



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE CIENCIAS
AMBIENTALES Y BIOTECNOLOGIA

**“CONSTRUCCIÓN DE VECTORES MEDIANTE DNA ASSEMBLER PARA LA
TRANSFORMACION DE *XANTHOPHYLLOMYCES DENDRORHOUS*”**

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

GABRIELA ALEJANDRA APARIZ VILLARROEL

Directora:

Dra. Jennifer Cecilia Alcaíno Gorman

Co-Director:

Maximiliano Alberto Venegas Ruiz

Julio 2023

Santiago – Chile



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE CIENCIAS
AMBIENTALES Y BIOTECNOLOGIA

Informe de Aprobación de Seminario de Título

Se informa a la Escuela de Ciencias Ambientales y Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la
Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por

Gabriela Alejandra Apariz Villarroel

“CONSTRUCCIÓN DE VECTORES MEDIANTE DNA ASSEMBLER PARA LA TRANSFORMACION DE *XANTHOPHYLLOMYCES DENDRORHOUS*”

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

Ingeniera en Biotecnología Molecular

Dra. Jennifer Alcaíno Gorman

Directora Seminario de Título:

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Julieta Orlando

Presidente Comisión:

Dra. María Soledad Gutiérrez

Evaluador:

Santiago de Chile, Septiembre 2023.

BIOGRAFÍA



Nací en Santiago de Chile el 17 de octubre de 1999. Primera hija de mis padres Paola Villarroel y Rodrigo Apariz, más adelante se unió a nuestra familia mi hermana Josefa Apariz. Mis padres siempre se encargaron de entregarme todo lo que necesitaba, educación, comida, salud, protección y amor.

Terminé mis estudios de enseñanza media en el Colegio Polivalente Camilo Henríquez de Maipú, en donde tuve profesores que además de entregarme las herramientas necesarias para rendir a nivel académico,

me marcaron a nivel personal por su dedicación y vocación para con los estudiantes. Hasta el día de hoy recuerdo a mis profesores con mucho cariño, sin ellos no habría llegado tan lejos.

En 2018 ingresé a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, donde empecé un camino difícil y gratificante al mismo tiempo. Durante estos años generé lazos con personas maravillosas con las que hasta el día de hoy sigo y espero seguir en contacto durante mucho tiempo. Además, tuve la oportunidad de expandir mis conocimientos en diversas áreas, así como también conocer diferentes profesionales que entregaron su granito de arena a lo largo de mi formación profesional.

Estos casi 6 años fueron una montaña rusa de emociones y dificultades, más de una vez tuve que replantearme mi camino y mis metas en esta carrera, con mucha perseverancia y dedicación pude sobrepasar cada problema, no me arrepiento de nada, cada paso dado y cada decisión tomada fue necesaria para llegar a donde estoy actualmente.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera partir esta sección expresando mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que de una u otra forma contribuyeron y formaron parte de este proceso, no sólo la realización de este Seminario de Título, sino que también de los 5 años de mi formación profesional.

Primero que todo quisiera agradecer a la Dra. Jennifer Alcaíno, por su apoyo a lo largo de estos últimos años, por entregarme de su tiempo y paciencia para aconsejarme y, por último, por ayudarme a encontrar la seguridad y confianza que necesito a la hora de trabajar.

Agradezco al Laboratorio de Genética, en especial a Maximiliano y Salvador por siempre tener la disposición de enseñar, por los consejos y el apoyo. Por ayudarme y guiarme a lo largo de este camino, no sólo en el trabajo práctico, sino que también por los consejos entregados a nivel académico y personal. Agradezco al proyecto FONDECYT 1220384, por entregar el financiamiento que permitió que se realizara este Seminario de Título.

Agradezco a mis padres, por guiarme a lo largo de este camino, por permitirme y darme la oportunidad de estudiar lo que yo quisiera, demostrándome un apoyo incondicional en cada paso que daba. Gracias por entregarme todo lo que estaba a su alcance, tanto en lo físico como en lo emocional.

Agradezco a mis amigas del colegio, a mis amigas y amigos que conocí en la universidad y a mi pareja, por escucharme cada vez que necesitaba un desahogo, por el apoyo emocional entregado durante estos años, por levantarme el ánimo en más de una ocasión y por sobre todas las cosas, les agradezco por estar ahí cada vez que lo necesitaba.

A todas las personas mencionadas anteriormente y muchas más que no fueron mencionadas, les agradezco de todo corazón por su apoyo incondicional.

ÍNDICE

BIOGRAFÍA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
MATERIALES Y MÉTODOS	14
1. Microorganismos y medios de cultivo utilizados	14
2. Cepas y Plásmidos	14
4. Extracción, análisis y amplificación de DNA	17
5. Transformación por electroporación	21
RESULTADOS	23
1. Diseño de vectores.....	23
2. Construcción de vectores.....	25
3. Análisis de Vectores	32
DISCUSION	37
CONCLUSIONES	42
REFERENCIAS	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes que participan en la vía SREBP en mamíferos y hongos.	8
Tabla 2. Cepas utilizadas en este trabajo	15
Tabla 3. Plásmidos utilizados y/o generados	15
Tabla 4. Detalles de módulos amplificados mediante PCR.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía SREBP en mamíferos.....	6
Figura 2. Síntesis de astaxantina y ergosterol	10
Figura 3. Diseño de vectores y diferentes versiones de la proteína Sre1	24
Figura 4. Diseño de vectores y diferentes versiones de la proteína Sre1	24
Figura 5. Esquema de la técnica DNA assembler.	26
Figura 6. Fragmentos de DNA amplificados para DNA assembler	28
Figura 7. PCR utilizado para seleccionar colonias de <i>S. cerevisiae</i>	30
Figura 8. PCR utilizado para la selección de colonias de <i>E. coli</i>	32
Figura 9. Análisis mediante PCR de los vectores A _{3.4.2} , B _{3.2.3} , C _{1.4.1} , D _{1.2.12} , E _{3.2.1} y F _{1.2.13}	33
Figura 10. Análisis de vectores construidos por restricción.....	35

ABREVIATURAS

<i>bHLH-LZ</i>	Motivo <i>basic Helix-Loop-Helix Leucine Zipper</i>
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
<i>DO</i>	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FPP	FPP
GPP	Geranil pirofosfato
GGPP	Geranilgeranil pirofosfato
INSIG	<i>Insulin Induced Gene</i>
IPP	Isopentenyl pirofosfato
LB	Medio utilizado para crecer <i>E. coli</i>
NTC	Nourseotricina
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena polimerasa
RE	Retículo endoplasmático
SCAP	<i>SREBP Cleavage Activating Protein</i>
SRE	<i>Sterol Regulatory Element</i>
Sre1N	Dominio amino terminal del factor de transcripción Sre1
SREBP	<i>Sterol Regulatory Element-Binding Proteins</i>
S1P	<i>Site-1 Protease</i>
S2P	<i>Site-2 Protease</i>
TE	Buffer Tris-EDTA
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
TM	Región transmembrana
YEP	Medio utilizado para crecer <i>S. cerevisiae</i>
YM	Medio utilizado para crecer levaduras

RESUMEN

Xanthophyllomyces dendrorhous es una levadura basidomicete que sintetiza astaxantina, carotenoide de alto interés comercial. Recientemente se ha descrito que esta levadura posee la vía SREBP (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein*) encargada de regular la síntesis de ergosterol y carotenoides; sin embargo, hasta la fecha no se conocen a totalidad los mecanismos que la regulan en este organismo. En *X. dendrorhous* el factor de transcripción Sre1 de la vía SREBP es procesado por una o más proteasas para liberar la forma activa del factor correspondiente a su dominio amino terminal (Sre1N). Actualmente se ha demostrado que la proteasa Stp1 procesa a Sre1, pero experimentos preliminares sugieren la participación de una segunda proteasa (SppA) para liberar a Sre1N activo. En este trabajo se busca avanzar en el entendimiento de la vía SREBP de *X. dendrorhous* evaluando las posibles regiones donde las proteasas Stp1 y SppA cortarían a Sre1 para liberar a Sre1N. De esta manera, el objetivo de este trabajo fue diseñar y construir distintos módulos de DNA para reemplazar al gen nativo *SRE1* en cepas mutantes del gen de cada proteasa por distintas versiones del gen *SRE1* en cuanto a su longitud y que codifiquen a la proteína con los epítomos FLAG y HA fusionados en sus extremos N- y C-terminal, respectivamente. Esto permitirá determinar cuál de las versiones codifica a una proteína Sre1 que no requiere de la acción de las proteasas para la formación de Sre1N activo. Lo anterior, podrá ser evaluado mediante ensayos de complementación analizando el fenotipo de los transformantes y la presencia del epítomo HA fusionado en el extremo C-terminal. Como resultado se diseñaron 6 módulos para transformar *X. dendrorhous* por recombinación homóloga. Cada módulo consiste en 7 fragmentos de DNA los cuales fueron obtenidos mediante reacciones de PCR y que fueron diseñados de tal forma que cada fragmento posea en sus extremos una región homóloga de otro de los fragmentos (“colas”) para que se puedan ensamblar formando un vector mediante la técnica *DNA assembler* la cual utiliza la maquinaria de recombinación homóloga de *Saccharomyces cerevisiae*. Los plásmidos construidos

fueron recuperados transformando *Escherichia coli* con el DNA total extraído desde colonias de *S. cerevisiae* transformantes con los fragmentos amplificados por PCR. La correcta construcción de los plásmidos fue evaluada mediante PCR y análisis de restricción. Se logró construir 6 plásmidos portadores de las distintas versiones del gen *SRE1* de *X. dendrohous* en su longitud y que codifican una proteína con epítomos fusionados en sus dos extremos, por lo que con estas construcciones será posible evaluar las regiones de corte de las proteasas Stp1 y SppA en Sre1.

ABSTRACT

Xanthophyllomyces dendrorhous is a basidiomycete yeast that synthesizes astaxanthin, a carotenoid of high commercial interest. This yeast has the SREBP (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein*) pathway, which regulates the synthesis of ergosterol and carotenoids. However, the mechanisms that regulate this pathway are not fully known in this organism. In *X. dendrorhous*, the transcription factor Sre1 of the SREBP pathway is processed by one or more proteases to release the active form of the factor corresponding to its amino-terminal domain (Sre1N). Currently, it has been demonstrated that the protease Stp1 processes Sre1, but preliminary experiments suggest the involvement of a second protease (SppA) to release the active Sre1N. This work aims to advance the understanding of the SREBP pathway in *X. dendrorhous* by evaluating the possible regions where the proteases Stp1 and SppA would cleave Sre1 to release Sre1N. Thus, the main goal of this work was to design and construct different DNA modules to replace the native *SRE1* gene in mutant strains of each protease gene with different versions of the *SRE1* gene in terms of its length and encoding the protein with FLAG and HA epitopes fused to its N- and C-terminal, respectively. This will allow determining which versions encode an active Sre1N that does not require the action of proteases. This can be evaluated through complementation assays, analyzing the phenotype of the transformants and the presence of the HA epitope fused to the C-terminal. As a result, six modules were designed to transform *X. dendrorhous* by homologous recombination. Each module consists of seven DNA fragments obtained through PCR reactions, designed in such a way that each fragment has part of another fragment ("tails") at its ends, enabling their assembly to form a vector using the *DNA assembler* technique, which utilizes the homologous recombination machinery of *Saccharomyces cerevisiae*. The constructed plasmids were recovered by transforming *Escherichia coli* with the total DNA extracted from *S. cerevisiae* colonies transformed with the PCR-amplified fragments. The correct construction of the plasmids was

evaluated through PCR and restriction analysis. Six plasmids carrying different versions of the *SRE1* gene of *X. dendrorhous* varying in length and encoding a protein fused to epitopes at both ends, were successfully constructed. Consequently, with these constructs, it will be possible to evaluate the cleavage regions of Sre1 by proteases Stp1 and SppA in *X. dendrorhous*.

INTRODUCCIÓN

Vía SREBP

La vía SREBP (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein*) es el principal sistema de regulación de lípidos en eucariontes. En esta vía participan proteínas SREBPs (*Sterol Regulatory Element-Binding Proteins*) que corresponden a factores de transcripción que poseen un motivo *bHLH-LZ* (*basic Helix-Loop-Helix Leucine Zipper*) el cual se une a regiones específicas del DNA en genes involucrados en la homeostasis de lípidos, incluyendo la síntesis de esteroides (Goldstein et al., 2006). La vía SREBP se encuentra estudiada principalmente en mamíferos, donde participan una serie de proteínas unidas al retículo endoplasmático (RE) involucradas en la homeostasis del colesterol. Una de estas proteínas corresponde al factor de transcripción SREBP, el cual en su forma precursora se encuentra anclado en la membrana del RE a través de 2 regiones de transmembrana (TM) y con sus dominios N- y C- terminal expuestos hacia el citoplasma, siendo el dominio N-terminal el dominio de unión a DNA y el C-terminal el dominio regulador. SREBP interactúa mediante el dominio C-terminal con la proteína SCAP (*SREBP Cleavage Activating Protein*), proteína de membrana que posee un dominio de unión a esteroides y que, a su vez, interactúa con la proteína INSIG (*Insulin Induced Gene*) en la membrana del RE (Espenshade & Hughes., 2007).

