

UCH-F
MKB-B
8633
C.1

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL
DEL GEN *STP1* CODIFICANTE DE UNA S2P
(SITE-2 PROTEASE) INVOLUCRADA EN LA VÍA
DE REGULACIÓN SREBP DE
*Xanthophyllomyces dendrorhous***

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

MELISSA KATHERINE GÓMEZ RÍOS

Octubre, 2017

Director de Tesis: Dra. Jennifer Alcaíno Gorman

Co-Director de Tesis: Dr. Víctor Cifuentes Guzmán

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata

MELISSA KATHERINE GÓMEZ RÍOS

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 18 de Agosto del año 2017,

Directora de Tesis:

Dra. Jennifer Alcaíno Gorman

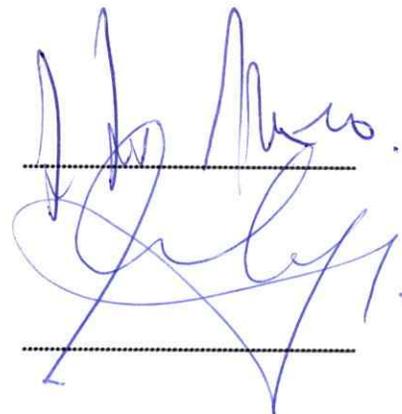
Co-Director de Tesis

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. María Cecilia Rojas

Dr. Ricardo Cabrera



Two handwritten signatures in blue ink, one above the other, each followed by a horizontal dashed line. The top signature is for Jennifer Alcaíno Gorman and the bottom one is for Víctor Cifuentes Guzmán.



Two handwritten signatures in blue ink, one above the other, each followed by a horizontal dashed line. The top signature is for María Cecilia Rojas and the bottom one is for Ricardo Cabrera.

DEDICATORIA.

A mi familia:

Mis padres Ángel y Gloria

Mis hermanos Ángel y Melany

BIOGRAFÍA

Nací el 16 de agosto del año 1984, en Copiapó, Chile. Mis padres son Ángel Gómez y Gloria Ríos, y soy la segunda de tres hijos. Debido a la profesión de mi papá, Ingeniero de Ejecución en Minas, he vivido la mayor parte de mi vida en el norte del país. De mi mamá he heredado la filosofía de vivir la vida de una forma optimista y tranquila. En cambio de mi papá he heredado las ganas de aprender y estudiar. Ellos me han enseñado a enfrentar las situaciones adversas de la vida con valentía. Actualmente, soy Ingeniera en Biotecnología Molecular, con esta tesis me gradúo como Magíster en Ciencias Biológicas y actualmente me encuentro en el programa de Doctorado en Ciencias con mención en Microbiología de la Universidad de Chile. Súper Feliz!



AGRADECIMIENTOS

Agradezco el amor y el apoyo incondicional que siempre me han brindado mis padres Ángel y Glorita. Los quiero mucho!

Agradezco a todas las personas del Laboratorio de Genética, entre ellos a nuestro *Team SREBP*: Anita, Sole, Cariita, Dony, Max y profe Jenny.

Agradezco a los Directores de mi proyecto, Profe Víctor y Profe Jenny, por orientarme en esta segunda tesis. Especialmente agradezco a la profe Jenny, por guiarme y aconsejarme en cada momento.

Finalmente, agradezco al proyecto FONDECYT 1160202 por el financiamiento otorgado.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	ii
BIOGRAFÍA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y MÉTODOS	14
1.1 Microorganismos y condiciones de cultivo	14
1.2 Plásmidos, cepas, enzimas y ácidos nucleicos	14
2.1 Extracción de ácidos nucleicos	20
2.2 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa.....	22
2.3 Digestión de DNA plasmídico y reacción de ligado.....	23
2.4 PCR, RT-PCR y qPCR	23
2.5 Transformación de las cepas de <i>E. coli</i> y de <i>X. dendrorhous</i>	25
2.6 Extracción de carotenoides y esteroides, y análisis por RP-HPLC.....	27
2.7 Crecimiento de las cepas de <i>X. dendrorhous</i> en medios suplementados con azoles o CoCl_2	29
RESULTADOS	31
DISCUSIÓN	64
CONCLUSIONES	74
BIBLIOGRAFIA	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plásmidos generados y utilizados en este trabajo	16
Tabla 2. Cepas generadas y utilizadas en este trabajo	17
Tabla 3. Partidores generados y utilizados en este trabajo.	18
Tabla 4. Cantidad y composición de carotenoides de las cepas parentales CBS 6938 y CBS <i>Scyp61</i> ⁻ y sus respectivos mutantes de delección de <i>STP1</i> de <i>X. dendrorhous</i> en ppm (µg/g peso seco de levadura).....	56
Tabla 5. Cantidad y composición de carotenoides de las cepas parentales CBS 6938 y CBS. <i>SRE1N</i> y sus respectivos mutantes de delección de <i>STP1</i> de <i>X. dendrorhous</i> en ppm (µg/g peso seco de levadura).....	58
Tabla 6. Cantidad y composición de carotenoides de las cepas de las cepas CBS 6938, CBSΔ <i>stp1</i> y CBSΔ <i>stp1</i> / <i>STP1</i> de <i>X. dendrorhous</i> en ppm (µg/g peso seco de levadura).	59
Tabla 7. Cantidad y composición de esteroides de las cepas parentales CBS 6938, CBS <i>Scyp61</i> ⁻ y CBS. <i>SRE1N</i> y sus respectivos mutantes de <i>X. dendrorhous</i>	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía SREBP en mamíferos.....	2
Figura 2. Ruta del MVA en <i>X. dendrorhous</i>	9
Figura 3. Rutas de biosíntesis de astaxantina y ergosterol.....	10
Figura 4. Vector pXdVexp2 de expresión en <i>X. dendrorhous</i>	15
Figura 5. Estructura del gen <i>STP1</i> de la vía SREBP de <i>X. dendrorhous</i>	31
Figura 6. Alineamiento múltiple de secuencias proteicas.....	35
Figura 7. Predicción de estructura secundaria para <i>Stp1</i>	36
Figura 8. Construcción del vector pBS- Δ g <i>STP1-hph</i> y su análisis.....	39
Figura 9. Representación del vector pBS- Δ g <i>STP1-hph</i> y su digestión enzimática, e integración del DNA transformante en el genoma de <i>X. dendrorhous</i>	41
Figura 10. Representación y verificación de la integración del DNA transformante en el genoma de <i>X. dendrorhous</i> por PCR.....	42
Figura 11. Representación de los loci <i>STP1</i> y <i>SRE1</i> en la cepa silvestre CBS 6938 y en el mutante CBS. <i>SRE1N</i> de <i>X. dendrorhous</i>	43
Figura 12. Representación y verificación de la integración del DNA transformante en el genoma de <i>X. dendrorhous</i> por PCR.....	43
Figura 13. Construcción del vector pXdVexp2- <i>cSTP1_cl13</i> y su análisis.....	45
Figura 14. Construcción del vector pBS-UP-g <i>STP1-DOWN_cl1-Zeo</i> y su análisis.....	46
Figura 15. Representación del vector pBS-UP-g <i>STP1-DOWN_cl1-Zeo</i>	47
Figura 16. Representación del vector pBS- Δ g <i>STP1-hph</i> y su digestión enzimática, e integración del DNA transformante en el genoma de <i>X. dendrorhous</i>	48
Figura 17. Representación y verificación de la integración del DNA transformante en el genoma de <i>X. dendrorhous</i> por PCR.....	49
Figura 18. Comparación de fenotipos entre las cepas parentales y sus mutantes de delección (y reintegración) de <i>STP1</i> de <i>X. dendrorhous</i>	51
Figura 19. Crecimiento en medio YM e YM suplementado con azoles o CoCl_2	54
Figura 20. Curvas de crecimiento.....	55
Figura 21. Composición de carotenoides luego de 120 h de cultivo.....	57
Figura 22. Análisis RT-qPCR.....	63

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
Amp	Ampicilina
CoA	Coenzima A
DMAPP	dimetilalil-pirofosfato
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FPP	Farnesil-pirofosfato
GGPP	Geranilgeranil-pirofosfato
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A
HMGR	3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A reductasa
HMGS	3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A sintasa
Hyg	Higromicina
IPP	Isopentenil-pirofosfato
kb	kilobases
kDa	kilo Dalton
LB	Medio de cultivo Lysogeny Broth
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pl	Punto isoelectrico
ppm	Partes por millón (μg carotenoides/g peso seco de levadura)
RE	Retículo endoplasmático
RT	Transcripción reversa
RT-HPLC	Cromatografía líquida en fase reversa
Scap	SREBP Cleavage-Activating Protein
SREs	Sterol-Response Elements
SREBP	Sterol Regulatory Element Binding Protein
S2P	Site-2 Protease
TAE	Buffer Tris-acetato-EDTA
TE	Buffer Tris-EDTA

Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
UV	Luz ultravioleta
YM	Medio de cultivo para levadura
Zeo	Zeocina

RESUMEN

Xanthophyllomyces dendrorhous es una levadura que sintetiza astaxantina, carotenoide de interés biotecnológico por sus características antioxidantes y uso como colorante. En *X. dendrorhous*, se han identificado genes que formarían parte de la vía SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*), la cual corresponde a una ruta conservada y caracterizada en mamíferos, y que está involucrada en la regulación de los niveles de esteroides celulares la cual responde a condiciones de bajos niveles de esteroides y de hipoxia. Entre los genes identificados se encuentran *SRE1* y *STP1* que codificarían a Sre1 y Stp1, homólogos de SREBP y de la *Site-2 Protease (S2P)* de *H. sapiens* de la vía SREBP, respectivamente, y probablemente estarían involucrados en la regulación de la carotenogénesis a través de los niveles de ergosterol (principal esteroide en hongos). Por lo tanto, el objetivo de esta tesis fue identificar y caracterizar al gen *STP1* que codificaría a la enzima Stp1 involucrada en la activación del producto génico de *SRE1* (Sre1) que corresponde al activador transcripcional de la vía SREBP de *X. dendrorhous*. La secuencia génica de *STP1* se identificó en bases de datos genómicas y transcriptómicas locales de *X. dendrorhous*; *STP1* corresponde a un gen de 2.284 pb que codificaría un polipéptido Stp1 de 620 residuos que contiene los motivos conservados HE-(x)₂-H y N-(x)₂-P-(x)₄-DG característicos en el sitio catalítico de las metaloproteasas de la familia M50. Para caracterizar funcionalmente al gen, se generaron cepas $\Delta stp1$ desde: i) una cepa silvestre (CBS 6938), ii) una cepa que no produce ergosterol y que sobreproduce carotenoides (CBS*Scyp61*) y iii) una cepa que expresa la versión activa del factor transcripcional Sre1 (CBS.*SRE1N*). Para ello se construyó un módulo para la delección de *STP1*, se transformó a la levadura y la delección del gen se confirmó por PCR. Luego, se evaluó el fenotipo de color y

crecimiento de las cepas parentales (CBS 6938, CBS*Scyp61*⁻, CBS.*SRE1N*) y sus respectivos mutantes Δ *stp1* en medio YM-agar suplementado con azoles o CoCl₂; los azoles inhiben a enzimas citocromos P450 como aquellas involucradas en la síntesis de ergosterol y el CoCl₂ induce una respuesta celular similar a la observada en condiciones de hipoxia. La producción de carotenoides y esteroides se analizó espectrofotométricamente, y se determinó su composición mediante RP-HPLC. Luego, se estudió la expresión de algunos genes que estarían regulados por la vía SREBP a nivel de sus mRNAs mediante RT-qPCR. Como resultados, la delección de *STP1* afectó el crecimiento de las cepas Δ *stp1* derivadas de CBS 6938 y CBS*Scyp61*⁻, en medios suplementados con azoles o CoCl₂. También afectó la producción y composición de isoprenoides, particularmente en la cepa CBS*Scyp61*⁻ que no produce ergosterol y sobreproduce carotenoides. Los carotenoides y esteroides disminuyeron en un 40% y 18%, respectivamente; y la fracción de astaxantina se redujo a un 66% de un 78%. Esto se relaciona con una disminución significativa en los niveles de transcrito de los genes *HMGR* y *HMGS* de la ruta del MVA, de los genes carotenogénicos *crtS* y *crtR* que controlan los pasos de β -caroteno a astaxantina, y *CYP51*, involucrado en la síntesis de esteroides. En conclusión, *STP1* codificaría a una metaloproteasa y su delección afecta el crecimiento en presencia de azoles o CoCl₂, y la producción/composición de isoprenoides como esteroides y carotenoides, lo que sugiere que el gen *STP1* identificado si estaría involucrado en la vía SREBP de *X. dendrorhous*.

ABSTRACT

Xanthophyllomyces dendrorhous is a yeast that synthesizes astaxanthin, a carotenoid of biotechnological interest due to its use as antioxidant and colorant. Genes that would be part of the SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein) pathway in *X. dendrorhous* have been identified; this pathway is conserved and characterized in mammals, and is involved in the regulation of cellular sterol levels and responds to low levels of sterols and hypoxia conditions. In the yeast, the *SRE1* and *STP1* genes encoding Sre1 and Stp1, homologues of SREBP and Site-2 Protease (S2P) from *H. sapiens* were identified, respectively, and probably through the SREBP pathway the levels of ergosterol (major fungal sterol) would be involved in the regulation of carotenogenesis. Therefore, the aim of this thesis was to identify and characterize the *STP1* gene that would encode the Stp1 enzyme involved in the activation of the *SRE1* gene product (Sre1) corresponding to the transcriptional activator of the *X. dendrorhous* SREBP pathway. The *STP1* gene sequence was identified in local genomic and transcriptomic databases of *X. dendrorhous*; *STP1* corresponds to a 2,284 bp gene encoding a 620-residue Stp1 polypeptide containing the characteristic HE-(x)₂-H and N-(x)₂-P-(x)₄-DG conserved motifs at the catalytic site of the M50 family metalloproteases. To functionally characterize the gene, Δ *stp1* strains were generated from: i) a wild-type strain (CBS 6938), ii) a non-ergosterol producing strain that over-produces carotenoids (CBS*Scyp61*) and iii) a strain that expresses the active version of the Sre1 transcriptional factor (CBS.*SRE1N*). For this, a *STP1* deletion module was constructed, introduced into the yeast and the generated deletion of the gene was confirmed by PCR. The color and growth phenotype of the parent strains (CBS 6938, CBS*Scyp61*, CBS.*SRE1N*) and their corresponding Δ *stp1* mutants was evaluated in YM-agar

medium supplemented with azole or CoCl_2 ; the first agent affects cytochrome P450 enzymes and the second one induces a cellular response similar to that observed under hypoxia conditions. The production of carotenoids and sterols was analyzed spectrophotometrically, and their composition was determined by RP-HPLC. Then the expression of some genes that would be regulated by the SREBP pathway was studied at their mRNAs level by RT-qPCR. As results, the *STP1* deletion affected the growth of Δstp1 strains derived from CBS 6938 and CBS cyp61^- in media supplemented with azoles or CoCl_2 . Production and composition of isoprenoids were also affected, particularly in the mutant derived from strain CBS cyp61^- that does not produce ergosterol and overproduces carotenoids. In this case, carotenoids and sterols decreased 40% and 18%, respectively, and the astaxanthin fraction was reduced to 66% from a 78%. These results could be related to a significant decrease in transcript levels of the *HMGR* and *HMGS* genes of MVA pathway, *crtS* and *crtR* carotenogenic genes that control the steps from β -carotene to astaxanthin, and *CYP51* gene involved in the synthesis of sterols, that was observed. In conclusion, the identified *STP1* gene would encode a metalloprotease and its deletion affects growth in the presence of azoles or CoCl_2 , and the production/composition of isoprenoids such as sterols and carotenoids, suggesting that *STP1* would be indeed involved in the SREBP pathway of *X. dendrorhous*.

INTRODUCCIÓN

La vía SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*) es un mecanismo de regulación de la transcripción génica mediada por los niveles de esteroides y oxígeno (Bien y Espenshade., 2010). Es una vía conservada y bien caracterizada en mamíferos, y recientemente está siendo estudiada en hongos.

1. LA VÍA SREBP EN MAMÍFEROS (Figura 1): El metabolismo lipídico es importante para el mantenimiento de la estructura y fluidez de la membrana celular en eucariotas. La compleja regulación de la homeostasis de esteroides ha sido estudiada principalmente en células de mamíferos, e involucra a una familia de factores de transcripción denominados SREBPs (*Sterol Regulatory Element Binding Proteins*). En *Homo sapiens* se han identificado dos genes que codifican tres SREBPs: SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2 (Hua y col., 1993; Yokoyama y col., 1993), los cuales son sintetizados como proteínas precursoras inactivas que residen en la membrana del retículo endoplasmático (RE). SREBP-1a y SREBP-1c preferencialmente activan la transcripción de genes que son requeridos para la síntesis de ácidos grasos, mientras que SREBP-2 principalmente activa la transcripción de genes que son requeridos para la síntesis de colesterol (Sato., 2010). Estas proteínas contienen dos segmentos transmembrana separados por un corto *loop* dejando a los dominios N- y C-terminal hacia el citoplasma (Hua y col., 1996). El dominio N-terminal de SREBP es un factor de transcripción de la familia de proteínas con cierre de leucina bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*), mientras que el dominio C-terminal interactúa con la proteína Scap (*SREBP Cleavage-Activating Protein*) que detecta los niveles de esteroides en la célula (Hua y col., 1993; Yokoyama y col., 1993; Sakai y col., 1998; Matsuda y col., 2001). Cuando

los niveles de esteroides son altos, Scap secuestra a SREBP en el RE, retención que es facilitada por unión de la proteína Insig (*Insulin induced gene*) al complejo SREBP-Scap (Yang y col., 2002; Yabe y col., 2002), mientras que cuando éstos son bajos, el complejo SREBP-Scap deja el RE en vesículas COPII con destino al aparato de Golgi (Espenshade y col., 2002) donde SREBP adquiere su forma activa (SREBP-N) al sufrir cortes proteolíticos que liberan al dominio N-terminal. La proteólisis de SREBP en el aparato de Golgi es realizada secuencialmente por las proteasas S1P (*Site-1 Protease*) y S2P (*Site-2 Protease*), que corresponden a una serina proteasa y a una zinc metaloproteasa, respectivamente. S1P realiza el primer corte en el *loop* de SREBP y S2P, el segundo corte en el primer segmento transmembrana de la proteína que libera al dominio N-terminal (Duncan y col., 1997; Duncan y col., 1998). Así, la forma activa de SREBP (SREBP-N) puede ingresar al núcleo de la célula y unirse a las secuencias SREs (*Sterol-Response Elements*) en los promotores de genes blanco incrementando su transcripción (Rawson y Li., 2007).

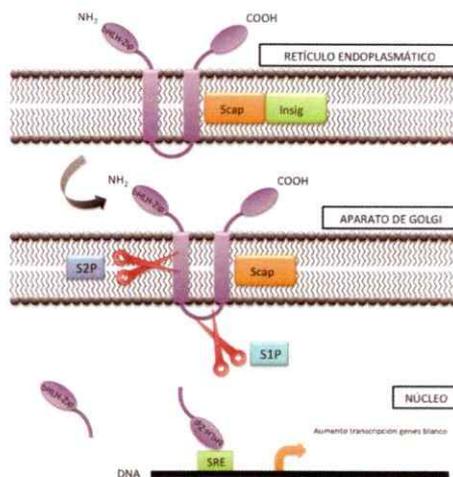


Figura 1. Vía SREBP en mamíferos. Cuando los niveles de esteroides celulares son altos, SREBP forma un complejo con Scap e Insig en el retículo endoplasmático (RE), pero cuando son bajos, SREBP es escoltada por Scap desde el RE al aparato de Golgi, donde SREBP es procesada secuencialmente por la S1P en el lumen y por la S2P en la membrana, liberando la forma activa de SREBP (SREBP-N) que

corresponde a un factor de transcripción con cierre de leucina bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*) que regula la transcripción de genes blanco al unirse a las regiones SREs (*Sterol-Response Elements*) del promotor.

Esta tesis se centra en la caracterización del gen *STP1* de la levadura *X. dendrorhous* que codificaría a la proteína homóloga de la S2P de la vía SREBP de mamíferos, por lo tanto, se abordará en detalle a continuación.

1.1. SITE-2 PROTEASE (S2P)

No todas las metaloproteasas descritas y que son homólogas a la S2P de *H. sapiens* se encuentran involucradas en cascadas de señalización conducentes a la homeostasis de esteroides celulares, pero la metaloproteasa humana de la vía SREBP es la mejor caracterizada ya que corresponde a la primera de las proteasas de escisión intermembrana (I-CLiPs, *Intermembrane-Cleaving Proteases*) en ser identificada (Rawson y col., 1997), en consecuencia, mucho de lo que se sabe de la S2P viene de estudios en células de mamífero. Como se mencionó anteriormente, la S2P de *H. sapiens* corresponde a una metaloproteasa involucrada en el procesamiento de SREBP cuando los niveles de esteroides celulares son bajos. Específicamente pertenece a las metaloproteasas del clan MM ("M": Metaloproteasa), uno de los 14 clanes formados por metaloproteasas propuestos por Rawlings y Barrett., (2013), donde el clan MM pertenece a los clanes que agrupan a aquellas proteasas que sólo poseen un ión metálico en su estructura, el que usualmente es zinc. Según estos autores, es un clan que contiene proteasas de membrana que están implicadas en la regulación de la expresión génica mediante la proteólisis de los reguladores de la transcripción. A su vez, este clan lo conforman todas aquellas metaloproteasas pertenecientes a la familia de proteasas M50. Los miembros de esta familia poseen el

motivo conservado HE-(x)₂-H, común en la mayoría de las metaloproteasas (Rawlings y Barret., 1995), y el motivo conservado x-DG, el cual luego se redefinió como N-(x)₂-P-(x)₄-DG (Lewis y Thomas., 1999; Rudner y col., 1999). Se propuso que las His del motivo HE-(x)₂-H y el Asp del motivo N-(x)₂-P-(x)₄-DG estarían involucrados en la coordinación del metal, mientras que el Glu del primero tendría un rol promoviendo el ataque nucleofílico de una molécula de agua sobre el átomo de carbono del carbonilo del enlace peptídico del sustrato (Rawling y Barret., 1995). Se ha visto que las mutaciones que afectan a las His y al Glu del motivo HE-(x)₂-H, y al Asp del motivo N-(x)₂-P-(x)₄-DG elimina la habilidad del cDNA de la S2P humana para restaurar la escisión de SREBP en células de mamífero que carecen de S2P (Rawson y col., 1997; Zelenski y col., 1999). De esta forma, estos residuos formarían parte importante del sitio activo de las metaloproteasas, y en la familia M50 se encontraría posicionado dentro de la membrana (Rawlings y Barrett., 2013); por ello, la actividad catalítica ocurriría dentro o muy cerca de la membrana. Por ejemplo, la S2P humana corta en el sitio formado por los residuos Leu-Cys que se encontrarían dentro del primer segmento transmembrana de SREBP (Duncan y col., 1998). Se han descrito homólogos de la S2P humana en otros eucariontes; por ejemplo, en plantas se han identificado cuatro homólogos (Adam., 2015), entre ellos la metaloproteasa EGY1 que se localiza en la membrana tilacoidal y que es requerida para el desarrollo de los cloroplastos (Chen y col., 2005; Chen y Zhang., 2010). Sin embargo, el sustrato de estos homólogos aún no ha sido determinado (Yu y col., 2016). Por otra parte, también se han descrito homólogos a la S2P eucariota en bacterias, donde los mecanismos han sido dilucidados en mayor detalle. En bacterias (Gram-negativas), las cascadas de señalización en las que participan los homólogos a S2P seguirían el mismo mecanismo

descrito en la vía SREBP de mamíferos, es decir, usualmente una S1P cortaría en el segmento periplasmático del sustrato transmembrana en respuesta a una señal inductora específica, y seguido cortaría dentro del mismo segmento transmembrana una S2P que liberaría el segmento citosólico del sustrato, que en muchos casos correspondería a un regulador transcripcional (Schneider y Glickman., 2013). Un homólogo a la S2P eucariota mejor descrito corresponde a la metaloproteasa SpoIVFB de *Bacillus subtilis* que estaría involucrada en el proceso de esporulación (Yu y Kroos., 2000). SpoIVFB se localiza en la membrana más externa que rodea a la pre-espora (membrana de la célula madre) y participaría en la activación de la forma precursora del factor sigma^K, el cual juega un rol fundamental en la regulación de la expresión de genes durante el proceso de esporulación (Rudner y col., 1999; Yu y Kroos., 2000).

