

Estudio de la regulación de la síntesis de  
carotenoides y ergosterol en  
*Xanthophyllomyces dendrorhous* por la vía  
SREBP usando mutantes del gen *crTE* bajo el  
promotor *HMGS*

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

José Alejandro Durán Muñoz

Noviembre, 2023

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 el candidato

**José Alejandro Durán Muñoz**

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

.....

Directora de Tesis:

Dra. Jennifer Alcaíno Gorman

.....

Co-Director de Tesis

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Julieta Laura Orlando

.....

Dra. Claudia Stange Klein

.....

## BIOGRAFÍA



Nací el 6 de Mayo de 1989 en la comuna de San Fernando, Chile. Criado en la comuna de Nancagua, mis estudios de enseñanza básica fueron realizados en el Colegio El Principito de Nancagua, continuando la enseñanza media en el Instituto Regional Federico Errázuriz de Santa Cruz, es aquí donde desarrollé mi idea de seguir una carrera científica, egresando en el año 2006, teniendo grandes profesores y guías a los cuales admiré mucho. En el año 2013 egresé de la carrera de Biología de la PUCV. Durante todos estos

años conocí muchas personas e hice grandes amistades. Ingresé al laboratorio de Genética en el año 2018, comenzando mi Magister en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, bajo la dirección de la Dra. Jennifer Alcaíno, donde conocí a un grupo humano y de trabajo de gran calidad que me ha permitido avanzar tanto en lo científico como en lo personal.

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias al Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile por recibirme como un integrante más del equipo de trabajo. Me permitió crecer y desarrollarme como profesional desde el primer día que llegué. Fueron años de constante aprendizaje.

Gracias a los profesores, la Dra. Jennifer Alcaíno (Directora de Tesis), quien ha sido una excelente tutora, y confiar en mí. Y al Dr. Víctor Cifuentes (Co-Director de Tesis), ambos me apoyaron en esta etapa, reconociendo mis capacidades y ayudándome a corregir mis debilidades.

Gracias a cada uno de los integrantes del laboratorio por enseñarme y apoyarme tanto en lo práctico como en lo humano. A Dony, Salvador, Rafael, a compañeros y compañeras que ya se han titulado como Max, Sergio, Anita, Meli, Esteban y Gabriela.

Gracias a mi familia por los valores entregados y el apoyo incondicional.

Gracias a todos mis amigos, del colegio, de la U, del lab, quienes de una u otra forma siempre han estado presentes en toda esta etapa.

Gracias, finalmente al financiamiento que me permitió desarrollar mi investigación a FONDECYT 1220384 y 1160202 (Investigadora responsable: Dra. Jennifer Alcaíno).

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b>	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>vi</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>vii</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xi</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1. <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	1
2. Síntesis de Astaxantina	2
3. Síntesis de Ergosterol	7
4. Vía SREBP en mamíferos	8
4.1. Vía SREBP en hongos	11
4.2. Vía SREBP en <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	12
<b>Hipótesis</b>	<b>18</b>
<b>Objetivos</b>	<b>18</b>
Objetivo general:	18
Objetivos específicos:	18
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>19</b>
1. Materiales	19
1.1. Microorganismos	19
1.2. Análisis de la región promotora del gen <i>HMGS</i>	19
1.3. Plásmidos, cepas, enzimas y ácidos nucleicos	20
2. Métodos	26
2.1. Extracción y purificación de ácidos nucleicos	26
2.3. Secuenciación de módulo contenido en el vector pBS- $\Delta$ Up-hph-pHMGS/crtE	31
2.4. Transformación de las cepas de <i>E. coli</i> y de <i>X. dendrorhous</i>	31
2.5. Extracción de carotenoides y esteroides, y análisis por RP-HPLC	33
<b>Resultados</b>	<b>37</b>