Cuando los niveles de esteroides en la célula son suficientes, INSIG se une al complejo SCAP-SREBP reteniendo a este complejo en la membrana del RE. Por otro lado, si los niveles de esteroides disminuyen, SCAP dejará de unir esteroides y sufrirá un cambio conformacional que provoca la interrupción de la interacción entre las proteínas INSIG y SCAP permitiendo que el complejo SREBP-SCAP migre a la membrana del aparato de Golgi. En el aparato de Golgi, SREBP es procesado por las proteasas S1P y S2P (*Site-1 Protease* y *Site-2 Protease*, respectivamente), las que realizan cortes consecutivos en la proteína liberando el dominio N-terminal de SREBP el cual

viaja al núcleo, uniéndose a secuencias conocidas como SRE (*Sterol Regulatory Element*) ubicadas en la región promotora de genes blanco que regulan la síntesis de lípidos como el colesterol (principal esteroles en mamíferos) (Figura 1).

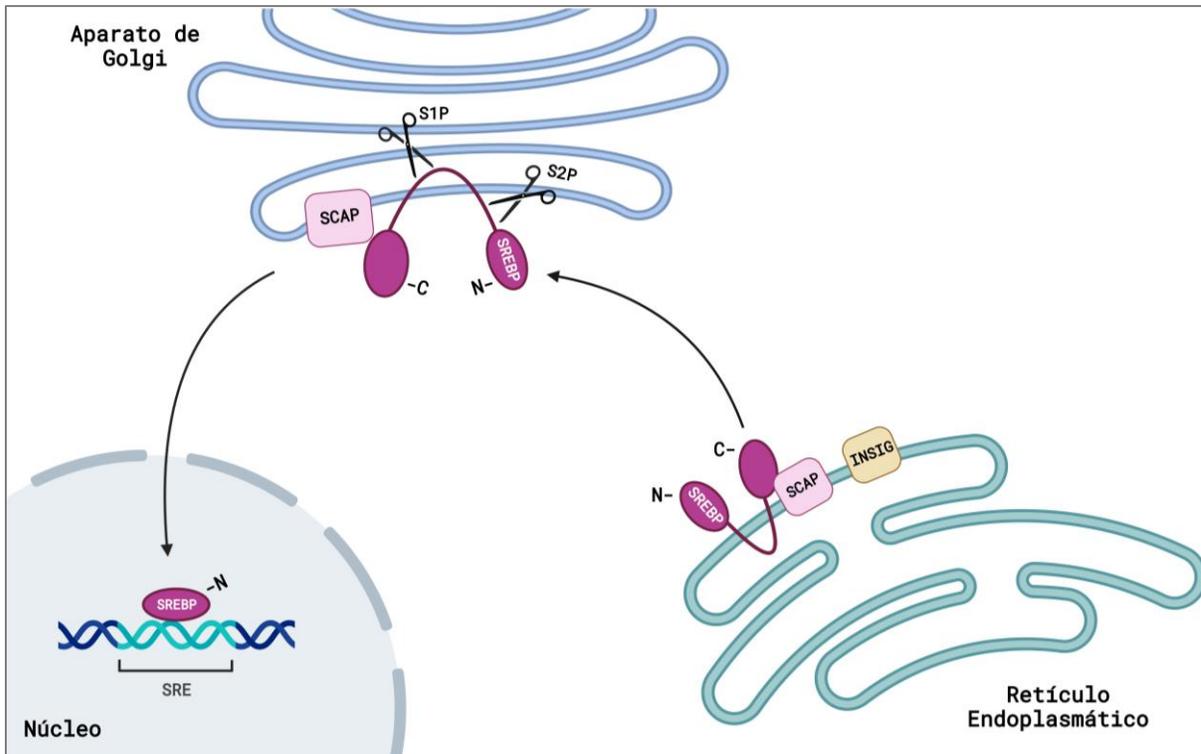


Figura 1. Vía SREBP en mamíferos. Cuando los niveles de esteroides disminuyen en la célula la interacción entre las proteínas SCAP e INSIG se interrumpe. El complejo SCAP-SREBP se transloca a la membrana del aparato de Golgi donde SREBP es procesada secuencialmente por las proteasas S1P y S2P liberando el dominio N- terminal de la proteína, el cual viaja al núcleo y se une a las secuencias SRE, regulando la transcripción en genes que participan en la regulación de lípidos. Figura adaptada de Bien y Espenshade, 2010 (3).

La vía SREBP ha sido descrita en algunas levaduras y hongos, sin embargo, los organismos del reino Fungi no sintetizan colesterol como es en el caso de los mamíferos, sino que sintetizan ergosterol, molécula que es análoga al colesterol, por lo que se han utilizado estos organismos como modelos para estudiar la homeostasis de lípidos (Espenshade & Hughes, 2007). Los principales modelos fúngicos en los cuales se ha estudiado la vía SREBP son las levaduras *Schizosaccharomyces pombe* y *Cryptococcus neoformans*, y en dos especies del hongo filamentoso *Aspergillus* (Tabla 1). En estos organismos se ha demostrado que la vía SREBP no solo participa

en la homeostasis de lípidos, sino que es esencial para el crecimiento de éstos en condiciones de hipoxia (Willger et al., 2008), lo que permite utilizar esta condición como un indicador al momento de estudiar la vía SREBP y los componentes que participan en ella.

En *S. pombe* se identificaron homólogos a las proteínas SREBP y SCAP de mamíferos, las cuales se denominaron Sre1 y Scp1, respectivamente. Junto con la identificación de estos homólogos, mediante ensayos de microarrays se demostró que Sre1 regula la expresión de genes que participan en la síntesis de esteroides y de genes necesarios para la adaptación a condiciones de hipoxia (Hughes et al., 2005). Si bien no se encontraron homólogos de S1P y S2P, se demostró que la activación de Sre1 depende del complejo Dsc E3 ligasa que se encuentra anclado en la membrana del aparato de Golgi, y de la proteasa romboide Rbd2 unida a Cdc48 al complejo (Hwang et al., 2016; Stewart et al., 2012). Por otro lado, en *C. neoformans* también se describieron homólogos de las proteínas SREBP y SCAP, denominados Sre1 y Scp1, respectivamente (Chang et al., 2007). Además, se encontró un homólogo de la proteasa S2P (denominado como Stp1) el cual procesa a Sre1 en su primer sitio TM. Además, en *C. neoformans* se evidenció que la proteasa Stp1 podría participar en el procesamiento de otros factores de transcripción ya que al escindir el gen no sólo se afecta la transcripción de genes dependientes de Sre1 (Bien et al., 2009). Por último, tanto en *A. fumigatus* como en *A. nidulans* se identificó un homólogo de SREBP denominado SrbA y evidencias muestran que es procesado por el mismo complejo que en *S. pombe* (Willger et al., 2012). Sin embargo, en el procesamiento de SrbA se demostró que es necesaria la participación de la proteasa aspártica SppA, la cual interactúa con SrbA en el RE. Lo anterior se demostró al generar una delección del gen de SppA (Δ SppA) donde la cepa resultante no crece en condiciones de hipoxia mientras que si esta misma cepa (Δ SppA) se complementaba con una versión de SrbA cuyo largo llegaba antes del primer TM, volvía a crecer en esta condición. Junto con esto se demostró que

SppA procesa SrbA después de que esta es procesada por el complejo Dsc (Bat-Ochir et al., 2016).

Hasta la fecha no se han encontrado homólogos de SCAP, S1P o de S2P en *Aspergillus spp.*

Tabla 1. Componentes que participan en la vía SREBP en mamíferos y hongos.

COMPONENTES DE LA VÍA SREBP								
	Organismo	SREBP	INSIG	SCAP	S1P	S2P	Complejo proteico	SppA
Mamifero	<i>H. sapiens</i>	SREBP	INSIG	SCAP	S1P	S2P	x	x
	<i>S. pombe</i> (Ascomicete)	Sre1	x	Scp1	x	x	Cdc48- Rbd2	x
Hongos	<i>C. neoformans</i> (Basidiomicete)	Sre1	x	Scp1	x	Stp1	x	x
	<i>A. fumigatus /A. nidulans</i> (Ascomicete)	SrbA	x	x	x	x	Cdc48- Rbd2	SppA

Nota: X indica la ausencia de un homólogo funcional que participe en la vía SREBP.

Xanthophyllomyces dendrorhous

Otro de los microorganismos en donde se ha demostrado que la vía SREBP participa en la regulación de esteroides es en la levadura basidiomicete *Xanthophyllomyces dendrorhous* donde la vía regula la biosíntesis de compuestos isoprenoides, tales como el ergosterol y los carotenoides. *X. dendrorhous* se caracteriza por su producción natural de carotenoides, los cuales son pigmentos cuyas tonalidades van desde el amarillo hasta el rojo que destacan por sus propiedades antioxidantes. *X. dendrorhous* es uno de los pocos microorganismos que sintetiza de manera natural astaxantina, carotenoide de alto interés biotecnológico debido a su uso como pigmento y antioxidante en las industrias alimentarias, cosméticas y, en especial, en la industria acuícola debido a que este pigmento se utiliza en las industrias salmoneras como suplemento alimenticio al otorgar el color anaranjado característico de la carne de los salmones. La capacidad de esta levadura de sintetizar astaxantina, la hace atractiva desde la mirada biotecnológica para aumentar su

producción y así competir con la astaxantina sintética que se encuentra actualmente en el mercado (Higuera-Ciapara et al, 2006).

En *X. dendrorhous* tanto la síntesis de carotenoides como la síntesis de esteroides tienen como precursor a la molécula IPP (isopentenil pirofosfato) sintetizada en la ruta del mevalonato representada en la Figura 2 (Loto et al., 2012). Esta ruta inicia con dos moléculas de acetil-CoA, las cuales mediante sucesivas reacciones dan lugar a la molécula IPP. Luego, el IPP es convertido en su isómero DMAPP (dimetilalil pirofosfato) y ambos se condensan formando GPP (geranil pirofosfato). Al GPP se le adiciona otra molécula de IPP generando FPP (farnesil pirofosfato) siendo esta molécula precursora de la síntesis de esteroides ya que la condensación de dos moléculas de FPP forman escualeno, molécula con la que se inicia la síntesis de los esteroides. Por otra parte, si al FPP se le adiciona una nueva molécula de IPP se genera GGPP (geranilgeranil pirofosfato), precursor de los carotenoides, y la condensación de dos moléculas de GGPP da lugar a fitoeno, el primer carotenoide de la biosíntesis de carotenoides.

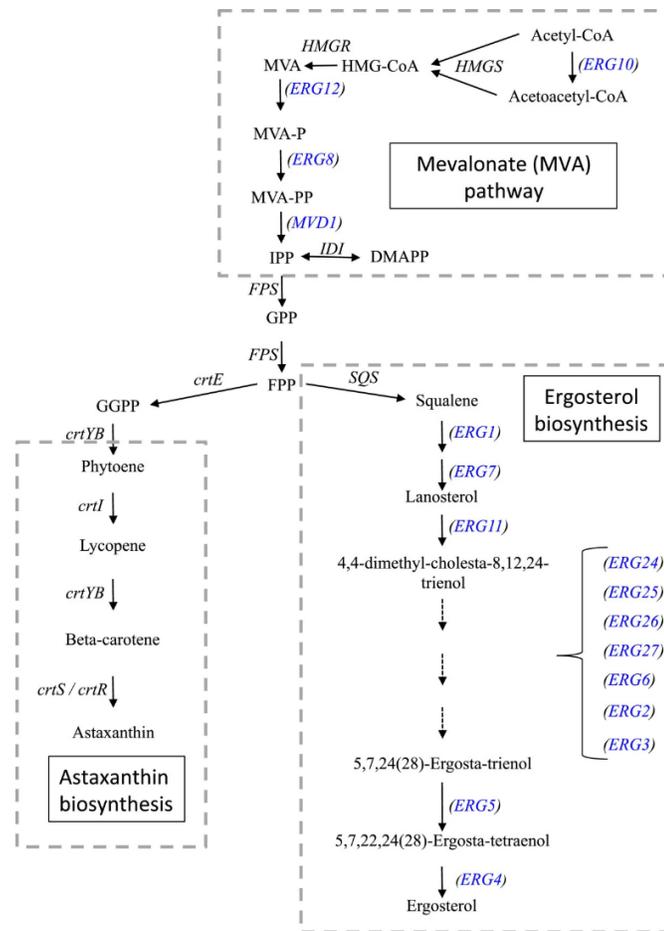


Figura 2. Síntesis de astaxantina y ergosterol. Se muestran las vías de síntesis de astaxantina y ergosterol junto con la ruta del mevalonato, precursora de ambas vías. Las flechas continuas simbolizan la conversión catalítica de los metabolitos y las flechas puntuadas simbolizan que hay más de un intermediario en la reacción. Junto a cada flecha se indica el gen que codifica la enzima que cataliza la reacción (Negro para *X. dendrorhous* y azul para *S. cerevisiae*). Figura tomada de Loto et al., 2012 (1).

Se ha evidenciado que al interrumpir el gen *CYP61* (*ERG5*) involucrado en los pasos finales de la síntesis de ergosterol (Figura 2), la cepa resultante sobreproduce esteroides y carotenoides con respecto a su parental, resultando en mutantes con fenotipo visualmente más rojizo, lo que sugiere que los esteroides tendrían un rol regulador en la síntesis de carotenoides (Loto et al., 2012). Posteriormente se demostró que este fenotipo sobreproductor de carotenoides se debe a la activación de la vía SREBP en estos mutantes (Gutiérrez et al., 2019).

