCCACCATC 3' y Reverse: 5' GCTTCATCGTGTCGGGTTAACATTACGG 3').

2.6.4.2 Amplificación de baculovirus recombinantes

Para aumentar el título viral se realizaron las amplificaciones en células *Sf9*. Brevemente, se infectaron células crecidas en botellas de 75 cm² con 2×10^7 células en forma de monocapa con 7 ml de medio de cultivo *SF900 II SFM* suplementado con 1% de SFB. Se trabajó con una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01. Luego de 4 días (dpi), los sobrenadantes de infección se colectaron de forma estéril, se clarificaron por

centrifugación a 1000g a 4 °C y se mantuvieron refrigerados (4 °C) protegidos de la luz, constituyendo los stocks virales de trabajo.

2.6.4.3 Determinación del título viral: método dilución a punto final

Los baculovirus recombinantes, fueron titulados por el método de dilución a punto final. Para ello se realizaron diluciones 1/10 de los stocks virales. Se mezcló 300 µl de cada dilución (1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} y 1×10^{-8}) con 2,7 ml de una suspensión de células *Sf9* con una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/ml. Luego, 200 µl de cada una de estas 5 suspensiones (virus+ células) fueron sembradas en 12 pocillos (una fila) de una placa de 96 pocillos. También se sembró una fila de células sin virus como control negativo de infección. La placa se incubó durante 7 días en cámara húmeda a 27 °C y se contaron los pocillos infectados tomando como evento positivo la visualización de células fluorescentes (expresión de GFP durante la replicación viral) utilizando microscopia de fluorescencia. El título viral se calculó según lo descrito por Reed y Muench [91]. Asumiendo una distribución de Poisson, se puede convertir las Dosis Infeccivas 50/ml calculadas a Unidades Formadoras de Placa/ml (UFP/ml) multiplicando por 0,69 [91].

2.6.4.4 Infección de células *Sf9*

La infección se realizó con cultivos de 25 ml en un medio igual al de crecimiento con el agregado de 0,5 µg/ml cloruro de hemina, 100µM de Acido δ-amino-levulínico y 100µM de citrato férrico. Se infectaron con los baculovirus con una MOI de 2. A los 3 días post infección (3dpi) se cosecharon y luego se resuspendieron a la mitad del volumen en el medio de crecimiento, con el agregado de colesterol (80µg/ml) vehiculizado en metil-β-ciclodextrina (MβCD-colesterol) o MβCD-³[H] colesterol (80 µg/ml y 4 µCi/ml) preparadas según Christian et al. [92]. Las células fueron incubadas 22hs en el primer caso o 5hs en el caso de las incubadas con colesterol radiactivo.

2.7 Extracción de ARN de *T. thermophila*

Se cultivaron las células hasta fase exponencial ($1-3 \cdot 10^5$ células/ml). En esa instancia se diluyó el cultivo al tercio con medio fresco y se agregó según corresponde 20 µg/ml colesterol (preparado en etanol), 20 µg/ml estigmasterol (preparado en

etanol) o etanol (control). Luego de 5 horas de cultivo, habiendo alcanzado la concentración correspondiente a la fase exponencial se extrajo el ARN de las células empleando el kit *RNeasy Mini (Qiagen)*. Se separaron 2 alícuotas, una para cuantificar mediante espectrofotometría a 230nm, 260nm y 280nm y evaluar además la pureza de la muestra, y la otra alícuota se utilizó para realizar una electroforesis en gel de agarosa para evaluar la integridad del ARN. Se obtuvieron 3 replicas de cada condición ensayada.

2.8 **Secuenciación del transcriptoma de *T. thermophila***

El análisis de las muestras se realizó en el Instituto de Agrobiotecnología Rosario (INDEAR) donde se completaron las etapas de purificación del mRNA (hibridación con oligo-dT), fragmentación química del ARN, síntesis de cDNA doble hebra, reparación y adenilación de los extremos, ligación de adaptadores y enriquecimiento (amplificación) de los fragmentos de la biblioteca de acuerdo al protocolo descrito en *TruSeq® RNA Sample Preparation Guide Illumina* (Julio 2012).

Se realizó una corrida de secuenciación rápida (2 lanes) generando lecturas tipo *single reads* 1x100bp en el equipo Hiseq 1500 – Illumina. El procesamiento de los resultados estuvo a cargo del INDEAR.

3. Análisis de secuencias y filogenia

3.1 **Análisis filogenético de HMG-CoA reductasas**

El árbol de 66 secuencias aminoácidas (UniProtKb, Abril 2013) fue creado con el método de máxima similitud (bootstrap 100) empleando el programa PhyML [42]. El modelo LG de sustitución de aminoácidos [93] fue usado para analizar la evolución de las secuencias, y se calculó con el programa *Protest model evolution* [94]. Los parámetros de proporción de sitios invariantes y a través de variación de sitios (gamma) fueron estimados y empleados en este análisis. Solo las partes de las secuencias que emparejaban con PF00368 HMG-CoA_red PFam [95] se alinearon previamente con el programa Clustal X 2.1 [96].

Las secuencias empleadas para el análisis fueron: P16237 *Schistosoma mansoni*; Q9Y0F3 *Leishmania major*; Q4D4C9 *Trypanosoma cruzi*; P43256 *Arabidopsis thaliana*;

Q9FS01 *Solanum tuberosum*; O04188 *Oryza sativa*; P34135 *Dictyostelium discoideum*; Q59VR2 *Candida albicans*; Q0ZJU5 *Tuber borchii*; Q4WHZ1 *Neosartorya fumigata*; Q2TYB8 *Aspergillus oryzae*; Q55RI4 *Cryptococcus neoformans*; A4KXN8 *Phaedon cochleariae*; Q58ER2 *Danio rerio*; Q7YT63 *Homarus americanus*; A5A799 *Bombyx mori*; Q16W73 *Aedes aegypti*; Q8ZVP7 *Pyrobaculum aerophilum*; A4YHA2 *Metallosphaera sedula*; Q4J936 *Sulfolobus acidocaldarius*; Q9YAS4 *Aeropyrum pernix*; A2BMZ2 *Hyperthermus butylicus*; Q9V1R3 *Pyrococcus abyssi*; Q8TYE5 *Methanopyrus kandleri*; Q0W5I4 *methanogenic archaeon*; A7I4K0 *Methanoregula boonei*; B9LQH6 *Halorubrum lacusprofundi*; Q18FE3 *Haloquadratum walsbyi*; A5UJQ4 *Methanobrevibacter smithii*; Q041Y7 *Lactobacillus gasserii*; A0NKU9 *Oenococcus oeni*; Q9FD65 *Enterococcus faecium*; Q02Y11 *Lactococcus lactis*; XP001438919 *Paramecium tetraurelia*; A6G140 *Plesiocystis pacifica*; Q8ETN4 *Oceanobacillus iheyensis*; A9B538 *Herpetosiphon aurantiacus*; B9LHI1 *Chloroflexus aurantiacus*; A7NHZ6 *Roseiflexus castenholzii*; A3U2Z8 *Oceanicola batsensis*; A9BQX8 *Delftia acidovorans*; A5W4Z1 *Pseudomonas putida*; Q6KZX4 *Picrophilus torridus*; Q979G8 *Thermoplasma volcanium*; Q28538 *Archaeoglobus fulgidus*; A0B7Q0 *Methanosaeta thermophila*; Q0W723 *methanogenic archaeon*; A1RYP8 *Thermofilum pendens*; A3DKY1 *Staphylothermus marinus*; Q15YT1 *Pseudoalteromonas atlantica*; E0TCL1 *Parvularcula bermudensis*; A6GTH7 *Limnobacter* sp; A4ACCO *Congregibacter litoralis*; Q3IUA6 *Natronomonas pharaonis*; Q2RZW0 *Salinibacter ruber*; Q820X7 *Coxiella burnetii*; Q7MZ04 *Photothabdus luminescens*; A1ZZS8 *Microscilla marina*; A3SIQ2 *Roseovarius nubinhibens*; Q1ZTF1 *Photobacterium angustum*; Q5DZ85 *Vibrio fischeri*; A5KZB5 *Vibrionales bacterium*; XP001032083 *Tetrahymena thermophila*; EJY66728.1 *Oxytricha trifallax*; EGR27763 *Ichthyophthirius multifiliis*; P04035 *Homo sapiens*.

3.2 Análisis filogenético de escualeno sintasas

El árbol de 51 secuencias de aminoácidos (UniProtKb, Abril 2013) fue creado de igual forma que el anterior (3.1)

Las secuencias empleadas para el análisis fueron D4GW93 *Haloferax volcanii*; E4NPJ6 *Halogeometricum borinquense*; Q18HR1 *Haloquadratum walsbyi*; Q5V250 *Haloarcula marismortui*; G2LL55 *Chloracidobacterium thermophilum*; P65861 *Mycobacterium tuberculosis*; P54977 *Streptomyces griseus*; D6AFF4 *Streptomyces*

roseosporus; D6EF52 *Streptomyces lividans*; O07333 *Spirulina platensis*; I2HDT9 *Neisseria meningitidis*; A6CON2 *Planctomyces maris*; P54905 *Rhodobacter sphaeroides*; D2V2H6 *Naegleria gruberi*; Q1KNJ1 *Aurantiochytrium limacinum*; K4E6C0 *Trypanosoma cruzi*; Q25308 *Leishmania major*; P37268 *Homo sapiens*; P53798 *Mus musculus*; Q32KR6 *Bos taurus*; Q23F99 *Tetrahymena thermophila*; P29704 *Saccharomyces cerevisiae*; Q7S4Z6 *Neurospora crassa*; P78589 *Candida albicans*; A4F3N8 *Glycyrrhiza uralensis*; A2AWV9 *Panax quinquefolius*; P53800 *Nicotiana benthamiana*; B2IWJ5 *Nostoc punctiforme*; G6FPH8 *Fischerella sp*; B7KDM4 *Cyanothece sp*; I4FXZ7 *Microcystis aeruginosa*; Q4COL2 *Crocospaera watsonii*; B1YLK1 *Exiguobacterium sibiricum*; P36596 *Schizosaccharomyces pombe*; H2DDL9 *Inonotus obliquus*; Q752X9 *Ashbya gossypii*; K0KPZ7 *Wickerhamomyces ciferrii*; F2TTI0 *Ajellomyces dermatitidis*; E4V3E7 *Arthroderma gypseum*; G2MKU6 Halophilic archaeon; D2RZE1 *Haloterrigena turkmenica*; I7CM37 *Natrinema sp*; G4GE87 *Natrinema pellirubrum*; Q54DR1 *Dictyostelium discoideum*; EIA 09086 *Tetrahymena malaccensis*; EI7 01631 *Tetrahymena ellioti*; EI9 00055 *Tetrahymena borealis*; F9DN25 *Sporosarcina newyorkensis*; D5E379 *Bacillus megaterium*; I4X3Y2 *Planococcus antarcticus*; Q8ESZ6 *Oceanobacillus iheyensis*;

3.3 Análisis filogenético de escualeno-hopano ciclasas

El árbol de 46 secuencias de aminoácidos (UniProtKb, Abril 2013) fue creado de igual forma que el anterior (3.1)

Las secuencias empleadas para el análisis fueron: B4WIK8 *Synechococcus sp*; C6HUP1 *Leptospirillum ferrodiazotrophum*; F3YVF7 *Desulfovibrio africanus*; P33990 *Zymomonas mobilis*; G8MDB7 *Burkholderia sp*; O69790 *Rhodopseudomonas palustris*; P54924 *Bradyrhizobium japonicum*; D8PBL8 *Nitrospira defluvii*; Q029U6 *Solibacter usitatus*; B9XSG0 *Pedosphaera parvula*; B4DCK3 *Chthoniobacter flavus*; I3ZG94 *Terriglobus roseus*; C1F699 *Acidobacterium capsulatum*; A3ZNQ7 *Blastopirellula marina*; D2QYV8 *Pirellula staleyii*; H6CKD8 *Paenibacillus sp*; J2I1W3 *Brevibacillus sp*; H0FMX5 *Bacillus amyloliquefaciens*; I4F8G3 *Microcystis aeruginosa*; Q59080 *Alicyclobacillus acidoterrestris*; Q05HJ8 *Frankia alni*; A0E2A8 *Paramecium tetraurelia*; Q24FB1 *Tetrahymena thermophila*; B8BV49 *Thalassiosira pseudonana*; D8LFF9 *Ectocarpus siliculosus*; Q2XPU6 *Ricinus communis*; P38605 *Arabidopsis thaliana*;

Q6Z2X6 *Oryza sativa*; Q9SLP9 *Luffa cylindrica*; Q8W3Z4 *Betula platyphylla*; Q55D85 *Dictyostelium discoideum*; D3BC24 *Polysphondylium pallidum*; P48449 *Homo sapiens*; P84466 *Bos taurus*; P48450 *Rattus norvegicus*; Q4QJ13 *Leishmania major*; Q57ZG6 *Trypanosoma brucei*; Q8BLN5 *Mus musculus*; E6ZUR0 *Sporisorium reilianum*; P38604 *Saccharomyces cerevisiae*; Q04782 *Candida albicans*; Q10231 *Schizosaccharomyces pombe*; C1H0A2 *Paracoccidioides brasiliensis*; D4ARN4 *Arthroderma benhamiae*; G7XMZ4 *Aspergillus kawachii*; FOXL15 *Grosmannia clavigera*.

3.4 Búsqueda de ortólogos del metabolismo del tetrahymanol

La búsqueda se realizó en las bases de datos de los genomas completos de *Tetrahymena thermophila* (<http://ciliate.org>), *Paramecium tetraurelia* (<http://paramecium.cgm.cnrs-gif.fr/>), *Ichthyophthirius multifiliis* (<http://ich.ciliate.org>) y *Oxytricha trifallax* (<http://oxy.ciliate.org>).

3.5 Búsqueda de ortólogos del metabolismo de esteroides

La búsqueda se realizó en las mismas bases de datos de los genomas completos de *T. thermophila*, *P. tetraurelia*, *I. multifiliis* y *O. trifallax*. Además se analizaron en la plataforma NCBI, 7689 EST de *Anophryoides haemophila*, 1487 EST de la familia Vestibuliferida, 3009 EST de la familia Entodiniomorpha, 5484 EST y 4240 GSS de *Nyctotherus ovalis*, 53806 contigs de *Styloichia lemnae* y 1820 EST de *Euplotes crassus*.

3.6 Análisis de presión selectiva (Ka/Ks)

Para este análisis se emplearon las secuencias obtenidas de las bases de datos de los genomas de *T. thermophila* y *T. malaccensis* (<http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/Tetrahymena/MultiHome.html>). A partir de las secuencias de *DES5A*, el *DES7*, *DES24*, C-4 metil oxidasa (THERM_00876970) y el gen THERM_00394500 (relacionado con una C-14 esteroil reductasa) se buscaron los ortólogos en *T. malaccensis* y se alinearon en el programa MEGA 5.2 [97] mediante ClustalW. A partir de esos alineamientos se realizó el análisis filogenético también en MEGA, obteniéndose los valores de Ka y Ks correspondientes.

3.7 Análisis filogenético de citocromos b_5 de *T. thermophila*

En base a información previa existente se identificaron varios genes putativos de citocromos b_5 en *T. thermophila* (Pfam: PF00173) correspondientes a 13 secuencias, 6 de las cuales están constituidas por 109 a 227 aminoácidos e incluyen un dominio hidrofóbico que indicaría su localización en transmembrana. Estas secuencias son probables homólogos a citocromos b_5 de localización citoplasmática o mitocondrial presentes en otros organismos. Las 7 secuencias restantes en cambio presentan el dominio típico pero tienen mayor tamaño, y poseen además otros dominios, como dopamina beta-monooxigenasa (DOMON), dominio de unión a catecolamina (DOH) y desaturasa de ácidos grasos, por lo cual no corresponderían a citocromos b_5 libres. Para los alineamientos se buscaron citocromos b_5 libres de otros organismos eucariotas (Febrero 2012, Uniprot) incluyendo: P00167 *Homo sapiens*; P56395 *Mus musculus*; P00171 *Bos Taurus*; P00170 *Equus caballus*; Q9V4N3 *Drosophila melanogaster*; P49096 *Musca domestica*; A8PS03 *Brugia malayi*; XP_001660580.1 *Aedes aegypti*; XP_001867082.1 *Culex quinquefasciatus*; P40312 *Saccharomyces cerevisiae*; F2QZE5 *Pichia pastoris*; Q9P5L0 *Neurospora crassa*; Q874I5 *Candida tropicalis*; B6Q8V6 *Penicillium marneffeii*; EED23361.1 *Talaromyces stipitatus*; NP_587997.1 *Schizosaccharomyces pombe*; Q9ZWT2 *Arabidopsis thaliana*; NP_173958.1 *Arabidopsis thaliana*; NP_180831.1 *Arabidopsis thaliana*; NP_200168.1 *Arabidopsis thaliana*; P49098 *Nicotiana tabacum*; O04354 *Borago officinalis*; P49100 *Oryza sativa*; Q57XJ7 *Trypanosoma brucei*; D2VUW9 *Naegleria gruberi*; Q86L22 *Dictyostelium discoideum*; D3B7X6 *Polysphondylium pallidum*; D0N9F0 *Phytophthora infestans*; Q234R4 *Tetrahymena thermophila*; Q233Z4 *Tetrahymena thermophila*; Q23D01 *Tetrahymena thermophila*; Q240P3 *Tetrahymena thermophila*; XP_001017614.1 *Tetrahymena thermophila*; XP_001033276.1 *Tetrahymena thermophila*; F0W037 *Albugo laibachii*; AAT84458.1 *Vernicia fordii*; AAO86521.1 *Triticum monococcum*; AAO17707.1 *Sorghum bicolor*; ACG41888.1 *Zea mays*; Q9HFV1.1 *Rhizopus stolonifer*; XP_001523711.1 *Lodderomyces elongisporus*; P21147 *Saccharomyces cerevisiae*. P13516 *Mus musculus* es una Acil-CoA desaturasa que contiene también un dominio de citocromo b_5 , y se empleó como *outgroup*.

3.8 Análisis del transcriptoma

La calidad de las lecturas, es decir los datos crudos, se analizó con el programa FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Básicamente el análisis consistió en realizar un ensamblado *de novo*, para lo cual se utilizó el programa Trinity (<http://trinityrnaseq.github.io/>), empleando las lecturas de todas las muestras para construir el transcriptoma de referencia. El mapeo y la cuantificación de abundancias de los transcritos se realizaron con los programas Bowtie2 y express, respectivamente. A partir de estos resultados, se realizó el análisis de la expresión diferencial empleando el programa estadístico Deseq2. Se decidió considerar como genes diferencialmente expresados a aquellos cuya comparación entre el control y el incubado con alguno de los esteroides mostrara un valor de p ajustado $< 0,05$ (proveniente del análisis estadístico con el programa Deseq2). Luego se realizó un alineamiento BLAST de los transcritos contra el genoma de *T. thermophila*.

4. Técnicas de microscopía

4.1 Preparación de muestras para microscopia de fluorescencia

4.1.1 Localización subcelular de DES5A en *T. thermophila*

Las células de *Tetrahymena* expresando DES5A-GFP fueron fijadas con 4.2% paraformaldehído en buffer HEPES 50 mM pH 7.0 durante 10 min a temperatura ambiente y luego permeabilizadas con Triton X-100 0,1% en buffer HEPES 50 mM pH 7.0, en baño de hielo. Se hicieron 3 lavados con el mismo buffer HEPES frío. Luego se trataron con solución de bloqueo (1% seroalbúmina bovina en buffer TBS) durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego incubadas durante 30 minutos en solución de bloqueo con el anticuerpo primario anti-GFP (A-11122; Invitrogen) en una dilución 1:400. Las células se lavaron 3 veces, 5 minutos cada vez, con buffer TBS con 0,1% de seroalbúmina bovina y luego incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario de burro, anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 488 (A21206; Invitrogen) en una dilución 1:200 en solución de bloqueo. Luego de un lavado con buffer TBS 0,1% seroalbúmina bovina y 2 lavados con buffer HEPES, las

células fueron montadas con solución anti blanqueo Trolox. Las imágenes digitales se obtuvieron con un microscopio de fluorescencia Carl Zeiss Axio imager M2.

4.1.2 Localización subcelular de DES5Alev en *S. cerevisiae*

Para localizar la Des5Ap-eGFP en levaduras, las células se cosecharon durante 5 minutos a 600g y se resuspendieron en 3 ml de paraformaldehído 4% preparado recientemente. Luego de incubar 20 minutos a temperatura ambiente, la suspensión se centrifugo 5 minutos a 350g y las células se lavaron 3 veces con 2 ml de buffer de fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,4 (KPB). Se resuspendieron las células en 2 ml de KPB suplementado con 1,2 M de sorbitol y se incubó a 4°C durante la noche. Luego se cosecharon las células 5 minutos a 600g, se resuspendieron en Triton X-100 0,1% en PBS y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados con 1 ml de PBS, las células se incubaron 10 minutos con colorante Hoechst 33258 5uM preparado en PBS con 3% de seroalbúmina bovina. Las células se lavaron 3 veces con PBS y se resuspendieron en medio de montaje fluorescente DakoCytomation (Dako). Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal Olympus Fv300 (modelo BX61) con el sistema de adquisición de imágenes FluoView 3.3.

5. Técnicas analíticas

5.1 Extracción de esteroides

5.1.1 Células *Sf9*

Se extrajeron los esteroides de muestras correspondientes a pellets de cultivos de células *Sf9* infectadas con los distintos baculovirus. Para ello se centrifugaron los cultivos (25 ml) a 5000 rpm, durante 10 minutos a 4 °C, y se resuspendió el pellet en 1,5 ml de agua destilada. En este paso y cuando fue necesario para la cuantificación, se agregó estigmasterol a una concentración final de 20 µg/ml como estándar interno. Se agregó luego 1,5 ml de solución de saponificación (NaOH 2M en Metanol:Agua, 1:1) y se incubó durante una hora a 80 °C. Los esteroides fueron extraídos siguiendo el método de Bligh and Dyer [98] y el residuo cloroformico fue secado en una corriente de nitrógeno gaseoso. El extracto se conservó a -20 °C.

5.1.2 *S. cerevisiae*

Se partió de un cultivo de 30 ml en fase estacionaria (48 h), se cosechó por centrifugación a 1500 rpm, y se resuspendió en 1,5ml de agua destilada. Luego se continuó como se indicó para la extracción de esteroides de células *Sf9*.

6. Técnicas cromatográficas

6.1 Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

Los extractos se resuspendieron en 200 µl etanol se analizaron por HPLC empleando una columna C18 Ultrasphere, con fase móvil Metanol:Agua (97:3). El flujo se reguló en 1 ml/min, y el detector espectrofotométrico se configuró a 210nm y a 285 nm. Cuando fue necesario, se detuvo la corrida en el pico correspondiente para realizar un barrido espectral.

Para el análisis de la biotransformación de colesterol radiactivo, el HPLC se acopló a un detector a *Flo-one Beta Radio 105*, siguiendo las instrucciones del fabricante (Radiomatic, Canberra Company).

6.2 Cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masa (CG-MS)

Los extractos fueron resuspendidos en 100 ml de N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA), y luego incubado 30 minutos a 70°C. La composición de derivados trimetilsililados fue analizada en una cromatógrafo gaseoso Hewlett Packard HP 6890, con una columna HP-5MS (30 m _ 0.25 mm _ 0.25 lm, Agilent Technologies) acoplado a un detector masa (modelo MSD 5973). La temperatura de la columna fue programada en una rampa de 100°C a 310°C con un ascenso de 10°C por minuto y luego se mantuvo 10 minutos a 310°C. El cromatógrafo gaseoso fue programado con un voltaje de ionización de 70 eV con un rango de escaneo de 50-600 amu. El tiempo de retención y el espectro de masas de los picos obtenidos fueron comparados con estándares (Steraloids, USA) y con los disponibles en la base de datos *NIST library*. El contenido de cada esteroide se expresó como porcentaje de esteroide en cada muestra respecto del total de esteroides presentes (% m/m del total de esteroides).

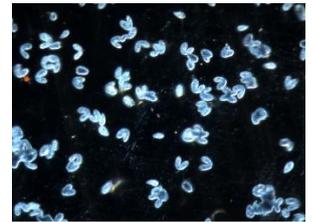
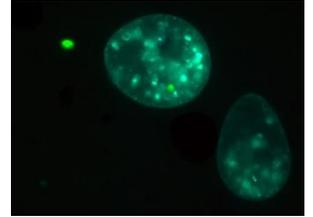
7. Electroforesis de proteínas

7.1 Preparación de microsomas y homogenatos

Para la obtención de homogenatos y fracciones microsomales las células fueron centrifugadas a 2500g y el pellet lavado 2 veces con buffer de resuspensión (buffer fosfatos 0,1M; EDTA 1mM; glicerol 20%) y resuspendido en el mismo buffer con agregado de inhibidores de proteasas (PMSF 50uM; Leupeptina 50uM; AEBSF 0,5mM). Los homogenatos se obtuvieron homogenizando las células por sonicación en 3 ciclos de 10 segundos a 30W. Para obtener fracciones microsomales, los homogenatos luego se centrifugaron a 9000g, 30 minutos a 4°C. Finalmente el sobrenadante de esta centrifugación se volvió a centrifugar a 100000g durante 70 minutos a 4°C. El pellet, o fracción microsomal, se resuspendió en el mismo buffer de resuspensión.

7.2 *Western blot*

Para la detección por *Western Blot* de las proteínas expresadas se corrieron las muestras en un gel de poliacrilamida 10%. Se sembraron aproximadamente 50ug de proteínas de la fracción microsomal y del homogenato, correspondientes a células infectadas DES7i como las DES7i-6xHis. Dado que la detección se planteó mediante el uso de un anticuerpo anti etiqueta de histidinas, el homogenato y los microsomas provenientes de las células DES7i sirvieron como control. El gel fue transferido a una membrana de PVDF (Hybond, Amersham) e incubado con el anticuerpo primario anti-6xHIS (BD Biosciences Pharmingen) en una dilución 1:5000 en buffer TBS suplementado con 2,5% de leche en polvo y luego tratado con un anticuerpo secundario anti-ratón peroxidasa (Sigma). El revelado se hizo con *Pierce ECL western blotting* (Thermo) siguiendo las instrucciones del fabricante.



Resultados



Capítulo 1

Análisis de la vía metabólica de
triterpenoides cíclicos en ciliados

1. Introducción

Siguiendo la hipótesis actual sobre la presencia de la vía metabólica de esteroides en el último ancestro común eucariota y la evolución de la vía [11], resulta interesante conocer el origen de las enzimas presentes en los ciliados, dado que presentan la curiosidad de no sintetizar esteroides y eventualmente ser auxótrofos pero poseer la capacidad de introducir modificaciones en ellos. Incluso como en el caso de *Tetrahymena*, no requerirlos para su ciclo vital, sintetizar tetrahymanol como análogo funcional y a la vez utilizarlos preferentemente por sobre el tetrahymanol y poder modificarlos.

La peculiar relación de los protozoos con el metabolismo de los esteroides ha sido investigada en numerosos organismos. Así por ejemplo en *Trypanosoma cruzi* (un miembro del filo euglenozoa, perteneciente al reino Excavata) se analizó la vía de síntesis de ergosterol sobre la base de evidencia experimental (limitada) y homología con genes de otros organismos (*S. cerevisiae*) [99]. De esta forma se reconstruyó la vía de síntesis, aunque aún queda un gen putativo *ERG27* que no ha sido identificado.

En el coanoflagelado opistoconto *Monosiga brevicolis* [100] también se empleó la estrategia de reconstrucción bioinformática de la vía metabólica de esteroides, apoyada en los perfiles de esteroides obtenidos de las células en cultivo y la información presente en las bases de datos de otros organismos.

El análisis de los genomas es una herramienta muy potente a la hora de la investigación de vías metabólicas, sobre todo cuando puede complementarse con evidencias experimentales. Más aún, los estudios de expresión génica (transcriptoma), permiten poner en evidencia características centrales respecto a la regulación de los genes involucrados en las vías metabólicas. Nuevamente, contar además del transcriptoma con evidencia experimental, expande las posibilidades de la investigación.