2. LA VÍA SREBP EN HONGOS:

El colesterol y el ergosterol (principal esteroles en hongos) son sintetizados, regulados y esterificados en procesos muy similares, y por lo tanto, no es sorprendente que numerosos componentes genéticos del metabolismo de esteroides se conserven en eucariotas (Sturley., 2000). Existe evidencia que la vía SREBP es conservada en hongos como un importante regulador de la homeostasis de los esteroides. Por ejemplo, en la levadura ascomicete *Schizosaccharomyces pombe* se han descrito homólogos de SREBP-1a y de Scap humanas, identificados como las proteínas Sre1 y Sre2 (homólogos de SREBP-1a) y Scp1 (homólogo de Scap) (Hughes y col., 2005). Al igual que la SREBP humana, Sre1 sufre cortes proteolíticos y a diferencia de Sre2, es activada en respuesta a los bajos niveles de esteroides en una forma dependiente de Scp1. La activación de Sre1 a Sre1N, regulada por los niveles de esteroides, ha sido

ensayada en medios de cultivos suplementados con azoles, los cuales son compuestos que inhiben la síntesis de ergosterol, porque se ha visto que afectan la actividad de las enzimas citocromos P450 como la Cyp51 involucrada en la desmetilación del lanosterol (Watson y col., 1989; Kelly y col., 1995). Interesantemente, en *S. pombe* Sre1 también estimularía la transcripción de genes requeridos para la adaptación a condiciones de hipoxia (Hughes y col., 2005). Estas condiciones de bajos niveles de oxígeno han sido controladas experimentalmente ($0,2\% \pm 0,1\%$ de O_2), pero también han sido simuladas al utilizar el compuesto $CoCl_2$, el cual es un agente químico que induciría en la célula una respuesta similar a la observada en condiciones de hipoxia (Hughes y col., 2005; Lee y col., 2007). Hughes y col., 2005 proponen que en condiciones de hipoxia, el complejo Sre1-Scp1 detecta una disminución en la síntesis de esteroides, la cual es dependiente de oxígeno, lo que llevaría a la activación proteolítica de Sre1. En particular, Sre1 controlaría la transcripción de genes en múltiples vías de biosíntesis dependientes de oxígeno, tales como la de ergosterol, hemo, esfingolípidos y de ubiquinona (Todd y col., 2006). Además, en esta levadura, Sre1 y Sre2 serían procesadas proteolíticamente por un mecanismo diferente (Stewart y col., 2011), ya que no se han identificado homólogos de las S1P y S2P humanas (Espenshade y Hughes., 2007). Por otro lado, en la levadura patógena basidiomicete ***Cryptococcus neoformans*** también se han detectado homólogos de SREBP, Scap y S2P humanas, y las proteínas se denominaron Sre1, Scp1 y Stp1, respectivamente (Chun y col., 2007; Chang y col., 2007). En este organismo, la activación de Sre1 en respuesta a bajas concentraciones de esteroides celulares y de oxígeno también requiere de Scp1, ya que probablemente Sre1 y Scp1 forman un complejo similar al descrito entre la SREBP y Scap de mamíferos (Chang y col., 2007). Interesantemente, a diferencia de la levadura ascomycete *S. pombe*, el factor Sre1 de *C. neoformans* es

activado a su forma N-terminal (Sre1N) por el homólogo de la S2P humana, identificado como Stp1 (Bien y col., 2009).

Otro basidiomicete con una potencial vía SREBP corresponde a la levadura carotenogénica *Xanthophyllomyces dendrorhous*, donde actualmente no existen reportes formales de esta vía. Sin embargo, en nuestro laboratorio se han identificado posibles genes de la vía SREBP ortólogos a los identificados en *H. sapiens* y en las levaduras antes mencionadas, y en consecuencia la biosíntesis de esteroides de *X. dendrorhous* también podría estar regulada por la vía SREBP. Antecedentes de nuestro laboratorio sugieren que los niveles de esteroides estarían involucrados en la regulación de otras rutas de biosíntesis, principalmente la ruta carotenogénica de *X. dendrorhous*.

2.1 *Xanthophyllomyces dendrorhous*: Es una levadura carotenogénica aislada originalmente desde exudados de árboles en las regiones montañosas de Japón y Alaska (Visser y col., 2003), y es uno de los pocos organismos conocidos por sintetizar astaxantina como principal carotenoide (Echavarri-Erasun y Johnson., 2004), probablemente como una ventaja adaptativa, ya que se ha propuesto que la propiedad antioxidante de los carotenoides protege a la levadura contra especies reactivas de oxígeno (Schroeder y Johnson., 1993). La astaxantina es una xantófila (carotenoide oxigenado) y representa cerca del 85% del contenido total de carotenoides de cepas silvestres de *X. dendrorhous* (Visser y col., 2003). Estas características la convierten en un carotenoide valioso con aplicaciones industriales; por ejemplo, en la industria de los salmónidos es usada como colorante y como componente nutricional para el adecuado crecimiento y reproducción, y debido a sus propiedades antioxidantes

tendría un efecto positivo en enfermedades cuando es usada como suplemento (Higuera-Ciapara y col., 2006). Además, al igual que el ergosterol corresponde a un compuesto isoprenoide derivado de la ruta del mevalonato (MVA). A continuación se describe la biosíntesis de compuestos isoprenoides en *X. dendrorhous*, abordado desde la ruta del MVA que genera los precursores comunes para la síntesis de los compuestos isoprenoides: carotenoides y esteroides.

2.1.1 Biosíntesis de compuestos isoprenoides en *X. dendrorhous*:

En nuestro laboratorio se ha estudiado la organización genómica y la regulación de la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de compuestos isoprenoides de *X. dendrorhous*. Tanto los carotenoides como los esteroides pertenecen a la familia de compuestos isoprenoides o terpenos, moléculas sintetizadas a través de sucesivas condensaciones de dos formas de isopreno activadas: el isopentenil-pirofosfato (IPP, C₅) y el dimetilalil-pirofosfato (DMAPP, C₅). En eucariontes no fotosintéticos, el IPP y el DMAPP se generan en la ruta del MVA (Figura 2) (Miziorko., 2011). La ruta del MVA primero fue descrita en animales y en levaduras, y hoy es considerada la principal ruta de síntesis de IPP y DMAPP en eucariotas y arqueas. En la levadura *X. dendrorhous* se ha descrito la ruta del MVA y en nuestro laboratorio se han identificado genes que posiblemente participarían en ella, siendo éstos: *ERG10A* (homólogo del gen *ERG10* de *S. cerevisiae* que codifica una acetoacetil-CoA tiolasa), *HMG5* (HMG-CoA sintasa, siendo *ERG13* su homólogo en *S. cerevisiae*), *HMGR* (HMG-CoA reductasa, siendo *HMG1* y *HMG2* sus homólogos en *S. cerevisiae*), *MVK* (MVA-kinasa, siendo *ERG12* su homólogo en *S. cerevisiae*), *PMVK* (fosfo-MVA-kinasa, siendo *ERG8* su homólogo en

S. cerevisiae) y *MVD1* (MVAPP-descarboxilasa, siendo *ERG19* su homólogo en *S. cerevisiae*).

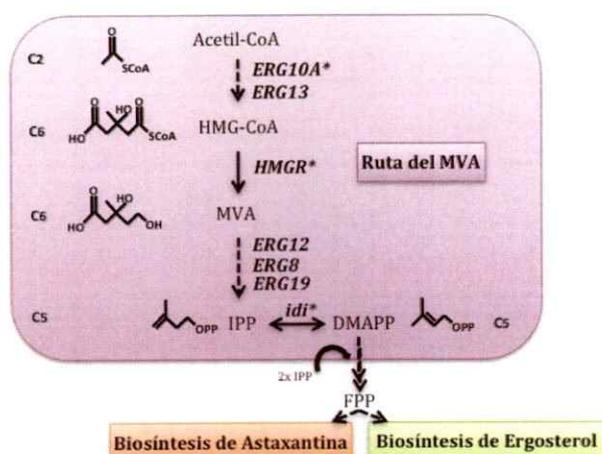


Figura 2. Ruta del MVA en *X. dendrorhous*. Se presenta en cursiva los genes que controlan la ruta de síntesis de IPP (isopentenil-pirofosfato) y su isómero DMAPP (dimetilalil-pirofosfato) desde acetil-CoA en *X. dendrorhous*. Los genes acompañados de asterisco corresponden a aquellos caracterizados en *X. dendrorhous*, mientras que el resto corresponden a *S. cerevisiae*. Se indican algunos metabolitos de la ruta, donde: HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA), MVA (mevalonato), FPP (farnesil-pirofosfato). Genes: *ERG10A* (acetoacetil-CoA tiasa) (Werner y col., 2016), *ERG13* (HMG-CoA sintasa), *HMGR* (HMG-CoA reductasa) (Loto., 2015), *ERG12* (MVA-kinasa), *ERG8* (fosfo-MVA-kinasa), *ERG19* (MVAPP-descarboxilasa), *idi* (IPP-isomerasa) (Niklitschek y col., 2008).

2.1.1.1 Carotenoides

En *X. dendrorhous*, la ruta de biosíntesis de carotenoides ha sido descrita (Figura 3) y se inicia cuando dos moléculas de geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) forman fitoeno, el primer carotenoide que se produce por acción de la enzima bifuncional fitoeno-β-caroteno sintasa codificada por el gen *crtYB* (Verdoes y col., 1999a). Luego, la enzima fitoeno desaturasa codificada por el gen *crtI*, forma licopeno a partir de fitoeno (Verdoes y col., 1999b). La ciclación de los extremos del licopeno genera β-caroteno por acción de la enzima fitoeno-β-caroteno sintasa, y

posteriormente la adición de grupos ceto en las posiciones 4 y 4', y de grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 3' de los anillos β -ionona del β -caroteno, da lugar a astaxantina. Este paso involucra la formación de intermediarios y la catálisis de un sistema citocromo P450 formado por la enzima citocromo P450 denominada astaxantina sintasa y una citocromo P450 reductasa, codificadas por los genes *crtS* y *crtR*, respectivamente (Alcaíno y col., 2008).

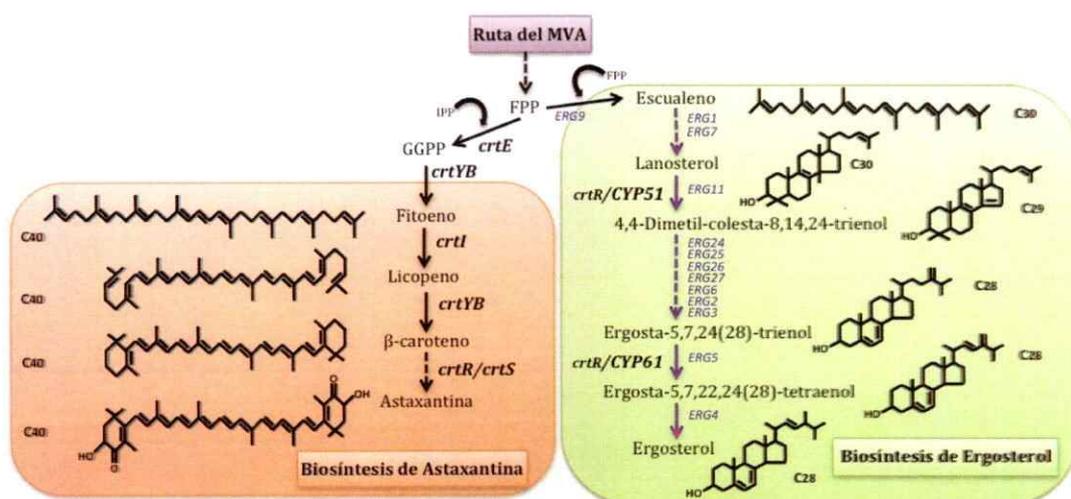


Figura 3. Rutas de biosíntesis de astaxantina y ergosterol. Cada ruta se encuentra encerrada en un recuadro, donde se presentan los genes descritos que controlan la ruta de biosíntesis de astaxantina en *X. dendrorhous*: *crtYB* (enzima bifuncional fitoeno- β -caroteno sintasa), *crtI* (enzima fitoeno desaturasa), *crtS/crtR* (sistema citocromo P450) (Alcaíno y col., 2008). Con flechas y en cursivas azules se presenta la ruta de biosíntesis de ergosterol descrita en *S. cerevisiae*, mientras que en cursivas negras genes descritos en *X. dendrorhous*: *CYP61*, codificante de una citocromo P450: C-22 esteroles desaturasa (Loto y col., 2012), y el gen *CYP51* codificante de una citocromo P450: C-14 esteroles demetilasa (Leiva y col., 2015). Genes fuera de los recuadros: *crtE* (GGPP sintasa) y *ERG9* (escualeno sintasa).

2.1.1.2 Esteroles

Los esteroles son componentes estructurales de las membranas de las células de eucariontes que regulan su espesor, fluidez y permeabilidad (Zhang y Rao., 2010;

Loto y col., 2012), siendo el ergosterol el principal esteroles en hongos incluyendo a las levaduras. La escualeno sintasa, codificada por el gen *ERG9* en *S. cerevisiae*, realiza la primera etapa comprometida en la formación de esteroides, generando escualeno (Figura 3). Mutaciones en este gen confieren una obligada auxotrofia de esteroides (Sturley., 2000). El escualeno sufre un proceso de ciclación y da lugar a lanosterol, donde la conversión de este último en ergosterol es un proceso complejo que involucra la acción de enzimas unidas a membranas, incluyendo a dos enzimas citocromo P450: Cyp51 y Cyp61 (Figura 3) (Loto y col., 2012; Leiva y col., 2015). En *X. dendrorhous* se ha visto que el ergosterol estaría implicado en la regulación de la expresión de genes involucrados en la síntesis de precursores comunes para las vías de biosíntesis de esteroides y carotenoides. Por ejemplo, se ha observado que la disrupción del gen *CYP61* en los mutantes *cyp61⁻*, impide la biosíntesis de ergosterol y provoca la acumulación de otros esteroides que podrían corresponder a ergosta-5,8,22-trien-3-ol y ergosta-5,8-dien-3-ol (Loto y col., 2012). En estos mutantes ocurre un aumento en los niveles de transcritos del gen *HMGR* (de la ruta del MVA), cuya expresión podría estar regulada por la vía SREBP ya que se identificaron probables secuencias SRE en su región promotora (Loto., 2015), sugiriendo que el ergosterol regula su expresión por un mecanismo de *feedback* negativo. Además de la alteración del contenido y composición de los esteroides, en los mutantes *cyp61⁻* aumenta significativamente el contenido de carotenoides, sugiriendo que la ausencia de ergosterol favorece la biosíntesis de carotenoides (Loto y col., 2012). Lo anterior también se apoya con observaciones en mutantes *cyp51⁻*, gen que también codifica una enzima involucrada en la síntesis de ergosterol (Leiva y col., 2015). Si bien en estos últimos mutantes la composición de esteroides no cambia, si disminuye el contenido de ergosterol y aumenta el contenido de carotenoides acompañado de un aumento en los niveles de

transcritos del gen *HMGR*, apoyando los resultados que afirman que la reducción de la producción de esteroides favorece la producción de carotenoides (Leiva y col., 2015). Recientemente, en el laboratorio se identificaron posibles genes que codificarían proteínas de la vía SREBP incluyendo a: Sre1 (homólogo de SREBP de *H. sapiens* y Sre1 de *S. pombe*) y Stp1 (homólogo S2P de *H. sapiens* y Stp1 de *C. neoformans*). También, mediante análisis bioinformático de las regiones promotoras de algunos genes de la ruta del MVA, carotenogénicos y de la biosíntesis de esteroides, se identificaron secuencias SRE; por lo tanto, estos genes podrían estar regulados por los niveles de esteroides a través de la vía SREBP (González., 2016). En consecuencia, resulta interesante estudiar los genes de la posible vía SREBP de esta levadura, específicamente a *STP1*, gen que codificaría a la S2P (identificada como Stp1) activadora de Sre1 en su forma N-terminal (Sre1N) de *X. dendrorhous*.

Hipótesis:

X. dendrorhous tendría una vía SREBP operativa que incluye al gen *STP1* que codificaría a Stp1 (homóloga de S2P, *Site-2 Protease*) involucrada en el procesamiento del factor de transcripción Sre1 (homólogo de SREBP); por lo tanto, la delección del gen *STP1* afectará la expresión de genes regulados por Sre1 incluyendo a genes que controlan la biosíntesis de isoprenoides en la levadura.

Objetivo General:

Caracterizar y estudiar la funcionalidad del gen *STP1* que participaría en la vía SREBP de *X. dendrorhous*, enfocándose en la síntesis de isoprenoides que incluye la biosíntesis de esteroides y carotenoides.

Objetivos específicos:

- 1)** Identificar y caracterizar bioinformáticamente el gen *STP1* de levadura *X. dendrorhous*.
- 2)** Estudiar la funcionalidad del gen *STP1* identificado en (1) construyendo cepas mutantes $\Delta stp1$ de *X. dendrorhous* y evaluar el fenotipo de acuerdo a contenido/composición de carotenoides y esteroides, y crecimiento en medios suplementados con azoles o CoCl_2 .
- 3)** Evaluar el efecto de la mutación del gen *STP1* en la expresión de algunos genes que estarían regulados por la vía SREBP en *X. dendrorhous* mediante RT-qPCR.
- 4)** Evaluar la función de Stp1 en la activación de Sre1 mediante la construcción de dos nuevas cepas, $\text{CBS}\Delta stp1/STP1$ y $\text{CBS.SRE1N}\Delta stp1$, y evaluar el fenotipo de acuerdo a contenido/composición de carotenoides y esteroides, y crecimiento en medios suplementados con azoles o CoCl_2 .

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

1.1.1 Bacterias

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

1.1.2 Levadura

Para los experimentos de transformación por recombinación homóloga, se utilizaron cepas silvestre y mutantes de *X. dendrorhous* (Tabla 1), la cuales se cultivaron en medio YM (extracto de levadura 0,3%, extracto de malta 0,3%, bactopectona 0,5%) suplementado con glucosa 1%, en agitación constante a 22°C. Para la selección de colonias transformantes, se utilizó medio YM sólido suplementado con higromicina B (35 $\mu\text{g/ml}$) y/o zeocina (45 $\mu\text{g/ml}$).

1.2 Plásmidos, cepas, enzimas y ácidos nucleicos

Los plásmidos y cepas generadas/utilizadas en este trabajo se describen en la Tabla 1 y Tabla 2, respectivamente. Dentro de los plásmidos usados, se destacan pBlueScript SK- (Stratagene) y el vector de expresión pXdVexp2, el cual se creó en el

Laboratorio de Genética (Figura 4) y se utilizó en un trabajo anterior para integrar una copia extra de los genes *FPS* y *crtE* en *X. dendrorhous* (Alcaíno y col., 2014). En esta ocasión, este plásmido se utilizó para integrar el alelo silvestre del gen *STP1* en el genoma de la cepa CBS Δ *stp1* de *X. dendrorhous*.

Vector de expresión pXdVexp2

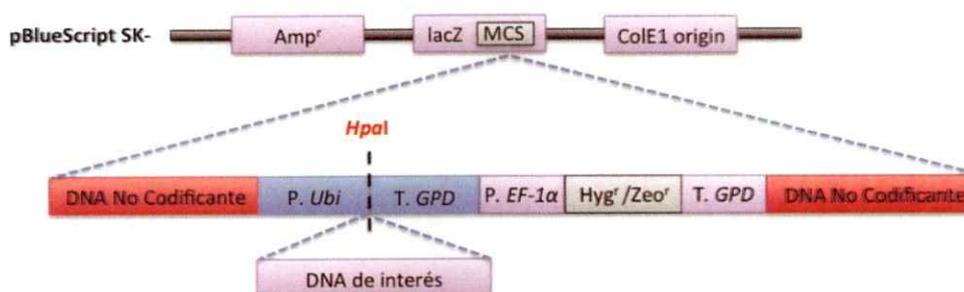


Figura 4. Vector pXdVexp2 de expresión en *X. dendrorhous*. Plásmido pBlueScript SK- portador de un fragmento integrado en el sitio de policlonamiento múltiple (MCS, *Multiple Cloning Site sequence*), el cual incluye el promotor del gen de ubiquitina (*P. Ubi*) y el terminador del gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*T. GPD*) de *X. dendrorhous*. El sitio de restricción *HpaI* permite la integración del DNA de interés a expresar entre *P. Ubi* y *T. GDP*. Presenta un módulo de resistencia a higromicina (*Hyg*^r) o zeocina (*Zeo*^r), donde el gen que otorga resistencia al antibiótico se encuentra río abajo del promotor del gen *EF-1α* (*P. EF-1α*) y río arriba del terminador *T. GDP*. Las regiones flanqueantes de DNA genómico no codificante (DNA No Codificante) permiten la integración de la construcción mediante recombinación homóloga en el genoma de *X. dendrorhous*, específicamente en el *locus int*₁ (Genbank: KJ140286), el cual representa una región de DNA no codificante que no revela un nuevo fenotipo evidente cuando es interrumpido. (Alcaíno y col., 2014).

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

obtenidas desde Agilent Technologies, ThermoScientific y Life Technologies, y utilizadas de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder de Thermo Scientific.

Tabla 1. Plásmidos generados y utilizados en este trabajo

Plásmido	Descripción	Fuente
pBlueScript SK-	ColE1 ori; Amp ^r ; vector de clonación con marcador de selección colonias azules-blancas.	Stratagene
pXdVexp2	Vector de expresión de <i>X. dendrorhous</i> : Plásmido pBlueScript SK- portador del promotor del gen de ubiquitina (<i>P-Ubi</i>) y del terminador del gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de <i>X. dendrorhous</i> (<i>T-GPD</i>). Presenta el módulo del gen que otorga resistencia a higromicina B (<i>hph</i>) o zeocina (<i>Sh ble</i>) y regiones flanqueantes de DNA genómico no codificante que permiten la integración de la construcción en el genoma de <i>X. dendrorhous</i> .	Alcaíno y col., 2014
pBS- <i>hph</i>	pBlueScript SK- portador del módulo del gen que otorga resistencia a higromicina B (<i>hph</i>) en el sitio <i>EcoRV</i> . <i>hph</i> está bajo el promotor del gen <i>EF-1 α</i> y el terminador del gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de <i>X. dendrorhous</i> (<i>T-GPD</i>).	Alcaíno y col., 2014
pBS- <i>zeo</i>	pBlueScript SK- portador del módulo del gen que otorga resistencia a zeocina (<i>Sh ble</i>) en el sitio <i>EcoRV</i> . <i>Sh ble</i> está bajo el control del promotor del gen <i>EF-1 α</i> y el terminador del gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de <i>X. dendrorhous</i> (<i>T-GPD</i>).	Alcaíno y col., 2014
pBS-Δ <i>gSTP1-hph</i>	Plásmido pBlueScript SK- que en el sitio <i>EcoRV</i> porta el módulo del gen que otorga resistencia a higromicina B (<i>hph</i>) entre regiones de DNA río arriba y río abajo del locus <i>STP1</i> para su delección.	Este trabajo.
pBS-Δ <i>gSTP1-Sh ble</i>	Plásmido pBlueScript SK- que en el sitio <i>EcoRV</i> porta el módulo del gen que otorga resistencia a zeocina (<i>Sh ble</i>) entre regiones de DNA río arriba y río abajo del locus <i>STP1</i> para su delección.	Este trabajo.