Investigaciones recientes evidenciaron, mediante análisis de RNA-seq y de co-inmunoprecipitación de cromatina (ChiP), que el factor de transcripción Sre1 (homólogo de SREBP en mamíferos) codificado por el gen *SRE1* participa en la regulación de carotenoides y esteroides en la levadura *X. dendrorhous* (Gutiérrez et al., 2019). Mediante ensayos de ChiP-exo, se demostró que Sre1 se une a la región promotora de varios genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de esteroides, incluyendo genes que codifican enzimas de la ruta del mevalonato, y de genes de la síntesis de carotenoides como *crtE* y *crtR*, que codifican enzimas que catalizan pasos iniciales y finales de la síntesis de astaxantina, respectivamente (Gómez et al., 2020). En este organismo, además de Sre1 se conoce la participación de la metaloproteasa Stp1, la que se demostró ser necesaria para la activación de Sre1 (Gómez et al., 2020), cuyo corte en Sre1 contribuye a liberar la parte activa del factor de transcripción correspondiente al N- terminal de la proteína (Sre1N). Esto se demostró al generar una delección del gen *STP1* en la cepa mutante del gen *CYP61*, donde se observó que se pierde el fenotipo sobreproductor de carotenoides. La dependencia de Stp1 para la activación de Sre1 se confirmó mediante ensayos de Western blot, los cuales mostraron que al no tener a la proteína Stp1 funcional, la proteína Sre1 no se corta; por lo tanto, no se libera Sre1N. Además, tanto en la cepa silvestre y en la cepa mutante del gen *CYP61* se observó que al no estar presente Stp1 estas no crecen en azoles, lo que indicaría que la vía participa en la resistencia a estos compuestos. También junto con estos análisis se reemplazó en la cepa silvestre el gen *SRE1* por una versión más corta del gen que solo codificaría a Sre1N, recuperando el fenotipo sobreproductor de carotenoides (en el caso de la cepa *CYP61*) y el fenotipo resistente a azoles (en el caso de la cepa silvestre y la cepa *CYP61*) al no requerir el procesamiento de la proteasa Stp1.

Por otra parte, experimentos preliminares sugieren que Stp1 por sí sola no bastaría para procesar Sre1 y liberar Sre1N, sino que además es necesaria la participación de una segunda proteasa para

la activación de Sre1. Como se mencionó anteriormente, en el hongo filamentoso *A. fumigatus* se demostró que la proteasa SppA participa en el procesamiento de SrbA, donde SrbA sufre de dos cortes consecutivos para poder liberar la forma activa del factor de transcripción. En *X. dendrorhous* se encontró un homólogo del gen *SPPA* y antecedentes sugieren que la proteasa SppA podría ser responsable de un segundo procesamiento en Sre1, dado que mutantes de delección del gen *SPPA* en *X. dendrorhous* presentan un fenotipo similar a los mutantes del gen *SRE1* y *STP1* en la cepa con el gen *CYP61* mutado, es decir no hay sobreproducción de carotenoides y la cepa es sensible a azoles lo que indicaría que la vía SREBP no se encuentra activa. Además, mutantes de SppA obtenidos a partir de la cepa sobreproductora de carotenoides que expresa a Sre1N y que no requiere de Stp1 para su activación, presenta un fenotipo silvestre en cuanto a pigmentación, lo que sugiere que SppA es necesaria para activar a la versión de Sre1N que se expresó en dicha cepa (Venegas, M. Tesis de Doctorado en desarrollo). Actualmente se desconocen las regiones donde la proteasa Stp1 y posiblemente la proteasa SppA, procesarían a Sre1. Y, si bien se tienen evidencias de que la proteasa SppA podría participar en el procesamiento del factor de transcripción, se requiere de estudios adicionales. Una alternativa para estos estudios es realizar análisis de complementación y análisis del tamaño de la proteína Sre1 mediante Western blot para evaluar si efectivamente se requiere del segundo procesamiento. Estos ensayos se podrían realizar sobre cepas que poseen delecciones de los genes *STP1* o *SPPA* transformadas con versiones del gen de Sre1 que codifiquen versiones de Sre1 de distinta longitud y cada vez más corta desde el extremo C-terminal hasta encontrar transformantes que recuperen el fenotipo sobreproductor de carotenoides característico de la cepa mutante del gen *CYP61* y, que además puedan crecer en presencia de azoles evidenciando que no requiere de alguna de las dos proteasas para liberar al factor de transcripción activo. Una vez evaluado el fenotipo de los transformantes, se podrá analizar

mediante Western blot la presencia o ausencia de los epítomos fusionados en los extremos de Sre1, evidenciando si ocurren o no cortes proteolíticos en Sre1.

Objetivo general

Construir vectores que contengan distintas versiones del gen *SRE1* unido a secuencias que codifican los epítomos FLAG y HA en sus extremos N- y C- terminal, respectivamente.

Objetivos específicos

(1) Diseñar bioinformáticamente vectores con las distintas versiones del gen *SRE1* con los módulos necesarios para que, mediante recombinación homóloga, se pueda reemplazar el gen *SRE1* nativo de *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

(2) Construir los vectores diseñados previamente en (1) utilizando la técnica de *DNA assembler in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos y medios de cultivo utilizados

1.1 Bacteria

Para seleccionar y conservar los plásmidos se utilizó la cepa *DH5α* de *E. coli* (Hanahan., 1983) la cual se cultivó en medio LB (*Lysogeny broth*: Triptona 1%, Extracto de levadura 0,5%, NaCl 0,5%) con agitación constante a 37°C. Para la selección de transformantes se utilizó el medio LB-agar 1,5% suplementado con el antibiótico ampicilina a una concentración de 100 µg/mL.

1.2 Levaduras

1.2.1 *S. cerevisiae*

Para generar los vectores mediante la técnica *DNA assembler in vivo* (Muller et al., 2012; Van Leeuwen et al., 2015) se utilizó la cepa de *S. cerevisiae S288c* (ATCC® 204508™) la cual fue cultivada en medio YEP (Extracto de levadura 1%, Glucosa 2%, Peptona 2%) con agitación constante a 30°C. Para la selección de transformantes se utilizó el medio YEP-agar 1,5% suplementado con el antibiótico geneticina (G418) a una concentración de 200 µg/mL.

1.2.2 *X. dendrorhous*

Se utilizó DNA genómico de la cepa CBS.*SREI*.Full.ΔStp1 (Gómez et al., 2020) de *X. dendrorhous* la cual fue cultivada en un medio YM semisólido (Extracto de levadura 0,3%, Extracto de malta 0,3%, Peptona 0,5% y Glucosa 1%) suplementado con higromicina (50 µg/mL) a 22°C.

2. Cepas y Plásmidos

2.1 Cepas

Las cepas de microorganismos utilizadas en este trabajo se encuentran detalladas en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas utilizadas en este trabajo

Cepa	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i> <i>DH5α</i>	Cepa de <i>E. coli</i> utilizada para la recuperación y conservación de plásmidos.	Hanahan., 1983
<i>S. cerevisiae</i> S288c	Cepa de <i>S. cerevisiae</i> de genotipo MATα <i>SUC2 gal2 mal2 mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6</i> , utilizada en el <i>DNA assembler</i> .	ATCC 204508
<i>X. dendrorhous</i> CBS. <i>SRE1</i> .Full.ΔStp1	Cepa que deriva de CBS 6938 en la cual se reemplazó el gen <i>STP1</i> por un módulo que otorga resistencia a higromicina. Además, presenta la secuencia que codifica al epítipo FLAG fusionado en el extremo amino terminal del gen <i>SRE1</i> .	Gómez et al., 2020

2.2 Plásmidos

Los plásmidos utilizados y/o generados en este trabajo se encuentran detallados en la Tabla 3.

Tabla 3. Plásmidos utilizados y/o generados

Plásmido	Descripción	Referencia
pBluescript II SK (pBS)	Vector utilizado para clonado en <i>E. coli</i> .	Stratagene
pBS-Nat	Plásmido pBS portador del módulo de resistencia Nat1 (nourseotricina N-acetil transferasa) que otorga resistencia a nourseotricina (NTC) a <i>X. dendrorhous</i> bajo el promotor del gen <i>GPD</i> y secuencia terminadora del <i>EF-1α</i> .	Venegas, Tesis de Doctorado en progreso
pYES2	Vector de expresión de <i>S. cerevisiae</i> que contiene el origen de replicación 2μ.	Invitrogen™
pYES2-kan	Plásmido pYES2 portador del módulo de resistencia a geneticina (G418).	Campusano, Tesis de Doctorado en progreso
pUC57-HA.tSRE1	Vector de clonado en <i>E. coli</i> que contiene la secuencia del epítipo 3xHA junto con la secuencia terminadora del gen <i>SRE1</i> .	Este trabajo
A_ <i>SRE1</i> -HA_N	Plásmido generado utilizando la técnica <i>DNA assembler</i> . Posee el origen de replicación y el gen de resistencia a ampicilina de pBS, el origen de replicación 2μ de pYES2, un módulo que confiere resistencia a geneticina de pYES2-kan, la secuencia que codifica la	Este trabajo

	<p>versión completa de Sre1 fusionada en sus extremos N- y C-terminal con los epítomos 3xFLAG y 3xHA, respectivamente, región terminadora del mismo gen, módulo que confiere resistencia a NTC en <i>X. dendrorhous</i> y regiones río arriba y río abajo del gen <i>SRE1</i>.</p>	
B_ <i>SRE1</i> -HA_N	<p>Plásmido generado utilizando la técnica <i>DNA assembler</i>. Posee el origen de replicación y el gen de resistencia a ampicilina de pBS, el origen de replicación 2μ de pYES2, un módulo que confiere resistencia a geneticina de pYES2-kan, la secuencia que codifica la versión de Sre1 hasta el aminoácido 674 fusionada en sus extremos N- y C-terminal con los epítomos 3xFLAG y 3xHA, respectivamente, región terminadora del mismo gen, módulo que confiere resistencia a NTC en <i>X. dendrorhous</i> y regiones río arriba y río abajo del gen <i>SRE1</i>.</p>	Este trabajo
C_ <i>SRE1</i> -HA_N	<p>Plásmido generado utilizando la técnica <i>DNA assembler</i>. Posee el origen de replicación y el gen de resistencia a ampicilina de pBS, el origen de replicación 2μ de pYES2, un módulo que confiere resistencia a geneticina de pYES2-kan, la secuencia que codifica la versión de Sre1 hasta el aminoácido 635 fusionada en sus extremos N- y C-terminal con los epítomos 3xFLAG y 3xHA, respectivamente, región terminadora del mismo gen, módulo que confiere resistencia a NTC en <i>X. dendrorhous</i> y regiones río arriba y río abajo del gen <i>SRE1</i>.</p>	Este trabajo
D_ <i>SRE1</i> -HA_N	<p>Plásmido generado utilizando la técnica <i>DNA assembler</i>. Posee el origen de replicación y el gen de resistencia a ampicilina de pBS, el origen de replicación 2μ de pYES2, un módulo que confiere resistencia a geneticina de pYES2-kan, la secuencia que codifica la versión de Sre1 hasta el aminoácido 611 fusionada en sus extremos N- y C-terminal con los epítomos 3xFLAG y 3xHA, respectivamente, región terminadora del mismo gen, módulo que confiere resistencia a NTC en <i>X. dendrorhous</i> y regiones río arriba y río abajo del gen <i>SRE1</i>.</p>	Este trabajo
E_ <i>SRE1</i> -HA_N	<p>Plásmido generado utilizando la técnica <i>DNA assembler</i>. Posee el origen de replicación y el gen de resistencia a ampicilina de pBS, el origen de replicación 2μ de pYES2, un módulo que confiere resistencia a geneticina de pYES2-kan, la secuencia que codifica la versión de Sre1 hasta el aminoácido 572 fusionada en sus extremos N- y C-terminal con los epítomos 3xFLAG y 3xHA, respectivamente, región terminadora del mismo gen, módulo que confiere resistencia a NTC en</p>	Este trabajo

X. dendrorhous y regiones río arriba y río abajo del gen *SRE1*.

F_ *SRE1*-HA_N

Plásmido generado utilizando la técnica *DNA assembler*. Posee el origen de replicación y el gen de resistencia a ampicilina de pBS, el origen de replicación 2 μ de pYES2, un módulo que confiere resistencia a geneticina de pYES2-kan, la secuencia que codifica la versión de Sre1 hasta el aminoácido 519 fusionada en sus extremos N- y C-terminal con los epítomos 3xFLAG y 3xHA, respectivamente, región terminadora del mismo gen, módulo que confiere resistencia a NTC en *X. dendrorhous* y regiones río arriba y río abajo del gen *SRE1*.

Este trabajo

3. Diseño bioinformático

Se utilizó el programa Geneious v8.1.9 para construir *in silico* los 6 vectores con las diferentes versiones codificantes de la proteína Sre1. Además, la misma herramienta fue utilizada para diseñar los partidores necesarios para amplificar los fragmentos utilizados en el *DNA assembler*, realizar mapas de restricción virtuales junto con el diseño de partidores para evaluar el correcto ensamblaje de los fragmentos para construir los vectores diseñados.

4. Extracción, análisis y amplificación de DNA

4.1 Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*

La extracción de DNA plasmídico desde *E. coli* se realizó con el kit Gene JET Plasmid Miniprep Kit (ThermoScientific) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El DNA plasmídico obtenido se almacenó a -20°C para su posterior utilización.