Como se mencionó previamente, el modelo eucariota *Tetrahymena* cuenta con la disponibilidad del genoma completo y además la secuenciación del transcriptoma de *T. thermophila* [50]. En este caso, basándonos en la evidencia experimental obtenida por Beedle *et al.* [101] sobre la regulación por esteroides de la síntesis de tetrahymanol, el análisis transcriptómico permite analizar la hipótesis que plantean Beedle *et al.*

(desarrollada hacia el final del capítulo) sobre la regulación basada en el cambio estructural que ocasionan los esteroides en la membrana plasmática.

2. Objetivos específicos

- Identificar genes involucrados en el metabolismo del tetrahymanol y de diversos esteroides en especies del filo ciliophora.
- Estudiar los posibles orígenes de los genes implicados en este metabolismo desde un punto de vista evolutivo.
- Investigar la expresión génica de las enzimas, así como posibles funciones de las enzimas codificadas y su posible regulación.

3. Resultados y discusión

3.1 Biosíntesis de tetrahymanol

Se realizó una búsqueda de las enzimas de la vía metabólica de síntesis de tetrahymanol en los genomas completos de ciliados disponibles (Abril de 2013) incluyendo: *Tetrahymena thermophila*, *Paramecium tetraurelia* e *Ichthyophthirius multifiliis* de la clase oligohymenophorea y *Oxytricha trifallax* de la clase Spirotrichea (Figura 4). Los resultados del análisis muestran los genes presentes en cada uno de los genomas analizados (Tabla 2). Según se observa, *T. thermophila* posee ortólogos de todos los genes necesarios para la biosíntesis de tetrahymanol, lo cual es consistente con los estudios metabólicos, mientras que *P. tetraurelia* carece de la escualeno sintasa, *O. trifallax* carece en adición a la anterior, de la escualeno-hopano ciclasa, mientras que *I. multifiliis* carece de todas ellas y de la fosfomevalonato quinasa y la isopentenil-PP isomerasa.

Tabla 2. Ortólogos de la biosíntesis de tetrahymanol en los ciliados. La presencia de ortólogos eucariotas y bacterianos se indica en celeste y azul respectivamente. En blanco se indica la ausencia de ortólogos en los genomas analizados.

Clase	Oligohymenophorea		Spirotrichea	
	Subclase	Hymenostomatia	Peniculia	Stichotrichia
Género	<i>Tetrahymena</i>	<i>Ichthyophthirius</i>	<i>Paramecium</i>	<i>Oxytricha</i>
Especie	<i>thermophila</i>	<i>multifiliis</i>	<i>tetraurelia</i>	<i>trifallax</i>
Acetil-CoA C-acetiltransferasa				
Hmg-CoA sintasa				
Hmg-CoA reductasa				
Mevalonato quinasa				
Fosfomevalonato quinasa				
Difosfomevalonato decarboxilasa				
Isopentenil-PP isomerasa				
Farnesil-PP sintasa				
Escualeno and fitoeno sintasa				
Escualeno-hopano ciclasa				

Por otro lado, también a la fecha del análisis se encontraban disponibles los genomas completos de 3 especies más del género *Tetrahymena*: *T. malaccensis*, *T. ellioti* y *T. borealis*. Se ha reportado que distintas especies del género *Tetrahymena*

sintetizan tetrahymanol, *T. corlissi*, *T. paravorax* [54,102,103], lo cual es consistente con los resultados obtenidos del análisis de los genes que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis de este hopanoide.

En el caso de *Paramecium tetraurelia*, este organismo posee un ortólogo de la escualeno-tetrahymanol ciclasa (STC), pero no de la escualeno sintasa, por lo cual es incapaz de producir los precursores de los hopanoides o tetrahymanol [104], del mismo modo que los otros organismos analizados (*O. trifallax* e *I. multifiliis*).

Un estudio filogenético reciente sobre las enzimas triterpeno ciclasas (disponibles en la base de datos de nucleótidos *nr* de NCBI) arribó a la conclusión de que las STC agrupan junto a las escualeno-hopano ciclasas (SHC) bacterianas, en especial con las de los géneros *Stigmatella*, *Methylococcus* y *Gemmata*. En el análisis se incluyeron diferentes SHC, STC y oxidoescualeno ciclasas (OSC) eucariotas [105]. Por otro lado, otro estudio sobre las STC obtuvo resultados similares, sugiriendo que forman un grupo monofilético con las SHC bacterianas [60].

Para profundizar sobre esta posible similitud entre las secuencias bacterianas y las de *Tetrahymena*, se analizaron también otras enzimas del metabolismo de esteroides de *T. thermophila* en un estudio filogenético. Se buscaron ortólogos de cada secuencia aminoacídica en la base de datos *OrthoMCL* (*OrthoMCL-DB Version 5*, [106]), si existen ortólogos tanto en eucariotas como en procariotas, se hizo un alineamiento local BLAST para analizar si la enzima de *Tetrahymena* presenta mayor similitud con las eucariotas o con las bacterianas. Finalmente, con las enzimas que presentaron mayor similitud con las procariotas, se generó un árbol filogenético incluyendo la secuencia de *Tetrahymena*, secuencias bacterianas, secuencias de archeas y secuencias eucariotas.

De esta forma, además de la escualeno-tetrahymanol ciclasa, otras 2 enzimas agruparon juntos a las homólogas bacterianas: hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa) y la escualeno sintasa. Cabe destacar que se realizaron BLAST empleando las HMG—CoA reductasas encontradas en todos en los ciliados analizados, mientras que la escualeno sintasa solo está presente en *Tetrahymena*.

A partir de 66 secuencias aminoacídicas correspondientes a HMG-CoA reductasas de distintos reinos se generó un árbol filogenético con los métodos de máxima verosimilitud y *neighbour joining* (obteniéndose el mismo resultado con

ambos métodos) (Figura 8). En la Figura 8 se observan las 2 clases presentes; las HMG-CoA reductasas, las de clase I asociada principalmente a eucariotas y la mayoría de las archaeas, y las HMG-CoA reductasas de clase II asociadas principalmente con eubacterias y otras archaeas. Las secuencias de ciliados que se incluyeron en el análisis agruparon con las de clase II [107].

Otro árbol filogenético se generó a partir de 48 secuencias aminoacídicas correspondientes a escualeno sintasas (Figura 9). Se incluyeron en el análisis las secuencias encontradas en todas las especies del género *Tetrahymena*. También en este caso se observa que las secuencias de *Tetrahymena* agrupan con el clado bacteriano, incluso habiendo una gran diversidad de orígenes de las secuencias eucariotas (*opisthokonta*, *stramenopiles*, *amoebozoans*, *archaeplastids*, *heteroloboseas* y *excavata*, entre otros). Este patrón tan marcado sugiere que es probable que el gen correspondiente a esta enzima haya sido adquirido por un ancestro en el origen de la familia Tetrahymenidae mediante el proceso de transferencia horizontal de una bacteria a este ancestro.

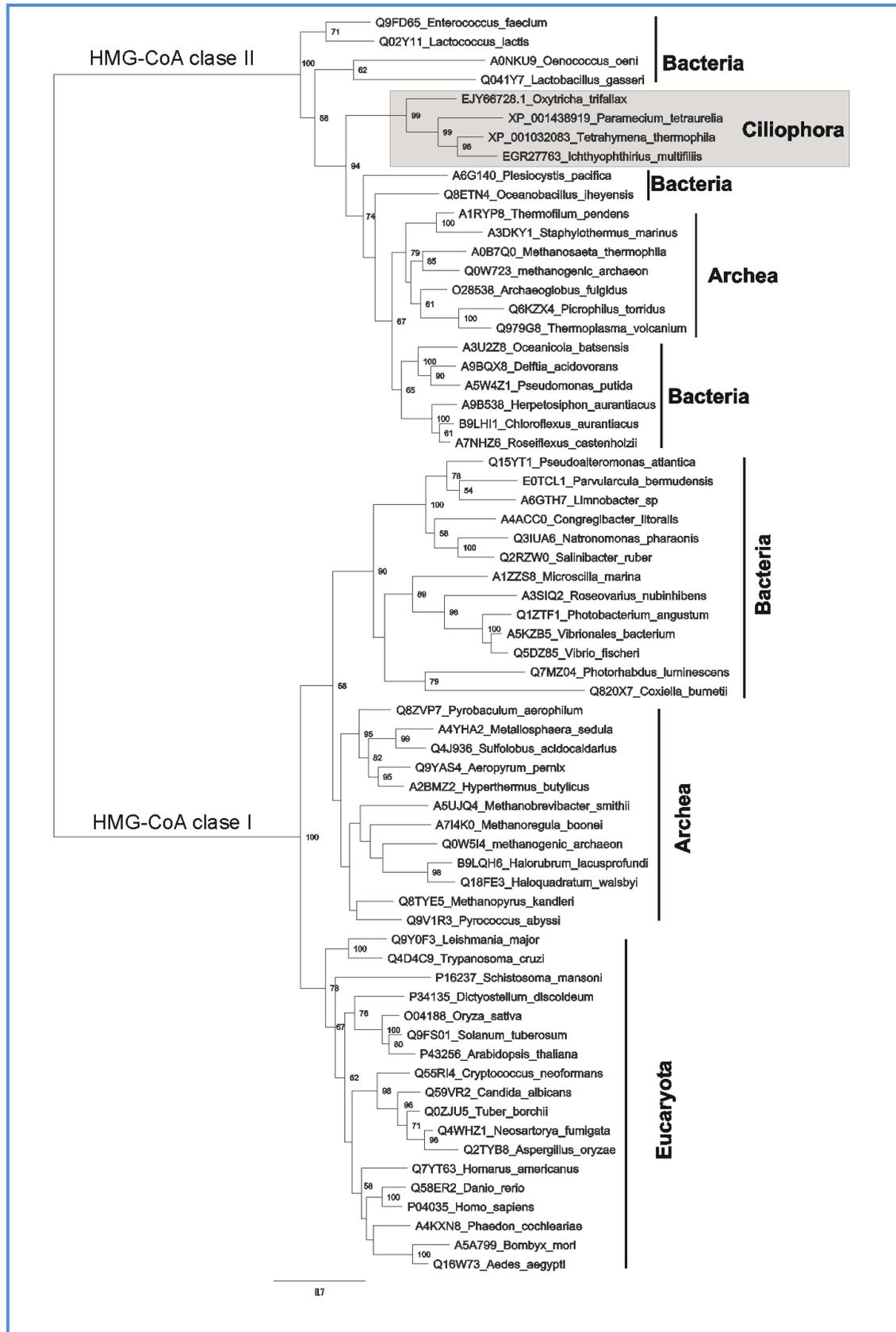


Figura 8. Análisis filogenético de HMG-CoA reductasas. Las secuencias de ciliados (resaltadas en gris) agrupan dentro de la clase II, junto a ortólogos bacterianos. Solo se muestran valores de remuestreo (*bootstrap*) mayores a 50. La barra indica porcentaje de sustitución.

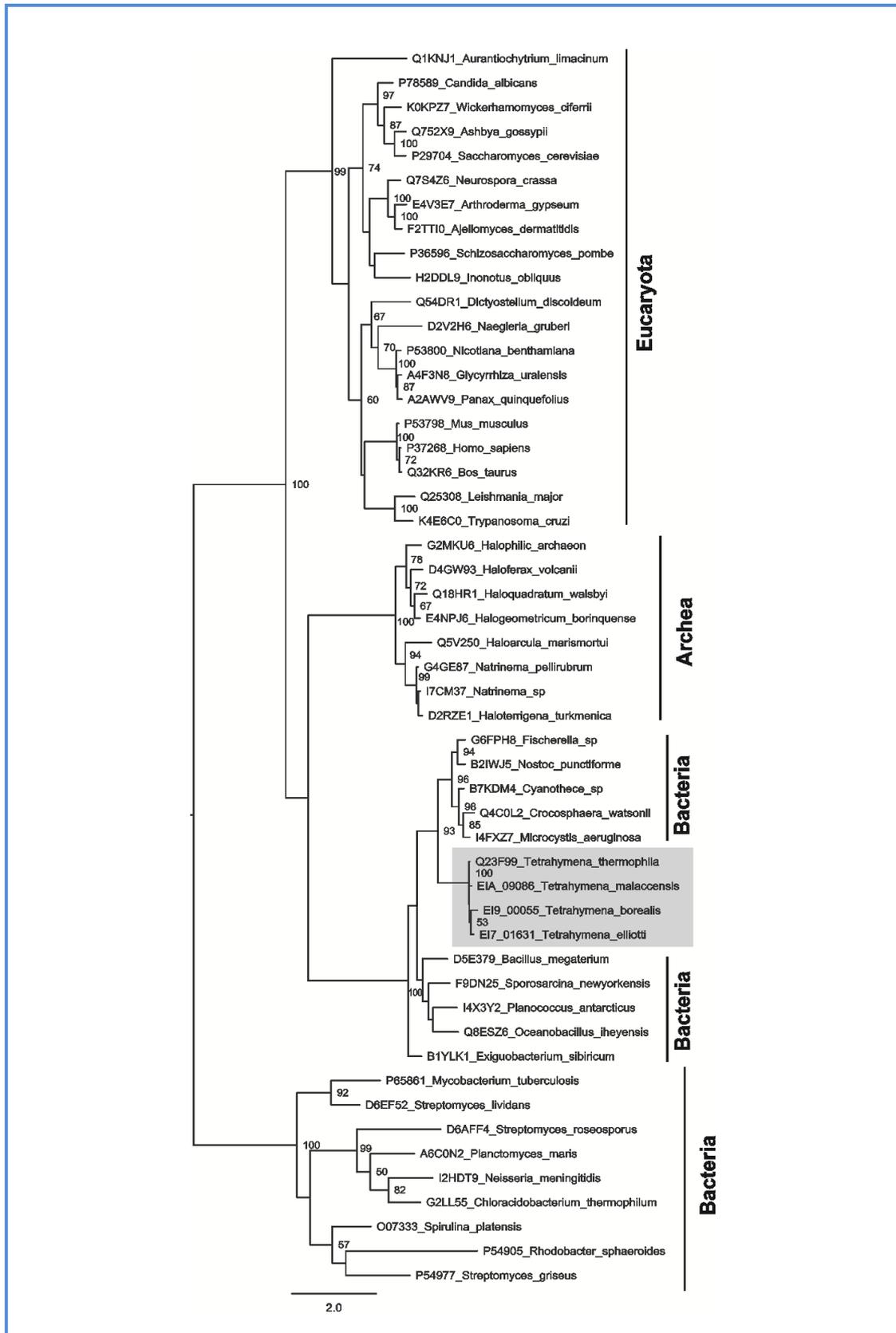


Figura 9. Análisis filogenético de escualeno sintasas. Las secuencias del género *Tetrahymena* (resaltadas en gris) agrupan junto a ortólogos bacterianos y separadas de las secuencias eucariotas. Solo se muestran valores de remuestreo (*bootstrap*) mayores a 50. La barra indica porcentaje de sustitución.

También es significativo que la mayoría de las bacterias que agrupan junto a la escualeno sintasa de *Tetrahymena* sean cianobacterias. Una explicación alternativa frente a la hipótesis de la transferencia horizontal es que el origen de la enzima esté en un plástido ancestral perdido en algún momento de la evolución. Una hipótesis acerca del origen evolutivo de los chromalveolados propone precisamente que los plástidos secundarios rojos serían el resultado de un solo evento endosimbiótico, mientras que los chromalveolados (incluyendo chromists (cryptophytes, haptophytes, y stramenopiles) y alveolados (ciliophora, apicomplexans y dinoflagellados) habrían obtenido el plástido gracias a un segundo evento de endosimbiosis. Este plástido se habría perdido con posterioridad, aunque algunos genes pudieron ser retenidos [41,108]. Sin embargo, aun aceptando la hipótesis de los chromalveolados, resulta más probable la explicación de una transferencia horizontal, dado que en dinoflagellados y stramenopiles (*Alexandrium tamarense* y *Thalassiosira pseudonana*, respectivamente) se encuentran genes correspondientes a escualeno sintasas similares a las eucariotas. En suma la explicación por transferencia horizontal resulta más parsimoniosa por encima de la explicación a través de las pérdidas múltiples de genes, como se sugirió en otros chromalveolados, atendiendo también al modo de vida bacteriívoro de *Tetrahymena*.

Respecto de la escualeno-tetrahymanol ciclasa, se siguió un tratamiento similar para el alineamiento de secuencias generándose un árbol en el cual se observa que también éstas agrupan junto a escualeno ciclasas bacterianas (Figura 10), como era de esperar según lo reportado previamente [60,105]. Además, analizando el peso molecular de las diferentes SHC, es posible distinguir también el posible origen bacteriano de la enzima presente en ciliados. El peso molecular de la enzima de *T. thermophila* es de 72 kDa, similar a la de bacterias como *Bacillus acidocalcaricus* de 75 kDa y la alfa-proteobacteria *Bradyrhizobium japonicum* de 74 kDa, mientras que las 2,3-epoxiescualeno-lanosterol ciclasa eucariota tiene un peso molecular de 83 kDa en el caso de la enzima de *Saccharomyces cerevisiae* y la de *Homo sapiens*, y la 2,3-epoxiescualeno-cicloartenol ciclasa de *Arabidopsis thaliana* o de *Dictyostelium discoideum* tiene un peso molecular de 86 kDa.

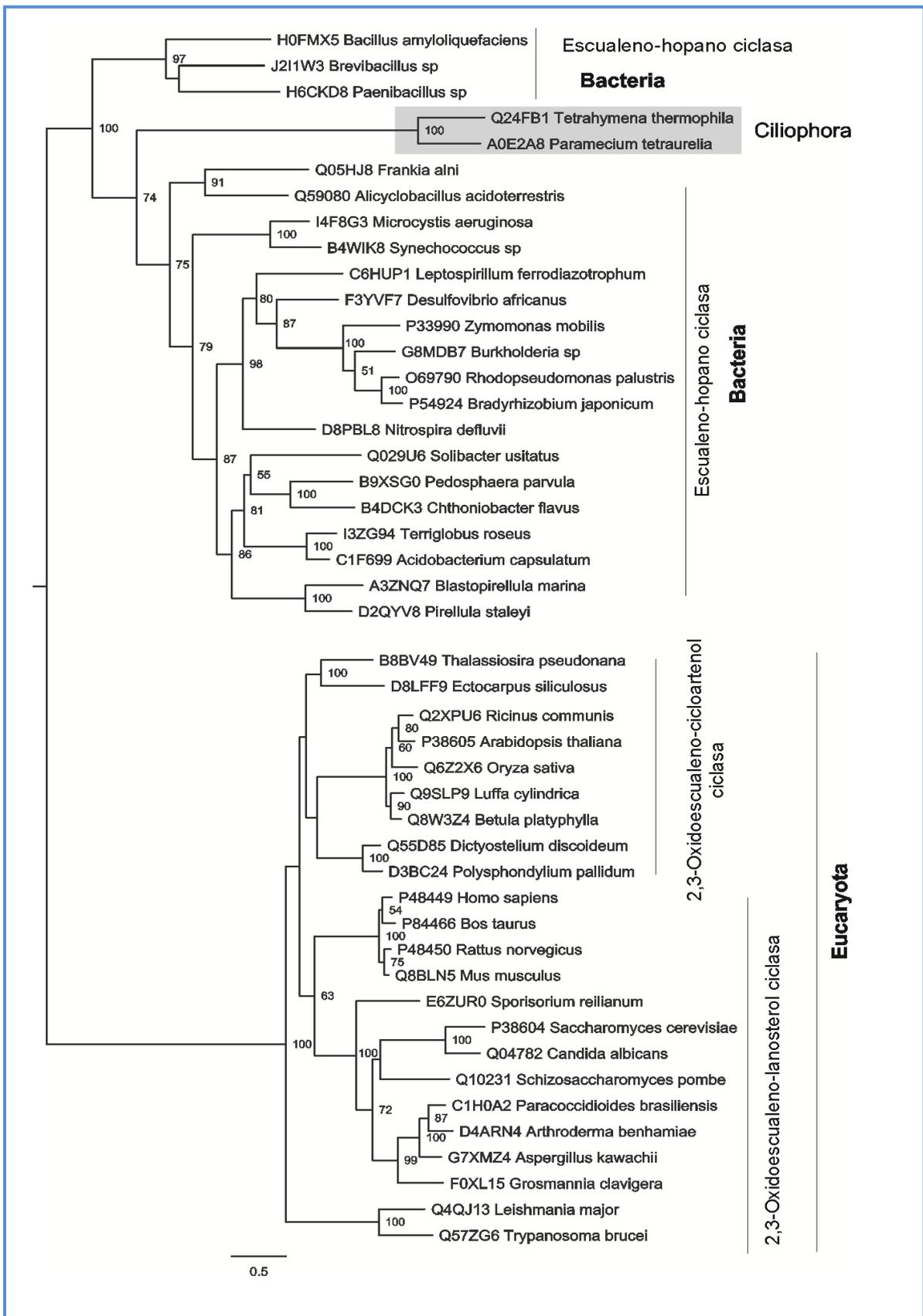


Figura 10. Análisis filogenético de escualeno-hopano ciclasas. Las secuencias de *Tetrahymena* y *Paramecium* (resaltadas en gris) agrupan junto a las secuencias bacterianas y separadas de las eucariotas. Solo se muestran valores de remuestreo (*bootstrap*) mayores a 50. La barra indica porcentaje de sustitución.

3.2 Metabolismo de esteroides

Como se mencionó anteriormente, los ciliados carecen de la vía completa de síntesis de esteroides. Sin embargo, algunos pueden, además de incorporarlos del medio, transformarlos o modificarlos. *T. thermophila* y *T. pyriformis* tienen la capacidad de desaturar esteroides en las posiciones C-5(6), C-7(8), y C-22(23), y también remover el grupo etilo de la posición C-24 de C29 esteroides (fitosteroides) [64]. A través de la actividad de 3 desaturasas (C-5, C-7 y C-22) y la des-etilasa (C-24), todas las especies de *Tetrahymena* son capaces de modificar los esteroides incorporados y acumular los productos insaturados y des-etilados en la membrana. En cambio, en *P. tetraurelia* solo se detectaron dos de las actividades, C-5(6) y C-7(8) esteroide desaturasa [65].

Dado que no hay información disponible respecto al metabolismo de esteroides para el resto de los ciliados, se realizó un análisis bioinformático en busca de ortólogos de todas las enzimas involucradas en la etapa posterior a la formación del escualeno. Para el análisis se incluyeron ciliados de 12 géneros, pertenecientes a 4 clases diferentes (Tabla 3), y se emplearon como plantados las secuencias correspondientes a enzimas reconocidas en *A. thaliana*, *Homo sapiens* y *S. cerevisiae*, donde esta vía está totalmente comprobada experimentalmente. Para el contraste se emplearon los genomas completos de los ciliados y, en los casos donde esto no fue posible, se emplearon los marcadores de secuencia expresada (EST) y las secuencias cortas genómicas (GSS) disponibles.

Los resultados obtenidos muestran que ninguno de los ciliados posee el gen putativo de la enzima escualeno epoxidasa, responsable de la primera oxidación que sufre la molécula de escualeno, consistente en la introducción de oxígeno molecular en la posición 9-10 del escualeno y formación del epóxido correspondiente. Una alternativa posible es que los ciliados tuvieran la capacidad de producir alternativamente tetrahimanol y esteroides según la disponibilidad de oxígeno y que su disponibilidad fuera precisamente el estímulo para la regulación de la síntesis de uno u otro compuesto. Sin embargo dada la mayoritaria ausencia de genes putativos en los genomas, la hipótesis resulta poco probable.

Como se observa en la Tabla 3, se encontraron algunos ortólogos de enzimas del metabolismo de esteroides con un E-valor $< 1e^{-10}$ en los ciliados de las clases oligohymenophorea y spirotrichea. Entre estos ortólogos figura uno del gen codificante para la enzima C-22 esteroide desaturasa, aun no identificado en *T. thermophila*. Si bien el ortólogo encontrado pertenece a la familia de enzimas citocromo P450, se analizó la presencia del mismo gen en *P. tetraurelia* (que no posee la actividad enzimática) y se encontró un gen con muy alta similitud. Por otro lado, el ortólogo mostrado es el de mejor valor de *score*, habiendo otros con valores muy similares, todos citocromos P450, indicando que no hay un ortólogo que resalte sobre el resto. Además, no presenta los motivos característicos propuestos de las enzimas C-22 esteroide desaturasas encontradas hasta el momento [17,109].

Sin embargo para otros genes, se han encontrado ortólogos con un E-valor $< 1e^{-15}$. Estos genes pertenecen a 2 familias de proteínas, una familia es la de hidroxilasas de ácidos grasos, y las proteínas con ortólogos en ciliados de estas clases son la C-5 esteroide desaturasa y las C-4 metil oxidasas. La otra familia es la ERG4/ERG24 de la biosíntesis del ergosterol, cuyas proteínas son la 7-dehidrocolesterol reductasa, la C-14 esteroide reductasa y la C-24(28) esteroide reductasa.

Tabla 3. Ortólogos de la biosíntesis de esteroides en ciliados. Los ortólogos con un E-valor $1e^{-15}$ se indican en azul, mientras que los ortólogos con E-valor $1e^{-10}$ se indican en celeste. La ausencia de ortólogos se indica en blanco.

Clase	OLIGOHYMENOPHOREA			LISTOSTOMATEA			ARMOPHOREA	SPIROTRICHEA		
Subclase	Hymenostomatia	Peniculia	Scuticociliaria	Trichostomatia				Stichotrichia		
Enzima	<i>Tetrahymena thermophila</i> Genoma MAC	<i>Ichthyophthirius multifiliis</i> Genoma MAC	<i>Paramecium tetraurelia</i> Genoma MAC	<i>Anophryoides haemophila</i> 7689 EST	<i>Vestibuliferida</i> (Familia) 1487 EST	<i>Entodiniomorphida</i> (Familia) 3009 EST	<i>Nyctotherus ovalis</i> 5484 EST + 4240 GSS	<i>Oxytricha trifallax</i> Genoma MAC	<i>Stylonychia lemnae</i> 53.806 Contigs	<i>Euplotes crassus</i> 1820 EST
Escualeno epoxidasa										
Escualeno epóxido ciclasas										
C-14 de-metilasa										
C14 reductasa										
C-4 metiloxidasa										
C-3 dehidrogenasa										
C-3 cetoreductasa										
erg 28										
C-8 isomerasa (levaduras)										
C-8 isomerasa (metazoa / plantas)										
C-5 desaturasa										
C-24 metiltransferasa										
7DHC reductasa										
C-24 reductasa (levaduras)										
C-24 reductasa (metazoa / plantas)										
C-22 desaturasa										
C-24 esterol des-etilasa										
Ciclopropilesterol isomerasa										
C-7 esterol desaturasa										

3.3 Análisis de la expresión génica

Una herramienta para analizar si los posibles genes participantes en la síntesis y/o modificación de esteroides tienen efectivamente el rol fisiológico asignado, es analizar la expresión diferencial de estos genes durante diferentes etapas del ciclo celular. En principio se encuentran disponibles resultados de experimentos de expresión génica en *T. thermophila* (*Tetrahymena Functional Genomics Database*, TFGD) y en *P. tetraurelia* (*ParameciumDB*) que se realizaron en diferentes instancias del ciclo celular incluyendo crecimiento vegetativo, hambreado y reproducción sexual (conjugación en *Tetrahymena* y autogamia en *Paramecium*) así como reciliación y exocitosis regulada (solo en *Paramecium*)[110,111]. Analizando las 3 enzimas de *Tetrahymena* que agruparon con el clado bacteriano se observa en los caso de HMG-CoA reductasa y SHC presentan una ligera expresión diferencial en *Tetrahymena*, y ninguna diferencia en *Paramecium*, mientras que la escualeno sintasa, solo presente en *Tetrahymena*, sí presenta una expresión diferencial a lo largo del ciclo. Este comportamiento en la modificación del nivel de transcripción de la escualeno sintasa sería indicativo de una cierta regulación transcripcional. Es interesante destacar que estudios previos realizados sobre el metabolismo de tetrahymanol en *Tetrahymena* indicaron que la escualeno sintasa sería la enzima clave en la inhibición de la síntesis de tetrahymanol en presencia de esteroides, sugiriendo también una regulación transcripcional por esteroides [101,112].