Continuación Tabla 1:

pXdVexp2-cSTP1_cl13	Vector de expresión pXdVexp2 que porta el cDNA del gen <i>STP1</i> codificante de la enzima Stp1 entre el promotor del gen de ubiquitina (<i>P-Ubi</i>) y el terminador del gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de <i>X. dendrorhous</i> (<i>T-GPD</i>).	Este trabajo.
pBS-UP-gSTP1-DOWN_cl1	Plásmido pBlueScript SK- que en el sitio <i>SmaI</i> porta el DNA del locus del gen <i>STP1</i> incluyendo sus regiones flanqueantes que permiten la integración en el genoma de las cepas mutantes $\Delta stp1$ de <i>X. dendrorhous</i> por recombinación homóloga.	Este trabajo.
pBS-UP-gSTP1-DOWN_cl1-Zeo	Plásmido pBS-UP-gSTP1-DOWN_cl1 que porta el módulo del gen que otorga resistencia a zeocina (<i>Sh ble</i>) en el sitio <i>AgeI</i> .	Este trabajo.

Tabla 2. Cepas generadas y utilizadas en este trabajo

Cepa	Genotipo	Fuente
<i>E. coli</i>:		
DH5 α	Amp ^s	Sambrook y col., 2001
<i>X. dendrorhous</i>:		
CBS 6938	Cepa parental silvestre.	ATCC 96594
CBS $Scyp61^-$	Cepa parental hemicigota (Zeo ^r) derivada de la cepa CBS 6938. El locus del gen <i>CYP61</i> se interrumpió con el módulo del gen que otorga resistencia a zeocina (<i>Sh ble</i>).	Alcaíno y col., 2012
CBS $\Delta stp1$	Transformante (Hyg ^r) derivado de la cepa CBS 6938. El locus del gen <i>STP1</i> se interrumpió con el módulo del gen que otorga resistencia a higromicina B.	Este trabajo.
CBS $Scyp61^- \Delta stp1$	Transformante (Zeo ^r /Hyg ^r) derivado de la cepa CBS $Scyp61^-$. El locus del gen <i>STP1</i> se interrumpió con el módulo del gen que otorga resistencia a higromicina B.	Este trabajo.
CBS.SRE1N	Transformante (Hyg ^r) derivado de la cepa CBS 6938. El locus del gen <i>SRE1</i> se reemplazó con el alelo de <i>SRE1</i> que sólo expresa la forma activa de Sre1 (Sre1N).	Gutiérrez., 2016a,b.

Continuación Tabla 2:

CBS.SRE1N Δ stp1	Transformante (Hyg ^r /Zeo ^r) derivado de la cepa CBS-SRE1N. El locus del gen STP1 se interrumpió con el módulo del gen que otorga resistencia a zeocina.	Este trabajo
CBS Δ stp1/STP1	Transformante (Zeo ^r) derivado de la cepa CBS Δ stp1 al cual se le reintegró el alelo silvestre de STP1.	Este trabajo

Amp^s = sensible a antibiótico ampicilina; Hyg^r = resistente a antibiótico higromicina B; Zeo^r = resistente a antibiótico zeocina; ATCC = American type culture Collection.

Tabla 3. Partidores generados y utilizados en este trabajo.

Nº	Identificación	Secuencia (5' - 3')	Dirección
Construcción de módulos para la delección del gen STP1:			
Módulos de Higromicina B y zeocina			
1	HF	ATGAAAAGCCTGAACTCACC	D
2	HR	CTATTCCTTTGCCCTCGGACG	R
3	ZN.F	ATGACCGAGATCGGCGAGCAG	D
4	ZN.R	TGATGAACAGGGTCACGTCGT	R
Regiones flanqueantes (UP y DOWN) al locus STP1			
5	Pre-del-gSTP1.F	AGCCCAAGCTATGGAGAGTAC	D
6	Post-del-gSTP1.R	GGAAATGTACAGCCGACGGTA	R
7	Del-gSTP1.F	AGCTGGGTTGGTAACGAAAGG	D
8	Del-gSTP1.R	GTCCTTCCCTTTGTCGCTCT	R
9	Del-gSTP1HpaI.F	CAATATGCACCGTTAACTCTCTCTGTCTCTCTCTTCT	D
10	Del-gSTP1HpaI.R	ACAGAGAGA <u>GTTAA</u> CGGTGCATATTGGGGAGGAAGGG	R
Gen STP1			
11	STP1.F-atg	AGCACAAGAACACCGAGCAAC	D
12	STP1.R-stop	AGCCCAAGCTATGGAGAGTAC	R
13	Ctrl. F	TCAGTCACTTTGCCCTCGATC	D
14	Ctrl.R	CTCCTTTGGACTCATCTGGCT	R
15	STP1.Fw	AGCACAAGAACACCGAGCAAC	D
16	STP1.Rv1	AGCCCAAGCTATGGAGAGTAC	R
Partidores comunes para la construcción de los módulos para la delección:			
17	P.Tef.F	ATCGGCTCATCAGCCGACAGT	D
18	T.gpd.R	ATGAGAGATGACGGAGATGAT	R
Construcción de módulos para la reincorporación del alelo silvete del gen STP1:			
19	Pre-del-gSTP1.F	Ver nº 5	D
20	Down del-STP1.R	GGACGGAAAGCTGACGGACGC	R
21	P.Tef.F	Ver nº 17	D
22	T.gpd.R	Ver nº 18	R
23	ZN.F	Ver nº 3	D

Continuación Tabla 3:

24	ZN.R	Ver nº 4	R
25	STP1.F-atg	Ver nº 11	D
26	STP1.R-stop	Ver nº 12	R
27	Ctrl. F	Ver nº 13	D
28	Ctrl.R	Ver nº 14	R
29	STP1.Fw	Ver nº 15	D
30	STP1.Rv1	Ver nº 16	R

Transformación de *X. dendrorhous*:

31	Pre-del-gSTP1.F	Ver nº 5	D
32	Post-del-gSTP1.R	Ver nº 6	R
35	STP1.F-atg	Ver nº 11	D
36	STP1.R-stop	Ver nº 12	R
33	Ctrl. F	Ver nº 13	D
34	Ctrl.R	Ver nº 14	R
37	SRE1.F	ATGGAAGACCTGTTCTGAAG	D
38	SRE1.R	TCAGCGTTTTGATGGGCC	R
39	SRE1.Fw1	TCATCTCATCCGCCCGAGTAC	D
40	Del2.Out.R	TGTGACAGACGAGACCAAGAACAG	R
41	GpdT.F	ACGGTTCTCTCCAAACCCTC	D
40	SRE1.Med.F	AATCACCCCTCCCGCTCGATACAC	D
41	SRE1.Med.R	GCTCCCTTTGAAGTTTCGAGGATGT	R
42	Flag3x.F	GACTACAAAGACCATGACGGT	D
43	Flag3x.R	TTTATCGTCGTCATCTTTG	R
44	HF	Ver nº 1	D
45	HR	Ver nº 2	R
46	ZN.F	Ver nº 3	D
47	ZN.R	Ver nº 4	R
48	P.Tef.F	Ver nº 17	D
49	T.gpd.R	Ver nº 18	R

PCR en tiempo Real (qPCR)

SRE1			
49	RT3_SRE1.F	GAGAAAATCACGAATGGATCAGC	D
50	RT3_SRE1.R	GGGTAAGGGCATGAGGTTG	R
STP1			
51	stp1_RT.F	GGCAGGGTCCGAGTGAATCAAT	D
52	stp1_RT.R	AGAATCCGCCATCCAACAGACT	R
HMGR			
53	Hmgr-real-2F	GGCCGATCGCTATACATCCGTTT	D
54	Hmgr-real-2R	ATCCAGTTGATGGCAGAAGGCT	R
HMGS			
55	Hmgs_RT2.F	AAGCAGGTTGAGCCTGGAATGA	D
56	Hmgs_RT2.R	AAAGCGGTTGAGCTCTTGACCT	R
crtR			
57	mcrtrF_RT	CTGGGAAACAAGACCTACGA	D
58	mcrtrR_RT	GGAACCTCGGTTACGACAAA	R
crtS			
59	crtS_RT.F	TATCTCTGGACCCAGAGCTTGC	D

Continuación Tabla 3:

60	crtS_RT.R	ACCTGCAAACGCATCTGGTAC	R
	CYP51		
61	Rt-CYP51.F	CAGCTCGCTCAGTTGATTCTAGTA	D
62	Rt-CYP51.R	ATGTGAACAGATCGCCGTGCTT	R

Continuación Tabla 3:

	ACT		
63	mActF-RT	CCGCCCTCGTGATTGATAAC	D
64	mActR-RT	TCACCAACGTAGGAGTCCTT	R
	INV		
65	inv-RT.F	CTTCAACGGCTCTGAAGGCTAC	D
66	inv-RT.R	AATCCAGGATGCTCCATCGTCG	R
	GRG2		
67	GRG2real Fw1	CATCAAGACCTCTGTCACCAAC	D
68	GRG2real Fv1	TTGGCGTCAGACGAGGACT	R

D = Directo; R = Reverso.

2. Métodos

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

2.1 Extracción de ácidos nucleicos

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

La purificación de DNA plasmídico se realizó mediante Gene JET Plasmid Miniprep Kit de acuerdo a las indicaciones del proveedor (ThermoScientific). El inserto, que incluye al locus *STP1* de los plásmidos construidos en este trabajo (Tabla 1), se secuenció completamente (Tabla 3).

2.1.2 Extracción de DNA genómico de *X. dendrorhous*

La extracción de DNA genómico de levadura se realizó mediante ruptura mecánica con perlas de vidrio (Sambrook y col., 2001). Se obtuvo un pellet celular proveniente desde un cultivo en medio sólido o líquido, se suspendió con 600 µl de buffer TE (Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8) y 100 µl de perlas de vidrio de 0,5 mm. Se llevó al molidor de células Mini-Beadbeater-16 (BioSpec) por 3 min, se agregó 600 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1, se homogenizó en vórtex por 2 min y se centrifugó a 10.000 x g por 5 min. Se recuperó la fase acuosa, se agregó 600 µl de cloroformo:alcohol isoamílico en una proporción 24:1, se homogenizó en vórtex y se centrifugó a 10.000 x g por 5 min. Nuevamente se recuperó la fase acuosa y el DNA se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C) incubando a -20°C por al menos 2 h. Luego se centrifugó a 10.000 x g por 10 min, se eliminó el sobrenadante y el DNA se lavó con un volumen de etanol al 70%. Finalmente el pellet se secó a 37°C y se suspendió en 100 µl de H₂O purificada para su utilización.

2.1.3 Extracción de RNA de *X. dendrorhous*

Para la extracción de RNA, se tomó entre 10-15 ml de un cultivo de levadura y se depositó en tubos de 2 ml que luego se centrifugaron por 5 min a 14.000 x g. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se suspendió con 200 µl de buffer de lisis (acetato de Na⁺ 0,002 M pH 5,5, SDS 0,5%, EDTA 1mM, en agua DEPC 0,1%), se agregó 100 µl de perlas de vidrio de 0,5 mm y se llevó al molidor de células por 3 min (o vórtex por 7 min). Luego, se agregó 800 µl de solución TriReagent (Life Technologies), se llevó al molidor por 3 min (o vórtex por 7 min) y se incubó en hielo por 10 min. A continuación se agregó 200 µl de cloroformo, se agitó manualmente por 15 s y se incubó a

temperatura ambiente por 10 min. Se centrifugó a 14.000 x g por 10 min a 4°C en centrífuga refrigerada y se recuperó la fase acuosa. Esta última se depositó en dos tubos Eppendorf y a cada uno se le agregó 250 µl de agua estéril y 550 µl de isopropanol frío y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Luego, se centrifugó por 10 min a 14.000 x g a 4°C, se eliminó el sobrenadante, se lavó el pellet con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó nuevamente por 6 min. El pellet se dejó secar y se suspendió con 20 a 30 µl de agua estéril.

2.2 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

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

2.3 Digestión de DNA plasmídico y reacción de ligado

Para la creación de los módulos para la delección y reintegración del gen *STP1* en el genoma de la levadura, los plásmidos pBlueScript SK- y pXdVexp2 se digirieron con una determinada enzima de restricción (*SmaI*, *AgeI*, o *HpaI*) en un volumen final de 20 μ l que incluyó 0,5-1 μ g de DNA plasmídico. Se incubó por el tiempo y temperatura indicado por el proveedor (ThermoScientific). La reacción de ligado entre el DNA plasmídico digerido y el DNA inserto (módulo) se realizó con la enzima DNA ligasa T4 en un volumen final de 20 μ l en una relación inserto-vector 5:1. Previo a la transformación de células de *E. coli* electrocompetentes, la reacción de ligado se dializó por 10 min.

2.4 PCR, RT-PCR y qPCR

2.4.1 Amplificación por PCR

Se realizaron reacciones de PCR con la enzima *Taq* DNA polimerasa para la confirmación de plásmidos e integración de fragmentos en el genoma de *X. dendrorhous*. Para la confección de módulos, la amplificación de fragmentos, entre ellos la versión genómica y de cDNA del gen *STP1*, se realizó con *Pfu* DNA polimerasa.

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

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

2.4.2 Síntesis de cDNA (RT-PCR)

Las muestras de RNA se trataron con DNasa I de acuerdo a las indicaciones del proveedor. La reacción de RT se realizó con la enzima Maxima Reverse Transcriptase (ThermoScientific) en un volumen final de 20 μ l. Se utilizó un determinado volumen de RNA (5 μ g) y se le agregó agua estéril hasta completar 11 μ l. A esta mezcla se le añadió 2 μ l del mix 1:1 de oligo-dT (25 μ M) y dNTPs (10 mM), y se incubó a 65°C por 5 min. Luego se dejó a 4°C por 3 min y después en hielo, y se agregó 6 μ l del mix 4:2 de buffer RT 5X y DTT (0,1M), más 1 μ l de enzima. Se incubó a 37°C por 52 min y luego a 70°C por 15 min, dejando enfriar a 4°C. Para amplificar el cDNA de cada gen se realizó una reacción de PCR como se indica en la sección 2.4.1.

2.4.3 PCR en tiempo real (qPCR)

Se utilizó la mezcla de reacción de PCR según las especificaciones del Kit SensiMix SYBR Green I (Quantance) que incluyó: 10 μ l de mezcla del kit, 8 μ l de agua estéril, 1 μ l de cDNA y 1 μ l de mezcla de partidores directo y reverso (10 μ M). Los partidores que se utilizaron tenían una eficiencia mayor al 95%, determinada en curvas estándares con un coeficiente de correlación de $R^2 \geq 0,996$. Las muestras se cargaron

en el equipo Mx 3000P (Stratagene). Para evaluar los niveles de transcritos, los valores de Ct (*threshold cycle*) se normalizaron respecto al valor obtenido del gen *ACT* (Genbank: X89898.1) de *X. dendrorhous*, y se expresaron en función de las condiciones control usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen; 2001).

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

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

2.5.1 Transformación de *E. coli*

Para preparar células electrocompetentes de *E. coli*, se inoculó medio LB con un cultivo de 12 h de *E. coli* DH5 α y se incubó con agitación constante a 37°C hasta alcanzar una DO entre 0,5 y 0,8 medida a 600 nm (cultivo en fase exponencial de crecimiento). Las etapas siguientes se realizaron a 4°C, manteniendo células y soluciones en hielo. Las células se colectaron por centrifugación a 10.000 x g por 5 min en centrífuga refrigerada y se lavaron dos veces, primero con 500 ml y luego con 250 ml de agua destilada estéril. El pellet celular se suspendió con 20 ml de glicerol estéril al 10% (v/v) y nuevamente se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y se suspendió con glicerol al 10% (v/v); la suspensión de células se fraccionó en alícuotas de 40 μ l que se depositaron en tubos Eppendorf que se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Para la transformación, se descongeló una alícuota de células electrocompetentes y se le agregó el DNA transformante en un volumen no mayor a 4 μ l. Esta mezcla se depositó en una cubeta de electroporación de 2 mm y se electroporó

utilizando el equipo BioRad Gene Pulser X Cell con las siguientes condiciones: 25 μ F, 200 Ω y 2,5 kV. Las células se suspendieron con 1 ml de medio LB y se incubaron a 37°C por 1 h. Posteriormente, el cultivo se sembró en alícuotas de 75 μ l, 150 μ l y 225 μ l en placas con medio LB suplementadas con el antibiótico ampicilina (100 μ g/ml), y se incubó a 37°C hasta la aparición de colonias.

2.5.2 Transformación de *X. dendrorhous*

La preparación de células electrocompetentes de la cepa silvestre y mutantes de *X. dendrorhous* se realizó según lo descrito por Kim y col., (1998) y Adrio y col., (1995). Se inoculó medio YM suplementado con glucosa 1% con un cultivo de la levadura de 48 h y se incubó con agitación constante a 22°C hasta alcanzar una DO entre 2 y 4 medida a 600 nm (cultivo en fase exponencial de crecimiento). Las células se colectaron por centrifugación a 4.000 x g por 3 min, se suspendieron con 25 ml de buffer fosfato de potasio (fosfato de potasio 50 mM pH 7, DTT 25 mM) y se incubaron a 22°C por 15 min. Luego, las etapas siguientes se realizaron a 4°C manteniendo células y soluciones en hielo. Las células se colectaron por centrifugación a 4.000 x g por 3 min y se lavaron dos veces con 25 ml de solución STM (sacarosa 270 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 1 mM). El pellet celular se suspendió con solución STM y se almacenó en hielo para su uso durante el mismo día.

La transformación de *X. dendrorhous* se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Kim y col., (1998). A una alícuota de 70-100 μ l de células electrocompetentes se le agregó 10 μ l de DNA transformante (10-15 μ g). Se electroporó en el equipo BioRad Gene Pulser X Cell bajo las siguientes condiciones: 125 μ F, 600 Ω y 450 V. Las células se suspendieron con 1 ml de medio YM y se incubaron a 22°C por 4 h. Posteriormente,

el cultivo se sembró en alícuotas de 200 µl en placas YM-agar suplementadas con los antibióticos higromicina B (35 µg/ml) y/o zeocina (45 µg/ml), y se incubó a 22°C hasta la aparición de colonias.

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

2.6.1 Extracción y análisis de carotenoides

La extracción de carotenoides se llevó a cabo según el método de extracción con acetona (An y col., 1989). Se colectó las células de un cultivo de levadura crecido en medio YM líquido a 22°C con agitación constante. Se centrifugó a 4.000 x g por 5 min, se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó con 10 ml de agua destilada. Luego, el pellet se suspendió con 1 ml de agua, se transfirió a un tubo de 5 ml y se agregó 500 µl de perlas de vidrio de 0,5 mm. Se llevó al molidor de células por 3 min, se agregó 1 ml de acetona y nuevamente se llevó al molidor durante 3 min. Después se centrifugó a 4.000 x g por 5 min y se recolectó el sobrenadante. Las extracciones con acetona se repitieron hasta que el extracto celular quedara incoloro. Para cada extracción, se llevó la mezcla por 3 min al molidor, seguido por 5 min de centrifugación a 4.000 x g, recolectando el sobrenadante cada vez en el mismo tubo. Finalmente, se agregó 1/5 de volumen de éter de petróleo al tubo que contenía los sobrenadantes colectados, se mezcló y se centrifugó por 5 min a 4.000 x g. La fase superior, correspondiente al éter de petróleo con los carotenoides, se transfirió a un tubo de vidrio y se determinó la absorbancia a 474 nm para la cuantificación total de los carotenoides. Los análisis se realizaron por triplicado y los pigmentos se normalizaron respecto al peso seco de la levadura. Se utilizó la siguiente fórmula:

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

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

La determinación de la composición de pigmentos se realizó mediante cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC) en un equipo de HPLC con un detector de arreglo de diodos Shimadzu SPD-M10A y una columna Lichrospher RP18 125-4 (Merck). Para ello, se dejó evaporar el éter de petróleo del extracto, se suspendió con 200 μl de acetona y se inyectó 20 μl en el equipo. Como fase móvil, se utilizó acetonitrilo:metanol:isopropanol en una proporción 75:20:5 (v/v), con un flujo de 1 ml/min en condiciones isocráticas. Los carotenoides fueron reconocidos de acuerdo a sus tiempos de retención y espectro de absorción de acuerdo a estándares.

2.6.2 Extracción de esteroides

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

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

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

Para la determinación de la composición de esteroides mediante RP- HPLC, se dejó secar el éter de petróleo y se suspendió en 200 μl de acetona. Como fase móvil se usó metanol:H₂O en proporción 97:3 (v/v), con flujo 1ml/min en condiciones isocráticas. Los esteroides fueron reconocidos de acuerdo a sus tiempos de retención y espectro de absorción de acuerdo a estándares.

2.7 Crecimiento de las cepas de *X. dendrorhous* en medios suplementados con azoles o CoCl₂.

Se evaluó el crecimiento de las cepas de levadura en medios de YM-agar (1,5%) suplementados con azoles o CoCl₂, ya que se ha documentado que los azoles, compuestos usados comúnmente como antifúngicos, inhiben la acción de los citocromos P450, y por otra parte, se ha descrito que el CoCl₂ induciría en la célula una respuesta similar a la observada en condiciones de hipoxia. Para ello, las cepas se crecieron en medio YM-líquido hasta fase exponencial de crecimiento (aproximadamente 48 h de crecimiento) y se tomó una muestra de este cultivo inicial con la que se realizaron dos experimentos cualitativos. Para un experimento, de dicha muestra de cultivo se tomó 100 μl y se sembró en una placa de YM-agar a la que luego se le incorporó un círculo de papel filtro en el centro donde se depositó 10 μl de una solución de azoles o CoCl₂; y para el otro experimento, de esta misma muestra de

cultivo inicial se realizó una dilución seriada, donde 5 μ l de cada dilución se depositó en una placa de YM-agar con y sin suplementación de azoles o CoCl_2 , luego las placas se incubaron por 5 días a 22°C. Para estos experimentos las soluciones de azoles y de CoCl_2 se utilizaron en concentraciones finales que no afectan el crecimiento de las cepas parentales CBS 6938 y CBS $_{cyp61}$ de *X. dendrorhous* (González., 2016). Para la determinación de las concentraciones de estos compuestos se utilizaron como referencia las concentraciones experimentales de azoles y de CoCl_2 ensayadas en cultivos de levaduras de *S. pombe* y *C. neoformans*, tanto silvestres como mutantes de la vía SREBP (Chang y col., 2007; Lee y col., 2007; Chang y col., 2009; Hughes y col., 2009; Bien y col., 2010).

RESULTADOS

1. Análisis bioinformático de la secuencia de la enzima Stp1 (homóloga de S2P) codificada por el gen *STP1*.

En nuestro laboratorio se han identificado los posibles genes *SRE1* y *STP1* que codificarían al factor de transcripción Sre1 (SREBP) y la proteasa Stp1 (S2P), respectivamente, que podrían estar involucradas en la vía SREBP en *X. dendrorhous*. En esta tesis se estudió el gen *STP1*, y a partir de su secuencia genómica y de cDNA se determinó su organización estructural, identificando 5 exones (de 462 pb, 104 pb, 422 pb, 342 pb y 533 pb) y 4 intrones (de 111 pb, 118 pb, 82 pb y 110 pb), además de la región codificante del transcrito maduro de 1863 bases.

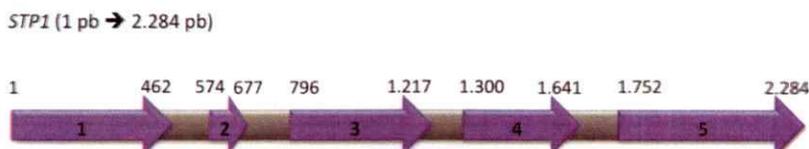


Figura 5. Estructura del gen *STP1* de la vía SREBP de *X. dendrorhous*. El gen *STP1* de *X. dendrorhous* se compone de 5 exones (en azul) y 4 intrones (en negro). En cada exón, los números indican su inicio y término en pares de bases (pb) desde el inicio de la traducción.