4.2 Extracción de DNA de *S. cerevisiae* y *X. dendrorhous*

La extracción de DNA de levaduras se realizó mediante ruptura mecánica (Sambrook & Russell, 2001). Para ello se colectaron células desde un medio de cultivo semi sólido en crio tubos, las cuales se lavaron con agua. Las células se suspendieron en 600 μ L de TE (Tris-HCl 25 mM, EDTA

10 mM, pH 8), se adicionaron 100 μ L de perlas de vidrio (diámetro 0,5mm) y 600 μ L de fenol: cloroformo: isoamílico (a una proporción de 25: 24: 1 respectivamente). Una vez agregados todos los componentes, se homogenizaron y los tubos se llevaron al molidor de células Mini-Beadbeater-16 (BioSpec) durante 3 min y luego se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio y se agregó 1 mL de etanol absoluto frío para precipitar el DNA incubando por 1 h a -20°C . Luego, se centrifugó por 10 min a 14.000 rpm y se eliminó el sobrenadante, el precipitado obtenido se lavó con 1mL de etanol 75% y se volvió a centrifugar por 5 min para eliminar los restos de etanol. Se dejó secar y el DNA se suspendió en 100 μ L de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM; pH 8) con RNasa (40 μ g/ml), el cual se almacenó a -20°C hasta su uso.

4.3 Amplificación por PCR

La amplificación de DNA tanto de los fragmentos necesarios para el *DNA assembler* como para la evaluación de los plásmidos generados se hizo utilizando la enzima *Pfu* DNA polimerasa (purificada en el Laboratorio de Genética). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 50 μ L que incluye: Buffer de PCR 1X (Tris-HCl 200 mM pH 8,4, KCl 500 mM), MgCl_2 2 mM, 200 μ M de cada desoxinucleótido (dNTP), 1U de enzima *Pfu* DNA polimerasa, 1 μ M de cada partidor, 10-20 ng de DNA molde y buffer de carga 1X (Rojo cresol 100 mM, Glicerol 8,3%).

Para llevar a cabo las reacciones de PCR se utilizó el termociclador Applied Biosystem 2720 con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, seguida por 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 20 s, alineación de partidores a 55°C por 20 s, la temperatura de alineación fue variable dependiendo de los partidores utilizados (Tabla 3), y, por último, elongación a 72°C por aproximadamente 1,5 min (dependiendo del tamaño del amplificado). Luego de los 35

ciclos, se realizó una elongación final a 72°C por 3 min, para finalmente mantener la reacción a 4°C hasta su posterior verificación.

Los partidores utilizados en las reacciones de PCR se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Partidores utilizados y/o generados en este trabajo.

N°	Nombre	Secuencia	Sentido
1	A.Fw	TATCATGCGTCAATCGTATGTGATGCTGGTCG CTATACTGGCATTAAAGCGCGGCGGGTG	D
2	A.Rv	AGTCCGTGGAATTAATTCTCATCTTTGACAGCT TATCATCGATAAGTGC GCGGAACCCCT	R
3	B.Fw	GAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGT TCCGCGCACTTATCGATGATAAGCTGTC	D
4	B.Rv	ACGTCCTTCGTAGTTTTGTCCCTCTCTCGTCTT GGGTAAACCATTGCGAATACCGCTTCC	R
5	C.Fw	TACTTTTGAGCAATGTTTGTGGAAGCGGTATTC GCAATGGTTAACCCAAGACGAGAGAGG	D
6	C_2.Rv	ATATCATGATCTTTATAATCACCGTCATGGTCT TTGTAGTCCATTGTGTGTGTGTGTGGG	R
7	E.Rv	CAAAGAGCTTGTGTCCGATGAACTGTCGGCTG ATGAGCCGATTGGGCAGACGGAAGCATG	R
8	F.Fw	TACTGTCTCGATCTGCTTTCATCTTTTCATGCTT CCGTCTGCCAATCGGCTCATCAGCC	D
9	F.Rv	AAAGACAAAAAGGAAGAGAAAAATAAAAGG AAACTAGATCAGAATCATGAGAGATGACGG	R
10	G.Fw	TCACATCTGTTGACCATCACCATCATCTCCGTC ATCTCTCATGATTCTGATCTAGTTTCC	D
11	G.Rv	GTCAAGACTGTCAAGGAGGGTATTCTGGGCCT CCATGTTCGTTAACTCCAAGCGCTGATCG	R
12	H.Fw	TCAATCTATCATATGTAAACCTTTCGATCAGCG CTTGGAGTTAACGACATGGAGGCCAG	D
13	H.Rv	GCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGC CGCGCTTAATGCCAGTATAGCGACCAGC	R
14	HA.Rv	GAAAAATAAAAGGAAACTAGATCAGATCATC AAGCGTAATCTGGAACGTCATATGGATAG	R
15	A_HA.Fw	TCGGCCTTTAGAATCAGGCCCATCAAACGCT ACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGG	D
16	B_HA.Fw	GGTCTCCCGCTCGGCCAGACGGAGGTTCCAAT ACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGG	D
17	C_HA.Fw	TCTCGGCACACAGGCCACTCCCTCATCCTCCTA CCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGG	D
18	D_HA.Fw	GTTCAACCCGTTTCGATCCTTTGTA CTCTGTTTA CCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGG	D

19	E_HA.Fw	TCGGAAGAAGGCCCGAGTGACGGCCACCGTCT ACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGG	D
20	F_HA.Fw	TCAGGACTTTCTCGCCACCGACTCCCACGCGT ACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGG	D
21	A_SRE1_STOP_H A.Rv	TAGCCAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTA GCGTTTTGATGGGCCTGATTCTAAAGGC	R
22	B_SRE1_STOP_H A.Rv	TAGGGATAGCCAGCGTAATCTGGAACATCGTA TGGGTATTGGAACCTCCGTCTGGCCGAG	R
23	C_SRE1_STOP_H A.Rv	ATAGGGATAGCCAGCGTAATCTGGAACATCGT ATGGGTAGGAGGATGAGGGAGTGGCCTG	R
24	D_SRE1_STOP_H A.Rv	CCAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAAAC AGAGTACAAAGGATCGAACGGGTTGAAC	R
25	E_SRE1_STOP_H A.Rv	CATAGGGATAGCCAGCGTAATCTGGAACATCG TATGGGTAGACGGTGGCCGTCCTCGGG	R
26	F_SRE1_STOP_HA .Rv	TCATAGGGATAGCCAGCGTAATCTGGAACATC GTATGGGTACGCGTGGGAGTCGGTGGCG	R
27	mKan.Fw	CCGTACTCCTGATGATGCATGG	D
28	mKan.Rv	CCGTACTCCTGATGATGCATGG	R
29	Sre1.Med.Fw	AATCACCTCCCGCTCGATACAC	D
30	Sre1_Med.Rv	ACATCCTCGAACTCAAAGGGAGC	R
31	FLAG.Fw	GACTACAAAGACCATGACGGT	D
32	Ori+Amp.Fw	CAGAGCGAGGTATGTAGGCG	D
33	Ori+Amp.Rv	CAGAGCGAGGTATGTAGGCG	R
34	Nat.Rv	ATGCCCTGCCCTAG	R
35	HAseq.Fw	TACCCATACGATGTTCCAG	D
36	HAseq.Rv	AGCGTAATCTGGAACGTC	R

4.4 Preparación de DNA para transformar *S. cerevisiae*

Se realizaron reacciones de PCR para amplificar los fragmentos para cada transformación de *S. cerevisiae*. Los productos de PCR se mezclaron para su ensamblaje y la generación de cada vector (7 fragmentos por vector) tomando 250 μ L (50 ng/ μ L) de reacciones de PCR de los fragmentos de menor tamaño (2 fragmentos de aproximadamente 500 pb) junto con 200 μ L (100 ng/ μ L) de las reacciones de PCR de fragmentos de mayor tamaño (5 fragmentos que varían entre 1500 a 3000 pb), dando un volumen final de 1500 μ L que se mezcló por agitación en vortex por 1 min. La mezcla se separó en fracciones de 200 μ L, que se precipitaron con 1 mL de etanol absoluto frío toda la noche. Los tubos se centrifugaron por 10 min a 14.000 rpm y se eliminó el sobrenadante.

El precipitado obtenido se lavó con 1 mL de etanol 75%, se centrifugó por 5 min para eliminar los restos de etanol y se dejó secando. Finalmente, el DNA se suspendió en 20 μ L de agua de biología molecular, se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y se almacenó a -20°C para su posterior uso.

4.5 Digestión enzimática

Las reacciones de digestión de los plásmidos se realizaron en un volumen final de 20 μ L, siguiendo las instrucciones indicadas por el proveedor de las enzimas (ThermoScientific). Cada digestión se incubó a 37°C y se revisaron 10 μ L de la reacción en un gel de agarosa al 1%.

5. Transformación por electroporación

5.1 Transformación de *E. coli*

Las células electrocompetentes se prepararon a partir de un inóculo de *E. coli DH5 α* crecido en medio LB con ácido nalidíxico (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 37°C . Cuando el cultivo alcanzó una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,4 a 0,5 (Sambrook & Russell, 2001) se centrifugó a 10.000 rpm a 4°C por 5 min y se descartó el sobrenadante. Obtenido el precipitado, se lavó 2 veces con 250 mL de agua fría estéril y una vez con 20 mL glicerol 10% estéril. Las células se suspendieron en 3 mL de glicerol 10% y se dividieron en fracciones de 40 μ L en tubos Eppendorf estériles los cuales se almacenaron a -80°C para su posterior utilización.

Para electroporar, se tomó una fracción de células y se añadió de 1 a 2 μ L de DNA plasmídico (200 $\text{ng}/\mu\text{L}$) o 5 μ L de DNA de *S. cerevisiae* (40 $\text{ng}/\mu\text{L}$), y la mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 2 mm. Las células se transformaron mediante pulso en el electroporador BioRad Gene Pulser X Cell a 2.500 V, 25 μF y 200 Ω . Una vez aplicado el pulso, las células se suspendieron en 1 mL de medio LB y se incubaron por 1 h a 37°C . Finalmente, las células se sembraron en medio LB-agar con ampicilina y se incubaron a 37°C hasta la aparición de colonias.

5.2 Transformación de *S. cerevisiae*

Las células electrocompetentes se prepararon a partir de un inóculo de *S. cerevisiae* S288c crecido en 100 mL de medio YEP a 30°C con agitación constante. Cuando el cultivo alcanzó una DO_{600nm} de 1 a 1,5, las células se colectaron centrifugando a 10.000 rpm a 4°C por 3 min. Se descartó el sobrenadante y las células se lavaron 2 veces con 50 mL de agua fría estéril y 1 vez con 25 mL de sorbitol 1M frío estéril. Las células se suspendieron en 800 μ L de sorbitol 1M y se separaron en fracciones de 100 μ L.

Para llevar a cabo la electroporación, una fracción de células se mezcló con 5 a 15 μ L de DNA para transformar (previamente dializado) y la mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 2 mm. Con el electroporador BioRad Gene Pulser X Cell, se aplicó un pulso de 1.500 V, 25 μ F y 200 Ω . Luego, las células se suspendieron en 900 μ L de medio YEP y se incubaron por 2 h a 30°C. Finalmente, se sembró el total de células en medio YEP-agar con G418 y se incubaron a 30°C por 48 h o hasta la aparición de colonias.

RESULTADOS

1. Diseño de vectores

Los vectores se diseñaron de modo que mediante recombinación homóloga se reemplace el gen nativo *SRE1* en *X. dendrorhous* por versiones de diferente largo (cada vez más cortas) y que, además, se exprese la proteína Sre1 fusionada a los epítomos FLAG y HA, en sus extremos N- y C-terminal, respectivamente. Se diseñaron vectores con 6 versiones del gen *SRE1* (Figura 3), los cuales fueron nombrados vector A hasta el F, siendo A la versión completa de la proteína unida a los epítomos y F, la versión más pequeña de la proteína.

Los vectores cuentan con las secuencias Up y Down que corresponden a secuencias de aproximadamente 500 pb de las zonas río arriba y abajo del gen *SRE1* que permitirán que ocurra la recombinación homóloga en *X. dendrorhous* y reemplazar al gen *SRE1*, además de contar con las distintas versiones del mismo gen fusionado a las secuencias de los epítomos FLAG y HA junto con el terminador del gen *SRE1* y, por último, un marcador de selección para levaduras, en este caso es el módulo Nat1 que confiere resistencia a NTC (Figura 4.A).

Además de la construcción de interés para reemplazar al gen *SRE1*, los vectores contienen los fragmentos necesarios para su replicación y mantención en *S. cerevisiae* (origen de replicación que en este caso corresponde al DNA 2 μ) y en *E. coli* (Ori), y marcadores de selección en ambas especies (*E. coli*: ampicilina/Amp y *S. cerevisiae*: geneticina/G418 (Figura 4.B).



Figura 3. Diseño de vectores y diferentes versiones de la proteína Sre1. Versiones del factor de transcripción Sre1 unido a los epítotos FLAG y HA en sus extremos N- y C- terminal respectivamente, en morado se destaca el motivo *bHLH* y en rosado se señalan los dominios transmembrana (TM). En la esquina inferior derecha, se indica el tamaño en aminoácidos (aa) de la correspondiente versión de Sre1.