La red de genes de *Tetrahymena* (*Tetrahymena gene network*, TGN, <http://tfgd.ihb.ac.cn/tool/network>) es una base de datos construida sobre la base de 67 experimentos de chips de ADN (*microarrays*) realizados en diferentes estadios del ciclo celular de *Tetrahymena*, caracteriza las interacciones entre biomoléculas, incluyendo las interacciones físicas, el flujo metabólico, las relaciones de regulación y las relaciones de coexpresión, entre otras [113]. Tomando esta base de datos se analizaron los perfiles de expresión de los ortólogos de la etapa post-escualeno, para estudiar algún posible rol biológico. El análisis no mostró ninguna co-regulación entre ellos, sugiriendo que estas proteínas podrían haber perdido su capacidad de interacción física para formar complejos estables, como ocurre con los ergosomas en las levaduras [114]. Además, para los genes DES5A, DES7, DES24 y STC, se analizaron

qué otros genes se encuentran correlacionados en cuanto al perfil de expresión, es decir, que otros genes presentan una expresión que correlaciona con la expresión de estos genes analizados. Se encontraron 76 genes que correlacionan con el gen de la escualeno-tetrahymanol ciclasa, 67 con DES5A, 16 con DES7 y 100 con DES24. Se analizaron estos grupos de genes en la base de datos de clasificación funcional DAVID [115] y entre todos estos genes, solo un pequeño grupo de proteínas con el motivo dedos de zinc estaría relacionado, funcionalmente, con DES24. Si bien con esta información no es posible establecer una función biológica, aporta evidencia sobre un posible rol aun no identificado en ciliados.

La regulación de la síntesis de tetrahymanol por adición de colesterol al medio de cultivo fue descrita por Beedle *et al.* [101] y luego por Warburg *et al.* [116], que mediante diferentes experimentos con acetato, mevalonato y colesterol marcados radiactivamente estudiaron la inhibición de algunas enzimas de la vía pre-escualeno, encontrando que existía una inhibición fuerte al nivel de la escualeno sintasa y la SHC, y postularon que esta inhibición debía ser a nivel de la síntesis de estas enzimas, dado que no se registraba esta inhibición *in vitro* en homogenatos celulares. Por otro lado, detectaron una inhibición menor en la vía entre el acetato y el mevalonato. Dado el conocimiento sobre la regulación sobre HMG-CoA reductasa en el hígado, probaron si era esta enzima el punto de regulación, pero no observaron inhibición en este paso.

Debido a que no se observa inhibición alguna ante el agregado de tetrahymanol, postularon que la inhibición no se debía a un proceso de retroalimentación, sino que estaría relacionado con la alteración de la membrana plasmática. La incorporación de colesterol o ergosterol a la membrana de *Tetrahymena*, reemplazando al tetrahymanol, ocasiona un cambio en la composición de ácidos grasos. La hipótesis es que la regulación está relacionada con estas alteraciones en la membrana [101].

En mamíferos, la regulación del metabolismo de ciertos lípidos, como esteroides y ácidos grasos, se ejerce por medio de un complejo integrado por la proteína de unión al elemento regulador de colesterol (SREBP) y las proteínas Scap e Insig. SREBP se encuentra en estrecha relación con Scap, en la membrana del retículo endoplásmico. A su vez, en presencia de colesterol (detectado por Scap), el complejo SREBP-Scap se

mantiene unido a Insig, lo cual determina la permanencia del complejo en el retículo endoplásmico. Al disminuir los niveles de colesterol, el complejo se desintegra, permitiendo la migración del complejo SREBP-Scap vía vesículas COPII al Golgi. En el Golgi se encuentran 2 proteasas que clivan a SREBP en 2 sitios específicos, liberando el dominio N-terminal de SREBP que es un factor de transcripción que luego va al núcleo donde activa un gran número de genes, entre los cuales se encuentran los involucrados en la síntesis de colesterol (principalmente HMG-CoA reductasa) [117,118].

Por otra parte, en *S. cerevisiae*, la proteína codificada por el gen *UPC2* detecta el descenso en la disponibilidad de oxígeno. Si bien no se conoce el mecanismo, es posible que sea a través de la detección del nivel de ergosterol (una molécula cuya biosíntesis es oxígeno dependiente). Cuando disminuye la disponibilidad de oxígeno, *Upc2* aumenta la transcripción de genes relacionados con la síntesis de ergosterol y además de transportadores ABC que facilitan la incorporación de esteroides exógenos [117,119].

En *T. thermophila* no se han encontrado ortólogos para estos genes reguladores del metabolismo de esteroides, incluyendo SREBP, Scap, Insig y Upc2, razón por la cual no es posible tener indicios sobre el mecanismo de regulación.

Para aportar al conocimiento del rol de los esteroides en la regulación de la expresión génica se realizó un análisis transcriptómico global de *T. thermophila* en 3 condiciones de cultivo: i) sin agregado de esteroides (control), ii) con agregado de colesterol y iii) con agregado de estigmasterol, como se describió en materiales y métodos (2.7).

El análisis de los datos procesados reveló que 130 genes vieron modificada su expresión con el agregado de colesterol al medio ($P < 0,05$). De los 130 genes afectados, 53 vieron su expresión disminuida, mientras que los 77 restantes aumentaron su expresión. Dentro de los genes afectados se encuentran efectivamente genes putativos de esteroles desaturadas, desaturadas de ácidos grasos y proteínas con dominios de unión a esteroides como los dominios START (pfam: PF01852), el dominio ML (PF02221) de reconocimiento de lípidos y proteínas anotadas como de unión a emopamil (PF05241), relacionadas en otros organismos con la unión a colesterol.

La respuesta ante el agregado de colesterol es evidente y tiene relación con los resultados obtenidos sobre el estudio de la biosíntesis de tetrahymanol [101] y sobre el efecto del agregado de esteroides en la composición en ácidos grasos de la membrana plasmática de *T. pyriformis* [120].

Los resultados obtenidos comparando la condición con agregado de colesterol respecto al control, refuerzan los resultados e hipótesis de Beedle *et al.* [101] ya que hay una marcada inhibición de la escualeno sintasa y de la escualeno ciclasa de alrededor de 50 veces.

Por otro lado, los mismos autores postularon una inhibición menor en las primeras etapas de la vía, la que sintetiza el mevalonato a partir del acetato. Los resultados de la secuenciación del transcriptoma indican que esa pequeña inhibición puede ser atribuible a la disminución en la expresión del gen que codifica para la HMG-CoA reductasa/sintasa (THERM_00691180). Al momento de la realización del análisis filogenético, el genoma de *T. thermophila* contaba con los genes THERM_00691180 y THERM_00691190 que codificaban para las enzimas HMG-CoA reductasa y HMG-CoA sintasa respectivamente. Una actualización entre la fecha del análisis filogenético y el análisis de la secuenciación del transcriptoma agrupó a ambos genes bajo la denominación THERM_00691180, tomando como descripción del gen HMG-CoA sintasa. El análisis de la transcripción de este gen indicó una leve inhibición (alrededor de 2 veces) al incubar los cultivos con colesterol. Este hecho está de acuerdo con la inhibición menor que postulaban Beedle *et al.* [101] en la etapa de síntesis del mevalonato. Serán necesarios nuevos estudios para evaluar por un lado si la disminución de la expresión de este gen impacta sobre la actividad HMG-CoA reductasa y/o la actividad HMG-CoA sintasa. Beedle *et al.* llegaron a la conclusión de que la actividad HMG-CoA reductasa no se veía afectada, pero no analizaron la actividad HMG-CoA sintasa. Sin embargo es esperable que si efectivamente el gen codifica para ambas enzimas, y su expresión se ve disminuida, ambas actividades enzimáticas deberían disminuir al incubar los cultivos con colesterol.

Tabla 4. Análisis de la expresión diferencial de los genes involucrados en el metabolismo del tetrahymanol y esteroides. Se analiza la expresión diferencial de genes de *T. thermophila* en cultivos sin agregado de esteroides (control) contra cultivos con agregado de colesterol y otros con estigmasterol. Se indica el incremento en la expresión del gen, el valor de p ajustado por el programa Deseq2 [121]. Se definió como punto de corte $P < 0,05$, para definir si el análisis era significativo o no significativo (NS).

Enzima	Gen	Colesterol		Estigmasterol	
		Incremento de la expresión	p ajustado	Incremento de la expresión	p ajustado
Hidroximetilglutaril-CoA sintasa/reductasa	TTHERM_00691180	0,5268	$1,77 \cdot 10^{-4}$	NS	
Difosfomevalonato decarboxilasa	TTHERM_00849200	0,5790	$3,57 \cdot 10^{-2}$	NS	
isopentenil-difosfato Δ -isomerasa	TTHERM_00438860	0,1182	$9,42 \cdot 10^{-27}$	0,1411	$1,95 \cdot 10^{-11}$
Poliprenil sintetasa	TTHERM_00268030	0,3777	$1,96 \cdot 10^{-9}$	NS	
Escualeno/fitoeno sintasa	TTHERM_00382150	0,0218	$1,34 \cdot 10^{-36}$	0,0038	$7,99 \cdot 10^{-71}$
Escualeno-tetrahymanol ciclasa	TTHERM_01008630	0,0210	$5,44 \cdot 10^{-34}$	0,0034	$2,62 \cdot 10^{-69}$
C-4 metiloxidasa	TTHERM_00348230	2,8328	$9,78 \cdot 10^{-6}$	NS	
C-5 esterol desaturasa	TTHERM_01194720	2,4738	$1,28 \cdot 10^{-4}$	NS	
C-7 esterol desaturasa	TTHERM_00310640	3,3425	$4,36 \cdot 10^{-11}$	NS	
C-24 esterol des-etilasa	TTHERM_00438800	NS		NS	

Por otro lado, otros 2 genes de la etapa pre-escualeno parecen estar regulados por el agregado de colesterol al medio de cultivo: Difosfomevalonato decarboxilasa (TTHERM_00849200) e isopentenil-difosfato Δ -isomerasa (TTHERM_00438860). El análisis de los transcritos indicó que la disminución en la expresión de ambos genes fue de 1,72 veces para la Difosfomevalonato decarboxilasa y de 8,46 para la isopentenil-difosfato Δ -isomerasa, un efecto no conocido hasta el momento para *T. thermophila*. Otro gen involucrado en el metabolismo en la etapa pre-escualeno es el que corresponde a la poliprenil sintetasa (TTHERM_00268030). Si bien no tiene una actividad definida en *T. thermophila*, es posible que esta enzima canalice el Farnesyl-PP hacia la síntesis de ubiquinona u otros terpenoides-quinonas. El análisis para este gen indica que su expresión ante el agregado de colesterol disminuye 2,65 veces, indicando que es posible que la inhibición de la vía pueda comprometer no solo a la síntesis de

tetrahymanol, sino que también puede afectar a vías relacionadas. Cabe destacar que Wilton [122] concluyó que ante el agregado de colesterol, se redirige el flujo metabólico desde el metabolismo de terpenoides de *T. pyriformis* hacia la síntesis de ubiquinona. Evidentemente es necesario un análisis más profundo de esta vía metabólica, valiéndose de los resultados de la secuenciación del transcriptoma y además acompañarlo de evidencia experimental sobre medición de flujos metabólicos.

Respecto de las enzimas de la etapa post-escualeno, el análisis transcripcional comparativo reveló que C-5 esterol desaturasa y C-7 esterol desaturasa aumentan su expresión (2,47 veces la primera y 3,34 veces la segunda) en presencia de colesterol. Estos resultados refuerzan resultados previos obtenidos por Nusblat *et al.* [74] que indicaron el aumento de la expresión del gen DES5A y Nusblat *et al.* [76] que indicó el aumento de la actividad C-7 esterol desaturasa en fracciones microsomales de *T. thermophila* cultivada con agregado de colesterol.

El gen THERM_00348230, no caracterizado al momento, fue anotado en el genoma como “C-4 metiloxidasa” basado en ortólogos más probables. Sin embargo hasta el momento no se ha probado esa actividad en *T. thermophila* [79] con lo cual no es posible aseverar si en realidad este gen codifica para dicha enzima. Igualmente la expresión de este gen se ve aumentada 2,8 veces ante el agregado de colesterol, sumando mas evidencia a la respuesta de una posible función regulada por esteroides.

Para ilustrar la complejidad de la regulación de la expresión en *T. thermophila*, puede servir de ejemplo el gen que codifica para C-24 esterol des-etilasa, una enzima confirmada en su actividad [82] pero que no presenta una modificación significativa en el nivel de transcripción génica frente al agregado de colesterol al medio de cultivo.

Por otra parte, el comportamiento de los ciliados frente a fitosteroides como el estigmasterol es todavía algo bastante desconocido. Así por ejemplo, *P. tetraurelia* es auxótrofo para esteroides y no posee la actividad C-24 esterol des-etilasa, pero requiere de estigmasterol para su crecimiento. En cambio *T. thermophila* no solo no lo requiere para su crecimiento, sino que posee la enzima para remover el grupo etilo. Su presencia podría relacionarse con un efecto deletéreo de los fitosteroides, pues una cepa noqueada en el gen codificante para la enzima C-24 esterol desaturasa presenta una morfología anormal en presencia de los mismos, indicativa de un efecto tóxico.

Teniendo en cuenta la respuesta ante el estigmasterol, y sabiendo que el estigmasterol es transformado también en 5,7,22-colestatrien-3 β -ol, al igual que el colesterol, es decir que *Tetrahymena* remueve el grupo etilo de la posición C-24 y la desatura en la posición C-7 esterol desaturasa, se comparó también la expresión diferencial entre el cultivo control y el cultivo con agregado de estigmasterol.

El análisis mostró una disminución en la expresión de los genes codificantes para la isopentenil-difosfato Δ -isomerasa, escualeno sintasa y la escualeno-tetrahymanol ciclasa, indicando la inhibición en la síntesis del tetrahymanol, como se indicó también con el colesterol. En cambio no se observó variación significativa para los genes codificantes para las enzimas modificadoras de esteroides, trazando una regulación diferencial respecto al colesterol.

3.4 Análisis de la presión selectiva

Uno de los grandes interrogantes ante la presencia de enzimas modificadoras de esteroides en ciliados que no sintetizan esteroides, es el rol fisiológico que tendrían y por qué motivo se conservan a lo largo de la evolución.

Una técnica que se utiliza para evaluar el tipo de selección al que están sometidos los genes es la relación de sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo (Ka) sobre las sustituciones sinónimas por sitio sinónimo (Ks). Para obtener estas relaciones se compararon los genomas de *T. thermophila* y *T. malaccensis*. En esta última, no están descritas las modificaciones de esteroides previamente mencionadas. Los genes analizados fueron *DES5A*, el *DES7*, *DES24*, C-4 metil oxidasa (THERM_00876970) y el gen THERM_00394500 anotada como C-14 esterol reductasa, cuya actividad no ha sido probada hasta el momento en *T. thermophila*.

Tabla 5. Análisis de la presión selectiva en genes ortólogos del metabolismo de esteroides. Los valores Ka y Ks fueron calculados para las especies *T. thermophila* y *T. malaccensis*.

Ortólogos de la biosíntesis de esteroides	Ka	Ks	Ka/Ks
C-4 metil oxidasa	0,024	0,441	0,054
C-5 esteroide desaturasa	0,025	0,633	0,039
C-14 esteroide reductasa	0,024	0,525	0,046
C-24 esteroide desaturasa	0,018	0,449	0,040
C-7 esteroide desaturasa	0,015	0,361	0,041

Brevemente, si la relación es mayor a 1 quiere decir que las mutaciones sobre el gen otorgaron una ventaja, por lo cual es indicador de una selección positiva. Si es menor a 1 indica que las mutaciones no sinónimas resultaron una desventaja, por lo cual es indicativo de una selección negativa o purificadora.

Los valores obtenidos para los genes analizados son bajos, indicando que existiría una tendencia selectiva negativa y sugiriendo que estas enzimas tendrían un rol biológico en estos organismos (Tabla 5).

En busca de un posible rol biológico, además del previamente presentado sobre la des-etilación de fitoesteroides, es posible analizar el rol de Tetrahymena, y otros ciliados de vida libre, en el ecosistema. Los ciliados constituyen un eslabón importante en la cadena trófica [123] y ha sido propuesta la transferencia de ácidos grasos bacterianos, esteroides y otros triterpenoides de ciliados a copépodos [55]. Dado que los ciliados no sintetizan esteroides, pero son capaces de incorporarlos del medio y modificarlos con las actividades mencionadas, es posible que el rol del metabolismo de esteroides en ciliados tenga un papel importante en la cadena trófica, proveyendo por ejemplo precursores triterpenoides para la síntesis de hormonas esteroideas. Esta teoría es apoyada por los resultados obtenidos por Martin-Creuzburg *et al.* [124] que reportó que el crecimiento del crustáceo *Daphnia magna* veía mejorado cuando era alimentado con ciliados suplementados con esteroides.

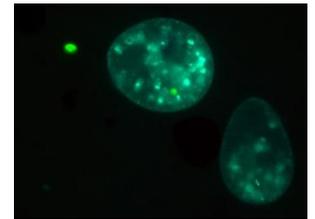
4. Conclusiones

Los resultados obtenidos, apoyados en la hipótesis de la presencia de la vía metabólica de esteroides en el último ancestro común eucariota, indican que los ciliados han ido perdiendo algunos genes involucrados en esta vía. No todos los ciliados presentan el mismo conjunto de genes, de los analizados, solo las especies del género *Tetrahymena* presentan el conjunto completo de genes para la síntesis de tetrahymanol.

Los ciliados analizados parecen haber perdido genes y además haber incorporado otros, posiblemente de bacterias (HMG-CoA reductasa, escualeno sintasa y escualeno-tetrahymanol ciclase) u organismos del grupo opisthokonta (C-24 esterol des-etilasa).

En el caso de *Tetrahymena*, los análisis sobre la posibilidad de una función o rol biológico para los genes de la vía metabólica de esteroides (post-escualeno) parecen indicar que son genes conservados, sometidos a presión selectiva negativa y que además la mayoría poseen un sistema de regulación a nivel transcripcional. Algunos genes involucrados en la etapa pre-escualeno experimentaron una disminución de la expresión, especialmente, de los genes codificantes para las enzimas escualeno sintasa y escualeno-tetrahymanol ciclase y en menor medida el gen que codifica para isopentenil-difosfato Δ -isomerasa, por el agregado tanto de colesterol como estigmasterol. El efecto de disminución de la expresión génica debido al colesterol alcanzó además a los genes codificantes para HMG-CoA reductasa/sintasa, difosfomevalonato decarboxilasa y poliprenil sintetasa.

Respecto de la etapa post-escualeno, el agregado de colesterol aumentó la expresión de los genes codificantes para las enzimas C-5 y C-7 esterol desaturasa, pero no de C-24 esterol des-etilasa. El agregado estigmasterol, por su parte, no modificó la expresión de genes involucrados en esta etapa.



Capítulo 2

Expresión de C-7 esterol desaturasa de *T. thermophila* en células de insecto *Sf9*.

1. Introducción

Como se mencionó en la introducción y en el capítulo anterior, *T. thermophila* es capaz de tomar esteroides del medio, y modificarlos. En particular Des7p, responsable de la actividad C-7(8) esteroide desaturasa, es una proteína de 453 aminoácidos, codificada en el gen DES7 (TTHERM_00310640), que carece de intrones y fue identificado por ensayos de ARN de interferencia y noqueo somático [72]. Se reconoce en la estructura de la proteína un dominio de tipo Rieske, involucrado en la transferencia de electrones, un dominio de transmembrana, y un sitio de unión a hierro no hemínico en la región C terminal, que forma parte del sitio catalítico de la enzima.

Existen numerosas proteínas con centros hierro – azufre [Fe-S] en la naturaleza, que participan de diversos sistemas redox. El componente de hierro es el encargado del almacenamiento de electrones en el centro [Fe-S] de la proteína. Los centros [Fe-S] pueden tener distinta proporción de estos átomos: así por ejemplo existen como [2Fe–2S], [3Fe–4S], [4Fe–4S], y otras combinaciones menos comunes [125]. En general los átomos de hierro son coordinados por átomos de azufre correspondientes a cisteínas presentes en la proteína, y estos átomos de hierro a su vez, coordinan otros átomos de azufre, como se observa en la Figura 11 (A). Dentro de las proteínas con un centro [2Fe-2S] existen dos tipos diferentes. En un caso, denominado tipo planta, ambos átomos de hierro son coordinados por grupos 2 sulfhidrilos cada uno (correspondientes a cisteínas) (A) y en el otro caso, denominado dominio Rieske, un átomo de hierro es coordinado por 2 grupos sulfhidrilo y el otro es coordinado por 2 grupos N imidazólicos, correspondientes a 2 histidinas (B) [126].

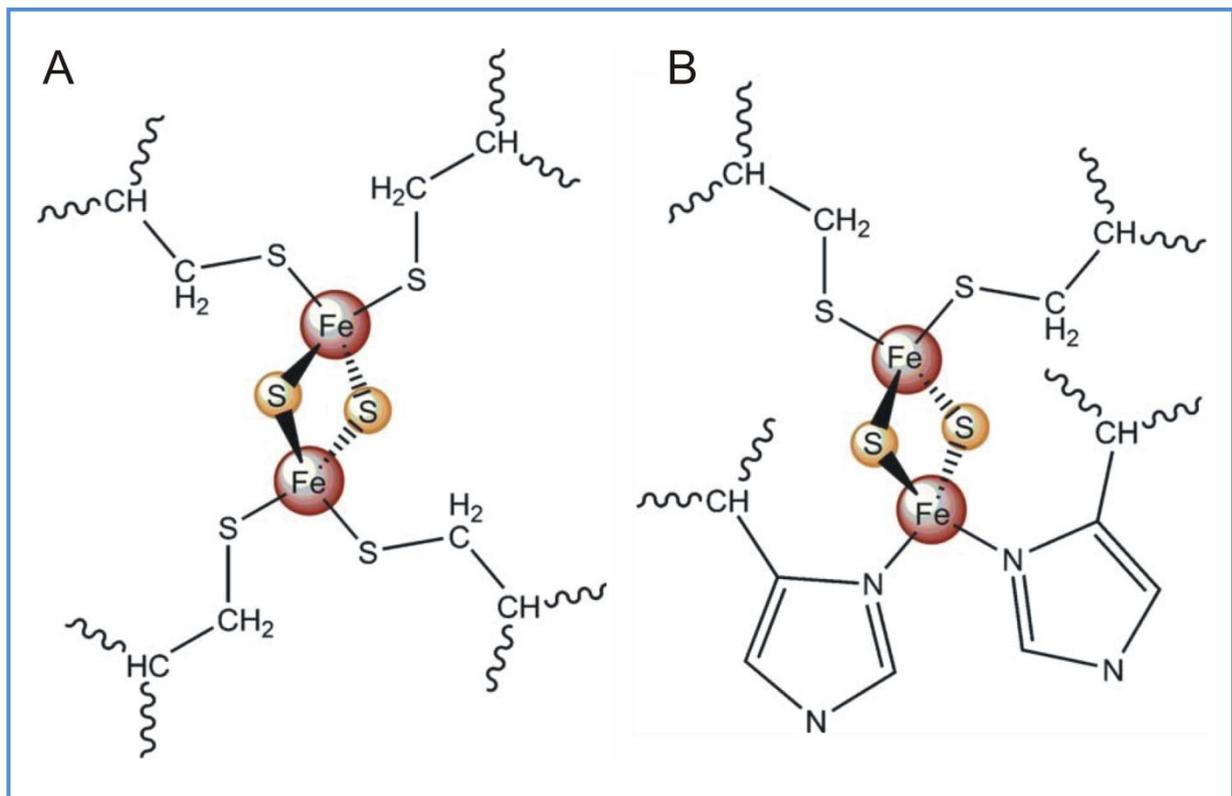


Figura 11. Dominios [2Fe-2S]. El dominio tipo planta con dos átomos de hierro coordinados por 4 átomos de azufre correspondientes a 4 cisteínas (A) y el dominio Rieske con un átomo de hierro coordinado por 2 átomos de azufre y el otro coordinado por dos N imidazólicos correspondientes a histidinas (B). (Adaptada de Ferraro *et al.* [126])

Las proteínas Rieske son mayormente conocidas por su participación en la cadena respiratoria; en efecto, la primera proteína Rieske descrita fue un citocromo de tipo bc1 mitocondrial [127], y luego un citocromo de tipo *bc* bacteriano [128]. Intervienen también en la cadena de transporte de electrones en la fotosíntesis, formando parte de los complejos citocromo b6f en plantas y en ciertas bacterias [129]. También se han encontrado proteínas con centros Fe-S como parte de la cadena respiratoria en Archaeas [130].

Además del rol mencionado en la cadena respiratoria en bacterias, mitocondria y en la fotosíntesis, se han encontrado enzimas con centros Rieske en bacterias y en eucariotas ligadas a actividades enzimáticas diversas. En bacterias han sido descritas numerosas oxigenasas, tanto mono- como di- oxigenasas [131–133] con función catabólica, asociada a la detoxificación de compuestos orgánicos hidrofóbicos, en particular compuestos aromáticos y policíclicos. En eucariotas se han identificado más recientemente y poseen una función anabólica. Por ejemplo, en insectos y nematodos se ha descrito la enzima Neverland/Daf-36 que interviene en la síntesis de hormonas

enzimas, que consiste en un átomo de hierro (II) coordinado por 2 histidinas y un carboxilato, en general de un residuo aspártico. Este hierro mononuclear, como también es conocido este centro catalítico, se encuentra en una porción hidrofóbica de la enzima, en el extremo C- terminal [126].

Las enzimas de tipo Rieske suelen tomar una de dos estructuras cuaternarias, en un caso homotrímeros llamados α_3 y en el otro caso hexámeros $\alpha_3\beta_3$ en las cuales las subunidades α poseen el centro Rieske y el centro activo, mientras que las subunidades β parecen tener una función de estabilización de la estructura cuaternaria. La necesidad de esta estructura cuaternaria radicaría en la distancia necesaria entre el centro Rieske y el centro activo en la proteína. El centro Rieske recibe electrones reduciéndose el hierro (III) coordinado por las 2 histidinas y luego los pasa al hierro (II) mononuclear del sitio activo. La distancia entre estos 2 sitios en la estructura de la proteína, hace muy difícil esta interacción, por lo cual la estructura cuaternaria facilita este pasaje entre los distintos monómeros [136].

El estudio de numerosas oxigenasas del tipo Rieske indicó que las mismas requieren dadores de electrones para catalizar la reacción redox, los cuales provienen de proteínas transportadoras asociadas. La transferencia de electrones desde un dador como NAD(P)H pueden requerir una o dos proteínas transportadoras (Figura 13). En consecuencia, las oxigenasas de tipo Rieske pueden ser parte de un sistema de 2 componentes (integrado por una oxigenasa y la reductasa correspondiente) o de un sistema de 3 componentes, agregándose a ambas una ferredoxina que transporta los electrones desde la reductasa a la oxigenasa [126]. Las ferredoxinas encontradas hasta ahora para los sistemas de tres componentes de oxigenasas tipo Rieske son moléculas pequeñas con un dominio [2Fe-2S], que puede ser de tipo planta o Rieske. Se describieron dos tipos de reductasas; uno consiste en una ferredoxin-reductasa con dominio de unión a FAD o FMN, otro dominio de unión a NADPH y un tercero de tipo [2S-2Fe] y por otro lado las Glutati6n reductasas, que poseen un dominio de unión a FAD, un dominio de unión a NADPH y un dominio C-terminal con actividad catalítica, con una estructura de 5 hojas beta antiparalelas con 2 alfa hélices y una hélice 3_{10} sobre el lado C-terminal de la hoja [126,137].