Para obtener información de Stp1, se dedujo la secuencia de aminoácidos utilizando *Translate Tool* del servidor ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>) y se determinó que el gen *STP1* codifica una proteína de 620 aminoácidos. A partir de las secuencia proteica deducida, se calcularon los parámetros físicos y químicos utilizando *ProtParam Tool* del mismo servidor (<http://web.expasy.org/protparam/>). La proteasa tendría un peso molecular de 66,74 kDa y un pI de 5,66. Para predecir la vida media, la herramienta considera el aminoácido que ocupa el N-terminal, donde la presencia de

metionina, glicina, prolina o valina determinan una vida media larga (Battaner., 2012). En este caso consideró metionina, por lo tanto, la vida media estimada fue de >20 h en levaduras *in vivo*. En cuanto a la composición de sus aminoácidos, un 53,4% corresponden a residuos no polares (Gly: 6,9%, Ala: 7,9%, Val: 5,2%, Leu: 12,4%, Ile: 7,3%, Pro: 6,9%, Trp: 2,1%, Phe: 3,7%, Met: 1,0%); por lo tanto, tendría una naturaleza hidrofóbica al igual que la caracterizada S2P humana de la vía SREBP (Gly: 6,0%, Ala: 5,6%, Val: 10,0%, Leu: 11,9%, Ile: 6,7%, Pro: 4,2%, Trp: 1,7%, Phe: 6,6%, Met: 1,7%).

Para predecir si la proteína Stp1 es de membrana, se determinó el número de hélices transmembrana con el servidor TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), el cual predijo gráficamente 7 hélices transmembrana. También se utilizó el servidor SOSUI (http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosui_submit.html) que predice hélices transmembrana y sus resultados indican explícitamente si la proteína es soluble o si es de membrana (indicando el número de hélices transmembrana). En concordancia con la predicción anterior, SOSUI predijo que la secuencia de aminoácidos corresponde a la de una proteína de membrana que posee 7 hélices transmembrana. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que la Stp1 de *X. dendrorhous* es una proteína asociada a membrana. Posteriormente se realizó un análisis de predicción de la localización sub-celular, donde los resultados fueron variables de acuerdo al servidor que se utilizó. El servidor PredictProtein (<https://www.predictprotein.org/>) permite predecir localización sub-celular en los distintos dominios de la vida y la puntuación de confianza que acompaña su resultado va desde 0 (no fiable) a 100 (fiable). Al ingresar la secuencia de Stp1, localizó en el dominio Eucarionte y la localización sub-celular fue la membrana plasmática, con una puntuación de confianza 54. Además, predijo que la proteína no

contiene una señal de localización nuclear (NLS, Nuclear Localization Signal). El servidor DISTILL (<http://distill.ucd.ie/distill/>) también predice localización sub-celular, pero a diferencia de *PredictProtein*, hace sus predicciones en los Reinos Animal, Planta y Fungi. Además, permite indicar en cuál de ellos se hará la predicción y como resultado entrega la localización sub-celular de la proteína consultada y el nivel de confianza (expresados explícitamente como bajo, medio o alto) en el Reino seleccionado. Para la búsqueda se seleccionó el Reino Fungi, y el servidor predijo que la localización sub-celular era citoplasmática con una confianza baja. Finalmente, se utilizó PSORT II (<http://psort.hgc.jp/form2.html>), el cual es recomendado para el análisis de secuencias de proteínas animales y de levaduras. Este servidor predijo una probabilidad de 52,2% de localización en la membrana plasmática, un 17,4% en el retículo endoplasmático (RE), y un 4,3% en el aparato de Golgi. Además predice que la proteína no posee señales de retención en el RE ni señales de destino al peroxisoma y vacuola. De acuerdo con los análisis realizados, la posible localización sub-celular de la proteína sería la membrana plasmática. Sin embargo, estos resultados no son del todo claros, pero indican que Stp1 es componente celular de membrana.

Posteriormente, para buscar posibles dominios y motivos conservados, la secuencia de la proteína Stp1 se analizó en el servidor InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) el cual proporciona un análisis funcional de las secuencias de las proteínas al clasificarlas en familias y predice la presencia de dominios y sitios importantes utilizando modelos predictivos proporcionados por diferentes bases de datos. También se utilizó la base de datos de peptidasas MEROPS (<https://merops.sanger.ac.uk/index.shtml>) que utiliza una clasificación jerárquica basada en la estructura de las proteasas. En este caso, cada proteasa es asignada a

una familia sobre la base de similitudes estadísticamente significativas en la secuencia de sus aminoácidos, y a su vez, a las familias que considera homólogas las agrupa en un clan. Según esta base de datos, un clan contiene familias de proteínas que derivan del mismo ancestro, incluso si no existe una similitud significativa entre sus secuencias, siendo el criterio más riguroso para incluir proteínas dentro de un mismo clan la similitud entre sus estructuras terciarias, mientras que en una familia de proteínas se puede demostrar que éstas están relacionadas sólo por comparación entre sus secuencias (Rawlings y col., 2010; Rawlings y col., 2012). Por lo tanto, un clan podría corresponder a una superfamilia de proteínas según la clasificación de la base de datos SCOP (Structural Classification of Proteins database), la cual agrupa a familias que entre ellas poseen una baja identidad de secuencias, pero sus estructuras sugieren un origen evolutivo común (Lo Conte y col., 2000). Al ingresar la secuencia de la proteína, la herramienta InterPro detectó al dominio Peptidasa M50 (IPR008915), que según la clasificación MEROPS, se encuentra en la familia de proteasas M50 incluidas en el clan MM ("M": Metaloproteasa; metaloendoproteasas embebidas en la membrana); y la afilió a la proteasa MBTPS2 (Membrane-bound transcription factor peptidase, site-2) (IPR001193) también conocida como S2P (*Site-2 Protease*), la que forma parte de la subfamilia de proteasas M50A de la base de datos de MEROPS (M50.001). Además, InterPro predijo que la función biológica es la proteólisis (GO:0006508) y cuya función molecular es la actividad metaloendopeptidasa (GO:0004222), además de ser un componente celular de membrana (GO:0016020). Lo cual correspondería a lo propuesto para la Stp1 por homología a la S2P de la vía SREBP de mamíferos. Además, los miembros de la familia M50 (clan MM) poseen el motivo conservado HE-(x)₂-H, común en la mayoría de las metaloproteasas (Rawlings y Barret., 1995), y el motivo conservado x-DG, el cual luego se redefinió como N-(x)₂-P-

(x)₄-DG (Lewis y Thomas., 1999; Rudner y col., 1999). Para identificar estos motivos conservados en la proteína de *X. dendrorhous*, se realizó un alineamiento múltiple en T-Coffee (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>) utilizando las secuencias de aminoácidos de las metaloproteasas caracterizadas de la familia M50 que incluye a la S2P de *Homo sapiens* (MEROPS M50.002) y al factor de esporulación SpoIVFB de *Bacillus subtilis* (MEROPS M50.002), además se utilizó la secuencia de la Stp1 (homóloga de la S2P humana) de *Cryptococcus neoformans* y de la metaloproteasa EGY de *Arabidopsis thaliana*. Del alineamiento se detectó el motivo HE-(x)₂-H (H₁₇₉E₁₈₀-(x)₂-H₁₈₃) y el motivo N-(x)₂-P-(x)₄-DG (N₄₈₄-(x)₂-P₄₈₇-(x)₄-D₄₉₂G₄₉₃) en la proteína de *X. dendrorhous*. Por lo tanto, la proteína deducida del gen *STP1* identificado en *X. dendrorhous* correspondería a una metaloproteasa y a su vez, pertenecería a la familia M50. En el panel A de la figura 6 se muestra parte de las secuencias alineadas y los motivos conservados presentes en secuencia de la proteína de *X. dendrorhous*, mientras que en panel B de la figura 6 se muestran los porcentajes de identidad sólo entre las proteasas caracterizadas de la vía SREBP de *H. sapiens*, *C. neoformans* y de la proteína de *X. dendrorhous*.

A) Alineamiento múltiple entre proteasas de la familia M50

<i>X. dendrorhous</i>	175	AQLVHEPGHAISA	<i>X. dendrorhous</i>	481	SIFNLLPLSLLDGGFF
<i>C. neoformans</i>	198	NQLIHELGHALSA	<i>C. neoformans</i>	476	FLFNLLPLPSTDGSOL
<i>H. sapiens</i>	167	SGVVHEIGHGIAA	<i>H. sapiens</i>	456	AIVNAVPCFALDGQWI
<i>B. subtilis</i>	39	IVLIHELGHAALA	<i>B. subtilis</i>	126	LFVNLLPIWPLDGGKL
<i>A. thaliana</i>	307	ILLFHELGHFLAA	<i>A. thaliana</i>	439	TAFNMLPVGCLDGRGA

B) Porcentaje de identidad (y % cobertura) entre proteasas de la vía SREBP.

	<i>X. dendrorhous</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>H. sapiens</i>
<i>X. dendrorhous</i>		25% (95%)	22% (76%)
<i>C. neoformans</i>	25% (95%)		20% (59%)
<i>H. sapiens</i>	22% (76%)	20% (59%)	

Figura 6. Alineamiento múltiple de secuencias proteicas. Se utilizó la herramienta T-Coffee disponible en línea (www.ebi.ac.uk/Tools) para alinear a la secuencia proteica Stp1 deducida del gen *STP1* de *X. dendrorhous* contra las secuencias de proteasas de la familia M50 de *C. neoformans* (XP_571333.1), *H. sapiens* (AAC51937.1), *B. subtilis* (WP_004398649.1) y *Arabidopsis thaliana*

de aminoácidos (números entre paréntesis), mientras que la línea 2 indica las posibles hélices α (H), láminas β (E) y *coils* (-) conformadas por un segmento de residuos. En la línea 3 se muestra la confianza de la predicción de 0 (baja confianza) a 9 (alta confianza). Los motivos HE-(x)₂-H y N-(x)₂-P-(x)₄-DG se presentan subrayados y los residuos conservados en negrita.

En resumen, la proteína Stp1 de *X. dendrorhous* correspondería a una proteína de membrana que contiene los motivos conservados HE-(x)₂-H y N-(x)₂-P-(x)₄-DG presentes en las metaloproteasas de la familia M50.

2. Construcción de módulos y transformación de *X. dendrorhous*.

Para estudiar la funcionalidad del gen *STP1* identificado se construyeron las cepas CBS Δ *stp1* y CBS*Scyp61* Δ *stp1* a partir de la cepa silvestre (CBS 6938) y de una cepa mutante de *X. dendrorhous* (CBS*Scyp61*⁻), respectivamente. Esta última cepa no produce ergosterol, y por ello, posiblemente la vía SREBP está activada. La funcionalidad del gen *STP1* se evaluó en estas cepas de acuerdo a su fenotipo en cuanto a contenido/composición de carotenoides y esteroides, y crecimiento en medios suplementados con azoles (inhibidores de enzimas P450, y dos de ellas, Cyp51 y Cyp61, están involucradas en la síntesis de ergosterol) y CoCl₂ (compuesto que induce una respuesta bioquímica y molecular similar a la observada en condiciones de hipoxia). Por otra parte, se propuso evaluar la función de Stp1 en la activación de Sre1 (a su forma Sre1N) mediante la construcción de dos nuevas cepas. Para ello se construyó un nuevo mutante Δ *stp1* a partir de la cepa CBS.*SRE1N*, mutante que deriva de la cepa silvestre y en el cual el locus del gen *SRE1* se reemplazó por el alelo de *SRE1* que sólo expresa la forma activa de Sre1 (Sre1N). Por lo tanto, en este mutante la activación de Sre1 (Sre1N) sería independiente de procesamiento por Stp1. Para el segundo mutante, se reintegró el alelo silvestre *STP1* en la cepa CBS Δ *stp1*, por lo

tanto, se espera que en este mutante se recupere la función de *STP1* en las condiciones propuestas. Las nuevas cepas también se evaluaron de acuerdo a su fenotipo. A continuación, se presenta la construcción de los módulos para la delección y reintegración de *STP1*, y la transformación de *X. dendrorhous* para la obtención de los mutantes mencionados.

2.1 Construcción de vectores con módulo para la delección de *STP1* en la cepa silvestre CBS 6938 y en los mutantes CBS*cyp61*⁻ y CBS.*SRE1N* de *X. dendrorhous*:

Con el objetivo de evaluar el efecto de la delección del gen *STP1* en *X. dendrorhous*, se construyeron módulos para su delección y para ello se utilizó el vector comercial pBlueScript SK- (pBS). Los módulos se generaron amplificando desde el genoma de *X. dendrorhous*, zonas de DNA río arriba y río abajo del *locus STP1* de aproximadamente 600 pb y 700 pb (denominadas zonas *UP* y *DOWN*, respectivamente) que permitirán la recombinación homóloga en la levadura para así reemplazar el gen *STP1* por el módulo que confiere resistencia a antibiótico (Higromicina B o zeocina). Dichas regiones se amplificaron con partidores que permiten dejar el sitio de restricción *HpaI* entre ellas luego de ser unidas mediante OE-PCR (fragmento *UP-DOWN*). De esta forma, luego de unir el fragmento *UP-DOWN* en el sitio *EcoRV* del vector pBS, el sitio *HpaI* permite integrar entre las regiones *UP* y *DOWN* un módulo que otorga resistencia a antibiótico.

Para la obtención de estos vectores se utilizó la cepa de *E. coli* DH5- α y la técnica de PCR de colonia para la selección de los transformantes resistentes al antibiótico ampicilina portadores del vector correctamente construido. Una vez identificadas las colonias portadoras de los plásmidos diseñados (pBS- Δ *gSTP1-hph* y

pBS- Δ gSTP1-*Sh ble*), se purificó el DNA plasmídico desde ellas y se analizó mediante PCR y por digestión enzimática. Como ejemplo, en el panel A de la figura 8 se muestra la construcción del vector de delección pBS- Δ gSTP1-*hph*, y en el panel B su verificación por PCR y digestión enzimática. Con esta última se libera el DNA con el cual se transforma a *X. dendrorhous* para reemplazar el gen *STP1* en su genoma por un evento de doble recombinación homóloga.

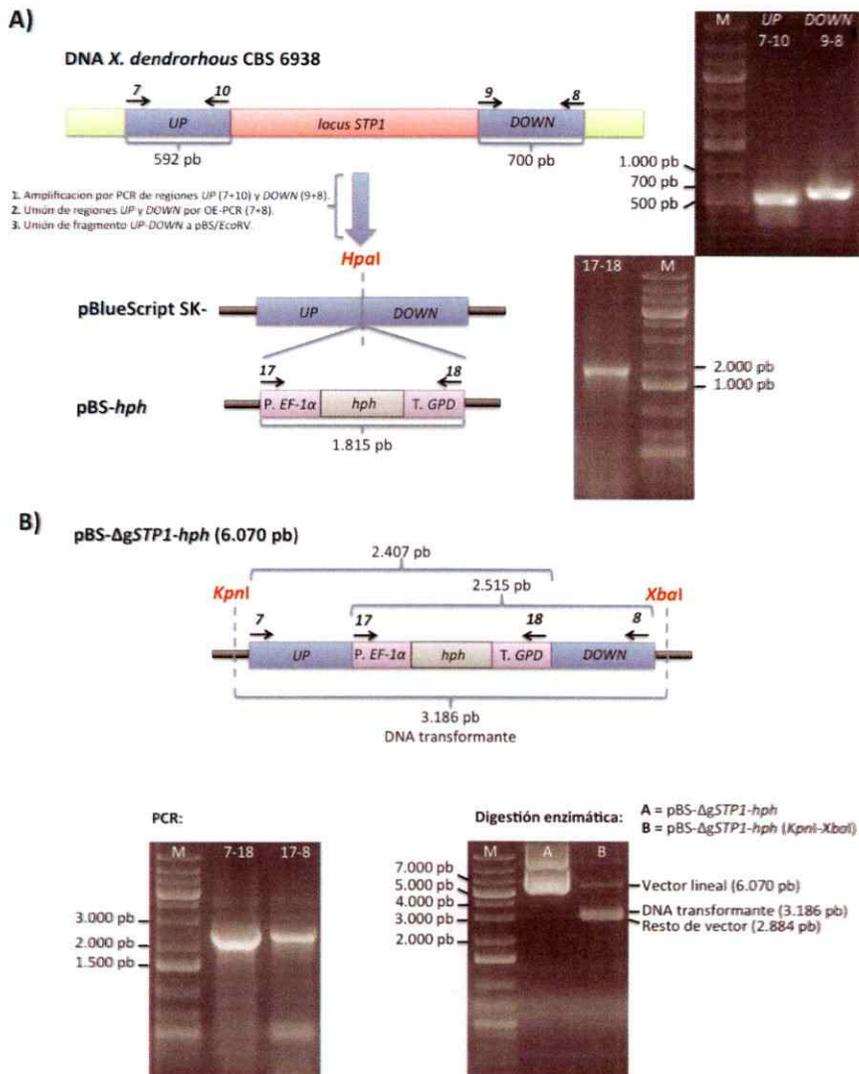


Figura 8. Construcción del vector pBS- Δ gSTP1-*hph* y su análisis. A) Amplificación por PCR de regiones de DNA río arriba (UP) y río abajo (DOWN) del locus de *STP1* y del módulo que otorga resistencia a higromicina B desde el

vector pBS-hph. Representaciones del genoma de *X. dendrorhous* desde donde se amplificaron los fragmentos de DNA *UP* y *DOWN* del locus *STP1*, y del vector pBS-*hph*, donde la expresión del gen *hph* está bajo la regulación del promotor del gen *EF-1 α* (*P. EF-1 α*) y del terminador de la transcripción del gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de la transcripción (*T. GPD*), de genes de *X. dendrorhous*; y desde el cual se amplificó el módulo del gen *hph* que otorga resistencia a higromicina B. Las regiones *UP* y *DOWN* se amplificaron utilizando los pares de partidores 7-10 y 9-8, respectivamente, los cuales permitieron integrar el sitio de restricción *HpaI* entre ellas. Estos fragmentos se ligaron en el plásmido pBlueScript SK-, y la digestión con la enzima de restricción *HpaI* permitió integrar el módulo del gen *hph* entre ellos. **B) Representación y análisis del vector pBS- Δ gSTP1-hph por PCR y digestión enzimática.** El DNA plasmídico purificado desde *E. coli* se analizó por PCR utilizando los pares de partidores 7-18 y 17-8, los cuales permiten corroborar la integración del módulo gen *hph* entre las regiones de DNA *UP* y *DOWN*. La digestión del vector con las enzimas *KpnI* y *XbaI* permiten la liberación del DNA transformante de 3.186 pb para transformar a *X. dendrorhous* y permitir la delección del gen *STP1* por un evento de doble recombinación homóloga. M=marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder. Se destacan los partidores utilizados como flechas y números en las figuras, y como pares numéricos en las fotografías de los geles de agarosa.

Con los módulos para la delección de *STP1* de los vectores pBS- Δ gSTP1-*hph* y pBS- Δ gSTP1-*Sh ble*, se transformó a la cepa silvestre CBS 6938 y a las mutantes CBS Δ cyp61 y CBS.SRE1N de *X. dendrorhous* como se presenta a continuación.

2.2 Transformación de la cepa silvestre CBS 6938 y de las mutantes CBS Δ cyp61 y CBS.SRE1N de *X. dendrorhous* con módulos para la delección de *STP1*:

Las cepas parentales CBS 6938 (sensible a ambos antibióticos) y CBS Δ cyp61 (resistente a zeocina) de *X. dendrorhous* se transformaron con el DNA transformante del vector pBS- Δ gSTP1-*hph*, mientras que la cepa CBS.SRE1N (resistente a higromicina B) con el vector pBS- Δ gSTP1-*Sh ble*. La figura 9, representa al vector pBS- Δ gSTP1-*hph*, su digestión enzimática, la integración del DNA transformante en el genoma de la cepa silvestre CBS 6938 de *X. dendrorhous*, y la obtención del mutante CBS Δ stp1. Particularmente, el vector pBS- Δ gSTP1-*hph* se digirió con las enzimas *KpnI*

y *Xba*I, las cuales permiten liberar el fragmento de DNA portador del módulo que otorga resistencia a higromicina B entre regiones de DNA *UP* y *DOWN* del locus *STP1*, las cuales permiten la incorporación de la resistencia en el lugar del alelo silvestre *STP1* mediante un evento de doble recombinación homóloga una vez en la célula, de esta forma logrando la delección de *STP1*.

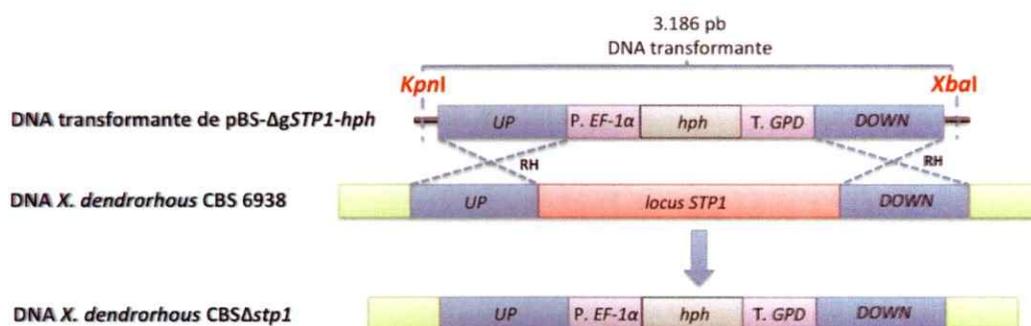


Figura 9. Representación del vector pBS- Δ gSTP1-hph y su digestión enzimática, e integración del DNA transformante en el genoma de *X. dendrorhous*. El vector pBS- Δ gSTP1-hph se digirió con las enzimas *Kpn*I y *Xba*I que liberan un fragmento de 3.186 pb que corresponde al DNA transformante. Este último se integra en el DNA genómico de la levadura luego de la electroporación por un evento de doble recombinación homóloga (RH, representados por las cruces con línea punteada), lo cual permite la integración del módulo que otorga resistencia a higromicina B en el lugar del alelo silvestre *STP1*.

Se obtuvieron colonias transformantes de *X. dendrorhous* en placas YM-agar suplementadas con antibiótico (higromicina B, 35 μ g/ml y/o zeocina 45 μ g/ml). Para evaluar a los mutantes, se seleccionaron las colonias más grandes y se les extrajo DNA genómico para confirmar la delección de *STP1* en el genoma. Los mutantes de delección obtenidos se identificaron como CBS Δ *stp1*, CBS*scp61* Δ *stp1* y CBS.*SRE1N* Δ *stp1*, derivados de las cepas CBS 6938, CBS*scp61*⁻ y CBS.*SRE1N*, respectivamente. A modo de ejemplo, la Figura 10 muestra la confirmación de la delección de *STP1* en el genoma de la cepa CBS Δ *stp1* (ahora resistente a higromicina B).

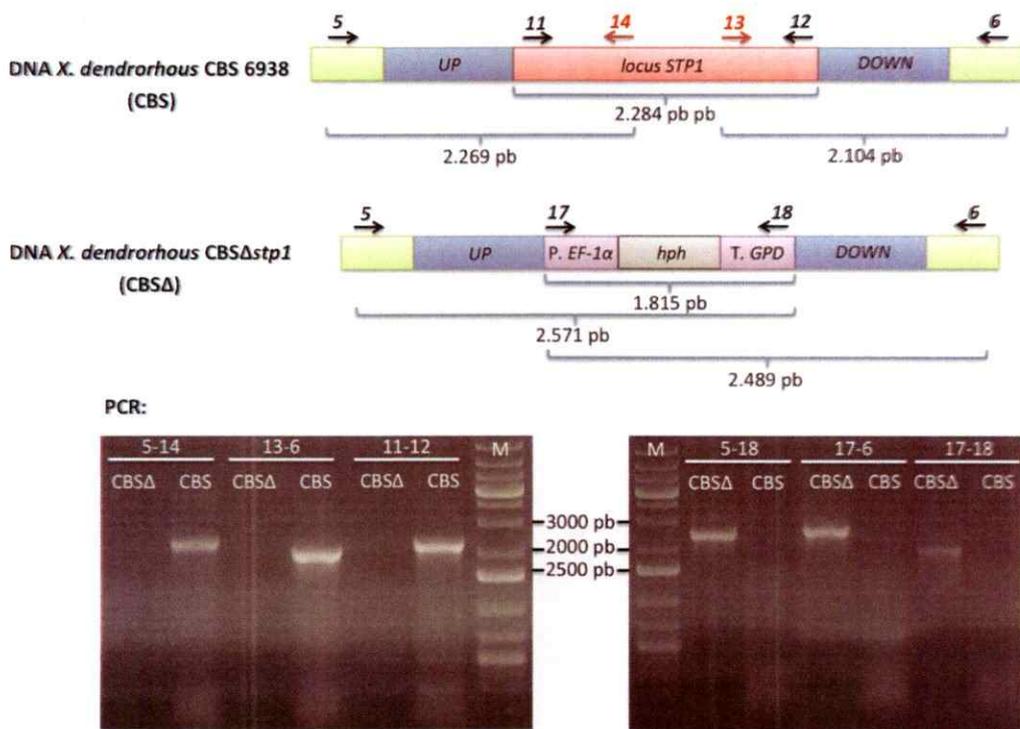


Figura 10. Representación y verificación de la integración del DNA transformante en el genoma de *X. dendrorhous* por PCR. Se verificó la delección del gen *STP1* en el genoma del mutante obtenido CBSΔ*stp1* utilizando como control el DNA de la cepa silvestre CBS 6938 de *X. dendrorhous* en las reacciones de PCR. Las figuras representan el locus *STP1* en el genoma de la cepa CBS 6938 y la delección de *STP1* en el genoma de la cepa CBSΔ*stp1*. En las figuras y en las fotografías de los geles de agarosa los números sobre cada carril representan a los partidores utilizados en cada reacción de PCR, donde el DNA molde fue: CBSΔ=cepa mutante de delección CBSΔ*stp1*; CBS=cepa silvestre CBS 6938. M=marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder.