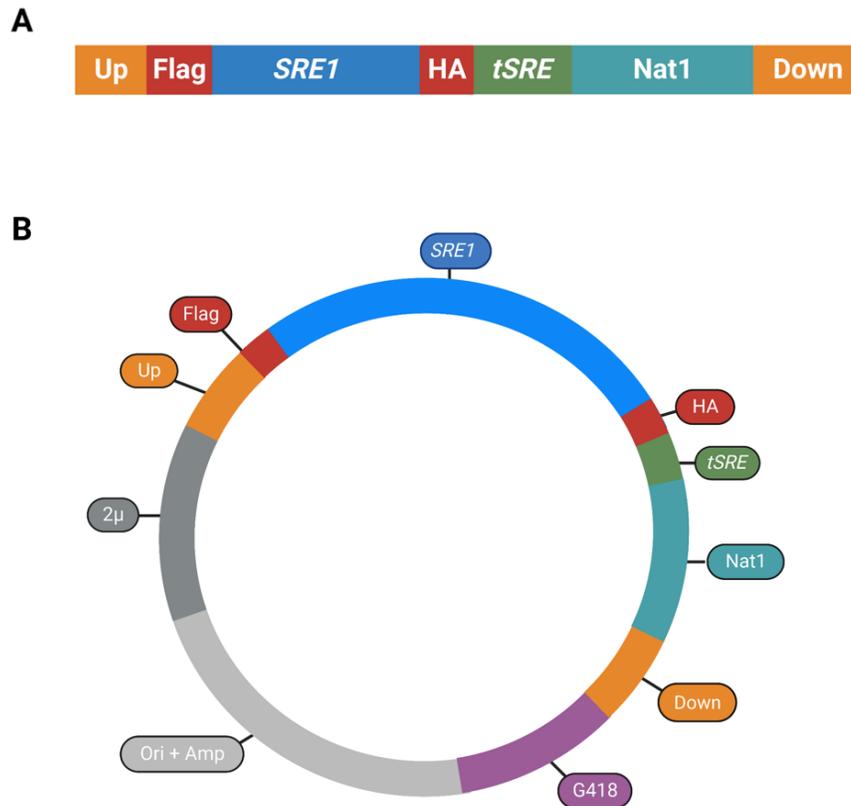


Figura 4. Diseño de vectores y diferentes versiones de la proteína Sre1. (A) Esquema general del módulo de transformación de cada vector para reemplazar a *SRE1* (Up-FLAG-SRE1-HA-tSRE-Nat1-Down). (B) Esquema general de los 6 vectores diseñados y construidos en este trabajo para reemplazar el gen *SRE1* nativo en *X. dendrorhous*. Se señala el módulo de transformación para reemplazar a *SRE1* (Up-FLAG-SRE1-HA-tSRE-Nat1-Down), los diferentes marcadores de resistencia (Amp, Nat1 y G418), orígenes de replicación de *E. coli* (Ori) y *S. cerevisiae* (2μ) y el orden de los diferentes fragmentos. diseñados en este trabajo.

2. Construcción de vectores

Para la construcción de los vectores se utilizó la técnica *DNA assembler* (Figura 5) la cual consiste en amplificar mediante PCR fragmentos de DNA cuyos extremos sean homólogos entre sí para permitir su ensamble *in vivo* mediante recombinación homóloga. En este trabajo, los fragmentos de DNA se amplificaron con partidores de 60 bases, de los cuales aproximadamente 40 bases correspondían a “colas” homólogas al fragmento o módulo aledaño, de esta forma los fragmentos de DNA se ensamblan mediante recombinación homóloga en *S. cerevisiae* (Figura 5.B). Una vez amplificados los fragmentos necesarios para construir el vector (en este trabajo: 7 fragmentos por cada vector), se transforma *S. cerevisiae* para ensamblar los fragmentos. Luego de la transformación, se siembran las células en placas que contengan un medio de selección (en este trabajo, el antibiótico G418) y se incuban a 30°C hasta la aparición de colonias. Se seleccionan algunas colonias al azar para extraer DNA con el cual se transforma *E. coli* para recuperar el plásmido construido (Figura 5.C).

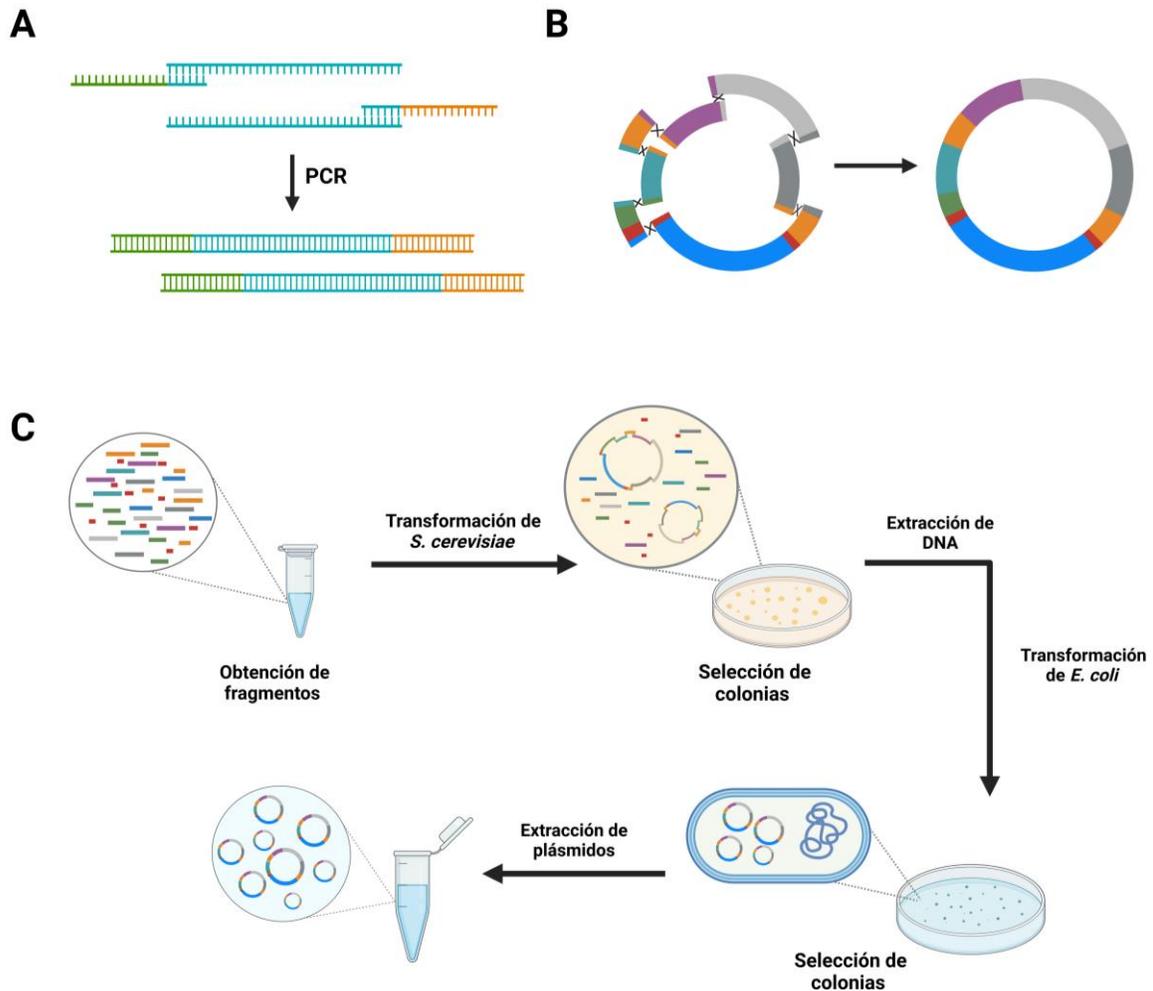


Figura 5. Esquema de la técnica *DNA assembler*. (A) Ejemplo de la obtención de fragmentos mediante PCR. (B) Recombinación homóloga de los diferentes fragmentos para la construcción de vectores. (C) Pasos clave de la técnica utilizada en este trabajo para la construcción de los vectores.

2.1 Amplificación de módulos

Lo primero que se hizo fue obtener las fuentes de DNA para amplificar mediante PCR los módulos necesarios para la construcción de los vectores. En la Figura 6.A se observan en un gel de agarosa los distintos fuentes de DNA utilizados como molde. En este caso corresponden a los plásmidos pBS para amplificar el módulo con el origen de replicación en *E. coli* y la resistencia a ampicilina (Ori+amp), pBS-Nat para amplificar el módulo de resistencia a NTC (Nat1), pYES2-kan para amplificar el módulo de resistencia a G418 (G418), pYES2 para amplificar el módulo de origen de

replicación en *S. cerevisiae* (2μ), pUC57-HA.tSRE1 para amplificar el epítipo HA junto con la secuencia terminadora del gen SRE1 (HA-tSRE), DNA genómico de la cepa CBS.SRE1.Full. Δ Stp1 de *X. dendrorhous* con el cual se amplificó el módulo que contiene la región río abajo del gen SRE1 (Down) y además el módulo que contiene arriba del gen SRE1, la secuencia del epítipo Flag y una versión del gen SRE1 (X_Up), y por último el módulo A_Up amplificado por PCR que contiene la secuencia río arriba del gen SRE1, la secuencia del epítipo Flag y la versión A del gen SRE1 (A_Up). Los fragmentos se amplificaron mediante PCR y se clasificaron en módulos comunes a todos los vectores (fragmentos Ori+Amp, Nat1, G418, 2μ y Down) o módulos específicos de cada vector que fueron amplificados con diferentes partidores dependiendo de las versiones del gen SRE1. Por lo tanto, dentro de los módulos específicos se tienen 6 versiones distintas del módulo HA-tSRE (Figura 6.B) el cual contiene las secuencias del epítipo HA y el terminador del gen SRE1, siendo las “colas” de este vector parte del gen SRE1 y del módulo Nat1 dado el orden de ensamble de fragmentos para formar el vector (Figura 4.A). También se tienen las 6 versiones de los módulos denominados como X_Up, los cuales contienen las secuencias río arriba del gen SRE1, la secuencia del epítipo Flag y una versión del gen SRE1, cuya diferencia de tamaño (versiones A-F) se evidenció mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 6.C). Por otro lado, la Figura 6.D muestra los módulos comunes que fueron amplificados con los mismos partidores para generar los distintos vectores. Los tamaños de todos los módulos se indican en la Tabla 4, donde se señala el tamaño del fragmento y del fragmento amplificado, siendo el segundo el que tiene las “colas” de sus módulos adyacentes, junto con la T de annealing, el tiempo de elongación para cada reacción y los partidores utilizados para amplificar cada fragmento. La amplificación de cada módulo fue evaluada mediante una electroforesis en gel de agarosa 1% (Figura 6).

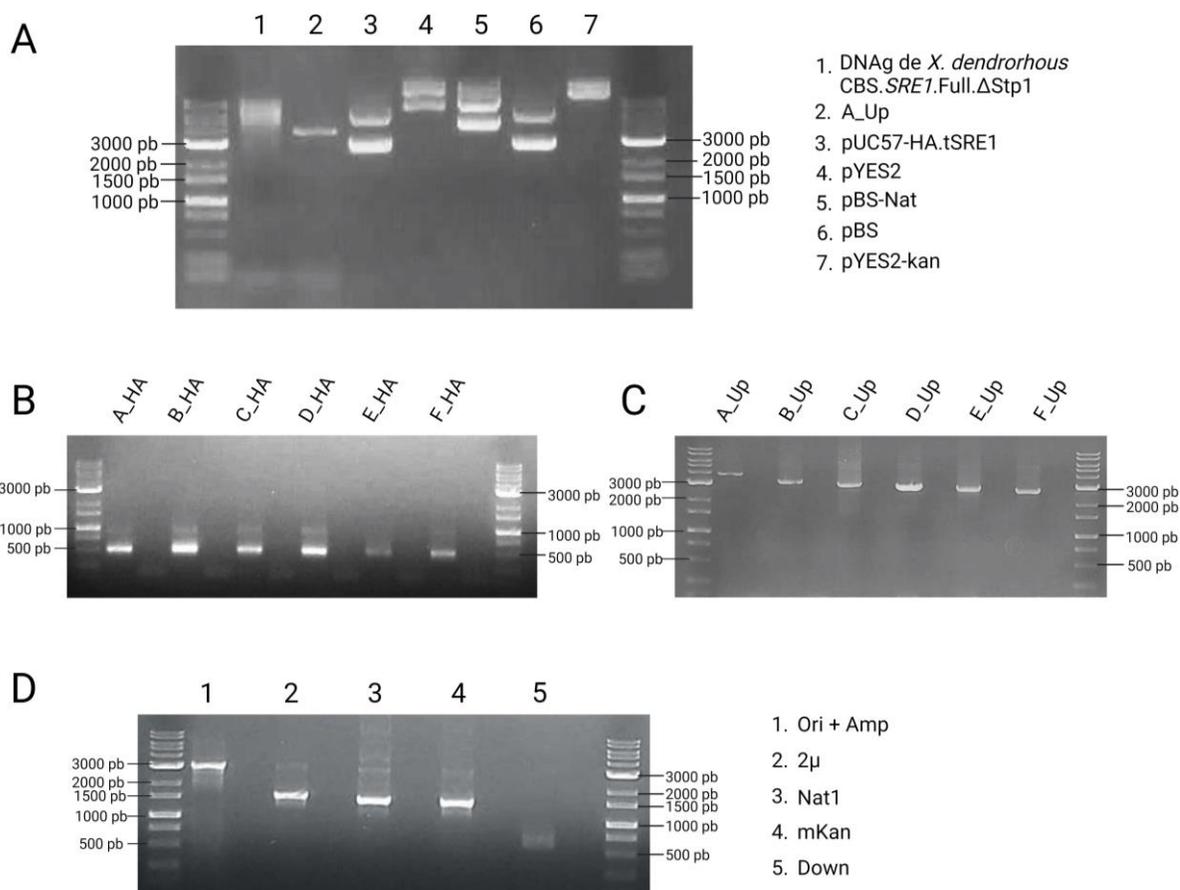


Figura 6. Fragmentos de DNA amplificados para *DNA assembler*. (A) Fuentes de DNA utilizadas para la amplificación de los fragmentos. A la derecha del gel se indica el DNA que corresponde cada carril. (B) Amplificación por PCR de módulos HA_tSRE específicos para cada vector. (C) Amplificación por PCR de Módulos específicos que contienen las 6 versiones del gen *SRE1* de diferente tamaño. (D) Amplificación por PCR de módulos comunes para generar todos los vectores. A la derecha del gel se indica el módulo que corresponde cada carril. En todos los geles se usó el marcador de tamaño molecular MaestroGen 1 Kb Plus DNA Ladder.