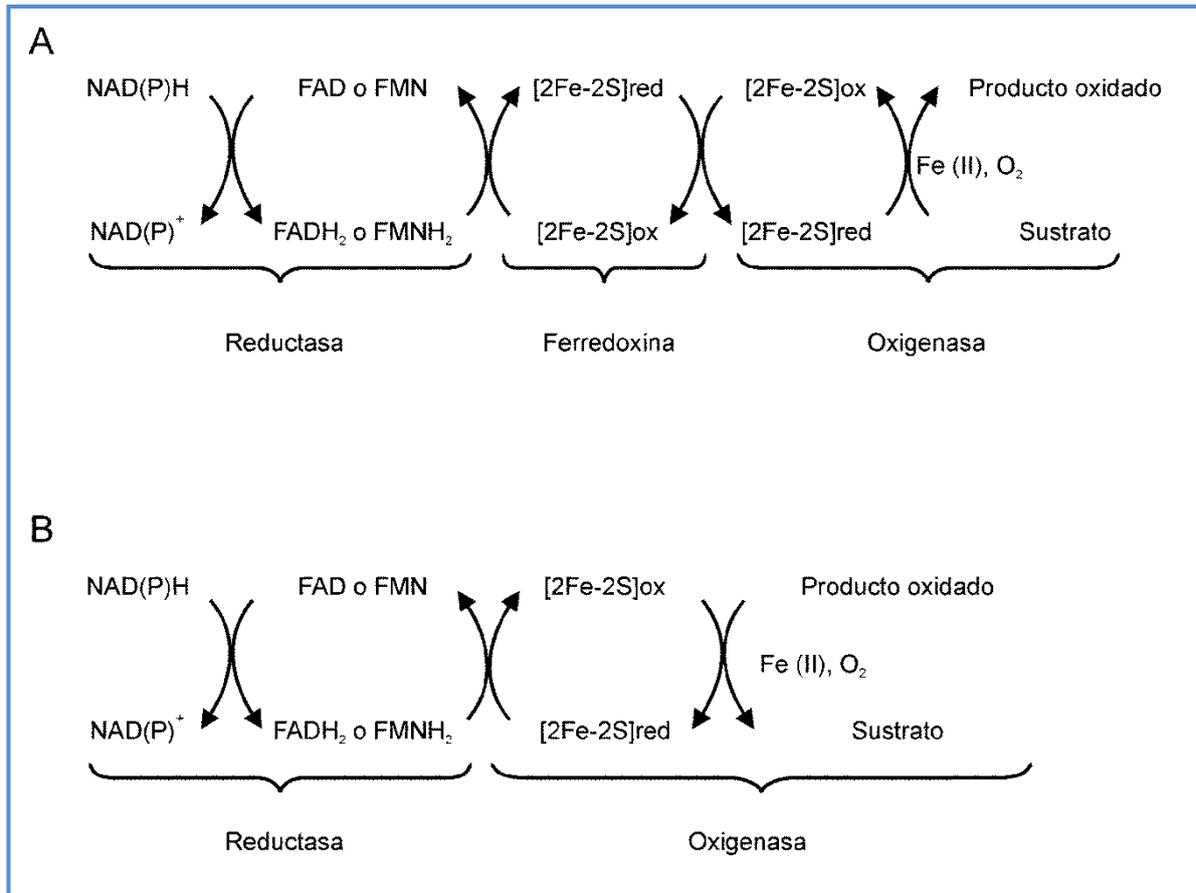


Figura 13. Sistemas de transferencia de electrones encontrados para oxigenasas tipo Rieske. El sistema de 3 componentes, presenta una reductasa, una ferredoxina y la oxidasa final (A), mientras que el sistema de 2 componentes supone la relación directa entre la reductasa y la oxigenasa final, sin necesidad de una ferredoxina aparte (B).

La clasificación de las oxigenasas tipo Rieske se encuentra en permanente revisión. Históricamente, se tomó como criterio principal el requerimiento de un sistema redox de dos o tres componentes, el tipo de centro [Fe-S] y el tipo de cofactor que tiene la reductasa (FMN (flavina mononucleótido) o FAD (flavina adenina dinucleótido) y el tipo centro [Fe-S] de la ferredoxina, en los sistemas de tres componentes [131]. Luego comenzaron a desarrollarse criterios que incorporan análisis filogenéticos, basados en la similitud de secuencias [138–140], aunque también tienen sus desventajas por los métodos de obtención de secuencias, de alineamiento múltiple y de análisis filogenético. Estas clasificaciones fueron diseñadas para las enzimas Rieske caracterizadas hasta el momento, prácticamente todas de origen bacteriano, por lo cual dejan fuera a las enzimas eucariotas. Capyk y Eltis [136] en un análisis filogenético que toma en cuenta todas las secuencias conocidas hasta el momento hacen también un análisis de las estructuras cuaternarias, e incluso analiza

por separado el dominio Rieske y el dominio catalítico. En ese trabajo, encuentran que las oxigenasas tipo Rieske (incluyendo bacterianas y eucariotas) se separan en 2 grupos, denominados grupo 1 y grupo 2, en un análisis filogenético basado en un análisis topológico realizado con 98 secuencias representativas de una colección obtenida por ellos de todas las secuencias de proteínas tipo Rieske (Figura 14). La diferencia entre el grupo 1 y el grupo 2 es la presencia, en las secuencias del grupo 1, de un motivo conservado Asn-Trp-Lys cerca del centro catalítico, así como también la presencia de una inserción característica entre el primer par de cisteína e histidina y el segundo par. Al profundizar el análisis, separando los dominios Rieske de los dominios catalíticos, observaron que el patrón de los dos grupos se repite para los dominios Rieske, pero no para los dominios catalíticos. A partir de esto, proponen que ocurrieron dos eventos de fusión entre un dominio catalítico y 2 dominios Rieske que originaron los 2 grupos.

homología de secuencias y la organización topológica similar entre estas proteínas (Figura 15).

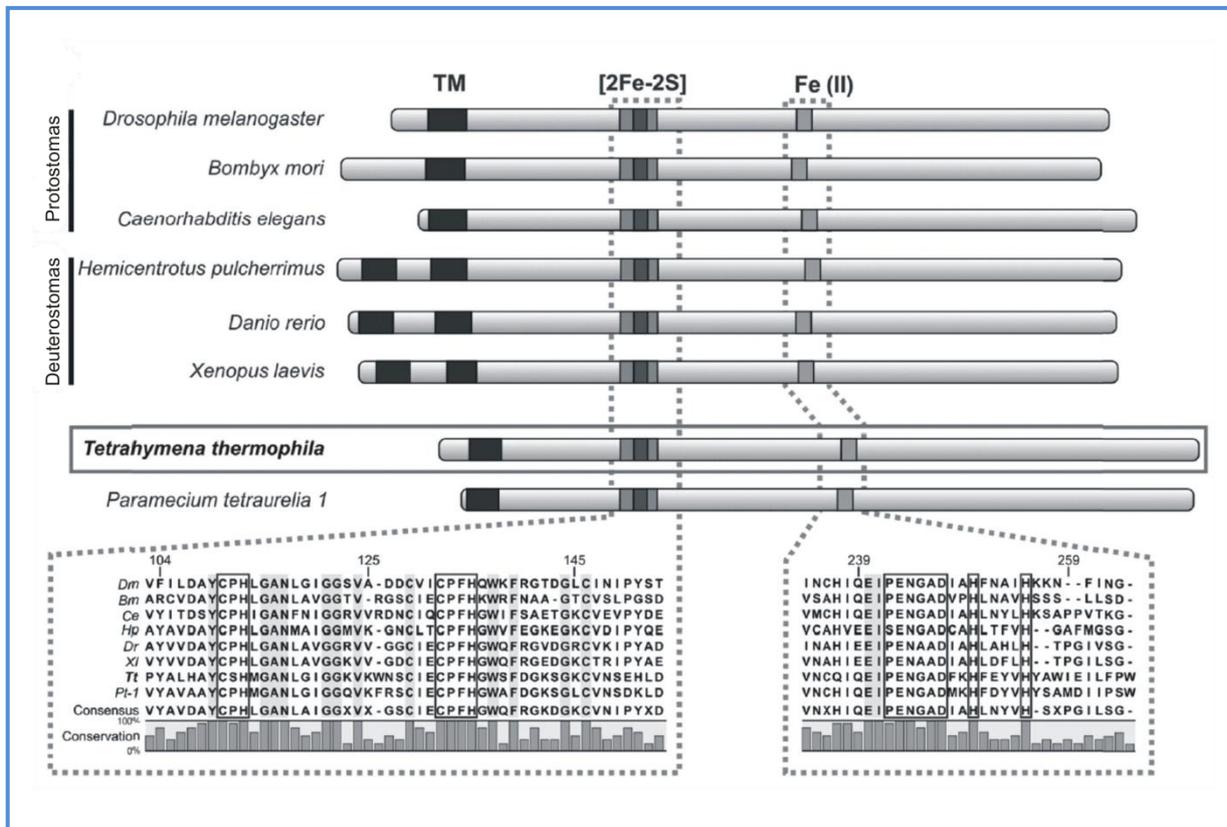


Figura 15. Alineamiento de oxigenasas tipo Rieske eucariotas (Tomada de Najle [72])

La proteína Des7p se localiza en la membrana perinuclear en *T. thermophila* y puede ser recuperada activa de microsomas [72,76]. Su estructura indica la presencia de un paso transmembrana, un centro [2Fe-2S] tipo Rieske y un dominio de unión a hierro no hemínico (Figura 15). Actualmente no se conoce información sobre el sitio catalítico, ni sobre los sistemas dadores de electrones, por lo cual ha sido el objetivo de esta investigación analizar posibles proteínas candidatas.

En la Figura 15 se muestra la similitud estructural de Des7p con algunas oxigenasas tipo Rieske cuya actividad ha sido demostrada experimentalmente como son DAF-36 de *C. elegans* y Neverland (Nvd) de *Drosophila sp.* y *Bombyx mori*, ambas con actividad 7-desaturasa sobre el colesterol, y que por lo tanto constituirían el primer paso en la síntesis de hormonas ecdisteroideas y ácidos dafacronicos en organismos de los clados ecdysozoa y deuterostomia. En estos organismos, la actividad C-7 colesterol desaturasa, aparece entonces relacionada con la regulación del

desarrollo, reproducción y longevidad [5,141]. En insectos la desaturación catalizada por Nvd, es el primer paso en la síntesis de 20E ecdisteroides a partir del colesterol o fitosteroles de la dieta [134,142]. La interferencia con ARNi del gen Nvd de *Drosophila melanogaster* provoca según el caso el arresto en el estadio larvario o la muerte de la larva [134,142]. En nematodos (*C. elegans*) se han obtenido larvas mutantes nulas para daf-36, que exhibieron un fenotipo característico de deficiencia de ácidos dafacrónicos. Este fenotipo consiste en la formación de larvas dauer en las cuales se paraliza el normal desarrollo larvario, además de la defectuosa migración de las gónadas. Estos defectos fueron revertidos mediante la adición de 7-dehidrocolesterol al medio de cultivo [143].

Se ha postulado para los Opisthokontas que la DAF-36/Nvd puede ser un nodo de regulación para la partición del colesterol hacia la síntesis de ácidos biliares u hormonas esteroideogénicas, que también influirían en el desarrollo y la longevidad [143]. Además reportes previos sobre DAF-36/Neverland enfatizaron sobre la alta conservación de esta familia de genes en el reino animal, incluyendo insectos y nematodos, y algunas especies de deuterostomas, con la excepción de los mamíferos [134,142]. Para ubicar las categorías evolutivas, en la Figura 3 se observa la diversidad dentro del grupo Opisthokonta, donde se puede el reino animal (Metazoa) y dentro de éste el supergrupo bilateria, dentro del cual se encuentran los superfilos deuterostomia y ecdysozoa (dentro del cual se encuentran los insectos y nematodos).

Curiosamente, *T. thermophila* no requiere ni sintetiza ecdisteroides ni ácidos dafacrónicos y no tiene (o no se conocen) etapas de desarrollo o diferenciación celular por lo cual una función similar a la observada en animales para su C-7 colesterol desaturasa parece poco probable. Sin embargo *T. thermophila* responde a hormonas de diferente naturaleza, incluyendo insulina y hormonas esteroideas. Han sido publicados trabajos en donde se analizó la presencia de diferentes hormonas en *T. thermophila*, se analizó la propia síntesis, la presencia de receptores, la transducción de señales y el efecto. La insulina parece tener un rol en la supervivencia de *T. thermophila* en muy bajas densidades celulares. Todas las hormonas estudiadas en *T. thermophila*, incluyendo también hormonas peptídicas, aminos biógenas, tiroxina y catecolaminas, poseen efectos sobre el movimiento, quimiotaxis, fagocitosis,

regeneración de cilias, producción de hormonas y/o la división celular, entre otros [144]

Como se mencionó en el capítulo 1 (3.3) el patrón de expresión de numerosos genes, incluyendo DES7, se modifica significativamente entre las condiciones de hambreado y conjugación [145], y ante el agregado de colesterol o estigmasterol en el medio de cultivo, sugiriendo un rol fisiológico para DES7p que es todavía desconocido.

Un análisis bioinformático BLAST [146] empleando Des7p contra una base de datos de nucleótidos traducida (tblastn), también arrojó una secuencia en el insecto *Spodoptera littoralis*, con un E-valor de $2e^{-38}$, una cobertura de 96% y una identidad de 29%. Analizando la secuencia obtenida de *S. littoralis*, se observó que presenta la misma distribución topológica de grupos funcionales que la enzima Des7p. La proteína en *S. littoralis* es de tipo Nvd y su transcripción y expresión ha sido reportada en la glándula protorácica y testículos en el estadio larval, pero este proceso no ha sido estudiado en suspensiones celulares [147].

Esta aparente homología topológica nos llevó a analizar la expresión de DES7 de *T. thermophila* en un huésped *Spodoptera*. Para esto, seleccionamos el sistema de expresión comercial baculovirus-células Sf9 [148], ya empleado con éxito para expresar la proteína Daf-36 de *C. elegans* [143]. Además, dado que la actividad C-7 colesterol desaturasa no ha sido investigada previamente en la especie *S. frugiperda* en ninguna condición, fue necesario simultáneamente evaluar los niveles endógenos de esta proteína en las células sin transformar de este huésped.

Por otra parte el sistema baculovirus/células de insecto, es un sistema de expresión eficiente de proteínas complejas [149,150]. Ha sido utilizado para expresar genes heterólogos de orígenes tan diversos como bacterias, hongos, plantas, virus y humanos, como así también proteínas de variada localización subcelular [151].

Los baculovirus pertenecen a la familia *Baculoviridae* y tienen la capacidad de infectar específicamente determinados artrópodos y/o líneas celulares derivadas de estos. El sistema comercial BaculoGold Bright[®] consiste en la incorporación del gen de interés bajo el control del promotor de poliedrina al genoma del baculovirus (*Nucleopolyhedrovirus de Autographa californica*, AcNPV) y se realiza la infección en células Sf9 (células de ovario de *S. frugiperda*) para la expresión de la proteína

recombinante. En la Figura 16 se observan los pasos a seguir para la expresión de proteínas heterólogas empleando este sistema.

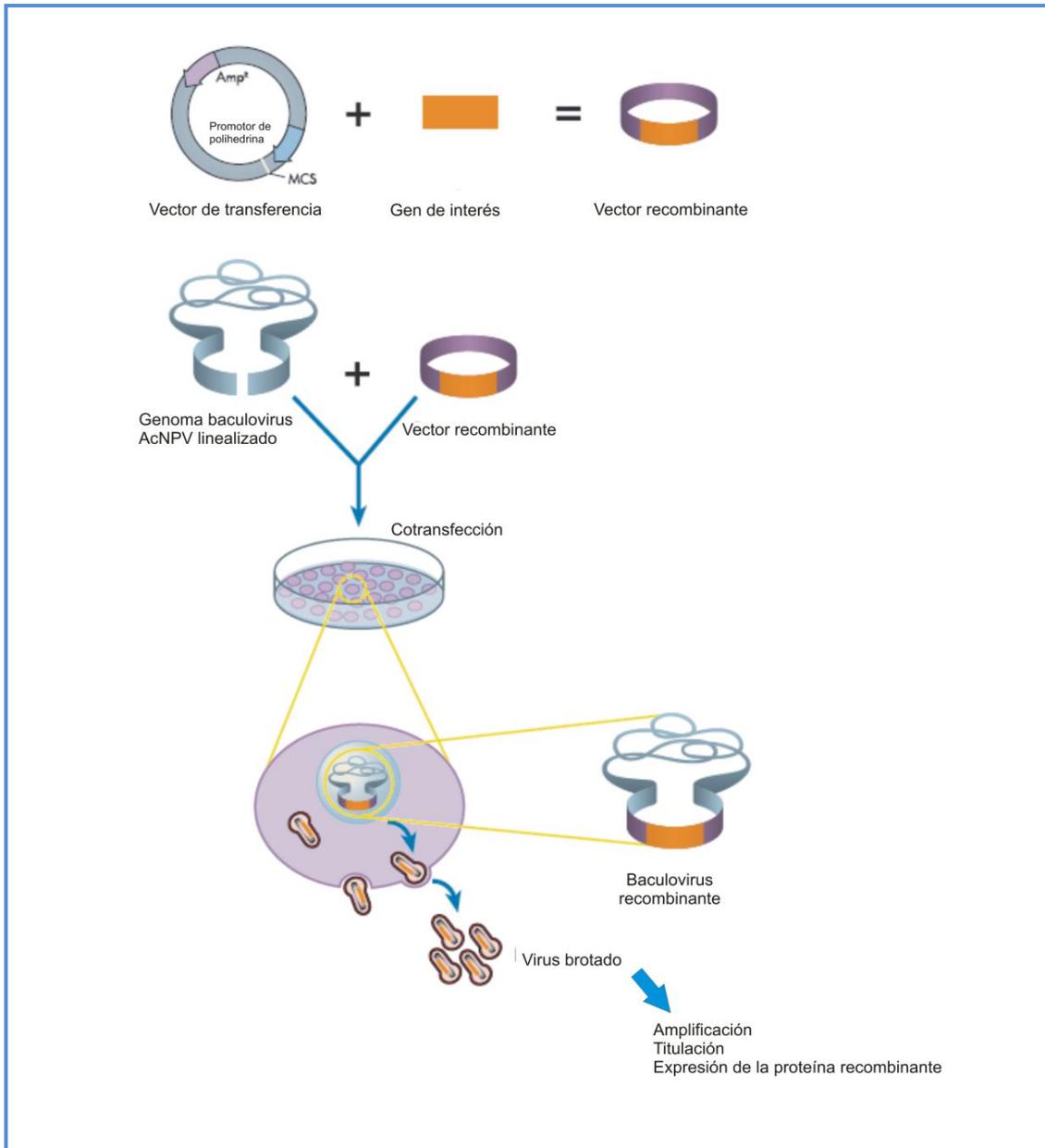


Figura 16. Procedimiento para la expresión de proteínas recombinantes en el sistema Baculovirus/células de insecto. El gen de interés se clona en un vector llamado de transferencia (en este caso pVL1392), río abajo del promotor de poliedrina. Este vector se co-transfecta en células *Sf9* junto al genoma viral linealizado y dentro del huésped ocurre la recombinación del gen de interés con el genoma viral, permitiendo la formación de partículas infectivas. Luego de amplificar y titular estas partículas infectivas, se procede nuevamente a la infección del huésped para producir la expresión de la proteína de interés. (adaptada de O'Reilly [150])

Actualmente no existe información sobre los sistemas redox asociados a las proteínas Rieske de eucariotas (Nvd o Daf36) por lo cual solo es posible hipotetizar sobre los mismos a partir de la información existente en procariontes. Dada la

homología topológica sugerida por Capyk y Eltis entre los sistemas Rieske de eucariotas y el sistema KSH de bacterias, estas son al presente las referencias más consistentes.

Los trabajos previos sobre la vía de degradación de colesterol en especies del genero *Rhodococcus* y *Mycobacterium tuberculosis* han propuesto que el funcionamiento del sistema de las enzimas de tipo Rieske identificadas como KSH podría tener características de “2 componentes”, estando integrados por una oxigenasa terminal KshA y la correspondiente reductasa KshB [152]. KshB pertenece al grupo de las ferredoxina reductasas previamente mencionado, dado que posee un dominio de unión a FAD, uno de unión a NADPH y un dominio [2S-2Fe] de tipo ferredoxina.

Como se mencionó antes, la enzima Des7p es similar en secuencia y topología a las enzimas Daf-36 y Nvd. Es esperable por lo tanto que el sistema redox que emplean todas ellas también sea similar, incluso al empleado por KshA de *Rhodococcus* sps.

2. Objetivos específicos

- Expresar el gen DES7 (TTHERM_00310640) de *T. thermophila* en células del insecto *Sf9*.
- Evaluar la actividad de la enzima correctamente expresada en la transformación de colesterol a 7-dehidrocolesterol utilizando el sistema redox del insecto.
- Reconocer y discriminar la expresión endógena de la misma enzima, perteneciente a las células de insecto y el efecto del agregado de colesterol exógeno.
- Estudiar posibles proteínas candidatas a formar parte del sistema redox de la enzima.

3. Resultados y Discusión

Para la expresión de la Des7p de *T. thermophila* en las células *Sf9*, fue necesario realizar una serie de procedimientos auxiliares. En primer lugar, el gen de interés (TTHERM_00310640) debió ser modificado según el código genético de las células de insecto, así como también optimizado según la frecuencia de uso de codones en este organismo. Además se fusionó el gen así obtenido de la empresa *Genescript* a una etiqueta de histidinas. El vector de transferencia empleado fue el pVL1392, y los genes sintéticos se clonaron en el sitio múltiple de clonado, entre los sitios de corte de enzimas de restricción PstI y BamHI, obteniéndose los constructos correspondientes. Dichas construcciones fueron co-transfectadas en las células huésped junto al ADN del baculovirus, un procedimiento que también se repitió con un vector vacío, a fin de generar un baculovirus que funcionara como control. En la Figura 17 se observa el esquema de las construcciones obtenidas.

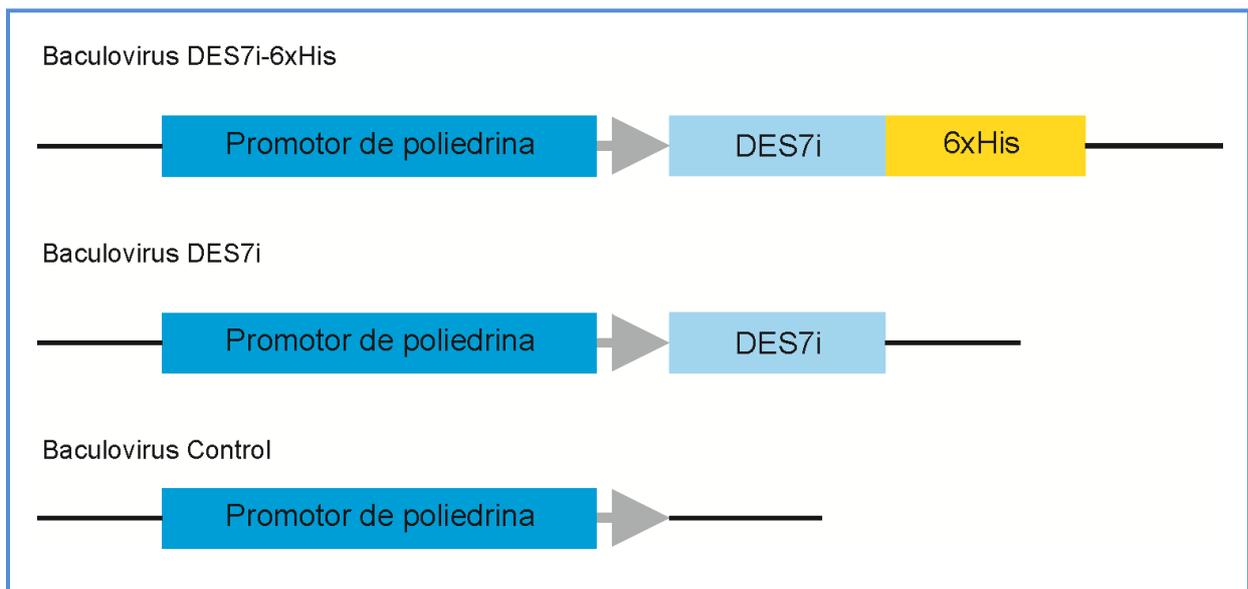


Figura 17. Construcciones que recombinan con el genoma de baculovirus.

Luego de la co-transfección, se realizó la amplificación de las partículas infectivas (con una multiplicidad de infección de 2), a fin de aumentar el número de las mismas y así lograr un título adecuado para poder llevar a cabo la expresión de las proteínas de interés (Materiales y métodos, 2.6.4). En esta instancia, se chequearon las construcciones de los baculovirus DES7i y DES7i-6xHis mediante una reacción en

cadena de la polimerasa con cebadores universales para el locus de recombinación en el genoma viral.

Como resultado de estas construcciones, se obtuvieron 3 baculovirus recombinantes (Figura 17): (i) baculovirus control, empleado como control negativo de expresión de la enzima, (ii) baculovirus DES7i con la secuencia del gen DES7i en su genoma y (iii) el baculovirus DES7i-6xHis, con la secuencia DES7i acompañada de una etiqueta de histidinas en el C-terminal para la detección mediante *Western blot*.

A los tres días post infección (3dpi) se cosecharon las células infectadas con los correspondientes virus, DES7i y DES7i-6xHis. A fin de evaluar la expresión de la proteína y conocer su localización subcelular, se realizó un *Western blot* empleando un anticuerpo primario dirigido hacia la etiqueta de histidinas. Las proteínas se analizaron en geles de poliacrilamida donde se sembraron los homogenatos y las fracciones microsomales provenientes de las células infectadas con ambos baculovirus. Para el revelado se usaron como control negativo los homogenatos y fracciones microsomales provenientes de las células infectadas con el baculovirus DES7i pero sin la etiqueta histidina, por lo cual la proteína expresada no es reconocida por el anticuerpo.

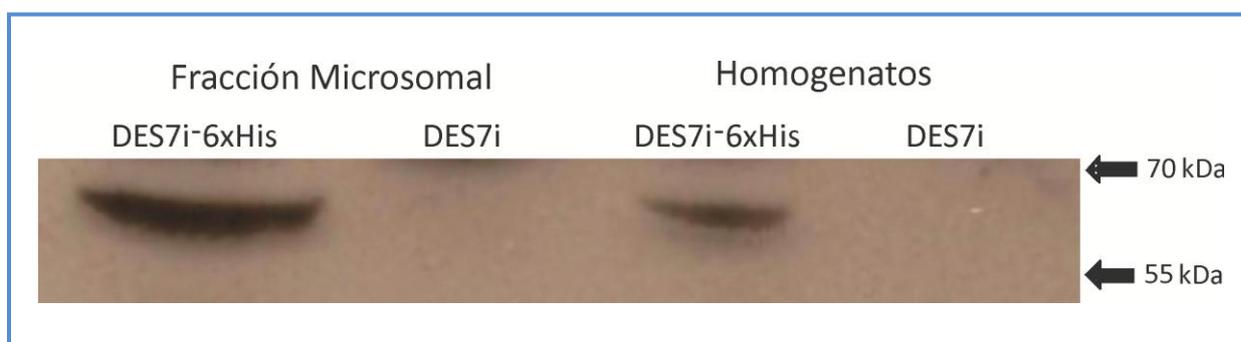


Figura 18. Los extractos celulares (homogenatos) y las fracciones microsomales purificadas muestran la presencia de una banda de aproximadamente 62 kDa correspondiente a la proteína Des7pi expresada con la etiqueta de histidinas (Des7i-6xHis) mientras que las que carecen de la etiqueta son empleadas como control negativo (Des7i). La mayor intensidad en la fracción microsomal indica un enriquecimiento de la proteína en esta fracción.

En la Figura 18 se observa la presencia de una banda de tamaño aproximado de 62 kDa tanto en la calle correspondiente al homogenato como en la calle correspondiente a la fracción microsomal, provenientes de las células infectadas con el baculovirus DES7i-6xHis. En cambio no se observa dicha banda en las 2 calles correspondientes a las células infectadas con el baculovirus DES7i sin etiqueta. La

presencia de la banda en las calles mencionadas, así como también la ausencia de la banda en las muestras empleadas como control (sin etiqueta de histidinas) y el tamaño aproximado similar al esperado, permiten inferir la correcta expresión. Por otra parte la presencia de una banda en la fracción microsomal y que la intensidad de esta banda es mayor que en el homogenato, sugieren un enriquecimiento de la proteína en esta fracción, confirmando estudios previos de localización realizados en *T. thermophila* que mostraron precisamente la localización microsomal de la enzima [72].

Habiendo evaluado la correcta expresión de la proteína mediante el sistema baculovirus en células *Sf9*, se compararon los perfiles de esteroides acumulados en homogenatos provenientes de células recolectadas 3 días post infección en los 3 sistemas de baculovirus obtenidos (DES7i, DES7i-6xHis, Control) empleando cromatografía líquida de alta performance (HPLC,) y cromatografía gaseosa acoplada un detector de masa (CG-MS).