Si bien la cepa CBS.*SRE1N* fue obtenida de forma paralela a esta tesis (Gutiérrez., 2016a,b), en los análisis de PCR realizados para la cepa CBS.*SRE1N*Δ*stp1* obtenida en este trabajo, se incluyó aquellos que permiten confirmar que efectivamente el gen *SRE1* nativo fue reemplazado por la versión que sólo codifica la forma activa (Sre1N) en la cepa parental. La figura 11 representa los loci *SRE1* y *STP1* en la cepa silvestre CBS 6938 y en el mutante CBS.*SRE1N* de *X. dendrorhous*,

mientras que en la figura 12 se comprueba la delección del gen *STP1* en la cepa obtenida CBS.*SRE1N* Δ *stp1* (resistente a higromicina B y zeocina).

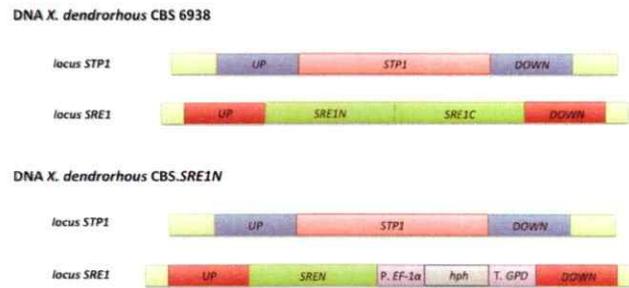


Figura 11. Representación de los loci *STP1* y *SRE1* en la cepa silvestre CBS 6938 y en el mutante CBS.*SRE1N* de *X. dendrorhous*. Para la obtención del mutante CBS.*SRE1N* se reemplazó el alelo silvestre del gen *SRE1* por el alelo *SRE1N* que sólo expresa la forma activa de Sre1 (Sre1N).

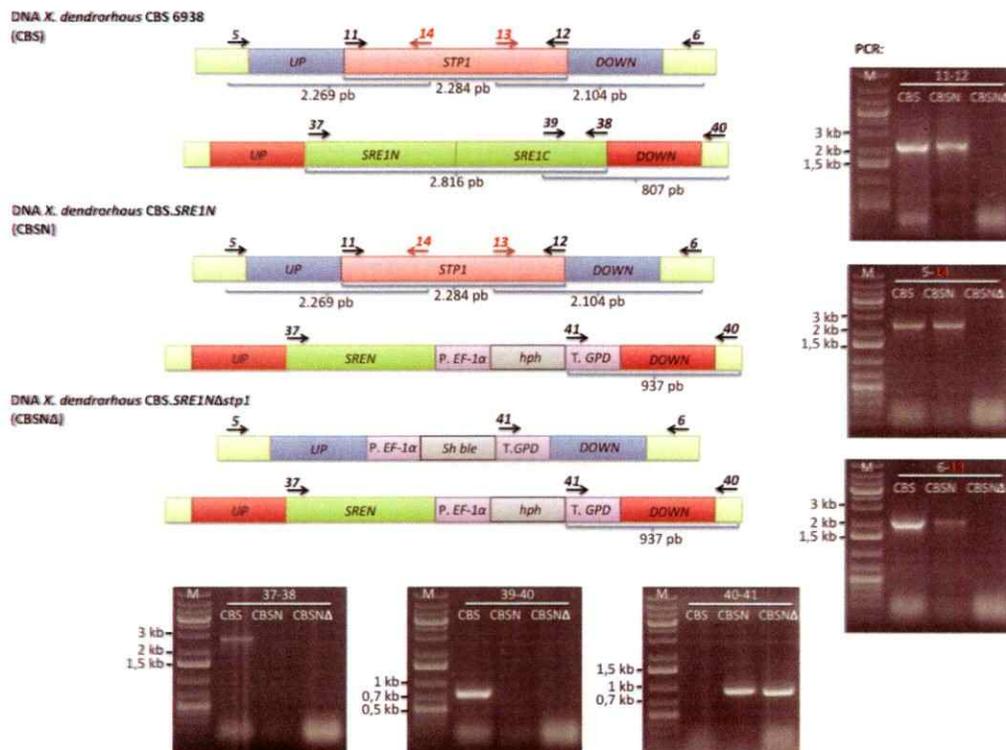


Figura 12. Representación y verificación de la integración del DNA transformante en el genoma de *X. dendrorhous* por PCR. Se verificó la delección del gen *STP1* en el genoma del mutante obtenido CBS.*SRE1N* Δ *stp1* utilizando como control el DNA de la cepa silvestre CBS 6938 y del parental CBS.*SRE1N* de *X. dendrorhous* en las reacciones de PCR. Las figuras representan los loci *STP1* y *SRE1*

en el genoma de las cepas CBS 6938 y CBS.SRE1N, y la delección de *STP1* en el genoma de la cepa CBS.SRE1N Δ *stp1*. En las figuras y en las fotografías de los geles de agarosa, los números sobre cada carril representan a los partidores utilizados en las reacciones de PCR, donde el DNA molde utilizado fue: CBS=cepa silvestre CBS 6938; CBSN=cepa parental CBS.SRE1N y CBSN Δ =cepa mutante de delección CBS.SRE1N Δ *stp1*. M=marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder.

2.3 Construcción de vectores con módulo para la reintegración de *STP1* en la cepa CBS Δ *stp1* de *X. dendrorhous*:

Con el objetivo de evaluar el efecto de la recuperación de la función del gen *STP1* de *X. dendrorhous*, se construyeron módulos para su reintegración en el genoma de la cepa mutante CBS Δ *stp1*, y para ello se utilizaron dos estrategias, ya que con la primera construcción propuesta no se logró reintegrar el gen *STP1* luego varios experimentos de transformación independientes, por lo tanto, se implementó una segunda estrategia de transformación. En la primera estrategia se construyó el módulo de expresión del gen *STP1* utilizando el vector pXdVexp2 (Alcaíno y col., 2014). Este módulo se generó ligando la versión cDNA de *STP1* al vector, obtenido a partir de RNA de la cepa CBS 6938 de *X. dendrorhous*, de tal forma que la expresión del *STP1* quedó bajo la regulación del promotor del gen de ubiquitina (*P. Ubi*) y el terminador de la transcripción del gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*T. GPD*), de genes de *X. dendrorhous*. Una vez ligados el vector y el cDNA, se utilizó la cepa de *E. coli* DH5- α para la replicación de éste, y se utilizó la técnica de PCR de colonia para seleccionar a las colonias portadoras del vector correctamente construido. Una vez identificada la colonia portadora del plásmido diseñado pXdVexp2-c*STP1*_c13, se purificó el DNA plasmídico desde ella y se analizó mediante PCR. Además, el inserto del plásmido se secuenció para confirmar que no había errores en la secuencia. La

Figura 13 ilustra la construcción del vector pXdVexp2-cSTP1_cl13 y su análisis por PCR y por digestión enzimática.

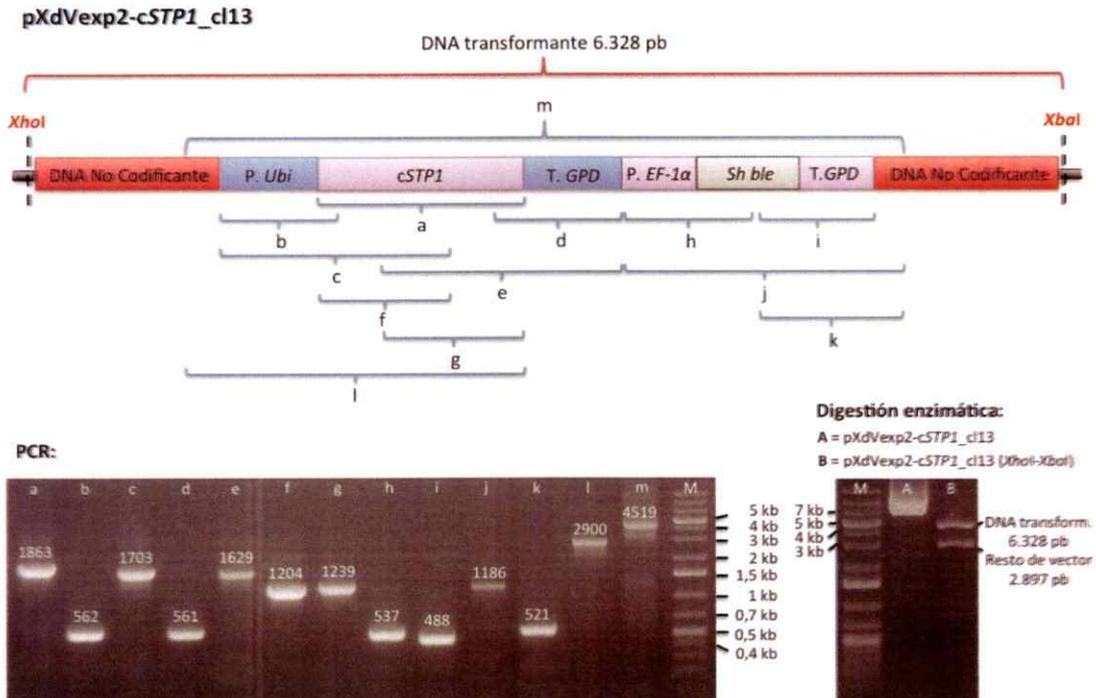


Figura 13. Construcción del vector pXdVexp2-cSTP1_cl13 y su análisis. Representación del vector pXdVexp2-cSTP1_cl13 portador de la versión cDNA del gen *STP1* de *X. dendrorhous* bajo la regulación del promotor *P. Ubi* y del terminador *T. GPD*. Esta construcción presenta un módulo que otorga resistencia al antibiótico zeocina donde el gen *Sh ble* está regulado por el promotor del gen *EF-1α* y el terminador *GPD* (*T.GPD*). El DNA transformante de 6.328 pb se libera por doble digestión enzimática (*Xho*I y *Xba*I) y las regiones de DNA no codificante permiten su integración en el genoma de la levadura por un evento de doble recombinación homóloga. Las fotografías de los gels de agarosa corresponden al análisis del vector por PCR (esquina inferior izquierda) y por digestión (esquina inferior derecha). En el análisis por PCR, las letras minúsculas en los carriles corresponden a las de la figura superior y los números sobre los amplificados, indican el tamaño esperado en pares de bases).

La segunda estrategia para reincorporar al gen *STP1* en el genoma de la cepa mutante CBSΔ*stp1*, consistió esta vez en reincorporar la versión genómica del gen en su locus. Para esto se amplificó, desde el genoma de la cepa silvestre CBS 6938, el

locus *STP1* incluyendo las zonas flanqueantes *UP* y *DOWN*, pero esta vez utilizando un par de partidores posicionados río arriba de la región *UP* y río debajo de la región *DOWN*, anteriormente descritas que se usaron como zonas recombinantes en los módulos de delección de *STP1*. De esta manera se obtuvo un fragmento de 3.918 pb que se ligó al sitio *SmaI* del vector pBlueScript SK-. Posteriormente, este vector se digirió con la enzima *AgeI* (sitio de restricción dentro de la zona *DOWN*) y se ligó el módulo que confiere resistencia al antibiótico zeocina, el cual previamente se amplificó desde el plásmido pBS-Zeo. De esta forma se obtuvo el vector pBS-UP-gSTP1-DOWN_c11-Zeo como se representa en la figura 14.

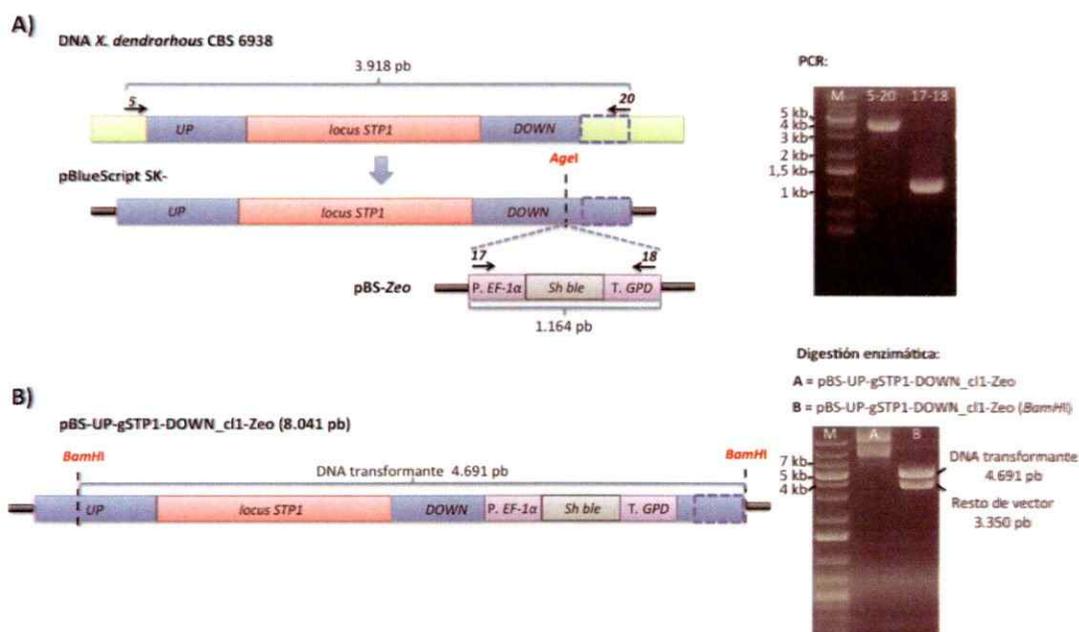


Figura 14. Construcción del vector pBS-UP-gSTP1-DOWN_c11-Zeo y su análisis. A) Amplificación por PCR desde regiones de DNA río arriba de la zona *UP* y río debajo de la zona *DOWN* del locus *STP1*, y del módulo que otorga resistencia a zeocina desde el vector pBS-Zeo. Representación del genoma de *X. dendrorhous* desde donde el par de partidores 5-20 amplifican un fragmento de 3.918 pb que incluye al locus *STP1* entre nuevas regiones flanqueantes *UP* y *DOWN*. Dicho fragmento se ligó al vector pBlueScript SK- en el sitio *SmaI*. Posteriormente, el vector construido (pBS + fragmento: *UP*/locus *STP1*/*DOWN*) se digirió con la enzima *AgeI* que corta en la zona *DOWN*, para integrar en dicho sitio el módulo que otorga resistencia a

zeocina que fue previamente amplificado con el par de partidores 17-18 desde el vector pBS-Zeo. Se destacan los partidores utilizados como flechas y números en las figuras, y como pares numéricos en la fotografía del gel de agarosa. **B) Representación y análisis del vector pBS-UP-gSTP1-DOWN_cl1-Zeo por digestión enzimática.** El DNA plasmídico purificado desde *E. coli* se analizó por digestión del vector con la enzima *BamHI*, la que permite la liberación del DNA transformante de 4.691 pb para transformar a *X. dendrorhous* y permitir la reintegración del gen *STP1* en su locus por un evento de doble recombinación homóloga. M=marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder.

2.4 Transformación de la cepa CBS Δ stp1 de *X. dendrorhous* con módulo para la reintegración de *STP1* en el genoma:

La cepa CBS Δ stp1 de *X. dendrorhous* se transformó con el DNA transformante del vector pXdVexp2-cSTP1_cl13 como primera estrategia. Este vector se digirió con las enzimas *XhoI* y *XbaI* que permiten liberar el fragmento de DNA transformante portador del módulo de expresión del gen *STP1* y el módulo que confiere a *X. dendrorhous* resistencia a zeocina, ambos módulos entre regiones de DNA genómico no codificante de aproximadamente 900 pb que permiten su integración en el genoma de la levadura mediante recombinación homóloga una vez en la célula. En la figura 15, se muestra la digestión del vector pXdVexp2-cSTP1_cl13 y el fenómeno de doble recombinación homóloga esperado para generar el nuevo mutante.

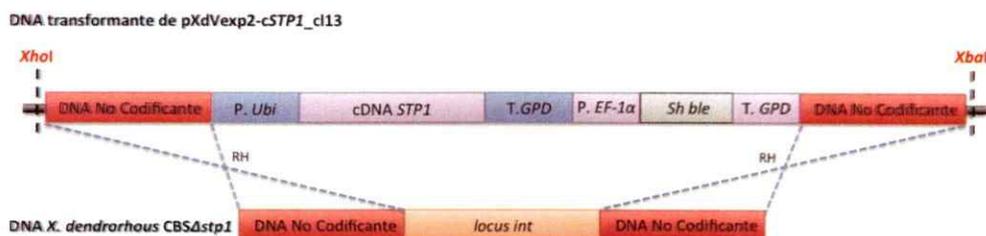


Figura 15. Representación del vector pBS-UP-gSTP1-DOWN_cl1-Zeo. La doble digestión enzimática con *XhoI* y *XbaI* permiten liberar al DNA transformante del vector. Las regiones de DNA no codificantes (en rojo) permiten la recombinación homóloga (RH) en el locus *int* de *X. dendrorhous*.

La cepa CBS Δ *stp1* se transformó con el DNA transformante obtenido desde el vector pXdVexp2-c*STP1*_cl13, no obteniendo colonias transformantes en las placas YM-agar suplementadas con antibióticos (higromicina B, 35 μ g/ml y zeocina 45 μ g/ml). Posteriormente, la cepa CBS Δ *stp1* se transformó con el DNA transformante del nuevo vector construido pBS-UP-g*STP1*-DOWN_cl1-Zeo, usado como segunda estrategia para reintegrar al alelo silvestre *STP1*. Este último se digirió con la enzima *Bam*HI que permiten liberar el fragmento de DNA portador del locus *STP1* y del módulo del gen que otorga resistencia a zeocina entre regiones de DNA *UP* y *DOWN* al locus *STP1*, las cuales permiten la incorporación de este fragmento en el lugar del alelo silvestre *STP1* que anteriormente fue escindido. La figura 16, representa al vector pBS-UP-g*STP1*-DOWN_cl1-Zeo, su digestión enzimática, la integración del DNA transformante en el genoma de la cepa CBS Δ *stp1* y la obtención del mutante CBS Δ *stp1*/*STP1*.

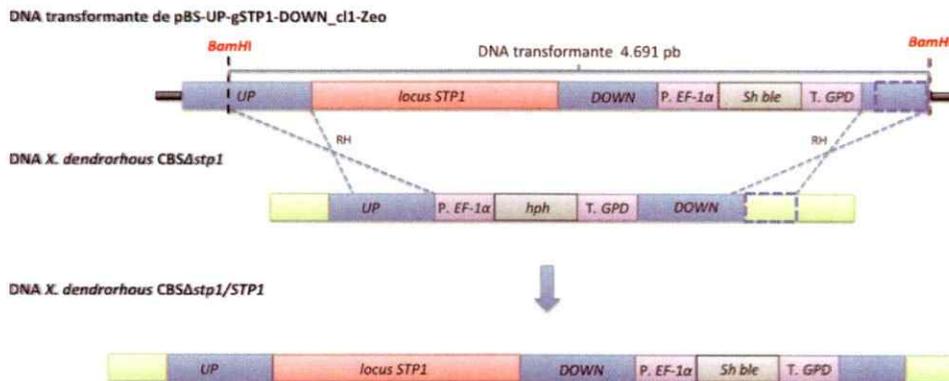


Figura 16. Representación del vector pBS- Δ g*STP1*-*hph* y su digestión enzimática, e integración del DNA transformante en el genoma de *X. dendrorhous*. El vector pBS-UP-g*STP1*-DOWN_cl1-Zeo se digirió con la enzima *Bam*HI que libera un fragmento de 4.691 pb que corresponde al DNA transformante, el cual se integra en el DNA genómico de la levadura CBS Δ *stp1* por un evento de doble recombinación homóloga (RH, representados por las cruces con línea punteada), reintegrando el gen *STP1* y el módulo que otorga resistencia a zeocina en el nuevo mutante CBS Δ *stp1*/*STP1*.

Con esta nueva estrategia se obtuvieron colonias transformantes de *X. dendrorhous* en placas YM-agar suplementadas con antibiótico (zeocina 45 µg/ml) y para evaluar a los mutantes, se seleccionaron las colonias más grandes y se les extrajo DNA genómico para confirmar la reintegración de *STP1* en el sitio esperado en el genoma. La figura 17 muestra la confirmación de la reintegración de *STP1* en el genoma de la cepa obtenida *CBSΔstp1/STP1* (ahora resistente a zeocina y sensible a higromicina B), utilizando como control en las reacciones de PCR la cepa parental *CBSΔstp1* y la cepa silvestre CBS 6938.

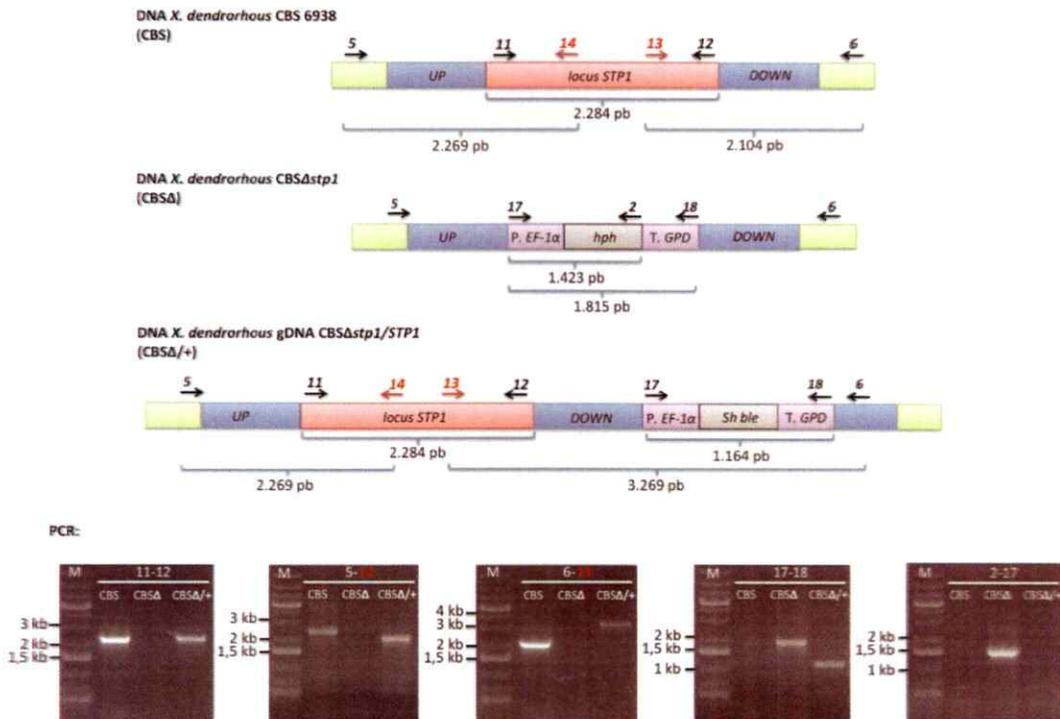


Figura 17. Representación y verificación de la integración del DNA transformante en el genoma de *X. dendrorhous* por PCR. Se verificó mediante PCR la integración del gen *STP1* en el genoma del mutante obtenido *CBSΔstp1/STP1* utilizando como control el DNA de la cepa silvestre CBS 6938 y del parental *CBSΔstp1* de *X. dendrorhous*. Las figuras representan al locus *STP1* en el genoma de las cepas CBS 6938 y el nuevo mutante *CBSΔstp1/STP1*, y la delección de *STP1* en el genoma de la cepa parental *CBSΔstp1*. En las figuras y en las fotografías de los geles de agarosa los números representan a los partidores utilizados en las reacciones de PCR

con el correspondiente DNA molde: CBS=cepa silvestre CBS 6938; CBS Δ =cepa parental CBS Δ *stp1* y CBS Δ /+=cepa CBS Δ *stp1*/*STP1* que reintegró el gen *STP1*. M=marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder.