Tabla 4. Detalles de módulos amplificados mediante PCR

Módulo	N° de Partidores Utilizados	Tamaño fragmento (pb)	Tamaño fragmento amplificado (pb)	T _{annealing} (C°)	Tiempo (min)
A_HA	7 y 15	434	507	55	1,5
B_HA	7 y 16	434	507	55	1,5
C_HA	7 y 17	434	507	55	1,5
D_HA	7 y 18	434	507	55	1,5
E_HA	7 y 19	434	507	55	1,5
F_HA	7 y 20	434	507	55	1,5
A_Up	5 y 21	3711	3788	55	2,0

B_Up	5 y 22	3059	3135	55	2,0
C_Up	5 y 23	2935	3019	52	2,0
D_Up	5 y 24	2863	2937	58	2,0
E_Up	5 y 25	2746	2831	55	2,0
F_Up	5 y 26	2587	2673	55	2,0
Ori+Amp	1 y 2	2918	3003	55	1,5
2μ	3 y 4	1472	1554	55	1,5
Nat1	8 y 9	1362	1453	55	1,5
mKan	12 y 13	1356	1445	55	1,5
Down	10 y 11	500	590	45	0,5

2.2 Transformación de *S. cerevisiae*

Primero cabe mencionar que las primeras transformaciones de *S. cerevisiae* se hicieron siguiendo el protocolo de Muller et al. (2012), donde se prepararon 30 ng de DNA por cada fragmento los cuales se precipitaron para resuspender el DNA total en un volumen de 10 μL. Al seguir este protocolo se obtuvo entre 1 – 2 colonias por transformación, por lo que se hicieron diferentes modificaciones a este protocolo llegando a lo mencionado en la sección de metodología donde por cada transformación de *S. cerevisiae* se obtenían al menos 15 colonias.

Por lo tanto, una vez amplificados los fragmentos para la construcción de cada vector, éstos se combinaron dependiendo del vector (A-F) y con la mezcla se transformó a la levadura *S. cerevisiae*. Las colonias transformantes se seleccionaron en placas con medio YEP suplementado con G418. Por cada transformación, se tomaron de entre 4 a 18 colonias al azar a las cuales se les extrajo DNA (mediante ruptura mecánica) y verificó mediante PCR la presencia del vector ensamblado con la versión apropiada del gen *SREI* en cuanto a su tamaño. Por esta razón, se amplificó la zona *SREI* – HA utilizando los mismos partidores (29 y 36) dado que el tamaño del producto de PCR varía para cada uno de los vectores, lo que permite diferenciarlos entre sí. A modo de ejemplo, se muestra el análisis por PCR de 8 colonias de *S. cerevisiae* de la construcción del vector A, en las que se confirmó la presencia del gen *SREI* (del tamaño apropiado de acuerdo con el diseño original del

vector A) unido a la secuencia que codifica al epítipo HA (Figura 7). En este caso, a partir del DNA de 4 de las 8 colonias seleccionadas (A_{1.3}, A_{3.1}, A_{3.3} y A_{3.4}), se obtuvo un producto de PCR del tamaño esperado.

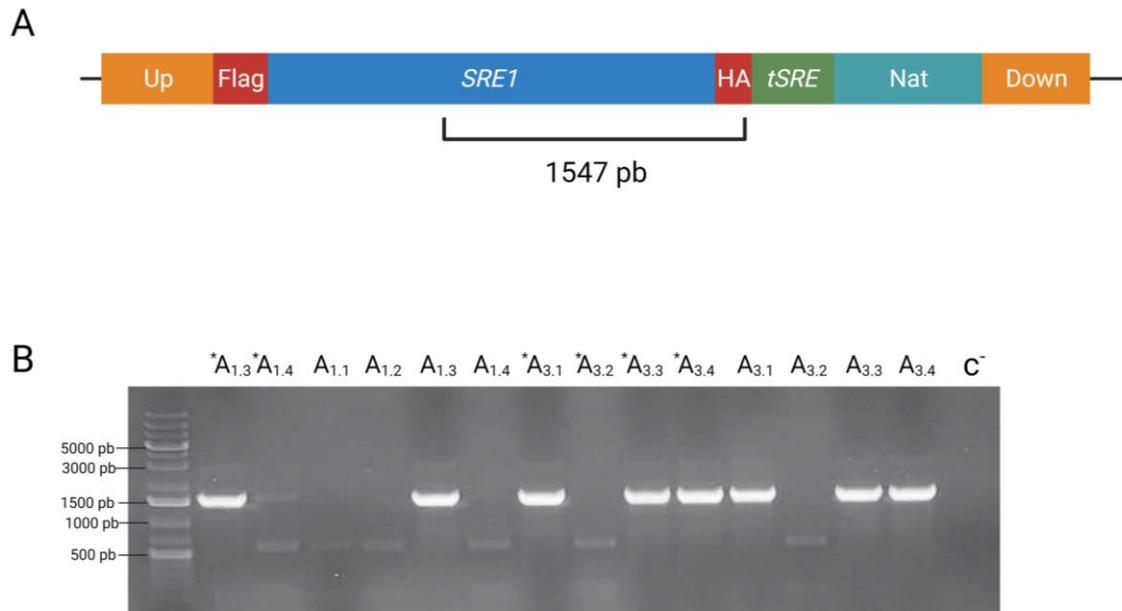


Figura 7. PCR utilizado para seleccionar colonias de *S. cerevisiae*. (A) Esquema del fragmento amplificado por PCR para evaluar la presencia del vector en el DNA extraído desde *S. cerevisiae*, donde se señala el tamaño esperado del fragmento amplificado para evaluar al vector A. (B) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR desde transformantes de *S. cerevisiae* para la construcción del vector A, donde el primer número indica el número de la transformación y el segundo la colonia de la cual se realizó la extracción de DNA. Los carriles marcados con * indican que para la reacción de PCR el DNA se diluyó 10 veces (C⁻: control negativo sin DNA). El marcador de peso molecular utilizado en el análisis corresponde a GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder.

2.3 Transformación de *E. coli* y obtención de plásmidos

Una vez extraído el DNA desde *S. cerevisiae* se transformó *E. coli* y se seleccionaron los transformantes en placas LB-ampicilina. Cabe mencionar que entre los DNA que dieron positivos en el PCR de selección de *S. cerevisiae*, se seleccionó uno al azar con el cual se transformó *E. coli* (en el caso del vector A, se seleccionó A_{3.4}). A partir de los transformantes de *E. coli* obtenidos, se seleccionaron entre 3 a 8 colonias para la extracción de DNA plasmidial. En todos los casos, el

DNA plasmidial obtenido fue evaluado mediante dos reacciones de PCR para confirmar el correcto ensamble del vector, una de ellas fue la misma reacción de PCR que se realizó al gDNA de *S. cerevisiae* (*SRE1*-HA) y además se amplificó con otro par de partidores el fragmento HA – Nat1, incluyendo el tSRE (Figura 8.A). Nuevamente, a modo de ejemplo, se muestran los resultados del análisis de la construcción del vector A (Figura 8). En este caso, 8 colonias transformantes de *E. coli* fueron evaluadas, donde todas ellas arrojaron resultados positivos en las reacciones de PCR, tanto para el fragmento *SRE1*-HA (Figura 8.B) como para el fragmento HA – Nat1 (Figura 8.C). Cabe señalar que en el caso del fragmento *SRE1*-HA se observan diferencias en la intensidad entre los amplificados de los distintos transformantes (Figura 8.B). De acuerdo con los resultados de las reacciones de PCR, se seleccionó una colonia de *E. coli* por cada vector (colonias A_{3.4.2}, B_{3.2.3}, C_{1.4.1}, D_{1.2.12}, E_{3.2.1} y F_{1.2.13}) a la cual se le extrajo DNA plasmidial para realizar los análisis posteriores (Figura 8.D).

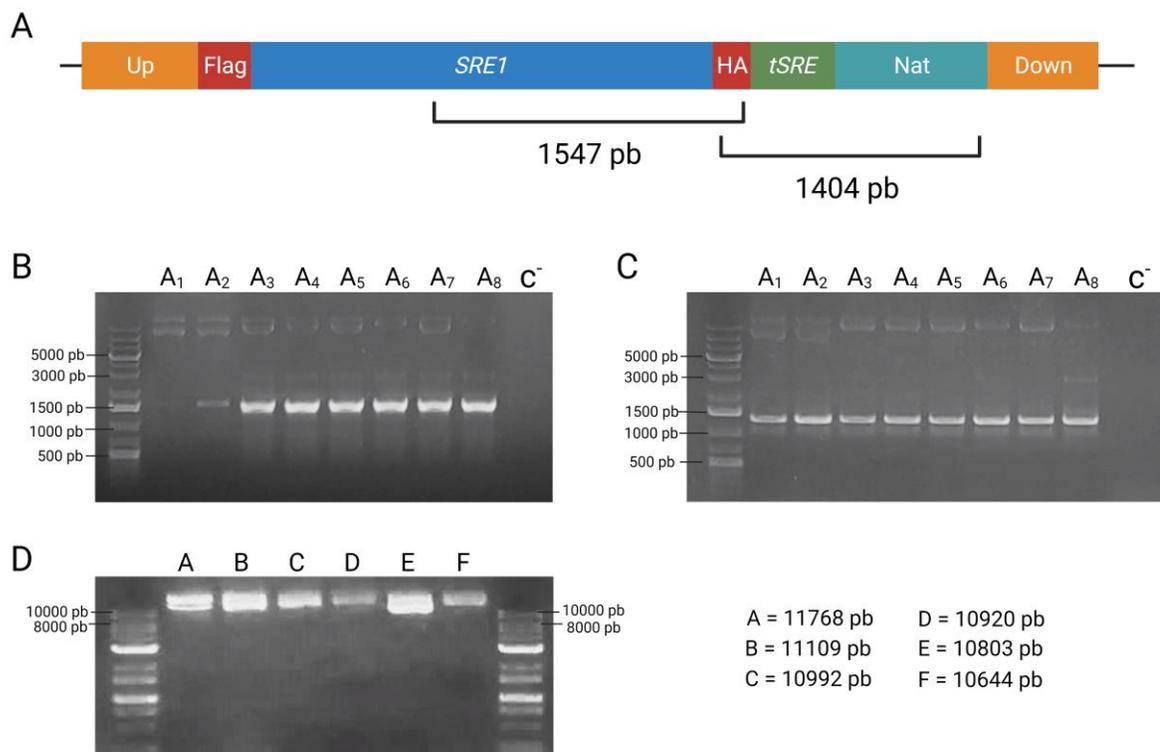


Figura 8. Leyenda en página siguiente.

Figura 8. PCR utilizado para la selección de colonias de *E. coli*. (A) Esquema donde se muestran las zonas amplificadas por PCR a partir de plásmidos extraídos desde colonias transformantes de *E. coli*. (B) Producto de PCR *SRE1* – HA, reacciones realizadas sobre plásmidos extraídos desde colonias transformadas con el vector A. (C) Producto de PCR HA – Nat1, reacciones realizadas sobre plásmidos extraídos desde colonias transformadas con el vector A. (D) Plásmidos extraídos desde *E. coli*. A la derecha del gel se indica el vector (A-F) que corresponde a cada carril y su tamaño. (C⁻: control negativo sin DNA). El marcador de peso molecular utilizado en los análisis corresponde a GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder.

3. Análisis de Vectores

3.1 Análisis por PCR

Ya obtenidos los 6 plásmidos diseñados, se verificó que éstos se hayan ensamblado correctamente. En primera instancia la verificación se hizo mediante PCR, donde se realizó un total de 6 reacciones por plásmido que amplifican diferentes regiones (Figura 9). Dentro de las 6 reacciones, 5 de ellas amplifican fragmentos del mismo tamaño en todos los vectores y una reacción amplifica fragmentos de diferentes tamaños dependiendo de la versión del gen *SRE1* incluida en el plásmido, la cual corresponde a la reacción que amplifica al fragmento *SRE1* – HA, utilizando los mismos partidores con los que se evaluó la presencia del vector tanto en *S. cerevisiae* y en *E. coli*.