En la Figura 19 se muestran los perfiles obtenidos por HPLC de los esteroides extraídos de las células control y las muestras expresando Des7i, medidos por absorbancia a 210 nm y a 285 nm, esta última específica para la detección de esteroides con dobles enlaces conjugados.

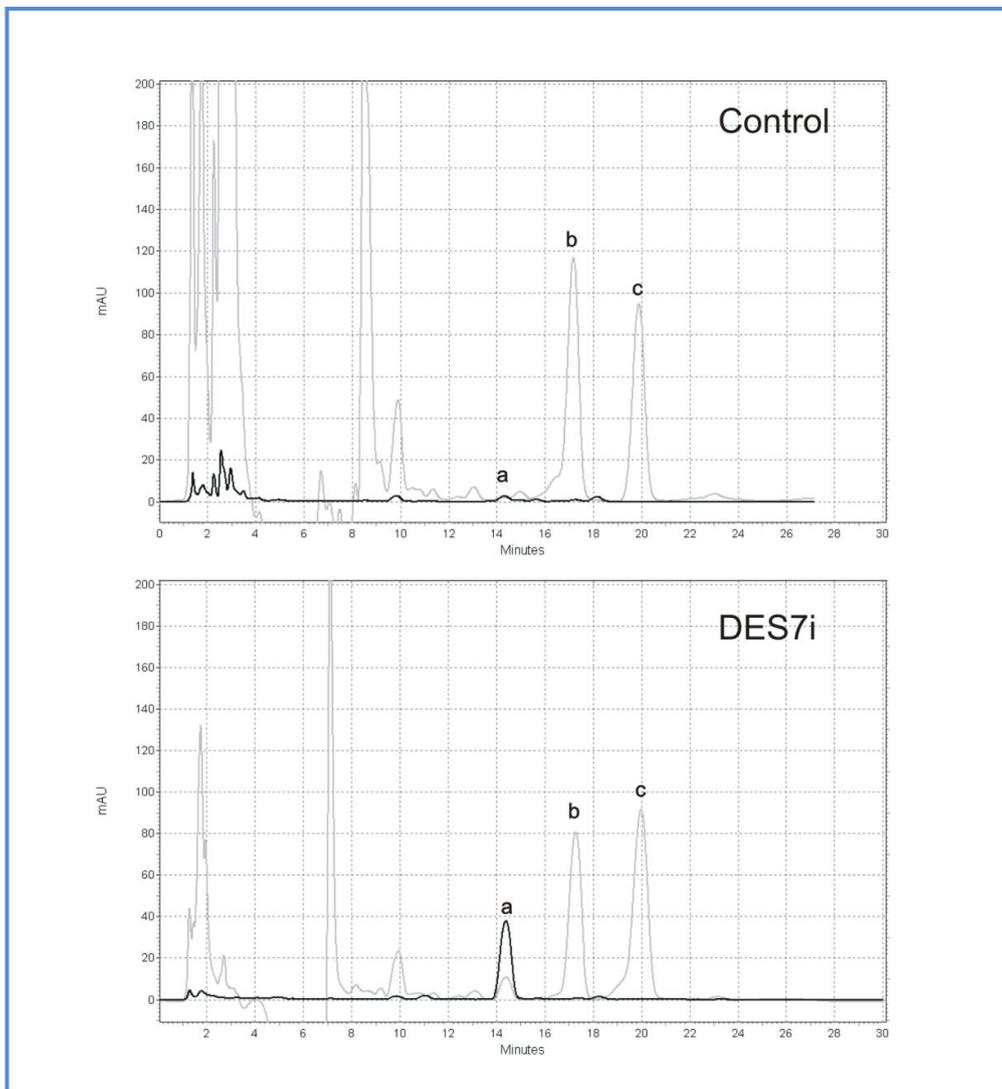


Figura 19. Cromatogramas obtenidos por HPLC mostrando el perfil de esteroides de células infectadas con los baculovirus Control y DES7i. Se observa la producción basal de 7-dehidrocolesterol en las células control (a), mientras que en el caso de las células DES7i, se incrementa la cantidad de 7DHC notablemente. Los picos b y c corresponden a colesterol y estigmasterol (estándar interno) respectivamente.

La identidad del 7-dehidrocolesterol se confirmó mediante un espectro de absorción comparado, que se indica en la Figura 20. Los picos característicos coinciden con los informados en la bibliografía, en el rango entre 270 -290 nm [153].

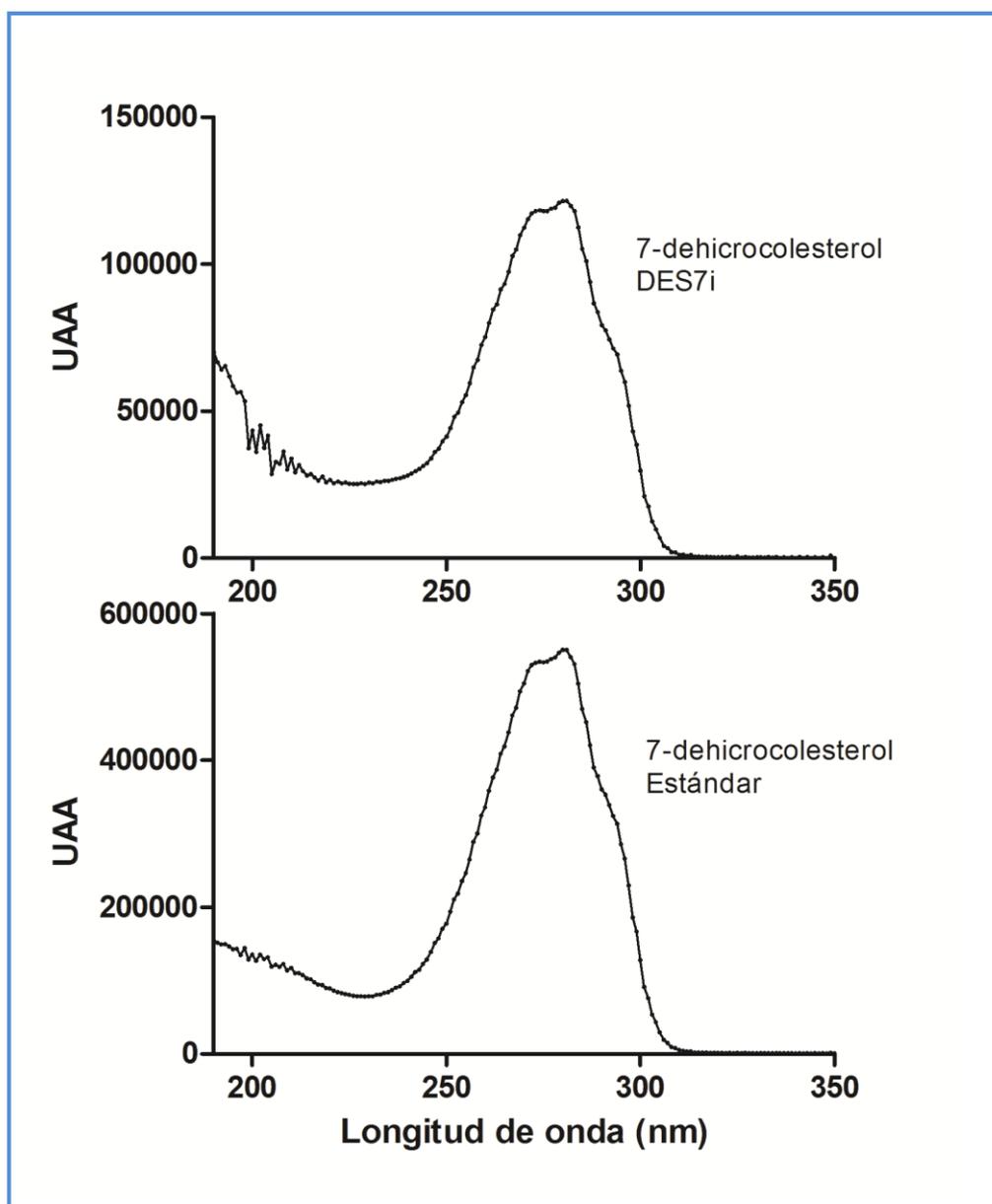


Figura 20. Barrido espectral del 7-dehidrocolesterol de las muestras comparado con el estándar. El barrido se realizó durante la cromatografía HPLC.

En el cromatograma representado en la Figura 19 se puede observar que los extractos de células control contienen colesterol (b) y una pequeña cantidad de 7-dehidrocolesterol (a) correspondiente a la producción basal de este compuesto por parte de las células *Sf9*. En cambio en el cromatograma correspondiente a las muestras expresando DES7i se observa que la concentración de 7-dehidrocolesterol es superior (16,3 veces).

Se ha reportado que la relación colesterol/fosfolípidos en la membrana es significativamente menor en insectos que en vertebrados [154], y que esta tasa puede

descender aun más por la infección con baculovirus, en la cual se interfieren procesos del desarrollo de los insectos. Por este motivo, y para prevenir la limitación de sustrato, se decidió suplementar los cultivos con colesterol exógeno.

Debido a que las células del insecto pueden aportar un cierto nivel de 7-DHC derivado de su producción endógena, se procedió a evaluar separadamente su posible contribución mediante una serie de experimentos. Como primera medida, y ante la posibilidad de una limitación en el sustrato, además de las condiciones mencionadas, se ensayó el agregado adicional de colesterol exógeno vehiculizado en un dispersante (metil- β -ciclodextrina). Debido a este agregado, realizado a los 3 días de infección con el virus, se extendió la incubación durante 24 hs más, a fin de asegurar un periodo suficiente para la biotransformación del sustrato (colesterol). Los resultados comparativos se muestran en la Figura 21.

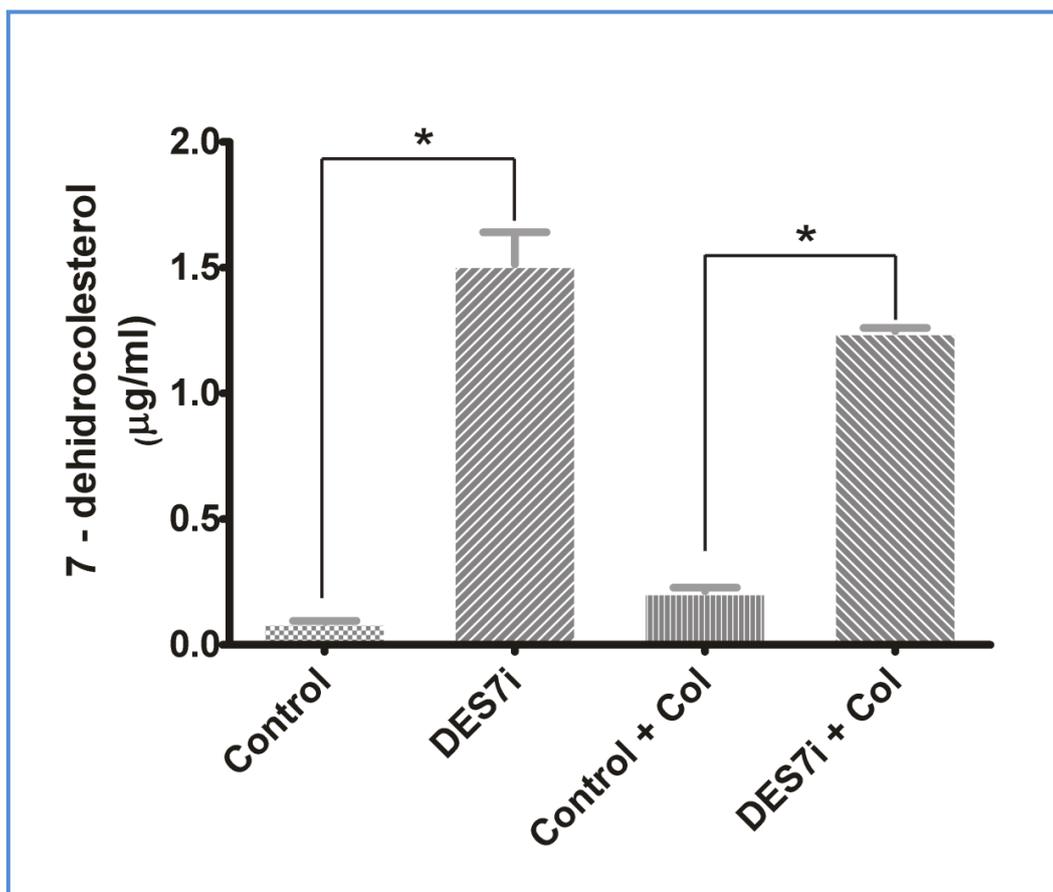


Figura 21. Acumulación de 7-dehidrocolesterol en cultivos de *Sf9* infectados con virus portadores del gen *Des7i*. Se observan diferencias significativas (*) entre el nivel de 7DHC acumulado por las células infectadas con *DES7i* y control, con y sin agregado de colesterol exógeno.

El análisis de los resultados indica que, en todas las condiciones ensayadas, la acumulación de 7-dehidrocolesterol fue mucho mayor en las células expresando el gen DES7i respecto de su correspondiente control ($P < 0,01$). Por otra parte el agregado adicional de colesterol no afectó los niveles máximos acumulados de 7-dehidrocolesterol en forma significativa, tanto en el control como en los transformantes expresando Des7i. En efecto, las células infectadas con el virus control acumularon $0,092 \pm 0,004 \mu\text{g/ml}$ de 7-dehidrocolesterol en el caso sin colesterol adicional (S/C) y $0,21 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ con dicha adición (C/C). Por otra parte, las células infectadas expresando DES7i produjeron $1,5 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$ (S/C) y $1,25 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ (C/C) de 7-dehidrocolesterol.

Esto indica un aumento de 16,3 veces en el nivel de 7-dehidrocolesterol para el caso de cultivos S/C y de 5,95 veces para cultivos C/C, claramente superiores a los cultivos de células infectadas con virus control. Si bien esta diferencia parece importante, no hay diferencia significativa entre los niveles de 7-dehidrocolesterol de ambas células control (S/C y C/C), ni entre las células DES7i (S/C y C/C).

Las muestras fueron también analizadas por GC-MS, confirmándose el aumento en la producción de 7-dehidrocolesterol en la cepa recombinante. Nuevamente se observa en este caso el incremento en la producción de 7-dehidrocolesterol en las células infectadas con DES7i respecto a las infectadas con el control (Figura 22).

Las especies a y b fueron identificadas por su perfil de fragmentación como 7-dehidrocolesterol (a) y colesterol (b) respectivamente (Figura 23), empleando la base de datos NIST.

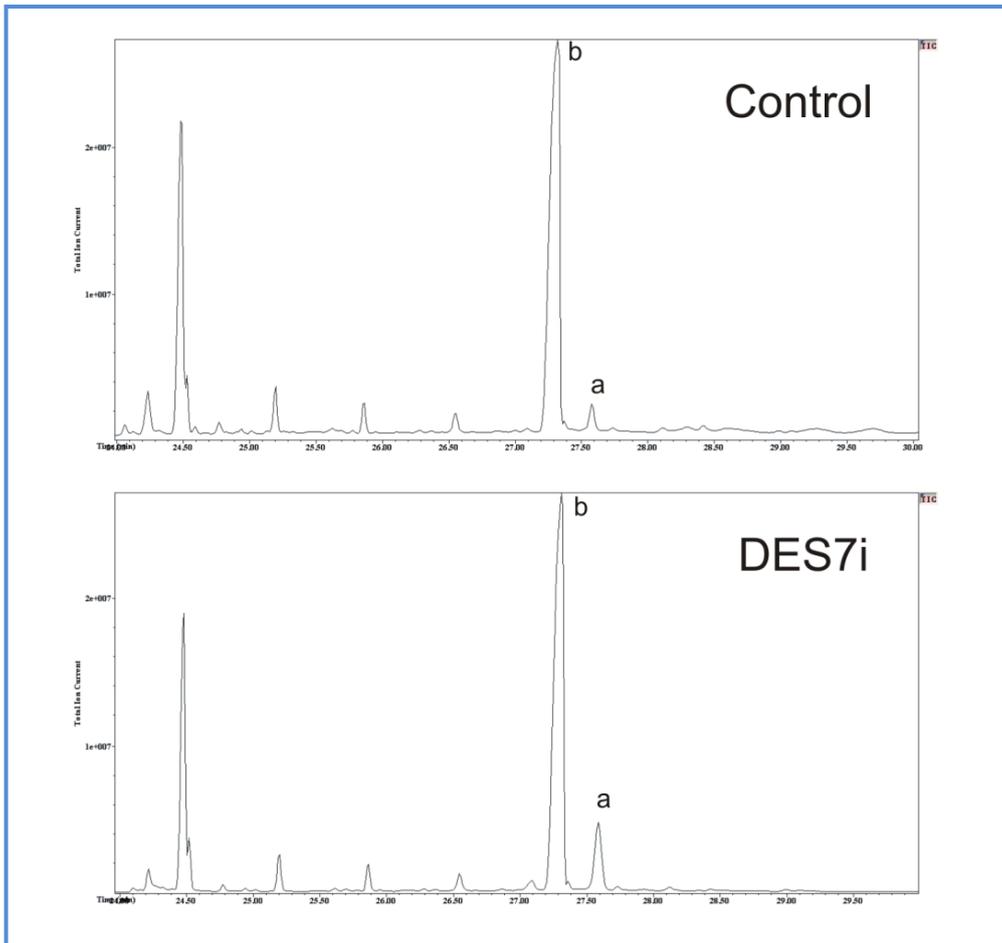


Figura 22. Identificación y cuantificación de las especies aisladas mediante CG-MS. Se observa el incremento en el 7-dehidrocolesterol (a) en las células infectadas con DES7i respecto a las Control. El pico (b) corresponde de colesterol.

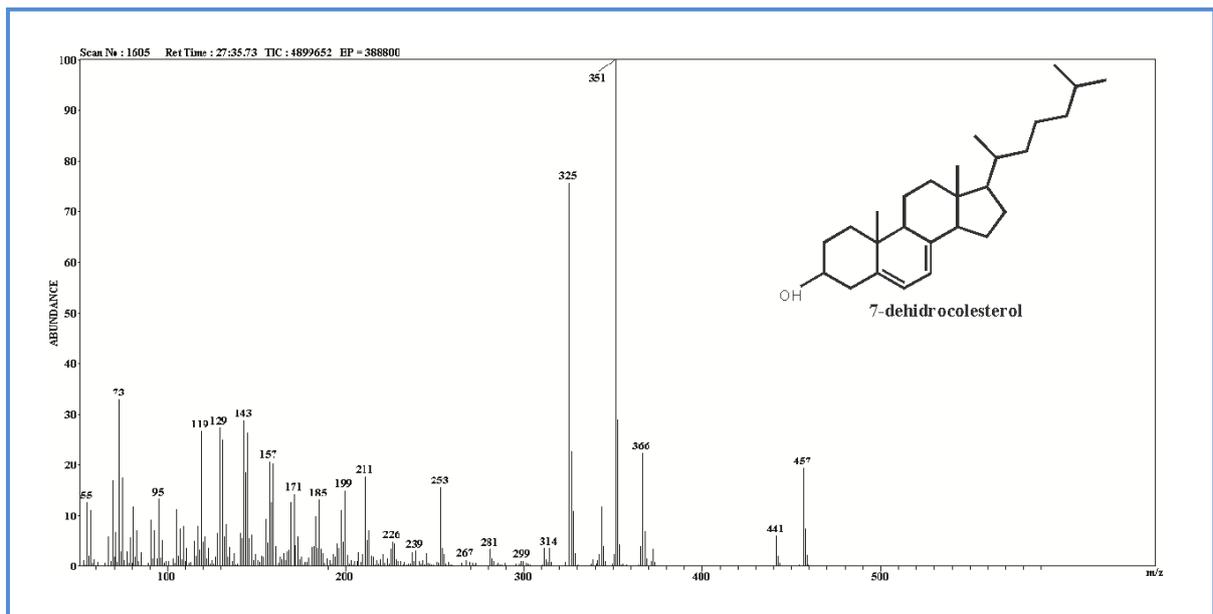


Figura 23. Patrón de fragmentación indicativo de 7-dehidrocolesterol, según la comparación con la base de datos NIST. El material analizado corresponde al pico (a) de la Figura 22.

A fin de discriminar el aporte de 7-dehidrocolesterol generado a partir del sistema de expresión respecto del endógeno aportado por el huésped (*Sf9*), se realizó una incubación con colesterol radiactivo. Para ello se empleó ^3H colesterol añadido a los 3 días posteriores a la infección con virus control y DES7i se incubaron durante 5 horas adicionales. Luego se analizaron los esteroides por HPLC acoplado a un detector de partículas beta (Figura 24).

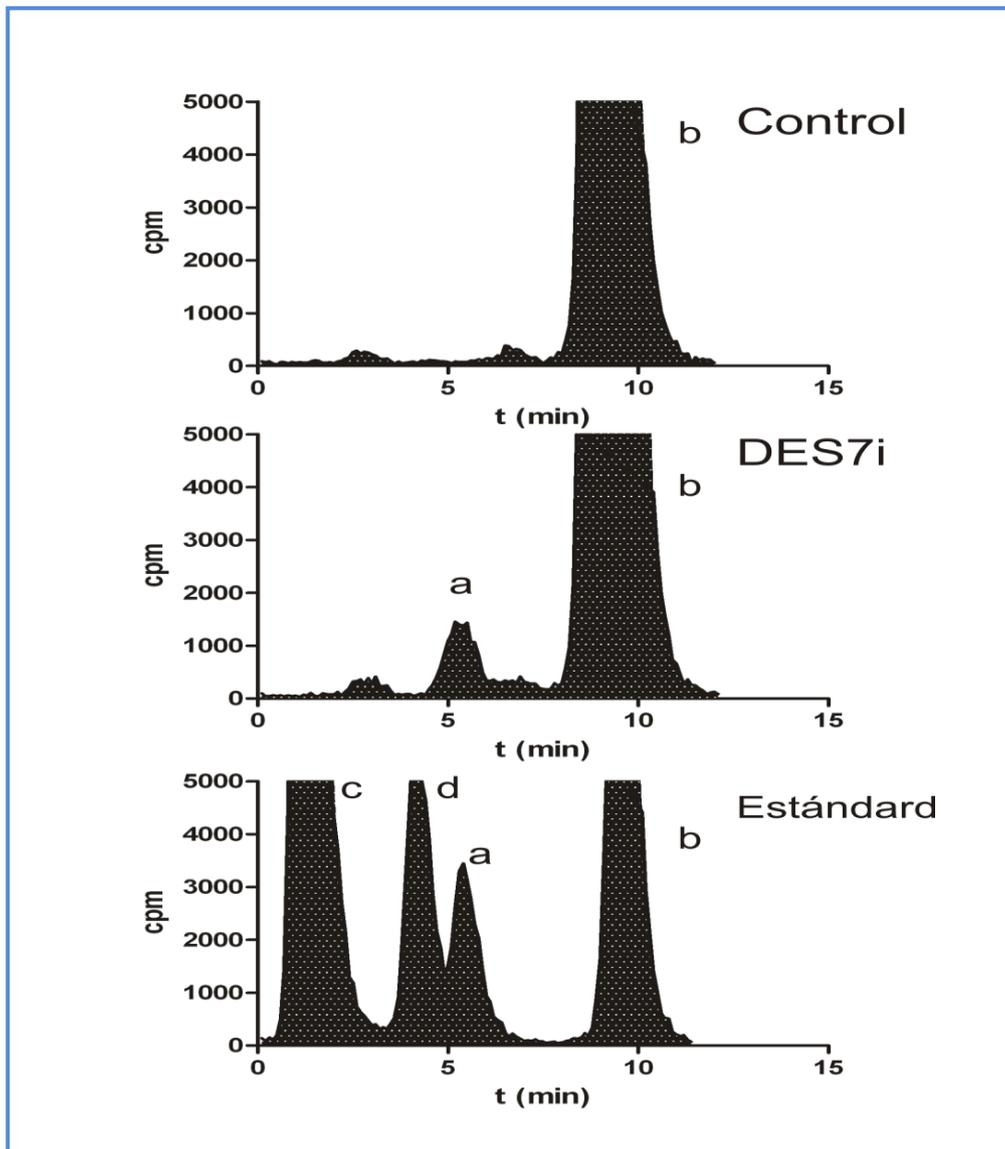


Figura 24. Perfil de esteroides obtenidos luego de la incubación con ^3H colesterol empleando las construcciones control (A) y Des7i (B). La identificación de las especies químicas se muestra en el grafico C, con muestras preparadas a partir un cultivo de la cepa salvaje de *T. thermophila* con ^3H colesterol. Las especies corresponden a: 7-dehidrocolesterol (a); colesterol (b); 7,22-bis-dehidrocolesterol (C) y 22-dehidrocolesterol (d). Se observa el incremento del nivel correspondiente a 7-dehidrocolesterol en las células infectadas con DES7i respecto a las control.

La cuantificación de las especies radiactivas generadas a partir de esta incubación mostró notables diferencias entre las condiciones control y Des7i. En efecto, mientras en la condición control solo un 0.04% del colesterol radiactivo fue transformado en 7-dehidrocolesterol, en las células infectadas con el virus DES7i se acumuló 1,5% de 7-dehidrocolesterol en el mismo período. Este aumento confirma la expresión de la enzima activa en las células transformadas de insecto. Como se indicó anteriormente en este capítulo, el análisis bioinformático agrupó a la proteína Des7p junto a Neverland/DAF36 de *D. melanogaster*, *C. elegans* y *S. littoralis*, como así también junto a otras proteínas Rieske de origen bacteriano como KshA de *Rhodococcus sp.*, con actividad 3-cetoesteroid-9 α -hidroxilasa (KSH) (Figura 14).

La actividad de Des7p de *T. thermophila* en el contexto de *Spodoptera* indica que hay una conservación significativa en el sistema redox necesario para el funcionamiento de Des7p, ya que la enzima del ciliado puede funcionar en el contexto del sistema de transporte de electrones de las células del insecto. Dada la enorme distancia evolutiva existente entre ambos organismos y la ausencia de esta actividad enzimática en gran parte del dominio eucariota, la C-7 colesterol desaturasa parece ser otro ejemplo de transferencia horizontal de genes como ha sido propuesto para la HMG-CoA reductasa, la escualeno-hopano ciclasa, la escualeno sintasa y la C-24 esterol desaturasa similar (C-24 esterol des-etilasa) aunque en este caso, la transferencia pudo darse desde un organismo unicelular Opisthokonta, a un ancestro fagotrópico de los ciliados [72,82,155].

Como se indicó previamente, no existe información sobre el sistema redox asociado a las proteínas Rieske de eucariotas (Nvd o Daf36) por lo cual solo es posible inferir dicho sistema a partir de la información existente en procariotas. Un punto de partida puede ser el conocimiento existente sobre el sistema KshA/KshB de la bacteria *Rhodococcus sp.* y su homólogo en *Mycobacterium*. KshB pertenece al grupo de las ferredoxin reductasas, dado que posee un dominio de unión a FAD, uno de unión a NADPH y un dominio [2S-2Fe] de tipo planta.

Tabla 6. Proteínas con centro Rieske identificadas por análisis bioinformático en *T. thermophila*. Se indica la Des7p con un *.