A continuación se evaluó el efecto de la delección y reintegración del gen *STP1* que probablemente codifica a la Stp1 de la vía SREBP de *X. dendrorhous* en las cepas construidas en comparación a las cepas parentales de cuales derivan. Se evaluó su fenotipo de acuerdo a la cantidad y composición de los pigmentos/esteroles y crecimiento en medios suplementados con azoles o CoCl₂.

3. Evaluación del efecto de la delección y reintegración de *STP1* en las cepas construidas de *X. dendrorhous*.

Las cepas mutantes obtenidas se evaluaron en comparación a las cepas parentales de las que derivan en todos los ensayos que se presentan a continuación. De esta forma, se evaluó el efecto de la delección de *STP1* en las cepas CBS Δ *stp1*, CBS*Scyp61* Δ *stp1* y CBS.*SRE1N* Δ *stp1* respecto de las cepas CBS 6938, CBS*Scyp61*⁻ y CBS.*SRE1N*, respectivamente; y el efecto de la reintegración de *STP1* en la cepa CBS Δ *stp1*/*STP1* respecto del parental CBS Δ *stp1*. Para ello, las cepas se crecieron en medio YM-agar suplementados con azoles o CoCl₂, y en medio YM líquido para realizar una curva de crecimiento por 5 días a 22°C en agitación constante. De la curva se extrajeron muestras luego 120 h de crecimiento para posterior análisis en cuanto a producción de carotenoides y esteroles. La cantidad de carotenoides y esteroles se evaluó mediante la determinación de la absorbancia a 474 nm y 280 nm, respectivamente; mientras que la composición de éstos se analizó por cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC). Se crecieron paralelamente bajo las mismas condiciones y en triplicados las cepas parentales CBS 6938 y CBS*Scyp61*⁻ junto a sus

mutantes de delección *CBS Δ stp1* y *CBS Δ scyp61*; en otro experimento, a las parentales CBS 6938 y CBS.*SRE1N* y sus mutantes *CBS Δ stp1* y CBS.*SRE1N Δ stp1*, y en un último ensayo, a las cepas CBS 6938, *CBS Δ stp1* y *CBS Δ stp1/STP1*. La organización de estos experimentos se debe a las características comunes entre mutantes; por ejemplo, el mutante CBS.*SRE1N Δ stp1* que deriva CBS.*SRE1N* tiene en común con *CBS Δ stp1* la delección de *STP1*. Además, en todos los ensayos se incluyó como control a la cepa silvestre CBS 6938.

3.1 Fenotipo de color y crecimiento en medios YM suplementados con azoles.

3.1.1 Fenotipo de color: El efecto de la delección de *STP1* sólo se evidenció a simple vista en el cambio de fenotipo de color de la cepa *CBS Δ scyp61* respecto su parental *CBS Δ scyp61*. En cambio, las cepas *CBS Δ stp1*, CBS.*SRE1N Δ stp1* y *CBS Δ stp1/STP1* no mostraron un cambio evidente en el fenotipo de color comparado con sus parentales respectivos (Figura 18).

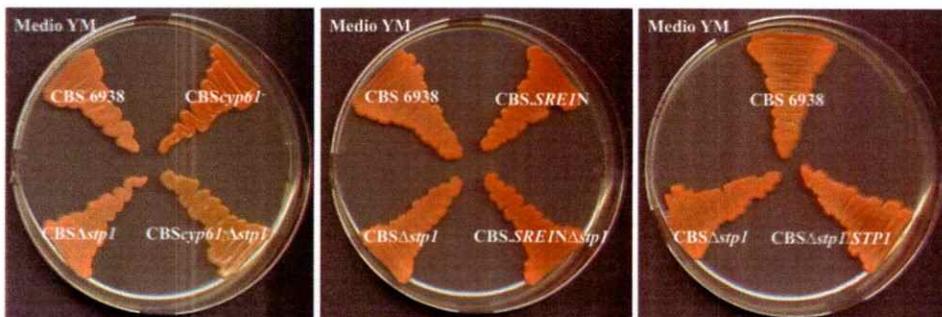


Figura 18. Comparación de fenotipos entre las cepas parentales y sus mutantes de delección (y reintegración) de *STP1* de *X. dendrorhous*. Placas YM (agar 1,5%), donde: CBS 6938: cepa parental silvestre, *CBS Δ stp1*: mutante de delección de *STP1* derivado de CBS 6938, *CBS Δ scyp61*: cepa parental donde el gen *CYP61* se encuentra interrumpido por un módulo que otorga resistencia al antibiótico zeocina, *CBS Δ scyp61 Δ stp1*: mutante de delección de *STP1* derivado de la cepa *CBS Δ scyp61*, CBS.*SRE1N*: mutante derivado de CBS 6938 donde el alelo de *SRE1* se reemplazó

por el alelo que sólo expresa la forma activa *SRE1N*, CBS.*SRE1NΔstp1*: mutante de delección de *STP1* derivado de CBS.*SRE1N*, CBS Δ *stp1/STP1*: mutante derivado de CBS Δ *stp1* al que se le reintegró el alelo *STP1*.

3.1.2 Crecimiento en medios YM suplementados con azoles o CoCl₂.

Anteriormente se mencionó que la vía SREBP es activada en respuesta a bajos niveles celulares de esteroides y en condiciones de hipoxia. Por este motivo, para analizar el comportamiento de *X. dendrorhous* en estas condiciones se creció en medios suplementados con azoles o CoCl₂. En la vía de síntesis de ergosterol participan enzimas citocromos P450 y se ha documentado que los azoles, compuestos usados comúnmente como antifúngicos, inhiben la acción de los citocromos P450. Por otro lado, se ha descrito que en las levaduras *S. pombe* y *C. neoformans* el factor de transcripción Sre1 (homólogo de la SREBP de mamífero) es activado a su forma N-terminal (Sre1N) en respuesta a bajos niveles de oxígeno. Por ese motivo se utilizó CoCl₂, el cual es un agente químico que induce en la célula una respuesta similar a la observada en condiciones de hipoxia, y en células de mamífero se ha observado que este compuesto activaría el mismo programa transcripcional de adaptación observado en condiciones de hipoxia (Goldberg y col., 1988). Las cepas evaluadas se cultivaron en medio YM líquido hasta fase exponencial de crecimiento (aproximadamente 48 h de crecimiento) y se tomó una muestra de cada cultivo con la que se realizó un experimento de microgotas en una placa de YM-agar con y sin suplementación de azoles o CoCl₂ en una concentración final ensayada que no afecta el crecimiento de las cepas parentales CBS 6938 y CBS Δ *cyp61* de *X. dendrorhous* (González., 2016) (Figura 19, panel A). Para ello, desde el cultivo inicial se realizó una dilución seriada, donde 5 μ l de cada dilución se depositó en las placas de YM-agar (con o sin suplementación de azoles o CoCl₂) las que incubaron por 5 días a 22°C. También, sólo para las muestras

de las cepas de delección CBS Δ *stp1* y CBS*cyp61* Δ *stp1* (y sus respectivos parentales), se sembró 100 μ l del cultivo inicial de cada cepa en una placa de YM-agar, y se incorporó un círculo de papel filtro en el centro de la placa al que se le depositó 10 μ l de una solución de azoles o CoCl₂ en concentraciones mayores, determinadas en ensayos de césped celulares de la levadura silvestre y sus mutantes de la vía SREBP (González., 2016). Posteriormente, las placas se incubaron por 5 días a 22°C. En el panel A de la figura 19 se observa que la suplementación de los medios con los azoles (itraconazol, clotrimazol y ketoconazol) y CoCl₂ afectó en mayor grado el crecimiento de las cepas de delección CBS Δ *stp1* y CBS*cyp61* Δ *stp1*, no así a la cepa CBS.*SRE1N* Δ *stp1* que expresaría la forma activa de Sre1 (Sre1N) por lo que sería independiente de procesamiento por Stp1 (homólogo de S2P de *H. sapiens*, y de Stp1 de *C. neoformans*). Mientras que el panel B de la figura 19 se observa que los azoles y el CoCl₂ inhiben el crecimiento en todas las cepas, pero éste es inhibido en mayor grado en las cepas de delección CBS Δ *stp1* y CBS*cyp61* Δ *stp1*.

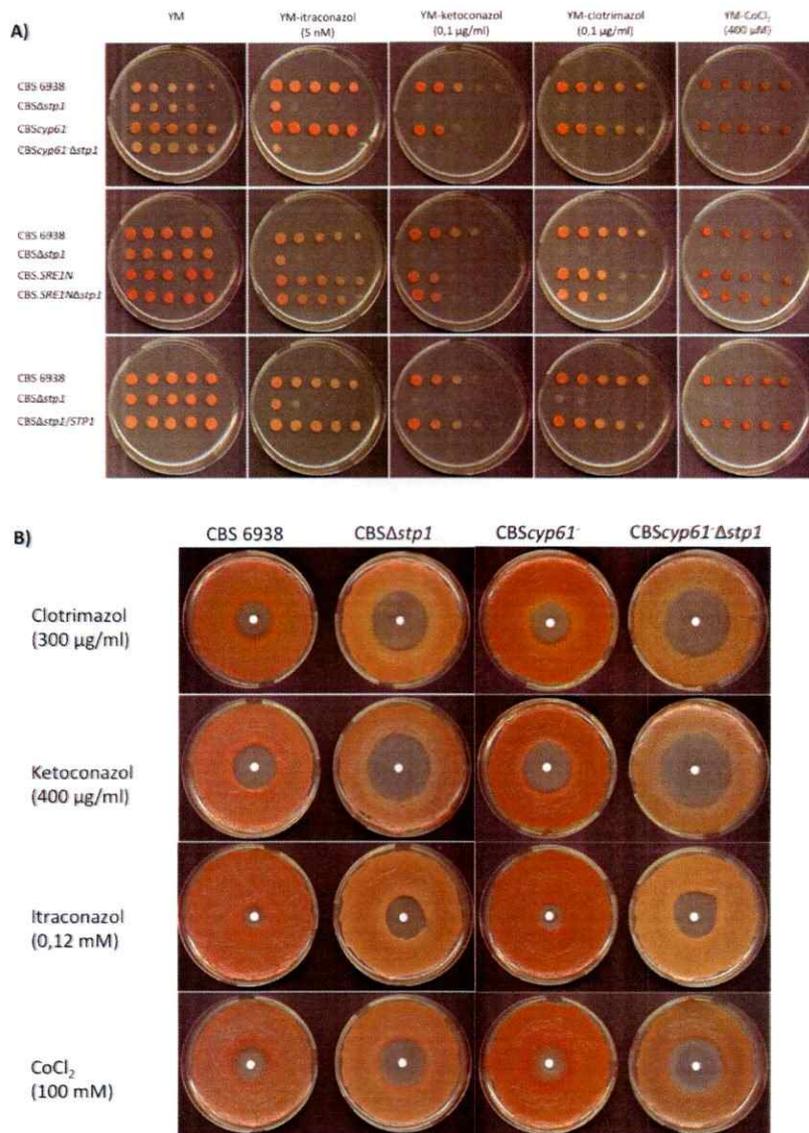


Figura 19. Crecimiento en medio YM e YM suplementado con azoles o CoCl₂. A) Ensayo de microgotas. B) Ensayo de halos de inhibición de crecimiento. Placas YM (agar 1,5%), donde: CBS 6938: cepa parental silvestre, CBSΔstp1: mutante de delección de STP1 derivado de CBS 6938, CBSScyp61: cepa parental donde el gen CYP61 se encuentra interrumpido por el módulo que otorga resistencia al antibiótico zeocina, CBSScyp61Δstp1: mutante de delección de STP1 derivado de la cepa CBSScyp61, CBS.SRE1N: mutante derivado de CBS 6938 donde el alelo de SRE1 se reemplazó por el alelo que sólo expresa la forma activa SRE1N, CBS.SRE1NΔstp1: mutante de delección de STP1 derivado de CBS.SRE1N, CBSΔstp1/STP1: mutante derivado de CBSΔstp1 al que se le reintegró el alelo STP1.

3.1.3 Crecimiento en medio YM-líquido

En cuanto al crecimiento (figura 20), las cepas $CBS\Delta stp1$, $CBS_{Scyp61}\Delta stp1$, $CBS.SRE1N\Delta stp1$ y $CBS\Delta stp1/STP1$ no presentaron diferencias significativas respecto a sus respectivos parentales en las distintas fases de crecimiento durante 5 días.

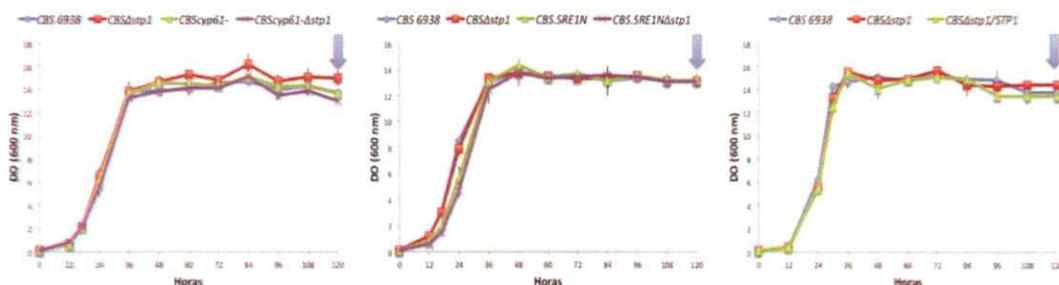


Figura 20. Curvas de crecimiento. Cultivos paralelos donde en todos los casos, no se observan cambios significativos en el crecimiento de las cepas de delección y de reintegración de *STP1* respecto a sus parentales durante 5 días de crecimiento que fue monitoreado a 600 nm. Las cepas se cultivaron en medio YM a 22°C en agitación constante. La flecha indica el tiempo en que se tomó una muestra de cultivo para análisis posteriores. Los valores son el promedio \pm desviación estándar de 3 cultivos independientes de cada cepa estudiada.

3.2 Cantidad y composición de pigmentos

Se mencionó anteriormente que se realizaron tres experimentos de curvas de crecimiento, y en consecuencia tres análisis de muestras independientes. El primero incluyó a las cepas parentales CBS 6938 y CBS_{Scyp61} crecidas en paralelo con sus respectivos mutantes de delección $CBS\Delta stp1$ y $CBS_{Scyp61}\Delta stp1$. Entre la cepa CBS 6938 y su mutante $CBS\Delta stp1$ no existen diferencias significativas en la producción y composición de los pigmentos bajo las condiciones de cultivo utilizadas. En ambas, el pigmento principal producido luego de 120 h de cultivo (fase estacionaria) es la astaxantina como lo muestra la tabla 4, donde se puede observar que la cepa silvestre

alcanza aproximadamente un 72% y la cepa de delección CBS Δ stp1 un 71% de astaxantina, respecto al total de carotenoides producidos.

Tabla 4. Cantidad y composición de carotenoides de las cepas parentales CBS 6938 y CBS Δ stp1 y sus respectivos mutantes de delección de STP1 de *X. dendrorhous* en ppm (μ g/g peso seco de levadura).

Carotenoide	Cepas de <i>X. dendrorhous</i>			
	CBS 6938	CBS Δ stp1	CBS Δ stp1	CBS Δ stp1
Astaxantina	256,6 \pm 12,5 (71,6 \pm 1,1)	230,5 \pm 10,0 (71,0 \pm 1,7)	429,8 \pm 10,6 (77,6 \pm 0,2)	216,9 \pm 25,9 (65,6 \pm 3,6)
Fenicoxantina*	38,8 \pm 1,9 (10,8 \pm 0,1)	39,3 \pm 3,8 (12,1 \pm 1,0)	22,5 \pm 0,7 (4,1 \pm 0,1)	46,1 \pm 4,2 (14,0 \pm 0,8)
OH-equinona*	13,6 \pm 2,2 (3,8 \pm 0,5)	13,6 \pm 2,2 (4,2 \pm 0,7)	16,8 \pm 2,3 (3,0 \pm 0,4)	22,5 \pm 4,4 (6,9 \pm 0,7)
Equinona*	9,2 \pm 0,9 (2,6 \pm 0,1)	9,0 \pm 0,7 (2,8 \pm 0,2)	6,8 \pm 0,6 (1,2 \pm 0,1)	9,4 \pm 1,4 (2,9 \pm 0,4)
β -caroteno	5,2 \pm 0,4 (1,5 \pm 0,1)	3,8 \pm 1,2 (1,2 \pm 0,4)	5,1 \pm 1,3 (0,9 \pm 0,2)	5,3 \pm 3,0 (1,6 \pm 1,0)
Otros carotenoides**	35,3 \pm 2,1 (9,8 \pm 0,4)	28,5 \pm 0,9 (8,8 \pm 0,1)	73,2 \pm 3,1 (13,2 \pm 0,5)	29,8 \pm 3,5 (9,1 \pm 1,6)
Total carotenoides	358,7 \pm 18,0 (100)	324,7 \pm 11,9 (100)	554,1 \pm 14,0 (100)	330,0 \pm 21,2 (100)

La tabla muestra el promedio \pm desviación estándar de tres cultivos independientes. *Intermediarios de la síntesis de astaxantina desde beta-caroteno; **Otros carotenoides: toruleno, OH-k-toruleno y carotenoides no identificados. Números en negrita y en paréntesis representan los porcentajes de cada uno respecto al total.

Además, la tabla 4 muestra que la cepa parental CBS Δ stp1 y su mutante de delección CBS Δ stp1 también produjeron astaxantina como principal carotenoide, pero la delección del gen STP1 afectó la producción total y composición de carotenoides. Por ejemplo, al comparar ambas cepas, se observa una disminución significativa (Prueba t-student; $p < 0,01$) en el total de carotenoides producidos en la cepa CBS Δ stp1 luego de 120 h de cultivo (la tabla 4 muestra que la cepa CBS Δ stp1 produjo 330 ppm y la cepa parental CBS Δ stp1 554 ppm). En la figura 21 se presentan gráficamente los pigmentos producidos donde se agruparon a aquellos que son intermediarios de las síntesis de astaxantina desde beta-caroteno

(fenicoxantina, OH-equinenona, equinenona). Se observa que en la cepa *CBS_{cyp61} Δ stp1* disminuyó significativamente (Prueba t-student; $p < 0,05$) la fracción de astaxantina (este mutante produjo 66%, respecto al total de carotenoides) comparado con su parental *CBS_{cyp61}* (que produjo 78%, respecto al total de carotenoides), y que la fracción de intermediarios aumentó significativamente (Prueba t-student; $p < 0,01$) a un 24% comparado con el parental que produjo una fracción de intermediarios de un 8%, respecto al total de carotenoides.

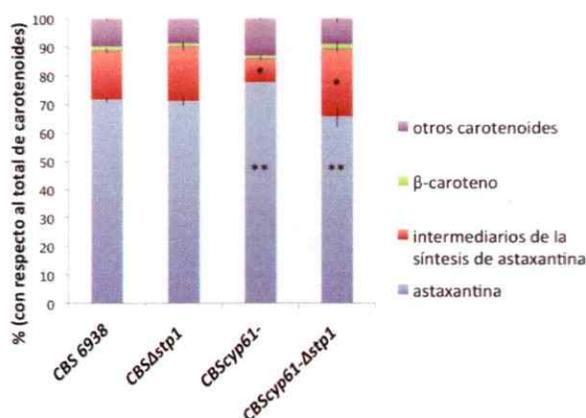


Figura 21. Composición de carotenoides luego de 120 h de cultivo. Otros carotenoides: toruleno, OH-k-toruleno, cantaxantina y carotenoides no identificados; Intermediarios de la síntesis de astaxantina: fenicoxantina, OH-equinenona y equinenona. Los valores son el promedio \pm desviación estándar de 3 cultivos independientes de cada cepa (Prueba t-student; * $p < 0,01$; ** $p < 0,05$).

En un segundo experimento se analizaron los carotenoides de las cepas parentales CBS 6938 y CBS.*SRE1N* y sus mutantes de delección CBS Δ stp1 y CBS.*SRE1N* Δ stp1 crecidas en paralelo. Como se mencionó anteriormente, se incluyó nuevamente a la cepa CBS Δ stp1 por su característica común de delección de *STP1* con la cepa CBS.*SRE1N* Δ stp1. La tabla 5 muestra que la delección de *STP1* en CBS.*SRE1N* Δ stp1 no afectó la producción total y composición de carotenoides comparado con su parental CBS.*SRE1N*, al igual que el resultado obtenido al comparar

la cepa CBS Δ stp1 con su parental silvestre CBS 6938. Además, se observa que las cepas CBS.SRE1N y CBS.SRE1N Δ stp1 producen más carotenoides que las cepas CBS 6938 y CBS Δ stp1. Por ejemplo, la cepa CBS.SRE1N produjo significativamente (Prueba t-student; p<0,05) 1,2 veces más carotenoides que la cepa silvestre (en la tabla 5 se observa que la cepa CBS.SRE1N produjo 421 ppm y la cepa silvestre 348 ppm).

Tabla 5. Cantidad y composición de carotenoides de las cepas parentales CBS 6938 y CBS.SRE1N y sus respectivos mutantes de delección de STP1 de *X. dendrorhous* en ppm (μ g/g peso seco de levadura).

Carotenoide	Cepas de <i>X. dendrorhous</i>			
	CBS 6938	CBS Δ stp1	CBS.SRE1N	CBS.SRE1N Δ stp1
Astaxantina	249,9 \pm 10,7 (71,7 \pm 0,8)	238,6 \pm 11,4 (73,4 \pm 0,8)	320,8 \pm 15,7 (76,3 \pm 0,6)	322,2 \pm 17,6 (75,6 \pm 0,6)
Fenicoxantina*	45,7 \pm 3,1 (13,1 \pm 0,5)	44,1 \pm 1,7 (13,6 \pm 1,1)	35,1 \pm 1,5 (8,4 \pm 0,7)	38,8 \pm 3,3 (9,1 \pm 0,2)
OH-equinona*	8,4 \pm 0,5 (2,4 \pm 0,2)	7,6 \pm 1,2 (2,3 \pm 0,3)	13,5 \pm 1,5 (3,2 \pm 0,3)	15,0 \pm 3,9 (3,5 \pm 0,8)
Equinona*	9,4 \pm 1,3 (2,7 \pm 0,5)	8,1 \pm 0,2 (2,5 \pm 0,1)	9,8 \pm 0,8 (2,3 \pm 0,1)	10,8 \pm 0,3 (2,5 \pm 0,1)
β -caroteno	4,9 \pm 0,1 (1,4 \pm 0,1)	3,5 \pm 0,8 (1,1 \pm 0,2)	7,1 \pm 1,3 (1,7 \pm 0,3)	8,9 \pm 1,9 (2,1 \pm 0,3)
Otros carotenoides**	47,8 \pm 1,0 (13,7 \pm 0,7)	38,9 \pm 2,0 (12,0 \pm 0,3)	57,5 \pm 3,5 (13,7 \pm 0,3)	56,3 \pm 7,6 (13,2 \pm 1,6)
Total carotenoides	348,3 \pm 12,8 (100)	325,1 \pm 12,1 (100)	420,5 \pm 18,0 (100)	426,2 \pm 26,0 (100)

La tabla muestra el promedio \pm desviación estándar de tres cultivos independientes. *Intermediarios de la síntesis de astaxantina desde beta-caroteno; **Otros carotenoides: toruleno, OH-k-toruleno y carotenoides no identificados. Números en negrita y en paréntesis representan los porcentajes de cada uno respecto al total de carotenoides.