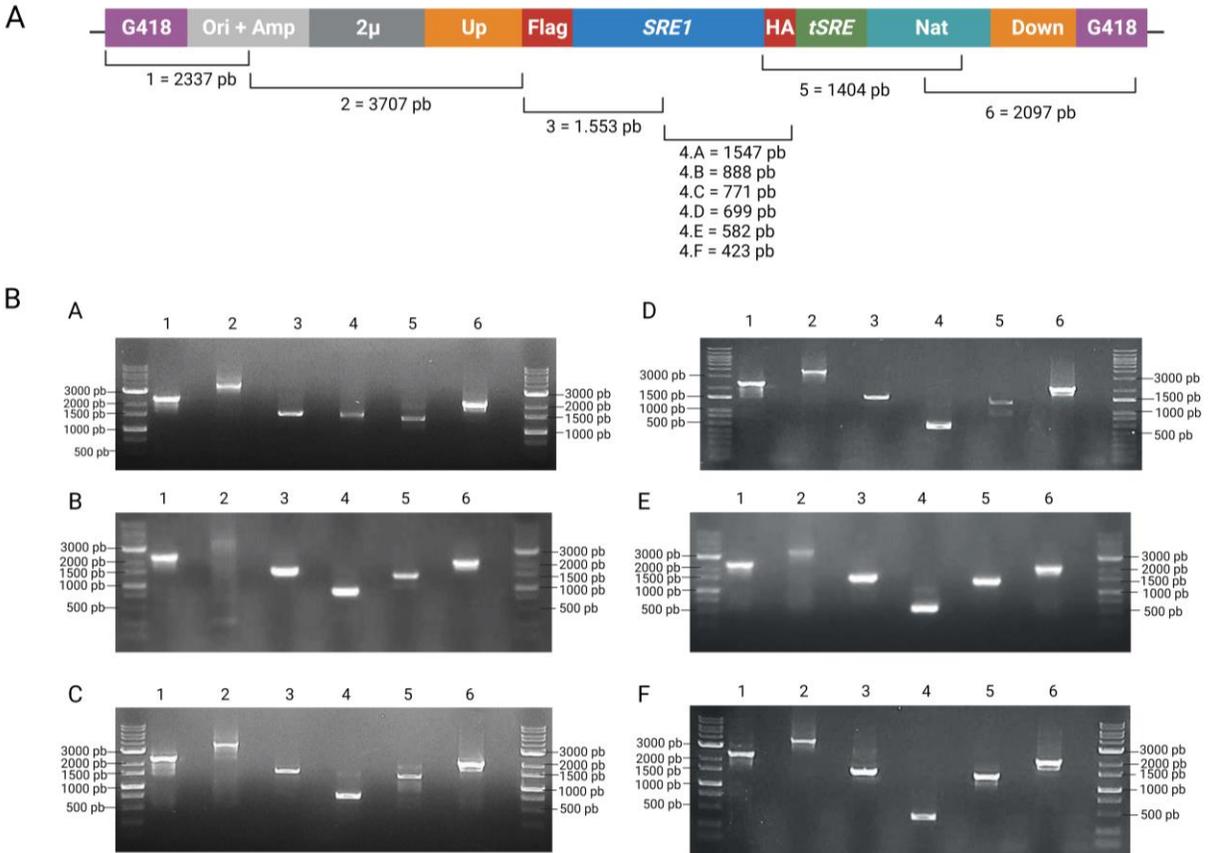


Figura 9. Análisis mediante PCR de los vectores A_{3.4.2}, B_{3.2.3}, C_{1.4.1}, D_{1.2.12}, E_{3.2.1} y F_{1.2.13}. (A) Esquema de las zonas amplificadas junto con los respectivos tamaños esperados, numeradas de 1 a 6 en el orden respectivo del ensamblaje del vector. El fragmento 4 permite diferenciar a los 6 vectores (A-F). (B) Análisis por PCR de los 6 vectores construidos, donde se muestran las reacciones 1 a 6 (de acuerdo con el esquema en A) junto con su respectivo control negativo a la derecha de cada carril. La letra en la esquina superior izquierda de cada gel, señala al vector analizado en cada gel. Los marcadores de peso molecular utilizados en estos análisis corresponden a MaestroGen 1 kb Plus DNA Ladder (para los análisis de A, B, C, E y F) y de ThermoFisher 1 Kb Plus DNA Ladder (para el análisis del vector D).

Como se puede ver en la figura, los análisis mediante PCR de los 6 vectores evidencian, mediante el tamaño de los productos de PCR, el correcto ensamblaje de los fragmentos. En el caso de los carriles número 4 (PCR *SRE1* – HA) se observa la diferencia de tamaños de los amplificadas, mostrando las diferentes versiones del gen *SRE1* en los 6 vectores (Figura 9.B).

3.2 Análisis por mapa de restricción

Para confirmar el tamaño y estructura, los plásmidos generados también fueron analizados por análisis de restricción. En este trabajo se utilizaron las enzimas de restricción XbaI y HpaI, las cuales poseen uno y tres sitios de cortes en los plásmidos construidos respectivamente. La figura 10.A muestra el mapa de restricción virtual general para todos los plásmidos y en la Figura 10.B se señala la diferencia de tamaño esperada de los respectivos fragmentos de cada plásmido construido. Cabe señalar que digerir los plásmidos solo con la enzima HpaI permite liberar el fragmento de DNA de interés para en un futuro transformar a *X. dendrorhous* y reemplazar al gen *SREI* nativo por las distintas versiones del gen diseñadas. En la Figura 10.C se muestran los geles de agarosa con las digestiones de los vectores analizados (A_{3.4.2}, B_{3.2.3}, C_{1.4.1}, D_{1.2.12}, E_{3.2.1} y F_{1.2.13}) junto con los plásmidos sin digerir.

Se observa en la Figura 10.C que la digestión con XbaI (Carril 2) linealiza todos los vectores al tener solo un sitio de digestión, en el carril 3 se muestra la digestión con la enzima HpaI, la cual libera el módulo de interés generando 2 cortes en los extremos de las zonas río arriba y río abajo del gen *SREI* (Zonas Up y Down) además de tener un sitio de restricción en el módulo 2 μ como se muestra en el esquema de la Figura 10.B. En el gel se pueden observar en las digestiones de todos los vectores los fragmentos comunes de 885 pb y de 4867 pb junto con los fragmentos específicos para cada vector, las cuales corresponderían al módulo de interés. Por último, en el carril 4 se observa la doble digestión con ambas enzimas donde se observan los fragmentos esperados en todos los vectores, además de observarse en todas las digestiones una banda tenue de aproximadamente 1500 pb.

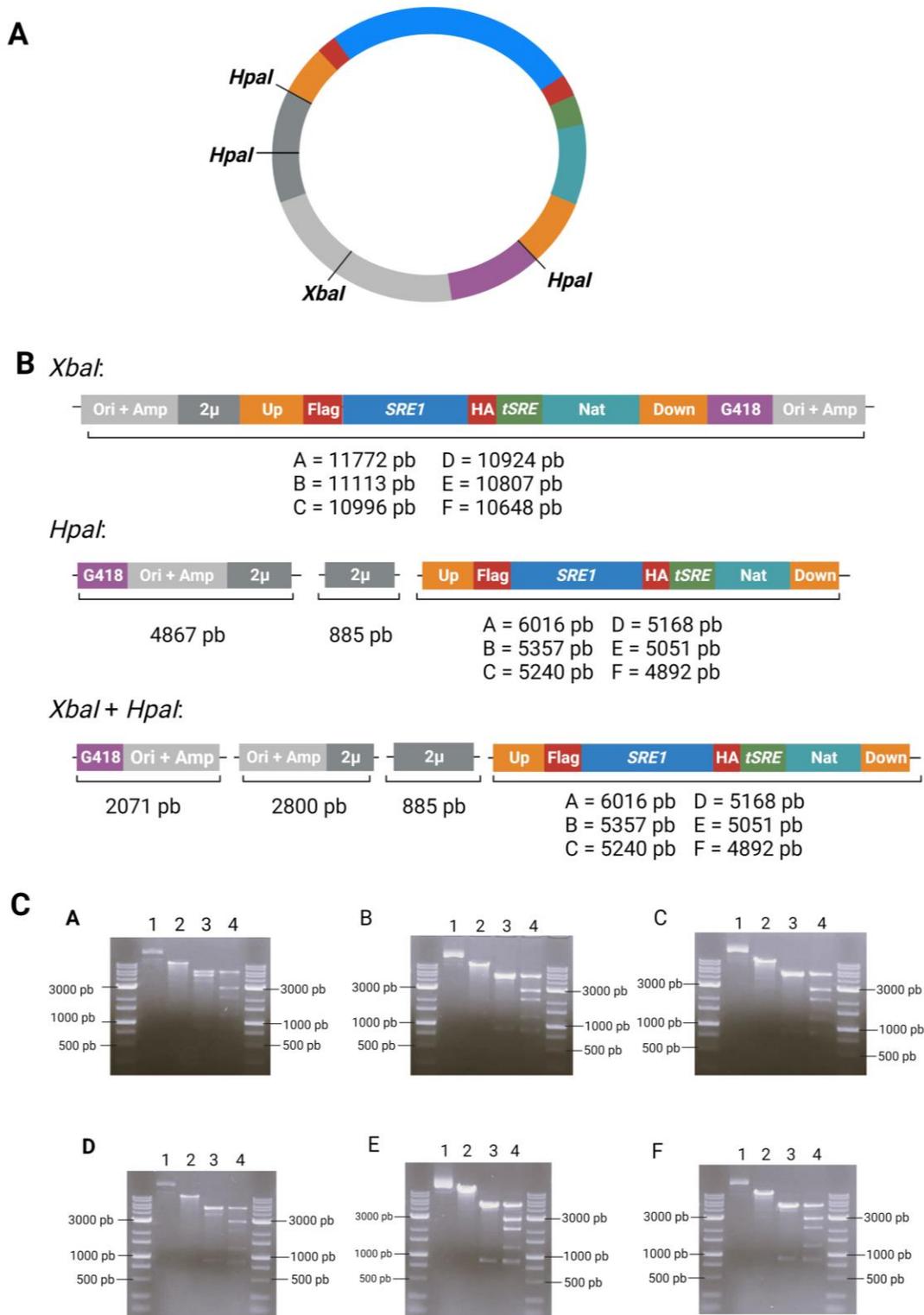


Figura 10. Leyenda en la siguiente página.

Figura 10. Análisis de vectores construidos por restricción. (A) Mapa virtual general de vectores construidos donde se muestran los sitios de corte de las enzimas XbaI y HpaI utilizadas para analizar los vectores. (B) Esquema de fragmentos generados por cada digestión junto con los tamaños esperados. (C) Digestiones de los vectores A, B, C, D, E y F. El orden de los carriles en cada caso es **1.** Plásmido sin digerir **2.** Digerido con XbaI **3.** Digerido con HpaI **4.** Digerido con XbaI + HpaI. El marcador de peso molecular utilizado en el análisis corresponde a GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder.

DISCUSION

Actualmente, en biología molecular la construcción de plásmidos utilizados con el objetivo de modificar genéticamente a distintos organismos implica que se diseñen, a partir del gen de interés, partidores a los cuales se le añaden sitios de restricción para que mediante la reacción de PCR se genere un fragmento de DNA que contenga las secuencias de los sitios de restricción integradas, posteriormente se realiza la digestión directa tanto del producto de PCR, como del vector para ligar ambos productos y transformar *E. coli*, obteniendo mediante la selección de algún marcador el plásmido deseado (Cohen et al., 1973). Si bien esta técnica ha sido ampliamente utilizada para la construcción de vectores, tiene ciertas limitaciones como, por ejemplo, la cantidad de sitios de restricción en el vector utilizado y la presencia de éstos en el gen de interés. Por otro lado, existen las problemáticas de ligar fragmentos de gran tamaño o de clonar múltiples fragmentos de DNA con esta metodología. Una solución a este problema ha sido la técnica del *DNA assembler*, en la que se utilizan partidores de aproximadamente 60 o más pb que añaden al fragmento amplificado “colas” que corresponden a la secuencia del extremo del fragmento o vector con el que se quiere unir. La unión de estos fragmentos puede ser *in vitro* utilizando las enzimas DNA ligasa, DNA polimerasa y 5' Exonucleasa (Gibson et al., 2009) o también se puede realizar *in vivo* con microorganismos que realicen la recombinación homóloga de manera eficiente como la levadura modelo *S. cerevisiae* (Shao et al., 2008). En la unión *in vitro* de los fragmentos mediante ensamblaje de Gibson, en primer lugar, una enzima 5' exonucleasa degrada los extremos solapantes de los fragmentos a unir generando salientes 3' de hebra simple, los que posteriormente se alinean secuencialmente a través de la complementariedad de bases en sus extremos. Luego una DNA polimerasa completa los espacios que quedaron por la exonucleasa y finalmente una enzima DNA ligasa forma el enlace fosfodiéster entre el extremo 5' de un fragmento y el extremo 3' del fragmento aledaño (Gibson et al., 2009). El mecanismo de recombinación homóloga en *S.*

cerevisiae funciona como un mecanismo de reparación del DNA, donde participan diferentes enzimas como DNA polimerasas, nucleasas, recombinasas, etc. Estas enzimas utilizan como molde un fragmento de DNA para reparar las hebras dañadas, este mecanismo puede ser utilizado para unir fragmentos. Esta técnica presenta como ventaja el hecho de que se pueden unir más de dos fragmentos generando fragmentos de DNA o vectores que pueden llegar a poseer más de dos módulos y el orden en el que se une cada fragmento es específico debido a que depende de la secuencia que uno agrega en el PCR con los partidores. En este trabajo se diseñaron y construyeron 6 vectores utilizando la técnica de *DNA assembler*, la cual permitió ensamblar en cada uno de ellos 7 fragmentos de tamaños que varían entre 500 pb a aproximadamente 3500 pb.