1. Análisis bioinformático de la secuencia promotora del gen <i>HMGS</i> .	37
2. Construcción de Módulos para la transformación de <i>X. dendrorhous</i>	38
<b>2.1. Construcción de vectores con módulo para la modificación del promotor del gen <i>crtE</i> por el promotor del gen <i>HMGS</i> (p<i>HMGS</i>)</b>	38
<b>2.2. Análisis de la secuenciación de módulo en el Vector pBS-Up-hph-p<i>HMGS</i>/<i>crtE</i></b>	45
3. Transformación de la cepa silvestre <i>CBS6938</i> y las cepas mutantes <i>CBS.cyp6I</i> y <i>CBS.SREIN.FLAG</i> de <i>X. dendrorhous</i> con módulo de reemplazo del promotor del gen <i>crtE</i> por el del <i>HMGS</i>	46
4. Evaluación del efecto del reemplazo del promotor nativo del gen <i>crtE</i> por el promotor del gen <i>HMGS</i> en las cepas construidas de <i>X. dendrorhous</i> .	49
<b>4.1. Fenotipo de las cepas transformantes</b>	49
<b>4.2. Crecimiento en medio YM-líquido</b>	52
<b>4.3. Análisis de la expresión a nivel de los transcritos del gen <i>crtE</i> en cepas parentales y mutantes.</b>	53
<b>4.4. Análisis de cantidad y composición de carotenoides</b>	55
<b>4.5. Análisis de la cantidad de esteroides</b>	59
<b>Discusión</b>	<b>61</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>71</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>72</b>
<b>Anexos</b>	<b>78</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plásmidos generados y utilizados en este trabajo	22
Tabla 2. Cepas generadas y utilizadas en este trabajo	23
Tabla 3. Partidores generados y utilizados en este trabajo	24
Tabla 4. Posibles secuencias de unión a Sre1 (SRE) identificadas con los programas TFBIND y JASPAR para una misma posición	38
Tabla 5. Cantidad y composición de carotenoides de las cepas parentales y sus respectivas cepas mutantes de <i>X. dendrorhous</i> en ppm ( $\mu\text{g/g}$ peso seco de la levadura).	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Biosíntesis de carotenoides y esteroles.	6
Figura 2. Vía SREBP en mamíferos.	10
Figura 3. Vía SREBP en <i>X. dendrorhous</i> .	14
Figura 4. Vector pBS- <i>Up-hph-pHMGS/crtE</i> .	21
Figura 5. Representación del gen <i>HMGs</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	38
Figura 6. Representación del vector pBS-p <i>HMGs/crtE</i> y su análisis.	40
Figura 7. Representación y análisis del vector pBS- <i>Up-pHMGS/crtE</i> .	42
Figura 8. Representación del análisis del vector pBS- <i>Up-hph-pHMGS/crtE</i> .	44
Figura 9. Representación del vector pBS- <i>Up-hph-pHMGS/crtE</i> y su proceso de digestión enzimática e integración del ADN transformante en el genoma de <i>X. dendrorhous</i> .	47
Figura 10. Representación y verificación de la integración del ADN transformante con el módulo <i>Up-hph-pHMGS/crtE</i> en el genoma de <i>X. dendrorhous</i> .	48
Figura 11. Comparación de fenotipos de color entre las cepas mutantes de <i>X. dendrorhous</i> y sus parentales.	51
Figura 12. Curvas de crecimiento y parámetros cinéticos en cuanto a tasa de crecimiento ( $r$ ) y tiempo generacional ( $t$ ) de cada cepa mutante y parental.	53
Figura 13. Producción y composición de carotenoides totales en las cepas parentales y mutantes.	58
Figura 14. Producción de esteroides en las cepas parentales y mutantes. significativas.	60

## ABREVIATURAS

A	Absorbancia
Aa	Aminoácido
Amp	Ampicilina
CoA	Coenzima A
crtE	Geranylgeranyl Difosfato sintasa
DMAPP	dimetilalil-pirofosfato
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FPP	Farnesil-pirofosfato
GGPP	Geranylgeranyl-pirofosfato
HMGS	3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A sintasa
Hyg	Higromicina
IPP	Isopentenil-pirofosfato
kb	kilobases
kDa	kilo Dalton
LB	Medio de cultivo <i>Lysogeny Broth</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pI	Punto isoeléctrico
ppm	Partes por millón ( $\mu\text{g}$ carotenoides/g peso seco de levadura)
RE	Retículo endoplasmático
RT	Transcripción reversa
RT-HPLC	Cromatografía líquida en fase reversa
Scap	SREBP <i>Cleavage-Activating Protein</i>
SREs	<i>Sterol Regulatory Elements</i>
SREBP	<i>Sterol Regulatory Element-Binding Protein</i>