En el tercer análisis se evaluó el efecto de la reintegración de STP1 en la cepa CBS Δ stp1. En la tabla 6 se observa que la cepa CBS Δ stp1/STP1 no presenta diferencias estadísticamente significativas en la cantidad y composición de carotenoides respecto a la cepa parental CBS Δ stp1 y cepa silvestre CBS 6938, siendo la astaxantina el principal carotenoide producido luego de 120 h de cultivo. Las cepas

CBS 6939, CBS Δ *stp1* y CBS Δ *stp1/STP1* produjeron un 70,3%, 70,2% y 70,6% de astaxantina (respecto al total de carotenoides) a las 120 h de cultivo, respectivamente. Estos resultados son los esperados, pues a simple vista se observó que la delección de *STP1* no tiene algún efecto en la coloración de la cepa silvestre.

Tabla 6. Cantidad y composición de carotenoides de las cepas de las cepas CBS 6938, CBS Δ *stp1* y CBS Δ *stp1/STP1* de *X. dendrorhous* en ppm (μ g/g peso seco de levadura).

Carotenoide	Cepas de <i>X. dendrorhous</i>		
	CBS 6938	CBS Δ <i>stp1</i>	CBS Δ <i>stp1/STP1</i>
Astaxantina	248,0 \pm 14,1 (70,3 \pm 0,5)	264,0 \pm 0,9 (70,2 \pm 0,3)	272,0 \pm 2,2 (70,6 \pm 0,9)
β -caroteno	3,0 \pm 0,6 (0,8 \pm 0,1)	2,7 \pm 2,0 (0,7 \pm 0,5)	2,7 \pm 0,3 (0,7 \pm 0,1)
Otros carotenoides*	102,1 \pm 6,8 (28,9 \pm 1,4)	109,2 \pm 0,9 (29,0 \pm 14,4)	110,7 \pm 3,7 (28,7 \pm 1,1)
Total carotenoides	353,0 \pm 21,2 (100)	375,8 \pm 0,5 (100)	385,4 \pm 2,2 (100)

La tabla muestra el promedio \pm desviación estándar de tres cultivos independientes. ***Otros carotenoides:** toruleno, OH-k-toruleno, cantaxantina, fenicoxantina, OH-equinenona, Equinenona y carotenoides no identificados. Números en negrita y en paréntesis representan los porcentajes de cada uno respecto al total de carotenoides.

3.3 Cantidad y composición de esteroides

Retomando lo mencionado anteriormente, la delección de *STP1* no tiene un efecto significativo en la cantidad y composición de los pigmentos en las parentales CBS 6938 y CBS.*SRE1N*. Sumado a esto, se observa que la producción y composición de esteroides tampoco se afecta significativamente en estas cepas en las mismas condiciones de cultivo. En estas cepas el esteroil principal producido luego de 120 h de cultivo, es ergosterol (Tabla 7). Por el contrario, dicha delección tiene un efecto significativo en la producción y composición de carotenoides y esteroides en la cepa parental CBS*Scyp61*.

Tabla 7. Cantidad y composición de esteroides de las cepas parentales CBS 6938, CBS Δ scp61 y CBS.SRE1N y sus respectivos mutantes de *X. dendrorhous*.

Cepas de <i>X. dendrorhous</i>				
Experimento 1	CBS 6938	CBS Δ stp1	CBS Δ scp61	CBS Δ scp61 Δ stp1
Ergosterol (%)	99,4 ± 0,2	99,9 ± 0,1	ND	ND
Esterol 1 (%)	ND	ND	28,3 ± 0,8	15,5 ± 1,4
Esterol 2 (%)	ND	ND	71,7 ± 0,8	84,6 ± 1,4
Total esteroides (mg/g peso seco)	3,7 ± 0,06	3,5 ± 0,12	4,4 ± 0,20	3,6 ± 0,12
Cepas de <i>X. dendrorhous</i>				
Experimento 2	CBS 6938	CBS Δ stp1	CBS.SRE1N	CBS.SRE1N Δ stp1
Ergosterol (%)	99,6 ± 0,4	99,7 ± 0,2	97,5 ± 0,8	98,4 ± 0,7
Total esteroides (mg/g peso seco)	3,2 ± 0,06	3,0 ± 0,06	3,6 ± 0,09	3,7 ± 0,20
Cepas de <i>X. dendrorhous</i>				
Experimento 3	CBS 6938	CBS Δ stp1	CBS Δ stp1/STP1	
Ergosterol (%)	99,8 ± 0,6	99,5 ± 0,5	99,2 ± 0,6	
Total esteroides (mg/g peso seco)	3,7 ± 0,1	3,9 ± 0,6	3,8 ± 0,4	

La tabla muestra el promedio ± desviación estándar de tres cultivos independientes de cada cepa. La tabla muestra el promedio ± desviación estándar de tres cultivos independientes de cada cepa. ND: No detectado.

Antes de analizar los resultados obtenidos, al comparar la cepa parental CBS Δ scp61 y su mutante de delección CBS Δ scp61 Δ stp1, es importante mencionar que la cepa CBS Δ scp61 presenta una mutación en el gen que codifica una citocromo P450 involucrada en la biosíntesis de ergosterol; por lo tanto, no produce ergosterol y acumula otros dos esteroides que podrían corresponder a ergosta-5,8-dien-3-ol y ergosta-5,8,22-trien-3-ol (Loto y col., 2012), respectivamente (esteroides 1 y 2, experimento 1 de la tabla 8). En la tabla 7 se observa que la cepa CBS Δ scp61 Δ stp1 produce significativamente (Prueba t-student; $p < 0,05$) menos esteroides que la cepa parental CBS Δ scp61 (la cepa CBS Δ scp61 produjo 4,4 mg de esteroides/g peso seco de levadura y la cepa CBS Δ scp61 Δ stp1 3,6 mg de esteroides/g peso seco de levadura). En el análisis de composición de esteroides mediante RP-HPLC se observó que el mutante CBS Δ scp61 Δ stp1 acumula los mismos esteroides que la cepa parental CBS Δ scp61 de acuerdo a los tiempos de retención y a la sobre posición de picos en el cromatograma

cuando ambas muestras se co-inyectan (datos no mostrados). La delección de *STP1* en la cepa CBS*scyp61*⁻ afectó la composición de los esteroides, ya que se observa que las fracciones de los esteroides identificados como esteroide 1 y 2 varían significativamente (Prueba t-student; p<0,05). En el experimento 3 se observa que la reintegración del alelo silvestre *STP1* en la cepa CBSΔ*stp1*/*STP1* tampoco afecta la producción/composición de esteroides, al igual como sucedió con los carotenoides, siendo el ergosterol el principal esteroide producido luego de 120 h de cultivo. Las cepas CBS 6939, CBSΔ*stp1* y CBSΔ*stp1*/*STP1* produjeron un 99,8%, 99,5% y 99,2% de ergosterol (respecto al total de esteroides) a las 120 h de cultivo, respectivamente.

4. Análisis de expresión de genes de la ruta del mevalonato y otros genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides y esteroides.

Con el fin de confirmar si efectivamente la delección del gen *STP1* tiene algún efecto en los niveles de transcrito de algunos genes en los que se predijo mediante análisis bioinformático de sus regiones promotoras que estarían regulados por la vía SREBP en *X. dendrorhous* (González., 2016), se determinó la expresión relativa por RT-qPCR de los genes *HMGR* y *HMGS* de la ruta del mevalonato, los genes carotenogénicos *crtS* y *crtR*, y del gen *CYP51* de la ruta de biosíntesis de esteroides, en las cepas de delección CBSΔ*stp1* y CBS*scyp61*⁻Δ*stp1* y sus respectivos parentales CBS 6938 y CBS*scyp61* luego de las 120 h de cultivo. Además, como controles se midieron los niveles de transcrito de los genes *INV* (*invertase*) y *grg2* (*glucose repressible gene 2*) de *X. dendrorhous* que posiblemente no son regulados por la vía SREBP debido a su función y a que no se encontraron posibles elementos SRE en su región promotora. En las cuatro cepas, el nivel de transcrito de cada gen se normalizó respecto al nivel de

transcrito del gen *ACT* y luego se normalizaron nuevamente con los niveles respectivos utilizando como control a la cepa parental correspondiente.

No se detectaron diferencias significativas en los niveles de transcrito de los genes analizados en la *CBS Δ stp1* respecto de su parental silvestre CBS 6938, lo cual es esperable ya que no se observaron diferencias significativas en la producción/composición de isoprenoides. Por el contrario, se observó que los niveles relativos de transcrito de los genes *HMGR*, *HMGS*, *crtS*, *crtR* y *CYP51* disminuyeron en la cepa *CBS Δ scyp61 Δ stp1* respecto de su parental *CBS Δ scyp61*, lo cual se relacionaría con la disminución de la producción de carotenoides y esteroides. En la figura 22 se observa que los niveles de transcrito alcanzados por los genes de la ruta del mevalonato *HMGR*, *HMGS* fueron 22,8 y 34,6 veces menores que en la cepa parental, respectivamente. Por otro lado, los niveles de transcrito alcanzados por los genes carotenogénicos *crtS*, *crtR* fueron 3,1 y 23,2 veces menores que en la cepa parental. Al igual que los genes anteriores, el nivel de transcrito del gen de la ruta de síntesis de esteroides *CYP51* fue 7,3 veces menor en la cepa *CBS Δ scyp61 Δ stp1* comparado al parental *CBS Δ scyp61*. Adicionalmente, se observó que el nivel de transcrito alcanzado por el gen *SRE1* disminuyó 4,3 veces respecto del parental, probablemente debido a que se ha documentado que el factor Sre1 activa su propia expresión (Sato y col., 1996). También, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de transcrito alcanzados por los genes controles *INV* y *grg2* en las cepas mutantes de delección *CBS Δ stp1* y *CBS Δ scyp61 Δ stp1* respecto sus parentales. Finalmente, se compararon los niveles de transcrito de los genes *SRE1* y *STP1* entre las cepas parentales CBS 6938 y *CBS Δ scyp61*, y se encontró que los niveles del gen *SRE1* eran 3,5 veces mayores en

la cepa *CBScyp61⁻* respecto de CBS 6938, mientras que el nivel del gen *STP1* no cambió significativamente, luego de 120 h de cultivo.

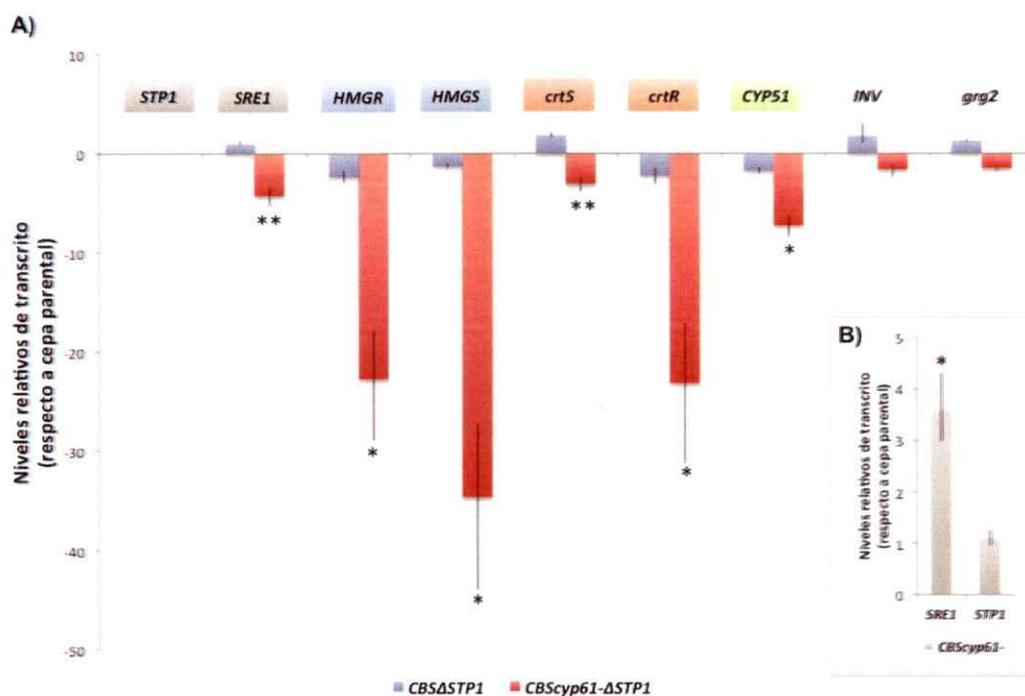


Figura 22. Análisis RT-qPCR de los genes A) *HMGR*, *HMGS*, *crtR*, *crtS* y *CYP51* en cepas *CBS Δ stp1* y *CBScyp61⁻ Δ stp1* respecto a sus parentales CBS 6938 y *CBScyp61⁻* y B) *SRE1* y *STP1* en la cepa *CBScyp61⁻* respecto a su parental CBS 6938 luego de 120 h de cultivo. Los niveles de transcrito se normalizaron respecto a los niveles de transcrito del gen de actina (*ACT*, Genbank: X89898.1), y luego normalizados respecto a la cepa parental correspondiente. Los genes *INV* (Genbank: FJ539193.2) y *grg2* (Genbank: JN043364) corresponden a controles que no serían regulados por la vía SREBP. Valores son el promedio \pm error estándar de 3 experimentos independientes (* $p \leq 0,01$, ** $p \leq 0,05$; Student's test).

DISCUSIÓN

Actualmente no existen reportes de la vía SREBP en la levadura basidiomicete *X. dendrorhous*, es así como en esta tesis se caracterizó estructural y funcionalmente por primera vez al gen *STP1* de la levadura, el cual probablemente codifica a la zinc metaloproteasa Stp1 involucrada en el procesamiento y activación del factor transcripcional Sre1, homólogos respectivos de los caracterizados S2P y SREBP de la vía SREBP de mamífero. Esta vía está involucrada en la regulación de los niveles de esteroides celulares y ha sido extensamente estudiada en mamíferos, existiendo evidencia de genes que codifican proteínas homólogas en bacterias y recientemente en levaduras, como es el caso de *S. pombe* y *C. neoformans*, donde la vía SREBP también respondería a condiciones de bajos niveles de oxígeno.

En relación a los resultados obtenidos en esta tesis, la aproximación bioinformática sugiere que el gen identificado como *STP1* en *X. dendrorhous* codifica a una zinc metaloproteasa que estructuralmente es similar a la S2P de *H. sapiens* (Rawson y col., 1997; Zelenski y col., 1999) y a la Stp1 (homóloga de S2P) de la vía SREBP recientemente descrita de la levadura basidiomicete *C. neoformans* (Chun y col., 2007; Chang y col., 2007; Bien y col., 2009), y con las cuales presenta un 22% y un 25% de identidad de secuencias, respectivamente. La Stp1 de *X. dendrorhous* posee el motivo conservado HE-(x)₂-H, común en la mayoría de las metaloproteasas (Rawlings y Barret., 1995), y el motivo conservado N-(x)₂-P-(x)₄-DG (Lewis y Thomas., 1999; Rudner y col., 1999) presente en metaloendoproteasas que unen zinc de la familia M50 (base de datos en línea MEROPS). Como se mencionó, la función catalítica de la S2P ha sido extensamente estudiada en mamíferos, y se ha descrito que cuando los niveles de esteroides son bajos, el factor de transcripción SREBP en su

forma inactiva es escoltado por Scap desde el RE al aparato de Golgi, donde es procesado secuencialmente por la S1P (*Site-1 Protease*) y la S2P a su forma activa N-terminal (SREBP-N), y de esta forma controlaría la transcripción de genes relacionados con el metabolismo de esteroides (Espenshade y Hughes., 2007). En *X. dendrorhous*, la activación de Sre1 (homólogo de SREBP de mamífero y de Sre1 de *S. pombe* y *C. neoformans*) (Gutiérrez., 2016a,b), probablemente recaería sólo en la Stp1 de la levadura, ya que no se ha detectado el gen que codifica al homólogo de la S1P en *X. dendrorhous*. También es probable que la activación de Sre1 no sólo sea en respuesta a la detección de bajos niveles celulares de esteroides, sino también en respuesta a condiciones de bajas concentraciones de oxígeno celular, tal como se ha descrito en las levaduras *S. pombe* y *C. neoformans* (Hughes y col., 2005; Bien y col., 2009).

En relación a estos antecedentes, los estudios de funcionalidad basados en la delección del gen *STP1* aportan información relevante sobre la posible regulación de los niveles de esteroides a través de la vía SREBP en *X. dendrorhous*. El principal esteroide en hongos es el ergosterol, y es sintetizado en un proceso altamente dependiente de oxígeno, y en el cual participan citocromos P450 monooxigenasas (Cyps) y otras enzimas (Rosenfeld y Beauvoit., 2003). Por este motivo, se analizó el crecimiento de *X. dendrorhous* en estas condiciones, cultivándola en medios suplementados con azoles o CoCl_2 . Se ha documentado que los azoles, compuestos usados comúnmente como antifúngicos, inhiben la acción de los citocromos P450, y particularmente la inhibición ocurriría a través de la coordinación de un átomo de nitrógeno del azol al hierro del grupo hemo de la enzima (Lamb y col., 1997). En *X. dendrorhous* se han identificado dos genes que codifican a dos citocromos P450, Cyp61 y Cyp51, que participan en la biosíntesis de ergosterol (Loto y col., 2012; Leiva y col., 2015). Por lo tanto, cuando el

medio de cultivo se suplementa con azoles se afectaría la biosíntesis de esteroides, y probablemente ésta sería la señal para la activación de la vía SREBP en la levadura. De esta forma, cuando las cepas se cultivaron en medios suplementados con estos antifúngicos, se observó que el crecimiento se afectó en mayor grado en las cepas de delección CBS Δ *stp1* y CBS*Scyp61* Δ *stp1*, en comparación a sus respectivos parentales. Por otra parte, el crecimiento de la cepa CBS.*SRE1N* Δ *stp1* se afectó en menor grado y de forma muy similar a su cepa parental. Posiblemente porque, a diferencia de las cepas CBS Δ *stp1* y CBS*Scyp61* Δ *stp1*, esta cepa expresa la forma activa del regulador Sre1 (Sre1N), que sería independiente de procesamiento por Stp1, y por ello tendría una vía SREBP funcional que responde a la señal de disminución de los niveles de esteroides debido a la inhibición de los citocromos Cyp51 y Cyp61 involucrados en la biosíntesis de ergosterol en *X. dendrorhous*. Es importante destacar que los azoles afectaron a todas las cepas, pero la alteración en el crecimiento fue mayor en las cepas de delección de *STP1*, con excepción de CBS.*SRE1N* Δ *stp1* por las razones antes mencionadas. El crecimiento de las cepas parentales se afectó en menor grado porque portan el alelo del gen *STP1*, y por ello probablemente poseen una vía SREBP funcional que detecta una disminución en los niveles de esteroides. El crecimiento se afectó levemente en las cepas parentales CBS 6938 y CBS.*SRE1N* que producen ergosterol como principal esteroide, porque específicamente la inhibición de la Cyp51 afecta la desmetilación de lanosterol, lo que da como resultado una disminución de la disponibilidad de ergosterol, un componente esencial de membrana, y un aumento de esteroides metilados fungistáticos que afectan el crecimiento celular (Watson y col., 1989). Interesantemente, también se observó una leve alteración en el crecimiento de la cepa parental CBS*Scyp61*⁻ que no produce ergosterol debido a una mutación en el gen que codifica a Cyp61, pero que no compromete la viabilidad celular (Loto y col.,

2012). De esta forma, probablemente la inhibición de la enzima Cyp51 es la señal fundamental para la activación de la vía SREBP en *X. dendrorhous*. Principalmente, la importancia de la Cyp51 radica en que es una enzima esencial para la biosíntesis de esteroides, y por ello es considerada un buen blanco para antifúngicos clínicos y agrícolas (Hargrove y col., 2012). También, se ha documentado que la mutación del gen que codifica a Cyp51 es letal e imita el efecto de los azoles (Kelly y col., 1995), a diferencia de la mutación en el gen que codifica a Cyp61 que permite la viabilidad celular sin producir ergosterol (Loto y col., 2012).

Por otra parte, se ha expuesto que en las levaduras *S. pombe* y *C. neoformans* el factor de transcripción Sre1 (homólogo de la SREBP de mamífero) es activado a su forma N-terminal (Sre1N) en respuesta a bajos niveles de oxígeno, y de esta forma regularía de la expresión de genes relacionados con la síntesis de ergosterol y otros genes relacionados con la adaptación a la hipoxia (Hughes y col., 2005; Chun y col., 2007; Chang y col., 2007). Por lo tanto, para analizar el comportamiento de *X. dendrorhous* en condiciones de hipoxia se creció en medios suplementados con CoCl_2 , el cual es un agente químico que induce en la célula una respuesta adaptativa similar a la observada en condiciones de hipoxia. Sin embargo, el mecanismo del CoCl_2 a nivel molecular no es comprendido en su totalidad, y la información que se conoce proviene principalmente de experimentos con líneas celulares de animales. En mamíferos el CoCl_2 activaría al complejo HIF-1 (Hipoxia Inducible Factor 1), un caracterizado factor de transcripción que, en respuesta a la hipoxia, activa la transcripción de genes involucrados en la eritropoyesis y el metabolismo del hierro, entre otras funciones (Goldberg y col., 1988; Wang y col., 1993). Se ha postulado que el Co^{2+} estabilizaría al complejo HIF-1 tal como ocurre en hipoxia, ya que inhibiría a las enzimas HIF- α -prolil-

hidroxilasas que, en normoxia, están involucradas en la regulación post-traducciona de este complejo, a través de la hidroxilación de residuos de prolina de su subunidad HIF-1 α , lo que favorecería la ubiquitinización y su degradación en el proteosoma (Simonsen y col., 2012). Estas enzimas consideradas sensores de O₂ coordinan Fe²⁺ (y no poseen un grupo hemo), y se postula que la inhibición ocurriría por la sustitución del Fe²⁺ por el Co²⁺ (Goldberg y col., 1988; Epstein y col., 2001; Simonsen y col., 2012). Se ha propuesto que el cobalto podría sustituir al hierro, porque ambos son los metales de transición con una estructura atómica semejante, donde el cobalto difiere del hierro por un electrón en uno de sus orbitales (Maxwell y Salnikow., 2004). Por ejemplo, se cree que el Co²⁺ en presencia de H₂O₂ generaría ROS en las células a través de reacciones *Fenton-like*, causando estrés oxidativo al DNA, proteínas y lípidos, tal como ocurre en la reacción de Fenton donde la reacción entre el Fe²⁺ y el H₂O₂ genera Fe³⁺, un ión y un radical hidroxilo (Kowanishi y col., 1994; Leonard y col., 1998).