Clase de Proteína	Gen ID	Uniprot ID	Código pfam	pfam	Longitud (aa)
Ferredoxinas	TTHERM_00161210	Q22W11	PF00111	Fer2	172
	TTHERM_00161840	Q22VV0	PF00111	Fer2	165
	TTHERM_00256970	Q23QI1	PF00111	Fer2	130
Oxigenasas/ Oxidasas	TTHERM_00310640*	I7ML19	PF00355	Rieske	514
	TTHERM_00241700	I7M403	PF13085	Fer2_3	312
			PF13534	Fer4_17	
	TTHERM_01250100	Q23YG3	PF14691	Fer4_20	1023
			PF13450	NAD_binding_8	
			PF01180	DHO_dh	
			PF14697	Fer4_21	
Reductasas	TTHERM_00194260	Q23KA9	PF13510	Fer2.4	718
			PF10588	NADH-G 4Fe-4S 3	
			PF00384	Molybdopterin	
			PF09326	DUF1982	
	TTHERM_00622710	Q241B3	PF00355	Rieske	631
			PF07992	Pyr_redox_2	
			PF00070	Pyr_redox	
			PF14759	Reductase_C	
	TTHERM_00295080	I7MIC7	PF00355	Rieske	269
	TTHERM_01104910	Q24D68	PF00355	Rieske	686
PF07992			Pyr redox 2		
TTHERM_00294640	I7MDW5	PF12838	Fer4_7	236	

Tomando en cuenta la información experimental existente sobre el sistema KSHB, se realizó una búsqueda bioinformática de las proteínas con dominio [2S-2Fe] presentes en el genoma de *T. thermophila*, a fin de encontrar especies candidatas que podrían formar parte del sistema redox asociado. En la Tabla 6 se muestran todas las proteínas halladas con dominio [2S-2Fe], que incluyeron 3 ferredoxinas, 5 reductasas y 2 oxidasas, además de la oxigenasa Des7p objeto de este estudio. Siendo todas ellas proteínas con función putativa, se investigó su rol en otros sistemas. Entre las reductasas se identificaron una posible NADH-ubiquinina oxidoreductasa (código *Uniprot* Q23KA9) mitocondrial y unida a membrana y una Ubiquinol-citocromo c reductasa (I7MIC7), ambas pertenecientes a la cadena respiratoria de electrones; una

NAD(FAD)-dehidrogenasa (Q241B3) y una Ferredoxina-NAD(+) reductasa (Q24D68), involucradas en el equilibrio redox en metazoos, y una NADH dehidrogenasa (I7MDW5) involucrada en la reducción de la ubiquinona. En el grupo de las oxidasas/oxigenasas se encontraron una succinato dehidrogenasa (I7M403) mitocondrial, y la di-hidro-pirimidin-dehidrogenasa (Q23YG3) involucrada en la biosíntesis de la uridina monofosfato, además de la oxigenasa Des7p (I7ML19) involucrada en el metabolismo de esteroides.

Comparando con los dominios presentes en KshB, 2 de las reductasas, (Q24D68) y una NAD(FAD)-dehidrogenasa (Q241B3), poseen el dominio de unión a flavina (FAD), el dominio de unión a NADH y el dominio [2S-2Fe] que sería requerido para la actividad de Des7p. Es importante destacar que si bien, el dominio [2Fe-2S] descrito en la reductasa KshB es de tipo planta, los encontrados en estas dos reductasas de *T. thermophila* son de tipo Rieske. Profundizando el análisis para estas 2 proteínas putativas, se encontró que en la base de datos STRING [156], que describe interacciones probables entre proteínas, la denominada NAD(FAD)-dehidrogenasa (Q241B3) interaccionaría con Des7p de *T. thermophila*, con lo cual refuerza la hipótesis sobre que sería el donante más probable. La predicción encontrada en la base de datos STRING está basada por un lado en la vecindad de los genes en bacterias del filo *Actinobacteria* y *Proteobacteria*, y por otro lado en la co-expresión de homólogos en otros grupos taxonómicos, pero no aun en datos en ciliados ni en eucariotas, por lo cual para evaluar esta hipótesis es necesario acompañarla de un desarrollo experimental.

Por otro lado, se realizó un alineamiento mediante el programa BLAST empleando como templatado la secuencia de la proteína NAD(FAD)- dehidrogenasa (Q241B3) y sus resultados mostraron proteínas putativas en *B. mori* y *S. frugiperda*, con los mismos 3 motivos identificados en la reductasa KshB (con la salvedad del dominio [2Fe-2S] tipo Rieske), que podrían explicar la funcionalidad de Des7p en las células *Sf9*.

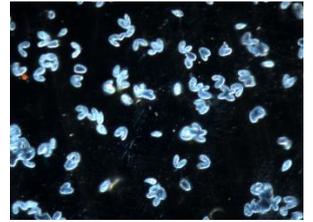
4. Conclusiones

Los resultados obtenidos demuestran que el gen DES7 de *T. thermophila* convenientemente optimizado se expresa en forma activa en la línea celular de insecto (Sf9). De este modo DES7 es el primer gen de un ciliado, codificante para una enzima microsomal, que se expresa en una línea celular de insecto, y Des7p la primer proteína con actividad C-7(8) colesterol desaturasa de ciliado expresada en forma heteróloga.

La localización de la enzima expresada concuerda con la localización microsomal sugerida en *T. thermophila*, como resulta del análisis de extractos obtenidos de la fracción microsomal aislada.

Considerando que la enzima del ciliado puede funcionar en el contexto del sistema redox del insecto, se concluye que existe una conservación significativa en el sistema dador de electrones requerido por la enzima del ciliado y la del insecto.

Dada la homología entre Des7p y la proteína KshA de la bacteria *Rhodococcus sp.* Se postula una probable homología también en el sistema redox asociado. En tal sentido, varios genes, en el genoma de *T. thermophila*, que codifican para proteínas con dominios [2S-2Fe] podrían actuar como dadores de electrones. Al momento no es posible sugerir una única reductasa acoplada a Des7p, pero puede especularse que el gen que codifica para la proteína putativa NAD(FAD)-dehidrogenasa (Q241B3) podría ser un buen candidato.



Capítulo 3

Expresión de C-5 esteroles desaturasa
(Des5Ap) de *T. thermophila* en *S. cerevisiae*.

1. Introducción

Entre las modificaciones sobre esteroides mencionadas en *T. thermophila* se encuentra la correspondiente a la desaturación en posición C-5(6). Esta actividad es llevada a cabo por la enzima C-5(6) esteroide desaturasa (Des5Ap). Recientemente fue identificado el gen codificante (DES5A, THERM_01194720) a través del noqueo somático del mismo [8] y presenta 3 intrones en su estructura. Des5Ap es una proteína de 403 aminoácidos, miembro de la superfamilia de hidroxilasas de ácidos grasos [74]. Esta superfamilia incluye hidroxilasas de ácidos grasos, de caroteno y desaturasas de esteroides. Dentro de las enzimas involucradas en el metabolismo de esteroides, la C-5(6) esteroide desaturasa y la C-4 metil oxidasa pertenecen a esta familia. Como característica esencial, las enzimas pertenecientes a esta superfamilia poseen dos copias de un motivo HXHH y son todas proteínas integrales de membrana [66].

La C-5(6) esteroide desaturasa es una enzima ubicua entre los eucariotas, por ejemplo presente en *Homo sapiens* (Metazoa), *S. cerevisiae* (Fungi), *Monosiga brevicollis* (Choanoflagellata), *Arabidopsis thaliana* (Plantae) y *Trypanosoma cruzi* (Excavata) [11]. El análisis de la secuencia de los ortólogos presentes en todos los organismos, incluyendo los evolutivamente distantes, mostró que presentan 4 segmentos hidrofóbicos y 3 motivos ricos en histidina, altamente conservados. Los motivos ricos en histidina están probablemente involucrados en la unión de átomos de hierro [157,158].

En *S. cerevisiae* y en hongos en general, la biosíntesis de esteroides tiene como producto final al ergosterol, un esteroide de 28 carbonos (C28), con dobles enlaces en las posiciones C-5(6), C-7(8) y C-22(23), y un grupo metilo en la posición C-24 (Figura 25).

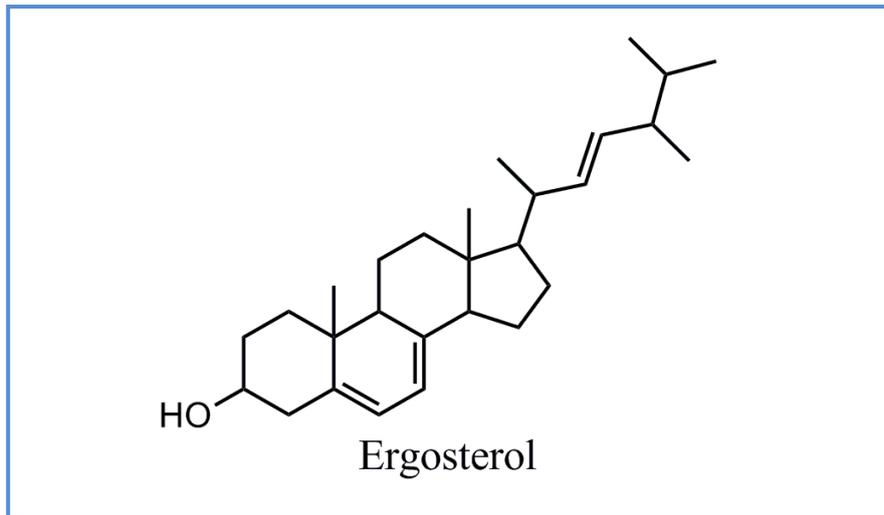


Figura 25. El esteroles principal encontrado en hongos es el ergosterol.

El ergosterol es blanco de numerosos antifúngicos. Un ejemplo de este tipo de antifúngicos son los denominados poliénicos siendo la Anfotericina B un representante de este grupo, cuyo mecanismo de acción consiste en la unión al ergosterol y la alteración de la permeabilidad de la membrana celular. Por otro lado, se han aislado y obtenido mutantes en los genes *erg* (involucrados en la biosíntesis de ergosterol), y se han estudiado en cuanto a su perfil de esteroides y su respuesta a diferentes antifúngicos y antibióticos. Además del mecanismo indicado de los antifúngicos poliénicos, otros compuestos como la cicloheximida tienen acción sobre las levaduras y este efecto está relacionado con su ingreso a la célula, dado que su acción de inhibición de la síntesis proteica ocurre dentro de la célula. Las mutantes en los genes *erg* exhiben variadas permeabilidades de membrana respecto a la cepa salvaje y con ello también presentan diferente sensibilidad a la cicloheximida, siendo en su mayoría más sensibles que la cepa salvaje [159].

Como se indicó en la introducción, la biosíntesis de esteroides es un proceso costoso desde el punto de vista energético y en el caso del ergosterol requiere entre 12 y 14 equivalentes de ATP, además de oxígeno molecular [119,160]. En un ambiente anaeróbico, o en ausencia de oxígeno, *S. cerevisiae* necesita incorporar esteroides del medio para sobrevivir [119], algo que no puede hacer en presencia de oxígeno.

El primer gen identificado con actividad C-5(6) esteroles desaturasa fue *ERG3*, en *S. cerevisiae* [161]. Fue identificado valiéndose de una biblioteca de expresión, de una cepa mutante *erg3* (sin actividad, generada al azar) y el fenotipo de hipersensibilidad a

cicloheximida de dicha cepa mutante. La complementación con el gen *ERG3* de *S. cerevisiae* restauró la síntesis de ergosterol y además aumento la resistencia a la cicloheximida.

En *S. cerevisiae*, la C-5(6) esterol desaturasa (Erg3p) es una enzima localizada en el retículo endoplásmico [162], su disrupción no resulta letal y ocasiona un bloqueo en la biosíntesis de ergosterol, acumulándose otros intermediarios de la biosíntesis. En estudios previos, la levadura mutante nula de *erg3* ha sido complementada con éxito con C-5(6) esterol desaturasas de plantas, mamíferos y algas [163,164], dando lugar a una poderosa herramienta para confirmar la funcionalidad de genes homólogos.

Erg3p, así como las homologas en vertebrados y plantas, requiere oxígeno molecular y el pasaje de electrones desde un cofactor reducido NAD(P)H, para lo cual emplea el sistema citocromo *b₅*/citocromo *b₅* reductasa [165,166]. Des5Ap requiere la transferencia de electrones provenientes de citocromo *b₅* microsomal para su actividad [74].

El citocromo *b₅* es una proteína pequeña, anclada a la membrana del retículo endoplásmico con un dominio globular citosólico de unión al grupo hemo en el N-terminal y un dominio hidrofóbico transmembrana seguido de una secuencia señal de localización en ER [167]. Es una proteína ubicua, que parece haber surgido muy temprano en la evolución. Intervienen en diversas reacciones de oxidación en la célula, como la introducción de dobles enlaces en los ácidos grasos y en esteroides. Puede actuar de diferentes formas, por ejemplo ser la proteína que transfiere los electrones desde la NADH citocromo *b₅* reductasa, a la desaturasa final, o bien puede formar parte de la oxidasa final, como en el caso de las sulfito oxidasas, D6-desaturasa-simil y L-lactato deshidrogenasas [168–170].

Además de la DES5A, la enzima esteroil-CoA desaturasa en *Tetrahymena* mostró la dependencia de esta enzima respecto del sistema de transferencia de electrones del citocromo *b₅* [171], evidenciando el funcionamiento del sistema citocromo *b₅* en *Tetrahymena*.

Es interesante que estudios estructurales de citocromo *b₅* de *Tetrahymena thermophila* sugieren que la proteína del ciliado puede diferir ligeramente, tanto en masa molecular como en el patrón de absorción espectrofotométrica, de los citocromos *b₅* de mamíferos y levaduras [172]. Esta divergencia puede tener origen en

una rápida evolución del citocromo b_5 del ciliado, un fenómeno ya reportado para otros genes de ciliados [88,173], y que da lugar a la pregunta sobre si las esterol desaturasas de *Tetrahymena* de evolución rápida siguen siendo compatibles con la maquinaria microsomal de transporte de electrones en organismos lejanamente relacionados como *S. cerevisiae*. La pregunta es reforzada por el metabolismo de esteroides inusual de *Tetrahymena*. Para atender a estas preguntas, se expresó una variante de DES5A optimizada en la frecuencia de uso de codones en *S. cerevisiae* y se probó tanto la funcionalidad como la localización. Además se expresó la DES5A fusionada a GFP en *Tetrahymena*, para comparar la localización en estos 2 organismos lejanamente relacionados.

S. cerevisiae es un organismo eucariota modelo, con una variada gama de herramientas experimentales que la hacen de elección en muchos casos. La expresión de genes en este sistema se vuelve una herramienta interesante para caracterizar la función y/o la actividad de proteínas de otros organismos. Tal es así que se han expresado diversas proteínas que incluyen algunas de *Tetrahymena* como la Histona H2A [174], el factor de liberación de la traducción eRF1 [175], la proteína de la vía de recuperación de metionina mtnBD [176] y la ribozima "Intron del Grupo I" [177].

La expresión del gen DES5A en este sistema suma un gen más a la lista, y además abre las puertas a la expresión de proteínas de membrana de *Tetrahymena*, contando también con la información de que el sistema de transporte de electrones Cit b_5 /Cit b_5 reductasa es compatible y proteínas que requieren de este sistema puede funcionar en este contexto heterólogo. Tavares *et al.* [178] expresaron una desaturasa de ácidos grasos de *Paramecium tetraurelia* en este mismo sistema. Esta enzima también tiene un mecanismo relacionado con citocromo b_5 , pero es una proteína que contiene el dominio citocromo b_5 fusionado a su N-terminal, y de esta forma no requiere de la funcionalidad de los citocromos b_5 propios de *S. cerevisiae*.

2. Objetivos específicos

- Expresar el gen DES5A (TTHERM_01194720) de *T. thermophila* en una cepa de *S. cerevisiae* sin actividad C-5 esteroles desaturasa (cepa *erg3*).
- Evaluar la recuperación de la biosíntesis de ergosterol utilizando el sistema redox de *S. cerevisiae* en la cepa complementada con DES5Alev.
- Localizar la enzima Des5Ap en *T. thermophila* y en *S. cerevisiae*.

3. Resultados y discusión

Se identificaron varios genes putativos de citocromo b_5 en *Tetrahymena*. Buscando en el genoma los dominios correspondientes a citocromo b_5 (Pfam: PF00173) se identificaron 13 secuencias, 6 de las cuales poseen un tamaño de entre 109 y 227 aminoácidos e incluyen un dominio hidrofóbico transmembrana, y que serían homólogos a citocromos b_5 libres en otros organismos. Las 7 secuencias restantes son similares pero de mayor tamaño, y poseen otros dominios como dopamina beta-monooxigenasa (DOMON), dominio de unión a catecolamina (DOH) y desaturasa de ácidos grasos, los cuales no corresponderían a citocromos b_5 libres.

Un árbol filogenético generado por el método de máxima verosimilitud basado en 43 secuencias aminoacídicas de proteínas citocromo b_5 incluyendo las 6 secuencias homólogas putativas de *Tetrahymena*, mostró el agrupamiento de secuencias por animales, hongos y plantas de acuerdo al linaje (Figura 26). Las secuencias de *Tetrahymena* no agrupan con una rama específica y exhiben la divergencia extensiva reportada para las proteínas citocromo b_5 de protistas [168].

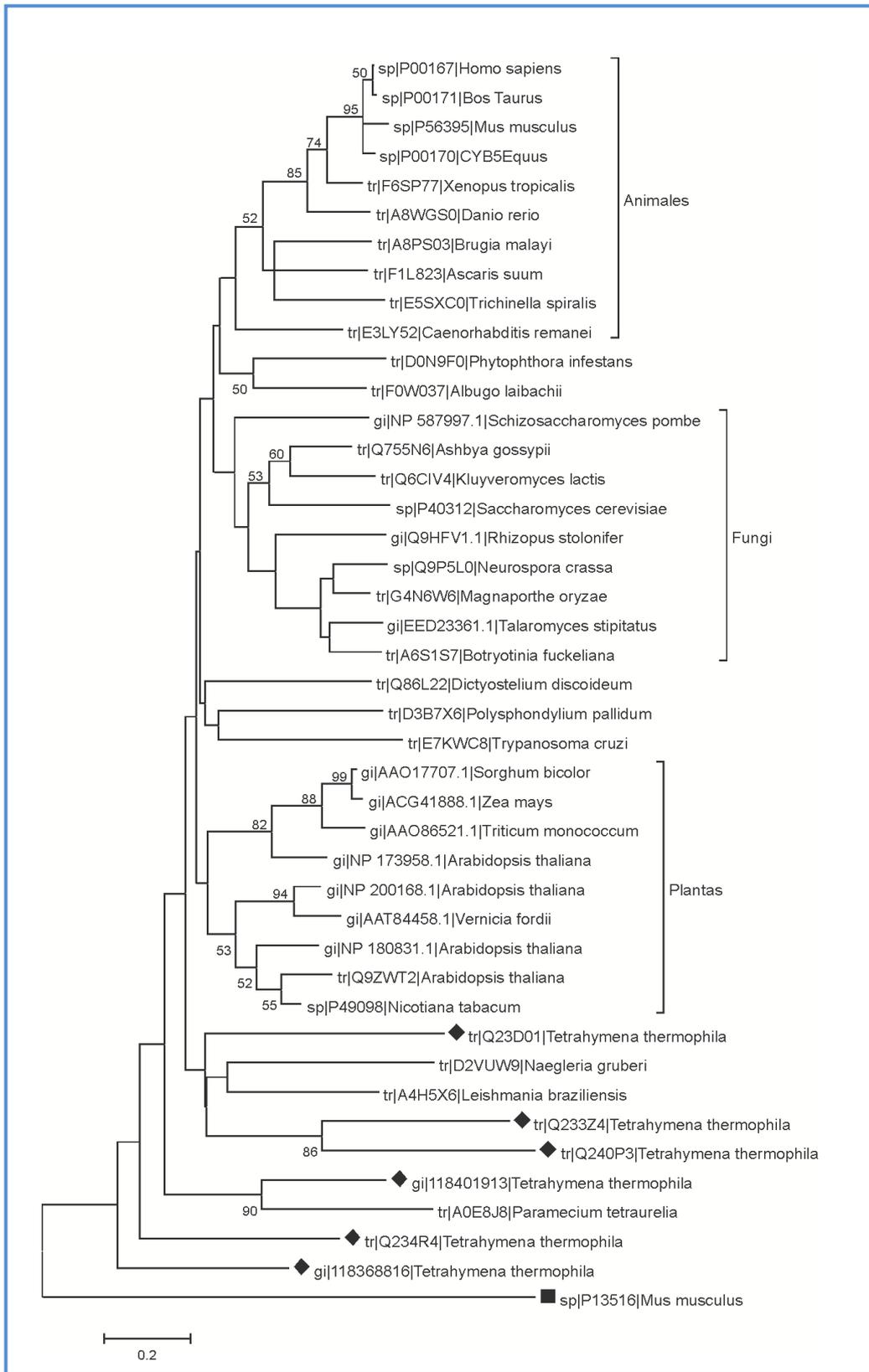


Figura 26. Análisis filogenético de citocromos b_5 . El árbol se construyó con 43 secuencias aminoacídica, con el método de máxima similitud con 500 remuestros (*bootstrap*). Los rombos negros indican los citocromos b_5 putativos de *T. thermophila*, mientras que el cuadrado negro indica la Acil-CoA desaturasa de *Mus musculus*, una proteína de fusión con citocromo b_5 , empleada como *outgroup*.

Tomando en cuenta la gran divergencia de las secuencias putativas de citocromo b_5 de *Tetrahymena*, se propuso estudiar si la enzima DES5A es funcional en otro organismo.

S. cerevisiae posee citocromos b_5 , cuyas secuencias presentan una identidad de entre 12,1% y 30,1% con las secuencias de *T. thermophila*, o una similitud de entre 17,6% y 53,4% con las secuencias homólogas de *T. thermophila*. Expresar con éxito esta enzima en *S. cerevisiae*, un sistema de expresión con muchas herramientas de biología molecular disponibles, va a permitir emplear este sistema de expresión para estudiar otras enzimas que requieran de la transferencia de electrones por parte de citocromos b_5 . Para tal fin se expresó el gen DES5A en una levadura haploide mutante nula para el gen homólogo *ERG3*, denominada *erg3*. La secuencia del gen se modificó según el código genético de *S. cerevisiae* y se optimizó para la frecuencia de uso de codones en esta especie (DES5Alev) [179]. Como se detalla en Materiales y Métodos (2.1), se empleó el vector lanzadera p425-GPD con marcador de selección por ganancia de prototrofia para la síntesis del aminoácido Leucina y se transformó a la levadura a través de electroporación. Los clones seleccionados fueron evaluados por PCR (datos no mostrados) para el gen expresado. El clon seleccionado se denominó *erg3* + DES5Alev.

Como se indicó en la introducción de este capítulo, las mutantes *erg* presentaban un incremento en la sensibilidad a la cicloheximida respecto de la cepa salvaje. Para analizar la complementación se evaluó la pérdida de sensibilidad a cicloheximida, ya que la cepa mutante nula para el gen *ERG3* presenta una marcada hipersensibilidad a la cicloheximida respecto a la cepa salvaje [180]. En la Figura 27 se observa como la cepa complementada presenta menor sensibilidad a la cicloheximida, similar al comportamiento de la cepa salvaje, revirtiendo de este modo el fenotipo de la cepa mutante *erg3*.

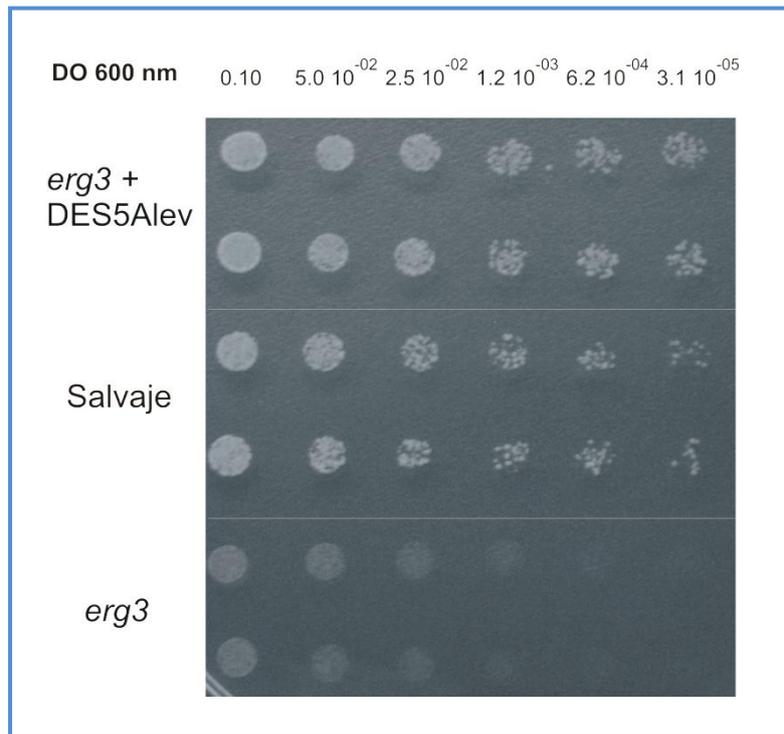


Figura 27. Reversión de la hipersensibilidad de cicloheximida de la cepa mutante *erg3*. Se sembraron diferentes cantidades de células salvajes, la cepa mutante *erg3* y la cepa complementada *erg3* + DES5Alev. Se observa la reversión del fenotipo mutante.

Para evaluar la actividad de la enzima expresada, se analizaron los perfiles de esteroides de la cepa mutante *erg3*, de la cepa salvaje y la cepa transformada con el gen de *Tetrahymena*. Los esteroides extraídos de los cultivos correspondientes fueron analizados mediante cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masa. En la Figura 28 se observan los cromatogramas correspondientes a cada cultivo de levaduras, presentando los diferentes intermediarios de la síntesis de ergosterol, y el espectro de masa correspondiente a los productos mayoritarios: ergosterol, en el caso de la cepa salvaje y la transformada con DES5A, y el precursor 5 α -ergostan-7,22-dien-3 β -ol en el caso de la cepa mutante *erg3*.

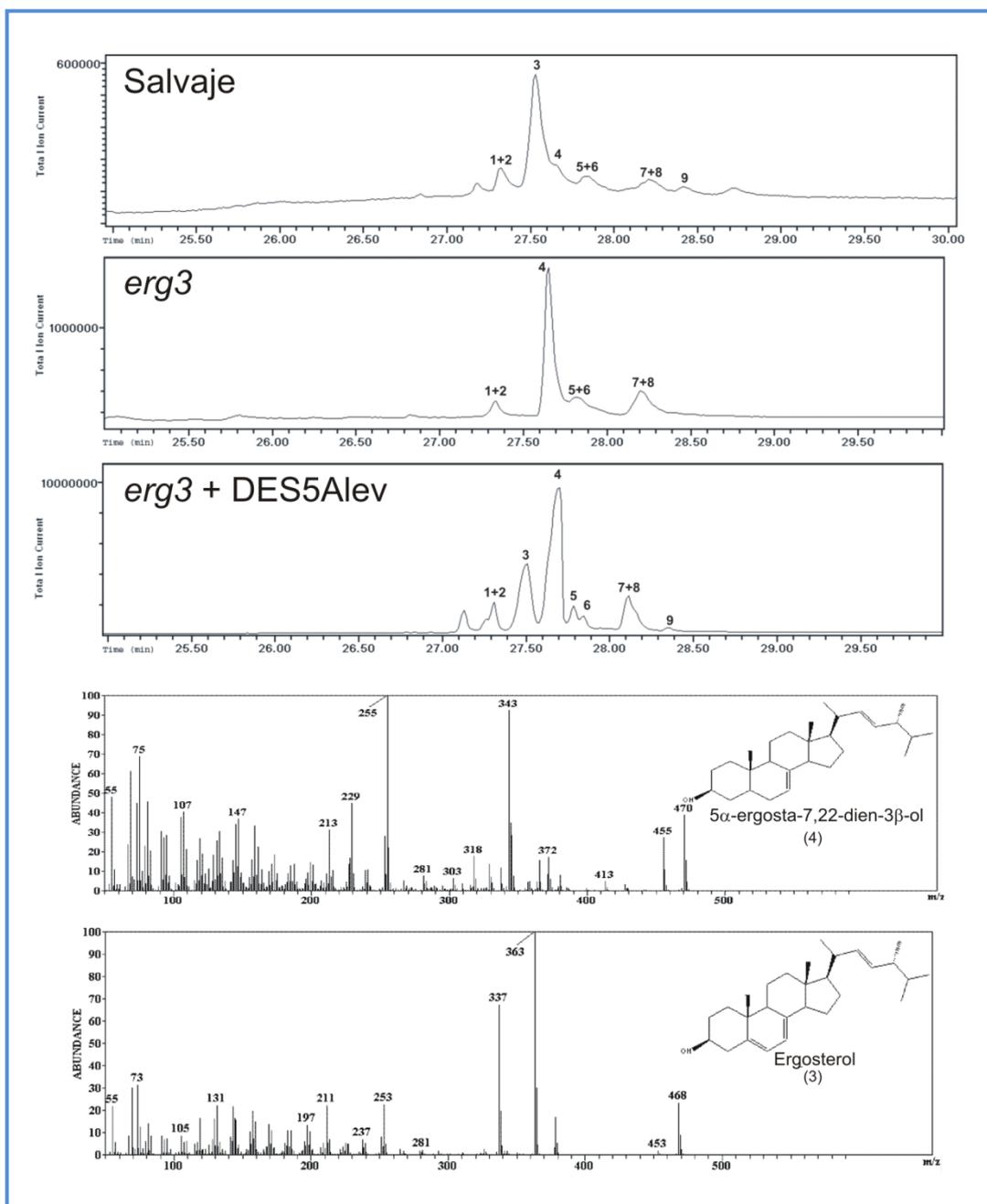


Figura 28. Análisis del perfil de esteroides por cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masa. Los compuestos fueron identificados por la comparación del espectro de masa con la base de datos NIST. Se muestran los patrones de fragmentación de los compuestos mayoritarios. Los compuestos identificados son: zimosterol (1), 5 α -ergosta-8,22-dien-3 β -ol (2), ergosterol (3), 5 α -ergosta-7,22-dien-3 β -ol (4), fecosterol (5), 5 α -ergosta-8-en-3 β -ol (6), 5 α -ergosta-7,24-dien-3 β -ol (7), 5 α -ergosta-7-en-3 β -ol (8) y lanosterol (9). Se observa la reversión parcial por la complementación con el gen DES5Alev.