S1P	<i>Site-1</i> Serina Proteasa
S2P	<i>Site-2</i> Zinc Metaloproteasa
OE-PCR	<i>Overlap Extension PCR</i>
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 el carotenoide astaxantina, el cual tiene diversas aplicaciones biotecnológicas. La síntesis de carotenoides inicia con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA, y luego con la formación de HMG-CoA, mediante la enzima hidroximetilglutaril-CoA sintasa (gen *HMGS*), comparte pasos con la vía de ergosterol hasta la formación de farnesil-pirofosfato (FPP) comprometiendo a la vía del mevalonato. El primer paso hacia la síntesis de carotenoides es la formación de geranylgeranyl-pirofosfato (GGPP) a partir de FPP catalizado por la GGPP sintasa (gen *crtE*). Se ha demostrado que la biosíntesis de astaxantina y ergosterol son reguladas por el factor de transcripción Sre1 de *X. dendrorhous*, y que el gen *HMGS* de la vía del mevalonato es un blanco de Sre1.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la regulación del promotor del gen *HMGS*, que posee sitios de unión de Sre1, al reemplazar el promotor del gen *crtE* por el promotor del gen *HMGS* y su efecto sobre la síntesis de carotenoides en mutantes de la levadura que poseen al factor Sre1 en su forma activa: cepa *CBS.cyp61<sup>-</sup>* que no produce ergosterol y sobreproduce carotenoides, cepa *CBS.SRE1N.FLAG* que sólo expresa la forma activa de Sre1 y sobreproduce carotenoides, y cepa silvestre (*CBS6938*). Para ello, mediante OE-PCR y experimentos de clonado molecular, se construyó un módulo que contiene el promotor de *HMGS* (*pHMGS*). Con esto se transformó las cepas en estudio, donde mediante recombinación homóloga se reemplazó el promotor de *crtE* por el promotor del gen *HMGS*.

Los transformantes obtenidos *CBS.pHMGS/crtE*, *CBS.cyp61.pHMGS/crtE* y *CBS.SREIN.FLAG.pHMGS/crtE* fueron confirmados mediante PCR y se evaluaron los niveles de transcritos de *crtE* y la producción de carotenoides en comparación con sus respectivas cepas parentales. Los niveles de transcritos de *crtE* aumentaron en *CBS.cyp61.pHMGS/crtE* y *CBS.SREIN.FLAG.pHMGS/crtE* en más de tres y cuatro veces, respectivamente, y la producción de carotenoides incrementó 1,43 y 1,22 veces en las mismas dos cepas. Esto no se observó en la cepa *CBS.pHMGS/crtE*, que no posee Sre1 activo. Además, los niveles de transcritos de *HMGS* no se vieron alterados, evidenciando que el reemplazo del promotor del *crtE* no alteraría a la vía del MVA en sus inicios. Por lo tanto, reemplazar promotores de genes carotenogénicos por promotores regulados por Sre1 en cepas que poseen al factor de transcripción en su forma activa, favorece la producción de carotenoides en esta levadura.

## ABSTRACT

*Xanthophyllomyces dendrorhous* is a yeast that synthesizes the carotenoid astaxanthin, which has various biotechnological applications. Carotenoid synthesis begins with the condensation of two molecules of acetyl-CoA, and then with the formation of HMG-CoA, through the enzyme hydroxymethylglutaryl-CoA synthase (*HMGS* gene), it shares steps with the ergosterol pathway until the formation of farnesyl pyrophosphate (FPP), involving the mevalonate pathway. The first step towards carotenoid synthesis is the formation of geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) from FPP, catalyzed by GGPP synthase (*crtE* gene). It has been demonstrated that the biosynthesis of astaxanthin and ergosterol is regulated by the transcription factor Sre1 in *X. dendrorhous*, and the gene for hydroxymethylglutaryl-CoA synthase (*HMGS*) in the mevalonate pathway is a target of Sre1.