En consecuencia, la estabilización del complejo HIF-1 favorecería un incremento en el número de eritrocitos y, por lo tanto, aumentaría el suministro de O₂ y la re oxigenación de los tejidos, mientras que la activación de los genes involucrados en el metabolismo del hierro favorecería la síntesis del grupo hemo (que es incorporado en la hemoglobina y citocromos) y de transportadores que suministran el metal a los tejidos eritropoyéticos (Ke y Costa., 2006), siendo un ejemplo de los últimos la transferrina, la cual participa en el transporte de Fe³⁺ a las células (Rolfs y col., 1997). Sin embargo, pese a que el CoCl₂ estimularía la síntesis del grupo hemo a través de la estabilización del complejo HIF-1, se ha descrito que el Co²⁺ afectaría su síntesis porque inhibiría a la enzima mitocondrial ácido δ -aminolevulinico sintasa (Nakamura y col., 1975), cuya actividad es controlada estrechamente por los niveles de

hierro y grupo hemo (Ajioka y col., 2006). De acuerdo a esto último, se ha observado en una línea celular neuronal de mamífero, que el CoCl_2 afecta a las mitocondrias, específicamente dañaría el material genético del organelo, pero no el DNA del núcleo celular (Wang y col., 2000). De acuerdo a todos antecedentes, los efectos del cobalto en la célula pueden ser múltiples, y se espera que la respuesta celular de *X. dendrorhous* al CoCl_2 sea muy similar a la reportada en células de mamífero. Es probable que el daño celular a causa del CoCl_2 active una respuesta adaptativa en la levadura, que involucre la activación de genes que controlan distintas rutas metabólicas, entre ellas vías muy relacionadas como lo son las rutas de síntesis del grupo hemo y de esteroides. Particularmente, la síntesis de esteroides depende del O_2 y requiere de las enzimas citocromos P450 Cyp61 y Cyp51, las que a su vez poseen un grupo hemo. De esta forma es posible que, en presencia de CoCl_2 , se afecte la síntesis de esteroides debido a la probable alteración de los citocromos P450 por sustitución del hierro por el cobalto en el grupo hemo, o también por una alteración en la síntesis del grupo hemo en la mitocondria. Similarmente, en levadura *C. neoformans* se ha observado que, en presencia de CoCl_2 , se activan algunos genes dependientes de Sre1 que estarían involucrados en la síntesis de ergosterol y en el transporte del hierro (Lee y col., 2007). Los esteroides son componentes importantes de la membrana celular y, en consecuencia, se activaría la vía SREBP en respuesta a una alteración en su síntesis. Por consiguiente, se observó que el crecimiento de las cepas mutantes *CBS Δ stp1* y *CBS Δ cyp61 Δ stp1* se afectó en estas condiciones, no así en la cepa *CBS.SRE1 Δ stp1* que, como se mencionó, expresa la forma activa del gen *SRE1* (Sre1N), que sería independiente de procesamiento por Stp1. Por otro lado, no se descarta que CoCl_2 genere un aumento de ROS en la célula que también afecte la viabilidad de las cepas mutantes. Particularmente, también es esperable que se afecte

el crecimiento de las cepas parentales (CBS 6938 y CBS*Scyp61*⁻), pero se determinó una concentración sub-lethal para estas cepas con el propósito de realizar una comparación cualitativa con sus respectivas cepas de delección de *STP1* en las placas de YM-agar, donde estas últimas presentan un defecto evidente en el crecimiento en las mismas condiciones experimentales. Finalmente, en los experimentos de crecimiento en presencia de azoles o CoCl₂ la reintegración de *STP1* en la cepa CBSΔ*stp1* (CBSΔ*stp1*/*STP1*) rescata su crecimiento en estos medios suplementados a un nivel similar a la cepa silvestre. Por lo tanto, la vía SREBP en *X. dendrorhous* se restablecería y le permitiría a la célula sintetizar esteroides en las condiciones experimentadas.

Con respecto a la producción/composición de compuestos isoprenoides en *X. dendrorhous*, ésta sólo se afectó en el mutante CBS*Scyp61*⁻Δ*stp1*, pese a que existen otras cepas donde la delección de *STP1* afectó el crecimiento en medios suplementados con azoles o CoCl₂. La particularidad de este mutante es que deriva de la cepa CBS*Scyp61*⁻ que no produce ergosterol, y acumula otros dos esteroides que podrían corresponder a ergosta-5,8,22-trien-3-ol y ergosta-5,8-dien-3-ol (Loto y col., 2012). Por lo tanto, se apostó a que la vía SREBP podría estar activada por la ausencia de ergosterol y que sería responsable de la sobreproducción de carotenoides. Es más, se detectó que los niveles de transcrito del gen *SRE1* en la cepa CBS*Scyp61*⁻ son 3,5 veces mayores que la cepa silvestre CBS 6938, luego de 120 h de cultivo, no así los niveles de transcrito del gen *STP1*, probablemente porque se ha visto que la expresión de S2P de mamífero no es regulada directamente por los esteroides (Sakai y col., 1996). De esta forma, la delección de *STP1* generó una disminución significativa en la producción de compuestos isoprenoides, lo que también se relacionó con una disminución

significativa en los niveles de transcrito de los genes *HMGR* y *HMGS* de la ruta del MVA (vía que genera metabolitos comunes para la biosíntesis de carotenoides y esteroides), los carotenogénicos, *crtS* y *crtR*, que controlan los pasos de β -caroteno a astaxantina, y el gen *CYP51* de la ruta de biosíntesis de ergosterol. Genes que probablemente se encuentran regulados por la vía SREBP, ya que mediante análisis bioinformático de sus regiones promotoras se detectaron posibles secuencias SRE (González., 2016), donde se uniría la forma activa del factor de transcripción (Sre1N) y controlaría su expresión en respuesta a la ausencia de ergosterol producido. Estos resultados son similares a los encontrados en células de mamífero auxótrofas de colesterol que portan una mutación en el gen que codifica a la S2P de la vía SREBP, donde la expresión de los genes que codifican a las enzimas HMGR y HMGS no es inducida tras la privación de esteroides, explicando así la auxotrofia del colesterol (Brown y Goldstein., 1997; Rawson y col., 1997). Similarmente en *C. neoformans*, cuando se comparan los niveles de expresión de los genes que codifican a las enzimas HMGR, HMGS y Cyp51, éstos se encuentran aumentados en la cepa silvestre respecto de la cepa de delección de *STP1* en condiciones de bajos niveles de O₂ (Bien y col., 2009). Por otra parte, la disminución de los niveles de transcrito de los genes carotenogénicos *crtS* y *crtR*, que controlan la producción de astaxantina desde β -caroteno, se traduce en un aumento de la fracción de carotenoides intermediarios y una disminución de la fracción de astaxantina. La fracción de astaxantina disminuyó de un 78% a un 66%, mientras que los carotenoides intermediarios aumentaron de 8% a un 24%. Este cambio en la composición de los carotenoides se relacionó con el cambio en el fenotipo de color de la cepa *CBScyp61 Δ stp1* respecto de su parental *CBScyp61*. Igualmente, la disminución en el nivel de transcrito del gen *CYP51* podría ser responsable del cambio en la composición de esteroides en la cepa *CBScyp61 Δ stp1*,

pero no se descartan otros genes de esta ruta que podrían estar involucrados, y que aún no han sido caracterizados en *X. dendrorhous*.

En conjunto, todos estos resultados son muy similares a los encontrados en la cepa *CBScyp61⁻* cuando el gen *SRE1* se escindió (Gutiérrez., 2015). Los mutantes de delección *CBScyp61⁻Δsre1* y *CBScyp61⁻Δstp1*, presentan un fenotipo muy similar en cuanto a cambio de fenotipo color, secundario a una disminución en la fracción de astaxantina, y a un aumento en la fracción de carotenoides intermediarios. También, se observó que la delección de *SRE1* en la cepa *CBScyp61⁻* afectó la producción de compuestos isoprenoides, y se vio que el total de carotenoides y esteroides disminuyó al igual que en la cepa *CBScyp61⁻* cuando se realizó la delección de *STP1*. Estos resultados permiten sugerir que posiblemente el rol de *Stp1* es activar a *Sre1*. Por otra parte, resulta importante complementar estos resultados con otros experimentos; por ejemplo, resultaría interesante evaluar el estado de activación de *Sre1* por *Stp1* mediante western blot. De esta forma, con la utilización de un anticuerpo monoclonal contra *Sre1* sería posible identificar su forma inactiva y activa (*Sre1N*) en las cepas generadas en esta tesis, y relacionar, por ejemplo, la detección sólo de la forma inactiva de *Sre1* en las cepas de delección de *STP1*, si existiera efectivamente una relación entre ambas proteínas.

Finalmente, se sugiere que *X. dendrorhous* tendría una vía SREBP operativa que incluye al gen *STP1* que codificaría a la zinc metaloproteasa *Stp1* (homóloga de la S2P de mamífero) involucrada en el procesamiento del factor de transcripción *Sre1* (homólogo de SREBP de mamífero); por lo tanto, la delección del gen *STP1* afecta la expresión de genes regulados por *Sre1*, incluyendo a genes que controlan la biosíntesis de isoprenoides en la levadura.

CONCLUSIONES

- El gen identificado como *STP1* probablemente codifica a la metaloproteasa Stp1 (homóloga de S2P de mamífero) involucrada en la vía de regulación SREBP de *X. dendrorhous*.
- La delección del gen *STP1* afecta el crecimiento de la levadura en medios suplementados con azoles o CoCl_2 , sugiriendo que *STP1* estaría involucrado en la vía SREBP de *X. dendrorhous*.
- La delección del gen *STP1* afecta la producción y composición de isoprenoides como esteroides y carotenoides en la cepa que no produce ergosterol, sugiriendo que *STP1* estaría involucrado en la vía SREBP de *X. dendrorhous*.

BIBLIOGRAFIA

- Adam Z. 2015. Plastid intermembrane proteolysis. *Biochim Biophys Acta*. **1847(9)**:910-914.
- Adrio J, Veiga M. 1995. Transformation of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol Tech*. **9(7)**:509-512.
- Ajioka R, Phillips J, Kushner J. 2006. Biosynthesis of heme in mammals. *Biochim Biophys Acta*. **1763(7)**:723-736.
- Alcaíno J, Barahona S, Carmona M, Lozano C, Marcoleta A, Niklitschek M, Sepúlveda D, Baeza M, Cifuentes V. 2008. Cloning of the cytochrome p450 reductase (*crtR*) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiology* **8**:169.
- Alcaíno J, Romero I, Niklitschek M, Sepúlveda D, Rojas MC, Baeza M, Cifuentes V. 2014. Functional characterization of *Xanthophyllomyces dendrorhous* farnesyl pyrophosphate synthase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase encoding genes that are involved in the synthesis of isoprenoid precursors. *PLoS One***9**:e96926.
- An G, Schuman D, Johnson E. 1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl Environ Microbiol* **55(1)**:116-124.
- Battaner E. 2012. Estructura de las proteínas. En Battaner E (Ed)., *Biomoléculas: una introducción estructural a la bioquímica*. España, pp. 294-295.
- Bien C, Chang Y, Nes W, Kwon-Chung K, Espenshade P. 2009. *Cryptococcus neoformans* site-2 protease is required for virulence and survival in the presence of azole drugs. *Mol Microbiol*. **74(3)**:672-690.
- Bien C, Espenshade P. 2010. Sterol regulatory binding proteins in fungi: hypoxic transcription factors linked to pathogenesis. *Eukaryot Cell* **9(3)**:352-359.
- Boyle J, Lew A. 1995. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends Genet* **11(1)**:8.
- Brown M, Goldstein J. 1997. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. **89(3)**:331-340.
- Chang Y, Bien C, Lee H, Espenshade P, Kwon-Chung K. 2007. Stp1p, a regulator of oxygen sensing and sterol homeostasis, required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*. **64(3)**:614-629.
- Chang Y, Ingavele S, Bien C, Espenshade P, Kwon-Chung K. 2009. Conservation of the sterol regulatory element-binding protein pathway and its pathobiological importance in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*. **8(11)**:1770-1779.

- Chen G, Bi Y, Li N. 2005. *EGY1* encodes a membrane-associated and ATP-independent metalloprotease that is required for chloroplast development. *Plant J.* **41(3)**:364-375.
- Chen G, Zhang X. 2010. New insights into S2P signaling cascades: regulation, variation, and conservation. *Protein Sci.* **19(11)**:2015-2030.
- Chun C, Liu O, Madhani H. 2007. Responses to hypoxia during infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog.* **3(2)**:e22.
- Duncan E, Brown M, Goldstein J, Sakai J. 1997. Cleavage site for sterol-regulated protease localized to a Leu-Ser bond in the luminal loop of sterol regulatory element-binding protein-2. *J Biol Chem.* **272(19)**:12778-12785.
- Duncan E, Davé U, Sakai J, Goldstein J, Brown M. 1998. Second-site cleavage in sterol regulatory element-binding protein occurs at transmembrane junction as determined by cysteine panning. *J Biol Chem.* **273(28)**:17801-17809.
- Echavarri-Erasun C, Johnson E. 2004. Stimulation of astaxanthin formation in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* by the fungus *Epicoccum nigrum*. *FEMS Yeast Res* **4(4-5)**:511-519.
- Epstein A, Gleadle J, McNeil L, Hewitson K, O'Rourke J, Mole D, Mukherji M, Metzger E, Wilson M, Dhanda A, Tian Y, Masson N, Hamilton D, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell P, Pugh C, Schofield C, Ratcliffe P. 2001. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell.* **107(1)**:43-54.
- Espenshade P, Hughes A. 2007. Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annu Rev Genet.* **41**:401-427.
- Espenshade P, Li W, Yabe D. 2002. Sterols block binding of COPII proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER. *Proc Natl Sci USA.* **99(18)**:11694-11699.
- Goldberg M, Dunning S, Bunn H. 1988. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science.* **242(4884)**:1412-1415.
- González, AM. 2016. Efecto de la delección del gen del factor transcripcional Sre1 en la expresión de sus genes blanco en la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Gutiérrez MS, Gómez M, Baeza M, Cifuentes V, Alcaíno J. 2016a. Construcción de módulos de expresión para la levadura carotenogénica *Xanthophyllomyces dendrorhous* mediante *DNA assembler*. Póster presentado en el XXIII CONGRESO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGÍA, XIV CONGRESO ARGENTINO DE MICROBIOLOGÍA. Desde el 26 al 30 de Septiembre, Rosario, Santa Fe, Argentina.

Gutiérrez MS, Gómez M, González AM, Gárate C, Sepúlveda D, Baeza M, Cifuentes V, Alcaíno J. 2016b. Sterols and carotenoids overproduction by expressing the transcriptional activation domain of Sre1 (Sre1N) in the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Póster presentado en el 7th WORLD CONGRESS ON MICROBIOLOGY. Desde el 28 al 29 de Noviembre, Valencia, España.

Gutiérrez MS, González AM, Baeza M, Cifuentes V, Alcaíno J. 2015. Phenotypic characterization of mutant strains of *SRE1* gene in carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Póster presentado en el XXXVII CONGRESO CHILENO DE MICROBIOLOGÍA. Desde el 1 al 4 de Diciembre, Hotel Club La Serena, La Serena, Chile.

Hargrove T, Kim K, de Nazaré Correia Soeiro M, da Silva C, Batista D, Batista M, Yazlovitskaya E, Waterman M, Sulikowski G, Lepesheva G. 2012. CYP51 structures and structure-based development of novel, pathogen-specific inhibitory scaffolds. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* **2**:178-186.

Higuera-Ciapara I, Félix-Valenzuela L, Goycoolea F. 2006. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **46(2)**:185-196.

Hua X, Sakai J, Brown M, Goldstein J. 1996. Regulated cleavage of sterol regulatory element binding proteins requires sequences on both sides of the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem.* **271(17)**:10379-10384.

Hua X, Yokoyama C, Wu J, Briggs M, Brown M, Goldstein J, Wang X. 1993. SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc Natl Acad Sci USA.* **90(24)**:11603-11607.

Hughes B, Nwosu C, Espenshade P. 2009. Degradation of sterol element-binding protein precursor requires the endoplasmic reticulum-associated degradation components Ubc7 and Hrd1 in fission Yeast. *J Biol Chem.* **284(31)**:20512-20521.

Hughes A, Todd B, Espenshade P. 2005. SREBP pathway responds to sterols and functions as an oxygen sensor in fission yeast. *Cell.* **120(6)**:831-842.

Kawanishi S, Inoue S, Yamamoto K. 1994. Active oxygen species in DNA damage induced by carcinogenic metal compounds. *Environ Health Perspect.* **102(Suppl 3)**:17-20.

Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). 2006. *Mol Pharmacol.* **70(5)**:1469-1480.

Kelly S, Lamb D, Corran A, Baldwin B, Kelly D. 1995. Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the formation of 14 alpha-methylergosta-8,24(28)-dien-3 beta,6 alpha-diol. *Biochem Biophys Commun.* **207(3)**:910-915.

- Kim I, Nam S, Sohn J, Rhee S, An G, Lee S, Choi E. 1998. Cloning of the ribosomal protein L41 gene of *Phaffia rhodozyma* and its use as a drug resistance marker for transformation. *Appl Environ Microbiol.* **64(5)**:1947–1949.
- Lamb D, Baldwin B, Kwon-Chung K, Kelly S. 1997. Stereoselective interaction of the azole antifungal agent SCH39304 with the cytochrome P-450 monooxygenase system isolated from *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother.* **41(7)**:1465-1467.
- Lee H, Bien C, Hughes A, Espenshade P, Kwon-Chung K, Chang Y. 2007. Cobalt chloride, a hypoxia-mimicking agent, targets sterols synthesis in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol.* **65(4)**:1018-1033.
- Leiva K, Werner N, Sepúlveda D, Barahona S, Baeza M, Cifuentes V, Alcaíno J. 2015. Identification y funcional characterization of the CYP51 gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* that is involved in ergosterol biosynthesis. *BMC Microbiology* **15**:89.
- Leonard S, Gannett P, Rojanasakui Y, Schwegler-Berry D, Castranova V, Vallyathan V, Shi X. 1998. Cobalt-mediated generation of reactive oxygen species and its possible mechanism. *J Inorg Biochem.* **70(3-4)**:239-244.
- Lewis A, Thomas P. 1999. A novel clan of zinc metallopeptidases with possible intramembrane cleavage properties. *Protein Sci.* **8(2)**:439-442.
- Livak K, Schmittgen T. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* **25(4)**:402-408.
- Lo Conte L, Ailei B, Hubbard T, Brenner S, Murzin A, Chothia C. 2000. SCOP: a structural classification of proteins database. *Nucleic Acids Res.* **28(1)**:257-259.
- Loto I. 2015. Identificación y caracterización del gen *HMGR* que codifica a la enzima HMG-CoA reductasa en *Xanthophyllomyces dendrorhous* y su rol en la síntesis de carotenoides. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Loto I, Gutiérrez M, Barahona S, Sepúlveda D, Martínez-Moya P, Baeza M, Cifuentes V, Alcaíno J. 2012. Enhancement of carotenoid production by disrupting the C22-sterol desaturase gene (*CYP61*) in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiol* **12**:235.
- Matsuda M, Korn B, Hammer R, Moon Y, Komuro R, Horton J, Goldstein J, Brown M, Shimomura I. 2001. SREBP cleavage-activating protein (SCAP) is required for increased lipid synthesis in liver induced by cholesterol deprivation and insulin elevation. *Genes Dev.* **15(10)**:1206-1216.
- Maxwell P, Salnikow. 2004. HIF-1: an oxygen and metal responsive transcription factor. *Cancer Biol Ther.* **3(1)**:29-35.
- Miziorko H. 2011. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* **505(2)**:131-143.

- Nakamura M, Yasukochi Y, Minakami S. 1975. Effect of cobalt on heme biosynthesis in rat liver and spleen. *J Biochem* **78(2)**:373-380.
- Niklitschek M, Alcaíno J, Barahona S, Sepúlveda D, Lozano C, Carmona M, Marcoleta A, Martínez C, Lodato P, Baeza M, Cifuentes V. 2008. Genomic organization of the structural genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biol Res.* **41(1)**:93-108.
- Rawlings N, Barrett A. 1995. Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods Enzymol.* **48**:183-228.
- Rawlings N, Barrett A. 2013. Introduction: metallopeptidases and their clans. En: Rawlings N, Salvesen G (eds)., *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Amsterdam: Elsevier, pp. 325-370.
- Rawlings N, Barrett A, Bateman. 2010. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* **38(Database issue)**:D227-D233.
- Rawlings N, Barrett A, Bateman. 2012. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* **40(Database issue)**:D343-D350.
- Rawson R, Li W. 2007. The Site-2 Protease at Ten. En: N. Hooper, U. Lendeckel (eds)., *Intermembrane-Cleaving Proteases (I-CLiPs)*. The Netherlands, pp.1-15.
- Rawson R, Zelenski N, Nijhawan D, Ye J, Sakai J, Hasan M, Chang T, Brown M, Goldstein J. 1997. Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs. *Mol Cell.* **1(1)**:47-57.
- Rolfs A, Kvietikova I, Gassmann M, Wenger R. 1997. Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem.* **272(32)**:20055-20062.
- Rosenfeld E, Beauvoit B. 2003. Role of the non-respiratory pathways in the utilization of molecular oxygen by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **20(13)**:1115-1144.
- Rudner D, Fawcett P, Losick R. 1999. A family of membrane-embedded metalloproteases involved in regulated proteolysis of membrane-associated transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96(26)**:14765-14770.
- Sakai J, Duncan E, Rawson R, Hua X, Brown M, Goldstein J. 1996. Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell.* **85(7)**:1037-1047.
- Sakai J, Nohturfft A, Goldstein J, Brown M. 1998. Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site-1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from in vivo competition studies. *J Biol Chem.* **273(10)**:5785-5793.

Sambrook J, Russel D. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sato R. 2010. Sterol metabolism and SREBP activation. *Arch Biochem Biophys.* **501(2)**:177-181.

Sato R, Inoue J, Kawabe Y, Kodama T, Takano T, Maeda M. 1996. Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2. *J Biol Chem.* **271(43)**:26461-26464

Schneider J, Glickman M. 2013. Function of site-2 proteases in bacteria and bacterial pathogens. *Biochim Biophys Acta.* **1828(12)**:2808-2814.

Schroeder W, Johnson E. 1993. Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma*. *J Gen Microbiol* **139**:907-912.

Simonsen L, Harbak H, Bennekou P. 2012. Cobalt metabolism and toxicology – a brief update. *Sci Total Environ.* 432:210-215.

Stewart E, Nwosu C, Tong Z, Roguev A, Cummins T, Kim D, Hayles J, Park H, Hoe K, Powell D, Krogan N, Espenshade P. 2011. *Mol Cell.* **42(2)**:160-171.

Sturley S. 2000. Conservation of eukaryotic sterol homeostasis: new insights from studies in budding yeast. *Biochim Biophys Acta.* **1529(1-3)**:155-163.

Todd B, Stewart E, Burg J, Hughes A, Espenshade P. 2006. *Mol Cell Biol.* **26(7)**:2817-2831.

Verdoes J, Krubasik K, Sandmann G, van Ooyen A. 1999a. Isolation and functional characterization of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Mol Gen Genet* **262(3)**:453-461.

Verdoes J, Misawa N, van Ooyen A. 1999b. Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnol Bioeng* **63(6)**:750-755.

Visser H, van Ooyen A, Verdoes J. 2003. Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *FEMS Yeast Res* **4(3)**:221-231.

Wang G, Hazra T, Mitra S, Lee H, Englander E. 2000. Mitochondrial DNA damage and a hypoxic response are induced by CoCl₂ in rat neuronal PC12 cells. *Nucleic Acids Res.* **28(10)**:2135-2140.

Wang G, Semenza G. 1993. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad USA.* 90(9):4304-4308.

- Watson P, Rose M, Ellis S, England H, Kelly S. 1989. Defective sterol C5-6 desaturation and azole resistance: a new hypothesis for the mode of action of azole antifungals. *Biochem Biophys Res Commun.* **164(3)**:1170-1175.
- Werner N, Gómez M, Baeza M, Cifuentes V, Alcaíno J. 2016. Functional characterization of thiolase-encoding genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous* and their effects on carotenoid synthesis. *BMC Microbiol.* **16**:278.
- Yabe D, Brown M, Goldstein J. 2002. Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99(20)**:12753-12758.
- Yang T, Espenshade P, Wright M, Yabe D, Gong Y, Aebersold R, Goldstein J, Brown M. 2002. Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell.* **110(4)**:489-500.
- Yokoyama C, Wang X, Briggs M, Admon A, Wu J, Hua X, Goldstein J, Brown M. 1993. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell.* **75(1)**:187-197.
- Yu F, Zhu X, Li G, Kronzucker H, Shi W. 2016. The Chloroplast Protease AMOS1/EGY1 Affects Phosphate Homeostasis under Phosphate Stress. *Plant Physiol.* **172(2)**:1200-1208.
- Yu Y, Kroos L. 2000. Evidence that SpoIVFB is a novel type of membrane metalloprotease governing intercompartmental communication during *Bacillus subtilis* sporulation. *J Bacteriol.* **182(11)**:3305-3309.
- Zelenski N, Rawson R, Brown M, Goldstein J. 1999. Membrane topology of S2P, a protein required for intramembranous cleavage of sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem.* **274(31)**:21973-21980.
- Zhang Y, Rao R. 2010. Beyond ergosterol: Linking pH to antifungal mechanisms. *Virulence* **1(6)**:551-554.