La amplificación de los fragmentos utilizados en el *DNA assembler* fue realizada con la enzima polimerasa *Pfu*, la cual presenta mayor termoestabilidad y capacidad correctora sobre la enzima *Taq* polimerasa. La *Pfu* polimerasa presenta actividades de exonucleasa en sentido 3' – 5', lo que permite que durante la amplificación de los productos de PCR esta misma corrija los errores que pudiese haber generado al momento de agregar los nucleótidos, teniendo una tasa de error de 1 cada 2,5 millones pb (Agilent Technologies). En la Figura 6, se muestran los fragmentos amplificados por PCR, en algunos casos se observan bandas de menor intensidad que las bandas de interés, esto podría explicarse debido a que los partidores utilizados para el *DNA assembler*, son de 60 pb, por lo que pueden formar horquillas u otro tipo de estructuras secundarias entre sí, así como también el hecho de que estos pueden unirse a otras regiones del DNA, perdiendo la especificidad a la hora de amplificar los fragmentos. La construcción de los vectores en *S. cerevisiae* fue exitosa para los 6 vectores, presentando un 25% de efectividad (al menos 1 construcción por cada 4 colonias analizadas) (Figura 7). Por otro lado, en los análisis a las colonias transformantes de *E. coli* se observa que en un 100% de las colonias analizadas hay presencia del

vector, pero con diferentes intensidades, lo cual puede deberse a que la extracción del DNA plasmídico en *E. coli* varió en las diferentes colonias.

Por lo mencionado anteriormente, es necesario analizar correctamente el ensamble de los vectores. El análisis mediante PCR mostrado en la Figura 9, indica que los 6 vectores presentan los 7 diferentes fragmentos correspondientes, y que estos se encuentran ensamblados en el sentido y orden correcto. Si bien en algunas reacciones se observan bandas de menor intensidad, esto puede deberse a características específicas de cada pareja de partidores utilizados en la amplificación. Pese a ello, las reacciones realizadas, si permitieron confirmar el correcto ensamble de los vectores. Sin embargo, para optimizar las reacciones de PCR y eliminar las bandas inespecíficas, se podrían realizar reacciones con un gradiente de temperatura para el paso de alineamiento de los partidores, y de esta manera evaluar a qué temperatura las bandas inespecíficas se dejan de ver. Para complementar el análisis por PCR, se realizó un análisis de restricción en el que, como se observa en la figura 10, los fragmentos resultantes en cada digestión coinciden con el tamaño de los fragmentos esperados, por lo tanto, los vectores construidos son portadores de los módulos de DNA diseñados para luego reemplazar al gen *SRE1* en *X. dendrorhous*. En el caso de la doble digestión con *XbaI* y *HpaI* se observa una banda tenue de alrededor 1500 pb en todos los vectores construidos, banda que no era esperada. Esto puede deberse a que las condiciones para que ambas enzimas actúen juntas, como el buffer utilizado, tiempo de digestión, cantidad de enzima, pueden no ser las óptimas generando lo que se conoce como *Star activity*, la que ocurre cuando las condiciones en las que se realiza la reacción no son las adecuadas para las enzimas y puede provocar que estas se unan a secuencias que son similares pero no idénticas a la secuencia de reconocimiento (Wei et al., 2008). Al realizar la doble digestión con las enzimas se utilizó el buffer recomendado, el cual era óptimo solo para una de las enzimas utilizadas, lo que llevó a utilizar el doble de la otra enzima, esto pudo haber llevado a que una de las dos enzimas se uniese a otra

región. Para evaluar esta posibilidad, se hizo una nueva digestión para uno de los vectores, donde se digirió con sólo una enzima bajo sus condiciones óptimas, y una vez digerido con ésta, la enzima se inactivó y la mezcla se dializó. A continuación, se digirió el vector con la segunda enzima, también bajo sus condiciones óptimas. Al evaluar la digestión del vector en un gel de agarosa, no se observó la banda de 1500 pb, demostrando que su aparición se debía a las condiciones de la reacción de digestión. Lo anterior no se realizó con todos los vectores debido a que, pese a la aparición de esta banda inespecífica, se observaban todos los fragmentos esperados. Otra posible explicación a la banda inespecífica es que hubiese ocurrido alguna mutación a la hora de amplificar alguno de los fragmentos comunes utilizados en el *DNA assembler* la cual haya generado un sitio nuevo de restricción que se presentaría en todos los vectores o también que alguna de las fuentes de DNA ya presentase el sitio de restricción. El resultado principal del análisis de digestión, es que el módulo de interés necesario para luego transformar a la levadura *X. dendrorhous*, si se libera en todos los vectores y este fragmento liberado tiene el tamaño esperado para cada versión de *SRE1*, por lo tanto los vectores si podrían utilizarse en futuros experimentos. Juntos, los análisis de PCR y de restricción indican que los fragmentos de los vectores fueron ensamblados en el orden y sentido correcto. Además, se observa en la Figura 10 que el módulo de interés que contiene las zonas río arriba y abajo del gen *SRE1*, las distintas versiones del mismo gen fusionado a las secuencias de los epítomos FLAG y HA junto con el terminador del gen *SRE1* y el marcador de selección Nat1 es liberado por la enzima *HpaI*, lo que nos indica que los 6 vectores podrían ser utilizados para transformar *X. dendrorhous* con las distintas versiones del gen *SRE1*.

Si bien los análisis realizados en este trabajo indican que los fragmentos de cada vector fueron ensamblados exitosamente según el diseño construido, aún queda por evaluar la secuencia de los módulos con los que se transformará *X. dendrorhous* para confirmar que durante el proceso de construcción de los vectores (desde la amplificación de los fragmentos hasta la obtención final de

los plásmidos desde *E. coli*) no hayan ocurrido mutaciones. Si hubiese alguna mutación en el gen *SRE1* y los respectivos epítomos, se podría afectar el correcto funcionamiento de la proteína Sre1, lo que afectaría la correcta evaluación del fenotipo de las cepas transformantes con los vectores en *X. dendrorhous*. Para determinar lo dicho anteriormente es necesario secuenciar el módulo que se quiere utilizar para transformar *X. dendrorhous* y analizar estas secuencias para determinar si ocurrió o no alguna mutación en los distintos genes de interés. Una vez confirmado que la secuencia de interés no posee mutaciones perjudiciales que afecten a Sre1, los vectores podrán ser utilizados para la transformación de *X. dendrorhous*, en la cual se espera reemplazar mediante un evento de doble recombinación homóloga el gen nativo *SRE1* por distintas versiones del mismo gen tanto en cepas mutantes de la proteasa Stp1 o SppA bajo fondo genético silvestre o mutante de *CYP61*. Así, se podrán evaluar los fenotipos resultantes como también a la proteína Sre1 mediante Western blot, lo que contribuirá para conocer la región donde la proteasa Stp1 corta a Sre1 y además determinar si efectivamente SppA participa en el procesamiento de Sre1 junto con la región donde la cortaría en *X. dendrorhous*.

CONCLUSIONES

- Se logró la construcción de 6 plásmidos que contienen distintas versiones del gen *SRE1* que varían en el tamaño y que además codifican a la proteína Sre1 fusionada a los epítotos FLAG y HA en sus extremos N- y C-terminal.
- Los plásmidos al ser digeridos con la enzima *HpaI* permiten liberar un fragmento de DNA que puede ser utilizado para transformar *X. dendrorhous* para reemplazar el gen *SRE1* nativo de la levadura, lo que permitirá evaluar en próximos trabajos las zonas de corte de las proteasas Stp1 y SppA en Sre1.

REFERENCIAS

- Bien, C. M., & Espenshade, P. J. (2010). Sterol Regulatory Element Binding Proteins in Fungi: Hypoxic Transcription Factors Linked to Pathogenesis. *Eukaryotic Cell*, 9(3), 352-359.
- Bien, C. M., Chang, Y. C., Nes, W. D., Kwon-Chung, K. J., & Espenshade, P. J. (2009). *Cryptococcus neoformans* Site-2 protease is required for virulence and survival in the presence of azole drugs. *Molecular microbiology*, 74(3), 672–690.
- Chang, Y. S., Bien, C. M., Lee, H., Espenshade, P. J., & Kwon-Chung, K. J. (2007). Sre1p, a regulator of oxygen sensing and sterol homeostasis, is required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 64(3), 614–629.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W., & Helling, R. B. (1973). Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(11), 3240-3244.
- Espenshade, P. J., & Hughes, A. D. (2007). Regulation of Sterol Synthesis in Eukaryotes. *Annual Review of Genetics*, 41(1), 401–427.
- Gibson DG. (2009). Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 37: 6984–6990
- Gibson, D. J., Young, L., Chuang, R., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 343-345.
- Goldstein, J. L., DeBose-Boyd, R. A., & Brown, M. E (2006). Protein Sensors for Membrane Sterols. *Cell*, 124(1), 35–46.

Gómez, M., Gutiérrez, M. E., González, A. M., Gárate-Castro, C., Sepúlveda, D., Barahona, S., Baeza, M., Cifuentes, V., & Alcaíno, J (2020). Metallopeptidase Stp1 activates the transcription factor Sre1 in the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of Lipid Research*, 61(2), 229-243.

Gómez, M., Baeza, M., Cifuentes, V., & Alcaíno, J. (2021). The SREBP (Sterol Regulatory Element-Binding Protein) pathway: a regulatory bridge between carotenogenesis and sterol biosynthesis in the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biological research*, 54(1), 34.

Gómez, M., Campusano, S., Gutiérrez, M. S., Sepúlveda, D., Barahona, S., Baeza, M., Cifuentes, V., & Alcaíno, J. (2020). Sterol regulatory element-binding protein Sre1 regulates carotenogenesis in the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of lipid research*, 61(12), 1658–1674

Gutiérrez, M. E., Campusano, S., González, A. M., Gómez, M., Barahona, S., Sepúlveda, D., Espenshade, P. J., Fernández-Lobato, M., Baeza, M., Cifuentes, V., & Alcaíno, J. (2019). Sterol Regulatory Element-Binding Protein (Sre1) Promotes the Synthesis of Carotenoids and Sterols in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Frontiers in Microbiology*, 10.

Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology*, 166(4), 557–580.

Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L., & Goycoolea, F. M. (2006). Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(2), 185-196.

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

Hwang, J., Ribbens, D., Raychaudhuri, S., Cairns, L., Gu, H., Frost, A., Urban, S., & Espenshade, P. J. (2016). A Golgi rhomboid protease Rbd2 recruits Cdc48 to cleave yeast SREBP. *The EMBO Journal*, *35*(21), 2332–2349.

Loto, I., Gutiérrez, M. E., 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 Microbiology*, *12*(1).

Muller, H., Annaluru, N., Schwerzmann, J. W., Richardson, S. M., Dymond, J. S., Cooper, E. M., Bader, J. S., Boeke, J. D., & Chandrasegaran, S. (2012). Assembling large DNA segments in yeast. *Methods in molecular biology*, *852*, 133–150.

Shao, Z., Zhao, H., & Zhao, H. (2008). *DNA assembler*, an in vivo genetic method for rapid construction of biochemical pathways. *Nucleic Acids Research*, *37*(2), e16.

Stewart, E.V., Lloyd, S.J., Burg, J.S., Nwosu, C.C., Lintner, R.E., Daza, R., et al. (2012) Yeast sterol regulatory element binding protein (SREBP) cleavage requires Cdc48 and Dsc5, a ubiquitin regulatory X domain-containing subunit of the Golgi Dsc E3 ligase. *Journal of Biological Chemistry* *287*, 672–681

Van Leeuwen, J., Andrews, B. J., Boone, C., & Tan, G. (2015). Construction of Multifragment Plasmids by Homologous Recombination in Yeast: Figure 1. *CSH Protocols*.

Venegas, M. (Tesis de Doctorado en desarrollo). Identificación de nuevos elementos reguladores de la vía SREBP en la levadura carotenogénica *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis para optar al Doctorado en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile.

Wei, H., Therrien, C., Blanchard, A., Guan, S., & Zhu, Z. (2008). The Fidelity Index provides a systematic quantitation of star activity of DNA restriction endonucleases. *Nucleic Acids Research*, 36(9), e50.

Willger, S. D., Cornish, E., Chung, D., Fleming, B. A., Lehmann, M. M., Puttikamonkul, S., & Cramer, R. J. (2012). Dsc Orthologs Are Required for Hypoxia Adaptation, Triazole Drug Responses, and Fungal Virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell*, 11(12), 1557-1567.

Willger, S. D., Puttikamonkul, S., Kim, K. H., Burritt, J. B., Grahl, N., Metzler, L. J., Barbuch, R., Bard, M., Lawrence, C. B., & Cramer, R. A. (2008). A Sterol-Regulatory Element Binding Protein Is Required for Cell Polarity, Hypoxia Adaptation, Azole Drug Resistance, and Virulence in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathogens*, 4(11).