En la Tabla 7 se muestra una cuantificación relativa de cada esteroide sobre la cantidad total de esteroides de cada muestra. La producción de ergosterol por parte de la cepa mutante *erg3* es menor al 1% de la cantidad total de esteroides, mientras que para la cepa salvaje el ergosterol es el producto mayoritario representando el 46% de los esteroides totales. La expresión del gen DES5A en la cepa mutante, revierte

parcialmente este fenotipo, llegando a un nivel del 34% de ergosterol en esta cepa transformada, es decir, casi un 74% de la producción en la cepa salvaje.

Tabla 7 Perfil de esteroides en las cepas salvaje, *erg3* y *erg3*+DES5Alev.

Pico	m/z TMS	Esterol	Porcentaje respecto a los esteroides totales en la cepa (%)		
			Salvaje	<i>erg3</i>	<i>erg3</i> + DES5Alev
1	456	Zimosterol			
2	470	5 α -ergostan-8,22-dien-3 β -ol	11	6	7
3	468	Ergosterol	46	<1	34
4	470	5 α -ergostan-7,22-dien-3 β -ol	12	47	41
5	470	Fecosterol			1
6	472	5 α -ergostan-8-en-3 β -ol	14	15	3
7	470	5 α -ergostan-7,24-dien-3 β -ol			
8	472	5 α -ergostan-7-en-3 β -ol	11	16	12
9	498	Lanosterol	6	16	2

La complementación parcial es apoyada por el análisis de intermediarios en la biosíntesis del ergosterol. La mutante *erg3* acumuló principalmente un precursor del ergosterol, 5 α -ergosta-7,22-dien-3 β -ol (47%). Este precursor representa hasta un 12% del pool de esteroides en las células salvajes, pero se acumula en mayor nivel (41%) en la cepa transformada *erg3* + DES5Alev. El perfil de otros intermediarios de la biosíntesis del ergosterol como el fecosterol (5 α -ergosta-8-en-3 β -ol) y el lanosterol fue ligeramente diferente entre las 3 cepas analizadas (Tabla 7).

Si bien el rescate de la cepa mutante *erg3* con la expresión del gen DES5A fue parcial (74% respecto a la cepa salvaje), resultados similares fueron reportados para experimentos similares con la enzima C-5 esteroide desaturasa de mamíferos o plantas, como por ejemplo el caso de *Arabidopsis thaliana*, que restauró en un 46% respecto a la cepa salvaje [164]. La regulación incompleta puede ser consecuencia de una regulación transcripcional diferente del transgen, aunque etapas post-transcripcionales pueden diferir del procesamiento óptimo.

Con la misma estrategia metodológica, se intentó expresar la enzima C-24 esterol des-etilasa del ciliado (Des24p), también perteneciente a la superfamilia de hidroxilasas de ácidos grasos, en una cepa salvaje de *S. cerevisiae*, ya que no posee esta actividad. Para evaluar la funcionalidad fue necesario que las células de *S. cerevisiae* tomen un C29 esterol, para lo cual se lo vehiculizo con *tween* 80 en el medio de cultivo. Aunque las células tomaron el estigmasterol, no se observó des-alquilación mediante HPLC ni CG-MS. Si bien, por la expresión exitosa de Des5Ap indicaría que el sistema redox de *S. cerevisiae* sería adecuado para la funcionalidad de estas enzimas de *T. thermophila*, es posible que la enzima Des24p tenga otros requerimientos, probablemente ausentes en *S. cerevisiae*. La levadura salvaje posee la actividad C-5 esterol desaturasa, pero no la C-24 esterol des-etilasa, con lo cual es esperable este resultado negativo. Es necesario investigar sobre el mecanismo de esta enzima en *T. thermophila* dado que ni siquiera tiene ortólogos en otros sistemas biológicos modelo, y solo teniendo algún indicio sobre los requerimientos en *T. thermophila* será posible evaluar este resultado negativo al expresarla en *S. cerevisiae*.

Desde el punto de vista evolutivo, los citocromos b_5 encontrados en *Tetrahymena* son muy divergentes respecto de los citocromos b_5 de *S. cerevisiae*, y la complementación con la enzima C-5 esterol desaturasa en la cepa de *S. cerevisiae* mutante *erg3* indica que existe una conservación funcional significativa entre los citocromos b_5 de ambas especies. Esta conclusión se apoya en el trabajo de Desmond & Gribaldo [11] donde proponen que el último ancestro común eucariota contaba con la maquinaria para la biosíntesis de esteroides y que durante la evolución se fueron modificando o perdiendo genes, como se informó para otras enzimas de la biosíntesis de esteroides.

Basados en trabajos en otros sistemas, la enzima C-5 esterol desaturasa sería de localización en el retículo endoplásmico. Analizando la secuencia aminoacídica de la enzima, se observa en el C-terminal al motivo di-lisina, QJKQKKN, necesario para la retención de algunas proteínas en la membrana del retículo endoplásmico en diferentes organismos, según ha sido demostrado por [181].

A partir de la presunción, se determinó localizar la enzima en *Tetrahymena* y la enzima expresada en levadura. Para esto, se fusionaron ambos genes a la proteína EGFP (*enhanced GFP*) en el extremo C-terminal. La EGFP es una versión

mejorada de la proteína fluorescente verde (GFP) con una intensidad de alrededor de 30 veces la GFP común. En el caso de *Tetrahymena*, la EGFP se fusionó al locus endógeno, de manera tal de replicar de la mejor manera posible la condición natural, y así evitar posibles artefactos en la expresión [89]. Una cepa salvaje de *Tetrahymena* fue transformada con un constructo DES5A-EGFP, de manera tal que se integró al macronúcleo somático, bajo el control del promotor endógeno, como se observa en la Figura 29A. Dado que *Tetrahymena* presenta una marcada autofluorescencia, se aumentó la sensibilidad para la localización mediante una inmunofluorescencia indirecta empleando un anticuerpo anti EGFP.

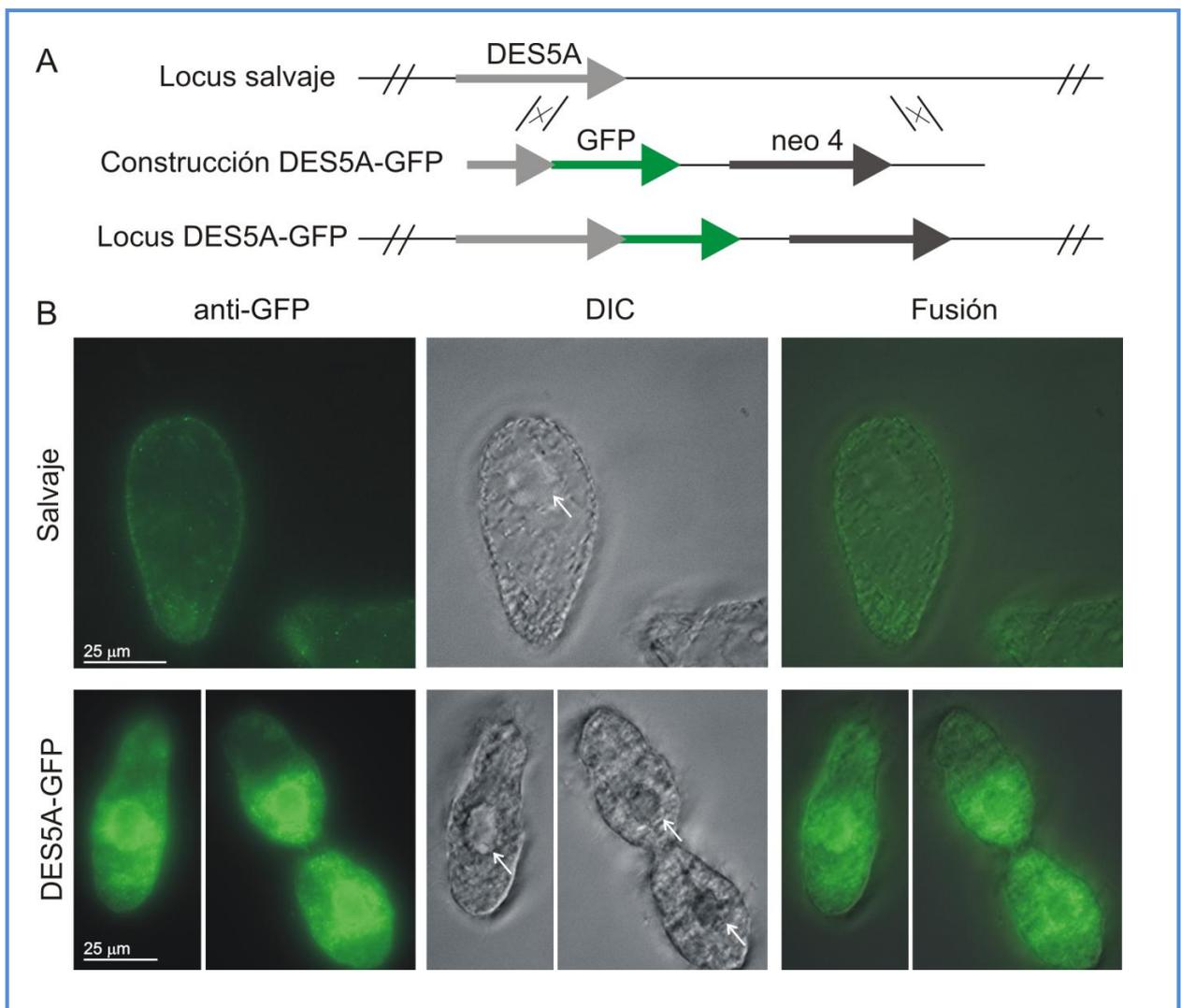


Figura 29. Localización del Des5Ap etiquetada con GFP en *T. thermophila*. (A) Representación esquemática del reemplazo del locus salvaje por el gen DES5A-GFP por recombinación homologa, incluyendo al marcador de selección neo4 que confiere resistencia a paromomicina. (B) Localización de Des5Ap-GFP. Las cepas salvajes y la cepa recombinante fueron cultivadas y fijadas en fase exponencial para la inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo anti GFP y el anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488. DIC: Microscopía de Contraste Diferencial interferencial. Las flechas blancas indican el macronúcleo de *T. thermophila*.

En la Figura 29B, la proteína C-5 esterol desaturasa fusionada a EGFP, presenta una localización perinuclear, compatible con una localización en la envoltura nuclear, y una señal más difusa en el citoplasma. Este patrón es consistente con la localización en retículo endoplásmico en estas células [182,183].

Para analizar la localización de la enzima de *Tetrahymena* expresada en las levaduras, se transformó la construcción DES5Alev-eGFP insertada en el vector p425-GDP en la mutante *erg3*, obteniéndose la cepa *erg3* + DES5Alev-GFP. También en este caso se observó (Figura 30), mediante microscopía, la localización perinuclear característica de las proteínas de localización en el retículo endoplásmico [10]. Como control, se expresó en el mismo vector la proteína EGFP (*erg3* + GFP), y se observó una señal citoplasmática.

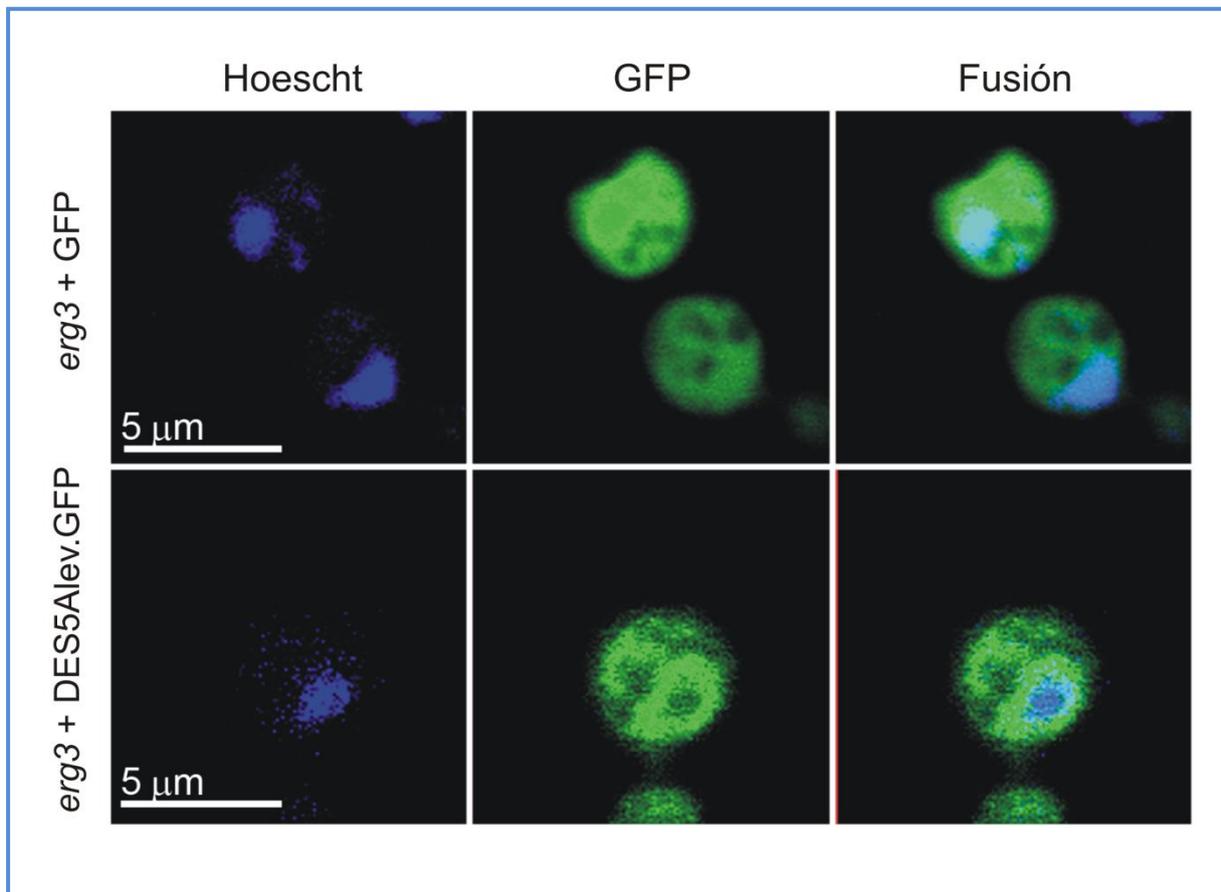


Figura 30. Localización de DES5Alev etiquetada con GFP en *S. cerevisiae*. La cepa *erg3* + GFP muestra un patrón de localización difuso, citoplasmático, mientras que la cepa *erg3* + DES5Alev.GFP muestra un patrón característico compatible con localización en el retículo endoplásmico. El ADN fue teñido con Hoescht. Se empleó microscopía de fluorescencia directa.

Tanto la imagen obtenida en *Tetrahymena*, como la obtenida en *S. cerevisiae* son consistentes con las localizaciones reportadas para otras proteínas en el retículo endoplásmico en *Tetrahymena* [182] y con estudios de la C-5 esterol desaturasa microsomal en *S. cerevisiae* [162].

Respecto a la localización de la enzima, la secuencia aminoacídica presenta un motivo di-lisina en el C- terminal, que ha sido caracterizado como una señal de retención en el retículo endoplásmico [181]. Las C-5 esterol desaturasas de *S. cerevisiae* (P32353), *Mus musculus* (O88822) y *Arabidopsis thaliana* (Q39208) presentan también este motivo. La localización observada mediante inmunofluorescencia indirecta en *Tetrahymena* y por fluorescencia en *S. cerevisiae*, es perinuclear, una señal característica de la localización en retículo endoplásmico (Figura 29 y Figura 30). Además, otras proteínas de ciliados con el motivo di-lisina han sido localizadas en el retículo, como la Ca²⁺-ATPasa [184] en *Paramecium tetraurelia*, lo cual implica que este tipo de mecanismo de retención en retículo endoplasmático para proteínas integrales es conservado en ciliados.

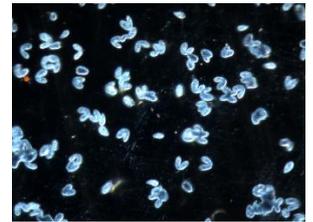
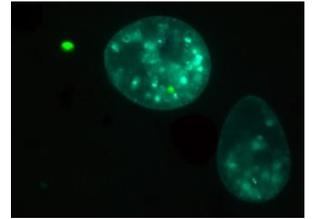
4. Conclusiones

La mutante nula *erg3* pudo ser parcialmente complementada por la expresión del gen DES5Alev de *T. thermophila*, confirmando que la Des5Ap tiene actividad C-5(6) esterol desaturasa.

La actividad de la enzima heteróloga indicaría que existe una conservación funcional significativa entre los citocromos *b₅* de ambas especies.

La localización de la enzima expresada en *S. cerevisiae* concuerda con la localización observada en *T. thermophila*, y con la localización reportada de la enzima endógena de *S. cerevisiae*, sugiriendo que el motivo C terminal de retención en el retículo endoplásmico esta conservado.

Los resultados sugieren que la complementación funcional en cepas mutantes de *S. cerevisiae* puede ser empleada como una estrategia eficiente para analizar genes de *Tetrahymena*. Esto incluye tanto el estudio de complejos proteicos de membrana y la caracterización de genes cuya función se desconoce.



Conclusiones finales

En este trabajo se investigó la presencia y funcionalidad de vías metabólicas para síntesis y modificación de esteroides y hopanoides en los ciliados en general y en *Tetrahymena* en particular.

En el capítulo 1 se realizó un acercamiento a las vías metabólicas y genes putativos presentes en los genomas de ciliados, mayormente empleando análisis bioinformáticos. Se observó la diversidad dentro del taxón y se analizaron los posibles orígenes evolutivos de las enzimas involucradas. A partir de la búsqueda de genes ortólogos en los genomas y secuencias de ciliados disponibles en bases de datos, se llegó a la conclusión de que, siguiendo la hipótesis de la presencia de la vía en el último ancestro común, los ciliados parecen haber perdido varios genes del metabolismo de esteroides, particularmente de la vía post-escualeno, pero además han incorporado otros.

Los resultados del estudio filogenético permiten concluir que 3 de las enzimas involucradas en la biosíntesis de tetrahymanol (HMG-CoA reductasa, escualeno sintasa y escualeno-hopano ciclasa) en *T. thermophila* parecen tener su origen en una transferencia horizontal de bacterias. Además se presentó un análisis preliminar del transcriptoma de *T. thermophila* en condiciones de cultivo con/sin esteroides, que evidencia un alto grado de regulación de la expresión génica, especialmente en algunos de los genes de la vía, apoyado también por el estudio de la presión selectiva sobre estos genes que parecen indicar que son genes altamente conservados. El análisis transcripcional mostró que ante el agregado de colesterol o estigmasterol, los genes correspondientes a escualeno sintasa, escualeno-tetrahymanol ciclasa e isopentenil-difosfato Δ -isomerasa disminuyen su expresión, mientras que con agregado de colesterol disminuyen además los genes correspondientes a HMG-CoA reductasa/sintasa, poliprenil sintetasa y difosfomevalonato decarboxilasa. El agregado de colesterol también tuvo efecto sobre la expresión de los genes correspondientes a C-5 y C-7 esteroles desaturasa.

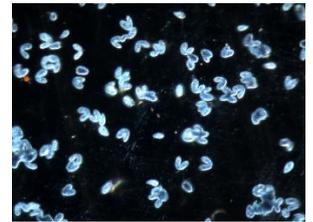
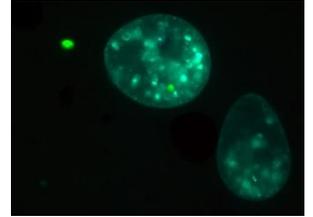
En el capítulo 2 se analizó la expresión de la proteína Des7p con actividad C-7 esteroles desaturasa, codificada por el gen THERM_00310640 en una línea celular de *Spodoptera frugiperda* (un insecto del orden lepidóptera) mediante el sistema de baculovirus. La selección del organismo se basó en la existencia de dicha actividad enzimática en el insecto y la probable existencia de un sistema redox similar necesario

para dicha actividad. El resultado exitoso de la expresión, localización subcelular y la medición de la actividad enzimática a partir del perfil de esteroides aislados de la cepa que expresó la enzima, permite concluir que existe significativo grado de conservación en esta enzima y su sistema dador de electrones (todavía desconocido). A partir del análisis informático de las oxigenasas tipo Rieske conocidas al presente se observó una gran similitud de Des7p con oxigenasa tipo Rieske presente en la bacteria *Rhodococcus sp.* (KshA). El funcionamiento de la enzima KshA está caracterizado y se conoce el sistema dador de electrones (KshB) lo cual serviría de indicador para seleccionar genes candidatos en *T. thermophila*. En efecto, La búsqueda de las proteínas con centro [Fe-S] en *T. thermophila* y el análisis de los dominios de estas proteínas permitió seleccionar 2 proteínas candidatas a formar parte del sistema dador de electrones de Des7p, aunque solo para una de ellas, se predice una posible interacción con la enzima Des7p, en la base de datos de interacciones (STRING).

En el capítulo 3 se analizó la complementación heteróloga de la vía de síntesis de ergosterol en una cepa mutante de *S. cerevisiae* noqueada para la actividad C-5 esterol desaturasa. La expresión del gen DES5A de *T. thermophila* en esta cepa de *S. cerevisiae* restauró largamente la síntesis de ergosterol. Por un lado, este resultado confirma que la enzima Des5p, perteneciente a la superfamilia de hidroxilasas de ácidos grasos, citocromo b_5 dependiente, es responsable de la actividad y por otro evidencia la conservación del sistema dador de electrones, a pesar de la divergencia existente entre los citocromos b_5 de *T. thermophila* y *S. cerevisiae*. Desde este punto de vista, es una proteína de membrana que requiere de un sistema citocromo b_5 /citocromo b_5 reductasa y que resultó funcional en este sistema heterólogo. Respecto a la localización de esta enzima, el resultado de la microscopía de fluorescencia indica que la enzima se localiza en el retículo endoplásmico, y que su secuencia presenta un motivo di-lisina que es responsable de dicha localización. En la expresión heteróloga en *S. cerevisiae* se obtuvo una localización similar, indicando que la señal de localización es conservada.

Los resultados presentados en esta tesis constituyen un avance en la comprensión del metabolismo de triterpenoides policíclicos en *T. thermophila*. Asimismo permiten profundizar en el origen y evolución de los genes, sus funciones y su conservación, en la transferencia horizontal de genes y en la posibilidad de expresar

estos genes en otros sistemas que pueden resultar ventajosas herramientas para el estudio de los sistemas enzimáticos involucrados o de aplicación biotecnológica para la síntesis de esteroides de interés industrial.



Referencias

- [1] London E. Insights into lipid raft structure and formation from experiments in model membranes. *Curr Opin Struct Biol* 2002;12:480–6.
- [2] Tyler KM, Fridberg A, Toriello KM, Olson CL, Cieslak JA, Hazlett TL, et al. Flagellar membrane localization via association with lipid rafts. *J Cell Sci* 2009;122:859–66.
- [3] Benveniste P. Biosynthesis and accumulation of sterols. *Annu Rev Plant Biol* 2004;55:429–57.
- [4] Brunt SA, Silver JC. Molecular cloning and characterization of two distinct hsp85 sequences from the steroid responsive fungus *Achlya ambisexualis*. *Curr Genet* 1991;19:383–8.
- [5] Gilbert LI, Rybczynski R, Warren JT. Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annu Rev Entomol* 2002;47:883–916.
- [6] Motola D, Cummins C, Rottiers V, Sharma K. Identification of Ligands for DAF-12 that Govern Dauer Formation and Reproduction in *C. elegans*. *Cell* 2006;9:1209–23.
- [7] Hancock JF. Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:456–62.
- [8] Schouten S, Bowman JP, Rijpstra WI, Sinnighe Damsté JS. Sterols in a psychrophilic methanotroph, *Methylosphaera hansonii*. *FEMS Microbiol Lett* 2000;186:193–5.
- [9] Bode HB, Zeggel B, Silakowski B, Wenzel SC, Reichenbach H, Müller R. Steroid biosynthesis in prokaryotes: identification of myxobacterial steroids and cloning of the first bacterial 2,3(S)-oxidosqualene cyclase from the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *Mol Microbiol* 2003;47:471–81.
- [10] Pearson A, Budin M, Brocks JJ. Phylogenetic and biochemical evidence for sterol synthesis in the bacterium *Gemmata obscuriglobus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:15352–7.
- [11] Desmond E, Gribaldo S. Phylogenomics of sterol synthesis: insights into the origin, evolution, and diversity of a key eukaryotic feature. *Genome Biol Evol* 2009;1:364–81.
- [12] Lamb D, Jackson C. Lanosterol biosynthesis in the prokaryote *Methylococcus capsulatus*: insight into the evolution of sterol biosynthesis. *Mol Biol Evol* 2007;24:1714–21.
- [13] Rohmer M. Hopanoids. *Handb. Hydrocarb. Lipid Microbiol.*, 2010, p. 133–42.

- [14] Ourisson G, Rohmer M, Poralla K. Prokaryotic hopanoids and other polyterpenoid sterol surrogates. *Annu Rev Microbiol* 1987;41:301–33.
- [15] Sáenz JP, Sezgin E, Schwille P, Simons K. Functional convergence of hopanoids and sterols in membrane ordering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:14236–40.
- [16] Berry AM, Harriott OT, Moreau RA, Osman SF, Benson DR, Jones AD. Hopanoid lipids compose the *Frankia* vesicle envelope, presumptive barrier of oxygen diffusion to nitrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:6091–4.
- [17] Nes WD. Biosynthesis of cholesterol and other sterols. *Chem Rev* 2011;111:6423–51.
- [18] Volkman JK. Sterols in microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003;60:495–506.
- [19] Erpenbeck D, van Soest RWM. Status and perspective of sponge chemosystematics. *Mar Biotechnol (NY)* 2007;9:2–19.
- [20] Barnathan G, Mirallès J, Kornprobst JM, Mangoni A, Fattorusso E, Boury-Esnault N, et al. Unusual sterol composition and classification of two marine sponge families. *Mar. lipids. Proc. Symp. held Brest, Fr. 19-20 Novemb. 1998.*, IFREMER; 2000, p. 87–94.
- [21] Brenac P, Sauvaire Y. Chemotaxonomic value of sterols and steroidal sapogenins in the genus *Trigonella*. *Biochem Syst Ecol* 1996;24:157–64.
- [22] Ourisson G, Nakatani Y. The terpenoid theory of the origin of cellular life: the evolution of terpenoids to cholesterol. *Chem Biol* 1994;1:11–23.
- [23] Summons RE, Jahnke LL, Hope JM, Logan G a. 2-Methylhopanoids as biomarkers for cyanobacterial oxygenic photosynthesis. *Nature* 1999;400:554–7.
- [24] Brocks JJ, Logan G a, Buick R, Summons RE. Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. *Science (80-)* 1999;285:1033–6.
- [25] Rasmussen B, Fletcher IR, Brocks JJ, Kilburn MR. Reassessing the first appearance of eukaryotes and cyanobacteria. *Nature* 2008;455:1101–4.
- [26] Fischer WW. Life before the rise of oxygen. *Nature* 2008;455:1051–2.
- [27] Ricci JN, Coleman ML, Welander P V, Sessions AL, Summons RE, Spear JR, et al. Diverse capacity for 2-methylhopanoid production correlates with a specific ecological niche. *ISME J* 2014;8:675–84.
- [28] Galea AM, Brown AJ. Special relationship between sterols and oxygen: were sterols an adaptation to aerobic life? *Free Radic Biol Med* 2009;47:880–9.

- [29] Volkman JK. Sterols and other triterpenoids: source specificity and evolution of biosynthetic pathways. *Org Geochem* 2005;36:139–59.
- [30] Fischer WW, Pearson a. Hypotheses for the origin and early evolution of triterpenoid cyclases. *Geobiology* 2007:070210031741002 – ???
- [31] Boucher Y, Doolittle WF. The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Mol Microbiol* 2000;37:703–16.
- [32] Lombard J, Moreira D. Origins and early evolution of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis in the three domains of life. *Mol Biol Evol* 2011;28:87–99.
- [33] Parfrey LW, Lahr DJG, Knoll AH, Katz L a. Estimating the timing of early eukaryotic diversification with multigene molecular clocks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:13624–9.
- [34] Canfield DE. A new model for Proterozoic ocean chemistry. *Nature* 1998;396:450–3.
- [35] Johnston DT, Wolfe-Simon F, Pearson A, Knoll AH. Anoxygenic photosynthesis modulated Proterozoic oxygen and sustained Earth's middle age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:16925–9.
- [36] Vinci G, Xia X, Veitia R a. Preservation of genes involved in sterol metabolism in cholesterol auxotrophs: facts and hypotheses. *PLoS One* 2008;3:e2883.
- [37] Whitaker BD, Nelson DL. Growth Support and Metabolism of Phytosterols in *Paramecium tetraurelia*. *Lipids* 1987;22:386–96.
- [38] Hernandez PC, Wasserman M. Do genes from the cholesterol synthesis pathway exist and express in *Giardia intestinalis*? *Parasitol Res* 2006;98:194–9.
- [39] Burki F. The eukaryotic tree of life from a global phylogenomic perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014;6:a016147.
- [40] Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, et al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* 52:399–451.
- [41] Keeling PJ. The number, speed, and impact of plastid endosymbioses in eukaryotic evolution. *Annu Rev Plant Biol* 2013;64:583–607.
- [42] Guindon S, Dufayard J-F, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 2010;59:307–21.

- [43] Lynn DH. The ciliated protozoa. Characterization, classification and guide to the literature. 3rd Editio. 2008.
- [44] Eisen JA, Coyne RS, Wu M, Wu D, Thiagarajan M, Wortman JR, et al. Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. *PLoS Biol* 2006;4:e286.
- [45] Karrer KM. *Tetrahymena* genetics: two nuclei are better than one. *Methods Cell Biol* 2000;62:127–86.
- [46] Cervantes MD, Hamilton EP, Xiong J, Lawson MJ, Yuan D, Hadjithomas M, et al. Selecting one of several mating types through gene segment joining and deletion in *Tetrahymena thermophila*. *PLoS Biol* 2013;11:e1001518.
- [47] Nanney DL, Simon EM. Laboratory and evolutionary history of *Tetrahymena thermophila*. *Methods Cell Biol* 2000;62:3–25.
- [48] Turkewitz AP, Orias E, Kapler G. Functional genomics: the coming of age for *Tetrahymena thermophila*. *Trends Genet* 2002;18:35–40.
- [49] Miao W, Xiong J, Bowen J, Wang W, Liu Y, Braguinets O, et al. Microarray analyses of gene expression during the *Tetrahymena thermophila* life cycle. *PLoS One* 2009;4:e4429.
- [50] Xiong J, Lu X, Zhou Z, Chang Y, Yuan D, Tian M, et al. Transcriptome analysis of the model protozoan, *Tetrahymena thermophila*, using Deep RNA sequencing. *PLoS One* 2012;7:e30630.
- [51] Orias E. Evolution of amitosis of the ciliate macronucleus: gain of the capacity to divide. *J Protozool* 1991;38:217–21.
- [52] Raederstorff D, Rohmer M. Polyterpenoids as cholesterol and tetrahymanol surrogates in the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *Biochim Biophys Acta - Lipids Lipid Metab* 1988;960:190–9.
- [53] Mallory FB, Gordon JT, Conner RL. The Isolation of a Pentacyclic Triterpenoid Alcohol from a Protozoan. *J Am Chem Soc* 1963;85:1362–3.
- [54] Holz Jr GG, Conner RL. The composition, metabolism and roles of lipids in *Tetrahymena*. *Biol. Tetrahymena*, 1973, p. 99–122.
- [55] Ederington MC, Mcmanus GB, Harvey HR. Trophic transfer of fatty acids, sterols, and a triterpenoid alcohol between bacteria, a ciliate, and the copepod *Acartia tonsa*. *Limnol Oceanogr* 1995;40:860–7.
- [56] Harvey H, Mcmanus G. Marine ciliates as a widespread source of tetrahymanol and hopan-3 β -ol in sediments. *Geochim Cosmochim Acta* 1991;55:3387–90.

- [57] Harvey H, Ederington M, Mcmanus G. Lipid Composition of the Marine Ciliates *Pleuronema* sp. and *Fabrea salina*: Shifts in Response to Changes in Diet. *J Eukaryot Microbiol* 1997;44:189–93.
- [58] Zander JM, Caspi E, Pandey GN, Mitra CR. The presence of tetrahymanol in *Oleandra wallichii*. *Phytochemistry* 1969;8:2265–7.
- [59] Kemp P, Lander DJ, Orpin CG. The lipids of the rumen fungus *Pirimonas communis*. *J Gen Microbiol* 1984;130:27–37.
- [60] Takishita K, Chikaraishi Y, Leger MM, Kim E, Yabuki A, Ohkouchi N, et al. Lateral transfer of tetrahymanol-synthesizing genes has allowed multiple diverse eukaryote lineages to independently adapt to environments without oxygen. *Biol Direct* 2012;7:5.
- [61] Rashby SE, Sessions AL, Summons RE, Newman DK. Biosynthesis of 2-methylbacteriohopanepolyols by an anoxygenic phototroph. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:15099–104.
- [62] Perzl M, Müller P, Poralla K, Kannenberg EL. Squalene-hopene cyclase from *Bradyrhizobium japonicum*: cloning, expression, sequence analysis and comparison to other triterpenoid cyclases. *Microbiology* 1997;143:1235–42.
- [63] Caspi E. Biosynthesis of tetrahymanol by *Tetrahymena pyriformis*: mechanistic and evolutionary implications. *Acc Chem Res* 1980;13:97–104.
- [64] Mallory FB, Conner RL. Dehydrogenation and dealkylation of various sterols by *Tetrahymena pyriformis*. *Lipids* 1971;6:149–53.
- [65] Conner R, Landrey J. The metabolism of stigmasterol and cholesterol by *Paramecium aurelia*. ... *Lipid Metab* 1971;239:312–9.
- [66] Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, et al. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* 2014;42:D222–30.
- [67] Valcarce G, Muñoz L, Nusblat a, Nudel C, Florin-Christensen J. The improvement of milk by cultivation with ciliates. *J Dairy Sci* 2001;84:2136–43.
- [68] Valcarce G, Nusblat A, Florin-Christensen J, Nudel BC. Bioconversion of Egg Cholesterol to Pro-vitamin D Sterols with *Tetrahymena Thermophila*. *J Food Sci* 2002;67:2405–9.
- [69] Hirsch AL. Industrial Aspects of Vitamin D. In: Feldman D, Wesley Pike J, Adams JS, editors. *Vitam. D Two-Volume Set*. Third Edit, Elsevier; 2011, p. 73–93.
- [70] Sheldon RA. Fundamentals of green chemistry: efficiency in reaction design. *Chem Soc Rev* 2012;41:1437–51.

- [71] Tan T, Zhang L. Preparation method for 7-dehydrochol esterol. 200810056886, 2008.
- [72] Najle SR, Nusblat AD, Nudel CB, Uttaro AD. The Sterol-C7 desaturase from the ciliate *Tetrahymena thermophila* is a Rieske Oxygenase, which is highly conserved in animals. *Mol Biol Evol* 2013;30:1630–43.
- [73] Aury J-M, Jaillon O, Duret L, Noel B, Jubin C, Porcel BM, et al. Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate *Paramecium tetraurelia*. *Nature* 2006;444:171–8.
- [74] Nusblat AD, Najle SR, Tomazic ML, Uttaro AD, Nudel CB. C-5(6) sterol desaturase from *tetrahymena thermophila*: Gene identification and knockout, sequence analysis, and comparison to other C-5(6) sterol desaturases. *Eukaryot Cell* 2009;8:1287–97.
- [75] Fu C, Xiong J, Miao W. Genome-wide identification and characterization of cytochrome P450 monooxygenase genes in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *BMC Genomics* 2009;10:208.
- [76] Nusblat AD, Muñoz L, Valcarce G a, Nudel CB. Characterization and properties of cholesterol desaturases from the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *J Eukaryot Microbiol* 2005;52:61–7.
- [77] Morikawa T, Mizutani M, Ohta D. Cytochrome P450 subfamily CYP710A genes encode sterol C-22 desaturase in plants. *Biochem Soc Trans* 2006;34:1202–5.
- [78] Skaggs BA, Alexander JF, Pierson CA, Schweitzer KS, Chun KT, Koegel C, et al. Cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* C-22 sterol desaturase gene, encoding a second cytochrome P-450 involved in ergosterol biosynthesis. *Gene* 1996;169:105–9.
- [79] Tomazic M. Estudios genéticos y bioquímicos dirigidos a la identificación y caracterización de enzimas implicadas en el metabolismo de esteroides en *Tetrahymena thermophila*. UBA, 2011.
- [80] Chitwood DJ, Lozano R, Lusby WR. Recent developments in nematode steroid biochemistry. *J Nematol* 1986;18:9–17.
- [81] Ikekawa N, Morisaki M, Fujimoto Y. Sterol metabolism in insects: dealkylation of phytosterol to cholesterol. *Acc Chem Res* 1993;26:139–46.
- [82] Tomazic ML, Najle SR, Nusblat AD, Uttaro AD, Nudel CB. A Novel Sterol Desaturase-Like Protein Promoting Dealkylation of Phytosterols in *Tetrahymena thermophila*. *Society* 2011;10:423–34.
- [83] Williams NE, Wolfe J, Bleyman LK. Long-term maintenance of *Tetrahymena* spp. *J Protozool* 1980;27:327.

- [84] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press; 2001.
- [85] Davies B, Wang H, Rine J. Dual activators of the sterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*: similar activation/regulatory domains but different response mechanisms. *Mol Cell Biol* 2005;25:7375–85.
- [86] Mumberg D, Müller R, Funk M. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* 1995;156:119–22.
- [87] Gauss R, Trautwein M, Sommer T, Spang A. New modules for the repeated internal and N-terminal epitope tagging of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 2005;22:1–12.
- [88] Bright LJ, Kambesis N, Nelson SB, Jeong B, Turkewitz AP. Comprehensive analysis reveals dynamic and evolutionary plasticity of Rab GTPases and membrane traffic in *Tetrahymena thermophila*. *PLoS Genet* 2010;6:e1001155.
- [89] Kataoka K, Schoeberl UE, Mochizuki K. Modules for C-terminal epitope tagging of *Tetrahymena* genes. *J Microbiol Methods* 2010;82:342–6.
- [90] Cassidy-Hanley D, Bowen J, Lee JH, Cole E, VerPlank LA, Gaertig J, et al. Germline and somatic transformation of mating *Tetrahymena thermophila* by particle bombardment. *Genetics* 1997;146:135–47.
- [91] Reed LJ, Muench. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Epidemiol* 1938;27:493–7.
- [92] Christian AE, Haynes MP, Phillips MC, Rothblat GH. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J Lipid Res* 1997;38:2264–72.
- [93] Le SQ, Gascuel O. An improved general amino acid replacement matrix. *Mol Biol Evol* 2008;25:1307–20.
- [94] Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 2011;27:1164–5.
- [95] Punta M, Coggill PC, Eberhardt RY, Mistry J, Tate J, Boursnell C, et al. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 2012;40:D290–301.
- [96] Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007;23:2947–8.
- [97] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011;28:2731–9.

- [98] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911–7.
- [99] Cosentino RO, Agüero F. Genetic profiling of the isoprenoid and sterol biosynthesis pathway genes of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One* 2014;9.
- [100] Kodner RB, Summons RE, Pearson A, King N, Knoll AH. Sterols in a unicellular relative of the metazoans. *PNAS* 2008;7:9897–902.
- [101] Beedle a S, Munday K a, Wilton DC. Studies on the biosynthesis of tetrahymanol in *Tetrahymena pyriformis*. The mechanism of inhibition by cholesterol. *Biochem J* 1974;142:57–64.
- [102] Holz G. The Sterol Requirement of *Tetrahymena paravorax* RP*. *J ...* 1961;8:297–300.
- [103] Holz G, Erwin J, Wagner B, Rosenbaum N. The Nutrition of *Tetrahymena setifera* HZ-1; Sterol and Alcohol Requirements. *J Protozool* 1962;9:359–63.
- [104] Kaneshiro ES. Lipids of *Paramecium*. *J Lipid Res* 1987;28:1241–58.
- [105] Frickey T, Kannenberg E. Phylogenetic analysis of the triterpene cyclase protein family in prokaryotes and eukaryotes suggests bidirectional lateral gene transfer. *Environ Microbiol* 2009;11:1224–41.
- [106] Chen F, Mackey AJ, Stoeckert CJ, Roos DS. OrthoMCL-DB: querying a comprehensive multi-species collection of ortholog groups. *Nucleic Acids Res* 2006;34:D363–8.
- [107] Friesen JA, Rodwell VW. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. *Genome Biol* 2004;5:248.
- [108] Cavalier-Smith T. Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree. *J Eukaryot Microbiol* 1999;46:347–66.
- [109] Chen W, Lee M-K, Jefcoate C, Kim S-C, Chen F, Yu J-H. Fungal cytochrome p450 monooxygenases: their distribution, structure, functions, family expansion, and evolutionary origin. *Genome Biol Evol* 2014;6:1620–34.
- [110] Arnaiz O, Sperling L. *ParameciumDB* in 2011: new tools and new data for functional and comparative genomics of the model ciliate *Paramecium tetraurelia*. *Nucleic Acids Res* 2011;39:D632–6.
- [111] Xiong J, Lu X, Lu Y, Zeng H, Yuan D, Feng L, et al. *Tetrahymena* Gene Expression Database (TGED): a resource of microarray data and co-expression analyses for *Tetrahymena*. *Sci China Life Sci* 2011;54:65–7.

- [112] Conner RL, Landrey JR, Burns CH, Mallory FB. Cholesterol Inhibition of Pentacyclic Triterpenoid Biosynthesis in *Tetrahymena pyriformis*. *Sci York* 1968;15:600–5.
- [113] Xiong J, Yuan D, Fillingham JS, Garg J, Lu X, Chang Y, et al. Gene network landscape of the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *PLoS One* 2011;6:e20124.
- [114] Mo C, Bard M. A systematic study of yeast sterol biosynthetic protein-protein interactions using the split-ubiquitin system. *Biochim Biophys Acta* 2005;1737:152–60.
- [115] Dennis G, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, et al. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 2003;4:P3.
- [116] Warburg CF, Wakeel M, Wilton DC. The role of squalene synthetase in the inhibition of tetrahymanol biosynthesis by cholesterol in *Tetrahymena pyriformis*. *Lipids* 1982;17:230–4.
- [117] Espenshade PJ, Hughes AL. Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annu Rev Genet* 2007;41:401–27.
- [118] Burg J, Espenshade P. Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. *Prog Lipid Res* 2011;50:403–10.
- [119] Shianna K V, Dotson WD, Tove S, Parks LEOW. Identification of a UPC2 Homolog in *Saccharomyces cerevisiae* and Its Involvement in Aerobic Sterol Uptake. *Society* 2001;183:830–4.
- [120] Ferguson KA, Davis FM, Conner RL, Landrey JR, Mallory FB. Effect of sterol replacement in vivo on the fatty acid composition of *Tetrahymena*. *J Biol Chem* 1975;250:6998–7005.
- [121] Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014;15:550.
- [122] Wilton DC. The effect of cholesterol on ubiquinone and tetrahymanol biosynthesis in *Tetrahymena pyriformis*. *Biochem J* 1983;216:203–6.
- [123] Sherr EB, Sherr BF. Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2002;81:293–308.
- [124] Martin-Creuzburg D, Bec A, von Elert E. Supplementation with sterols improves food quality of a ciliate for *Daphnia magna*. *Protist* 2006;157:477–86.
- [125] Schmidt C, Shaw L. A comprehensive phylogenetic analysis of Rieske and Rieske-type iron-sulfur proteins. *J Bioenerg Biomembr* 2001;33.

- [126] Ferraro DDJ, Gakhar L, Ramaswamy S. Rieske business: structure–function of Rieske non-heme oxygenases. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:175–90.
- [127] Rieske JS, Hansen RE, Zaugg WS. Studies on the electron transfer system. 58. Properties of a new oxidation-reduction component of the respiratory chain as studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J Biol Chem* 1964;239:3017–22.
- [128] Trumpower BL, Gennis RB. Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation. *Annu Rev Biochem* 1994;63:675–716.
- [129] Riedel A, Rutherford AW, Hauska G, Müller A, Nitschke W. Chloroplast Rieske Center. EPR study on its spectral characteristics, relaxation and orientation properties. *J Biol Chem* 1991;266:17838–44.
- [130] Schäfer G, Purschke WG, Gleissner M, Schmidt CL. Respiratory chains of archaea and extremophiles. *Biochim Biophys Acta* 1996;1275:16–20.
- [131] Batie CJ, Ballou DP, Correll CC. Phthalate dioxygenase reductase and related flavin-iron-sulfur containing electron transferases. *Chem. Biochem. flavoenzymes*, vol. 3, CRC Press Boca Raton, FL; 1991, p. 543–56.
- [132] Mason JR, Cammack R. The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annu Rev Microbiol* 1992;46:277–305.
- [133] Butler CS, Mason JR. Structure-function analysis of the bacterial aromatic ring-hydroxylating dioxygenases. *Adv Microb Physiol* 1997;38:47–84.
- [134] Yoshiyama-Yanagawa T, Enya S, Shimada-Niwa Y, Yaguchi S, Haramoto Y, Matsuya T, et al. The conserved Rieske oxygenase DAF-36/Neverland is a novel cholesterol-metabolizing enzyme. *J Biol Chem* 2011;286:25756–62.
- [135] Gray J, Wardzala E, Yang M, Reinbothe S, Haller S, Pauli F. A small family of LLS1-related non-heme oxygenases in plants with an origin amongst oxygenic photosynthesizers. *Plant Mol Biol* 2004;54:39–54.
- [136] Capyk JJK, Eltis LDL. Phylogenetic analysis reveals the surprising diversity of an oxygenase class. *JBIC J Biol Inorg Chem* 2012;17:425–36.
- [137] Friemann R, Lee K, Brown EN, Gibson DT, Eklund H, Ramaswamy S. Structures of the multicomponent Rieske non-heme iron toluene 2,3-dioxygenase enzyme system. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2009;65:24–33.
- [138] Werlen C, Kohler HP, van der Meer JR. The broad substrate chlorobenzene dioxygenase and cis-chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas*

- sp. strain P51 are linked evolutionarily to the enzymes for benzene and toluene degradation. *J Biol Chem* 1996;271:4009–16.
- [139] Nam JW, Nojiri H, Yoshida T, Habe H, Yamane H, Omori T. New classification system for oxygenase components involved in ring-hydroxylating oxygenations. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001;65:254–63.
- [140] Kweon O, Kim S-J, Baek S, Chae J-C, Adjei MD, Baek D-H, et al. A new classification system for bacterial Rieske non-heme iron aromatic ring-hydroxylating oxygenases. *BMC Biochem* 2008;9.
- [141] Fielenbach N, Antebi A. C. elegans dauer formation and the molecular basis of plasticity. *Genes Dev* 2008:2149–65.
- [142] Yoshiyama T, Namiki T, Mita K, Kataoka H, Niwa R. Neverland is an evolutionally conserved Rieske-domain protein that is essential for ecdysone synthesis and insect growth. *Development* 2006;133:2565–74.
- [143] Wollam J, Magomedova L, Magner DB, Shen Y, Rottiers V, Motola DL, et al. The Rieske oxygenase DAF-36 functions as a cholesterol 7-desaturase in steroidogenic pathways governing longevity. *Aging Cell* 2011:879–84.
- [144] Csaba G. The hormonal system of the unicellular Tetrahymena: a review with evolutionary aspects. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2012;59:131–56.
- [145] Xiong J, Lu Y, Feng J, Yuan D, Tian M, Chang Y, et al. Tetrahymena functional genomics database (TetraFGD): an integrated resource for Tetrahymena functional genomics. *Database (Oxford)* 2013;2013:bat008.
- [146] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215:403–10.
- [147] Iga M, Blais C, Smagghe G. Study on ecdysteroid levels and gene expression of enzymes related to ecdysteroid biosynthesis in the larval testis of *Spodoptera littoralis*. *Arch Insect Biochem Physiol* 2013;82:14–28.
- [148] Van Oers MM. Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. *J Invertebr Pathol* 2011;107 Suppl:S3–15.
- [149] Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol* 2005;23:567–75.
- [150] O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA. *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*. Oxford University Press; 1994.
- [151] Drugmand J-C, Schneider Y-J, Agathos SN. Insect cells as factories for biomanufacturing. *Biotechnol Adv* 2012;30:1140–57.

- [152] Petrusma M, van der Geize R, Dijkhuizen L. 3-Ketosteroid 9 α -hydroxylase enzymes: Rieske non-heme monooxygenases essential for bacterial steroid degradation. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2014;106:157–72.
- [153] Conner RL, Mallory FB, Landrey JR, Iyengar CW. The conversion of cholesterol to delta-5,7,22-cholestatrien-3-beta-ol by *Tetrahymena pyriformis*. *J Biol Chem* 1969;244:2325–33.
- [154] Marheineke K, Grünewald S, Christie W, Reiländer H. Lipid composition of *Spodoptera frugiperda* (Sf9) and *Trichoplusia ni* (Tn) insect cells used for baculovirus infection. *FEBS Lett* 1998;441:49–52.
- [155] Tomazic ML, Poklepovich TJ, Nudel CB, Nusblat AD. Incomplete sterols and hopanoids pathways in ciliates: gene loss and acquisition during evolution as a source of biosynthetic genes. *Mol Phylogenet Evol* 2014;74:122–34.
- [156] Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res* 2013;41:D808–15.
- [157] Shanklin J, Whittle E, Fox BG. Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry* 1994;33:12787–94.
- [158] Taton M, Hüsselstein T, Benveniste P, Rahier a. Role of highly conserved residues in the reaction catalyzed by recombinant Delta7-sterol-C5(6)-desaturase studied by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 2000;39:701–11.
- [159] Abe F, Hiraki T. Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 2009;1788:743–52.
- [160] Parks LW. Metabolism of sterols in yeast. *CRC Crit Rev Microbiol* 1978;6:301–41.
- [161] Arthington BA, Bennett LG, Skatrud PL, Guynn CJ, Barbuch RJ, Ulbright CE, et al. Cloning, disruption and sequence of the gene encoding yeast C-5 sterol desaturase. *Gene* 1991;102:39–44.
- [162] Natter K, Leitner P, Faschinger A, Wolinski H, McCraith S, Fields S, et al. The spatial organization of lipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* derived from large scale green fluorescent protein tagging and high resolution microscopy. *Mol Cell Proteomics* 2005;4:662–72.
- [163] Brumfield KM, Moroney J V, Moore TS, Simms T a, Donze D. Functional characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii* ERG3 ortholog, a gene involved in the biosynthesis of ergosterol. *PLoS One* 2010;5:e8659.

- [164] Husselstein T, Schaller H, Gachotte D, Benveniste P. Delta7-sterol-C5-desaturase: molecular characterization and functional expression of wild-type and mutant alleles. *Plant Mol Biol* 1999;39:891–906.
- [165] Honjo K, Ishibashi T, Imai Y. Partial purification and characterization of lathosterol 5-desaturase from rat liver microsomes. *J Biochem* 1985;97:955–9.
- [166] Taton M, Rahier A. Plant sterol biosynthesis: identification and characterization of higher plant delta 7-sterol C5(6)-desaturase. *Arch Biochem Biophys* 1996;325:279–88.
- [167] Mitoma J, Ito A. The carboxy-terminal 10 amino acid residues of cytochrome b5 are necessary for its targeting to the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 1992;11:4197–203.
- [168] Gostincar C, Turk M, Gunde-Cimerman N. The evolution of fatty acid desaturases and cytochrome b5 in eukaryotes. *J Membr Biol* 2010;233:63–72.
- [169] Napier JA, Sayanova O, Stobart AK, Shewry PR. A new class of cytochrome b5 fusion proteins. *Biochem J* 1997;328 (Pt 2:717–8.
- [170] Sayanova O, Shewry PR, Napier JA. Histidine-41 of the cytochrome b5 domain of the borage delta6 fatty acid desaturase is essential for enzyme activity. *Plant Physiol* 1999;121:641–6.
- [171] Sasaki N, Fukushima H, Watanabe T, Nozawa Y. Studies on Tetrahymena microsomal electron transport systems: solubilization of microsomal electron transport enzymes involved in fatty acid desaturation. *Comp Biochem Physiol B* 1984;79:219–23.
- [172] Fukushima H, Takeda T, Sasaki N, Watanabe T, Nozawa Y. Purification and characterization of microsomal cytochrome b560ms from a unicellular eukaryote Tetrahymena pyriformis. *J Biol Chem* 1983;258:11991–6.
- [173] Zufall RA, McGrath CL, Muse S V, Katz LA. Genome architecture drives protein evolution in ciliates. *Mol Biol Evol* 2006;23:1681–7.
- [174] Liu X, Bowen J, Gorovsky MA. Either of the major H2A genes but not an evolutionarily conserved H2A.F/Z variant of Tetrahymena thermophila can function as the sole H2A gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1996;16:2878–87.
- [175] Karamyshev AL, Ito K, Nakamura Y. Polypeptide release factor eRF1 from Tetrahymena thermophila: cDNA cloning, purification and complex formation with yeast eRF3. *FEBS Lett* 1999;457:483–8.

- [176] Salim HMW, Negritto MC, Cavalcanti ARO. 1+1 = 3: a fusion of 2 enzymes in the methionine salvage pathway of *Tetrahymena thermophila* creates a trifunctional enzyme that catalyzes 3 steps in the pathway. *PLoS Genet* 2009;5:e1000701.
- [177] Good L, Elela S a, Nazar RN. *Tetrahymena* ribozyme disrupts rRNA processing in yeast. *J Biol Chem* 1994;269:22169–72.
- [178] Tavares S, Grotkjær T, Obsen T, Haslam RP, Napier JA, Gunnarsson N. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of eicosapentaenoic acid, using a novel $\Delta 5$ -desaturase from *Paramecium tetraurelia*. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:1854–61.
- [179] Horowitz S, Gorovsky M a. An unusual genetic code in nuclear genes of *Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:2452–5.
- [180] Smith SJ, Parks LW. The ERG3 gene in *Saccharomyces cerevisiae* is required for the utilization of respiratory substrates and in heme-deficient cells. *Yeast* 1993;9:1177–87.
- [181] Teasdale RD, Jackson MR. Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12:27–54.
- [182] Xie R, Clark KM, Gorovsky MA. Endoplasmic reticulum retention signal-dependent glycylation of the Hsp70/Grp170-related Pgp1p in *Tetrahymena*. *Eukaryot Cell* 2007;6:388–97.
- [183] Rahaman A, Elde NC, Turkewitz AP. A dynamin-related protein required for nuclear remodeling in *Tetrahymena*. *Curr Biol* 2008;18:1227–33.
- [184] Hauser K, Pavlovic N, Klauke N, Geissinger D, Plattner H. Green fluorescent protein-tagged sarco(endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase overexpression in *Paramecium* cells: isoforms, subcellular localization, biogenesis of cortical calcium stores and functional aspects. *Mol Microbiol* 2000;37:773–87.