The objective of this study was to evaluate the regulation of the *HMGS* gene promoter, which contains Sre1 binding sites, by replacing the *crtE* gene promoter with the *HMGS* gene promoter and its effect on carotenoid synthesis in yeast mutants that possess the active form of the Sre1 factor: the *CBS.cyp61<sup>-</sup>* strain that does not produce ergosterol and overproduces carotenoids, the *CBS.SRE1N.FLAG* strain that only expresses the active form of Sre1 and overproduces carotenoids, and the wild-type strain (*CBS6938*). Using OE-PCR and molecular cloning experiments, a module was constructed containing the *HMGS* promoter (*pHMGS*). This module was used to transform the studied strains, where the *crtE* gene promoter was replaced by homologous recombination.

The obtained transformants *CBS.pHMGS/crtE*, *CBS.cyp61.pHMGS/crtE*, and *CBS.SRE1N.FLAG.pHMGS/crtE* were confirmed by PCR, and transcript levels of the *crtE* gene and carotenoid production were evaluated, and compared against their respective parental strains. Transcript levels of the *crtE* gene increased more than three and four times in strains *CBS.cyp61.pHMGS/crtE* and *CBS.SRE1N.FLAG.pHMGS/crtE*, respectively, and carotenoid production increased 1.43 and 1.22 times in these two strains when compared to their corresponding parental strain. These increments were not observed in strain *CBS.pHMGS/crtE*, where Sre1 is not active. Furthermore, *HMGS* transcript levels were not altered, indicating that the replacement of the *crtE* promoter would not affect the MVA pathway at its outset. Therefore, replacing carotenogenic gene promoters with promoters from genes regulated by Sre1 in strains that have the Sre1 transcription factor in its active form, promote carotenoid production in this yeast.

## INTRODUCCIÓN

### 1. *Xanthophyllomyces dendrorhous*

*Xanthophyllomyces dendrorhous* es una levadura basidiomicete ampliamente estudiada por su capacidad de sintetizar carotenoides, pigmentos naturales tipo terpenoides formados por 40 átomos de carbono, liposolubles, y de tonalidades desde el amarillo hasta el rojo-anaranjado (Armstrong, 1994). Entre los carotenoides, la astaxantina destaca por sus propiedades antioxidantes beneficiosas para la salud, y por su utilización en las industrias cosmética, farmacéutica y acuícola; en este último caso, como suplemento alimenticio para otorgar el color anaranjado característico de los salmones (Schroeder y col., 1995).

Se proyecta que el mercado global de los carotenoides debería alcanzar un valor de \$US 2.700 millones para el año 2027 a partir de los \$US 2.000 millones logrados durante 2022; en el año 2010, la astaxantina ocupó el tercer lugar en el mercado mundial de los carotenoides con \$US 226 millones, convirtiéndose en los últimos años en la fuente principal de carotenoides en la acuicultura (März, 2022). Aunque el 95% de este mercado consume el derivado de la síntesis química, la demanda del consumidor por productos naturales hace que los pigmentos naturales sean una alternativa atractiva y proporciona una oportunidad para la producción de la astaxantina natural (Schmidt y col., 2011).

*X. dendrorhous* es uno de los pocos organismos capaces de producir naturalmente astaxantina; sin embargo, la producción de este pigmento por cepas silvestres es relativamente baja (200 a 400 µg por gramo de levadura seca) para competir con la síntesis

química del carotenoide (Hu Z-C, 2005; Yamane y col., 1997). Este microorganismo es capaz de producir astaxantina a partir de  $\beta$ -caroteno, y actualmente se realizan una serie de esfuerzos para obtener cepas de *X. dendrorhous* sobreproductoras de astaxantina.

## 2. Síntesis de Astaxantina

La astaxantina (3,3'-dihydroxy- $\beta$ ,  $\beta'$ -carotene-4,4'-dione) es un carotenoide cuya estructura consiste en 40 átomos de carbono que contiene dos anillos de  $\beta$ -ionona en sus extremos, unidos por una cadena de polieno con dobles enlaces conjugados, además de poseer un grupo hidroxilo y ceto en ambos anillos. Esta conformación le confiere su coloración distintiva, rojo-anaranjada, y adicionalmente, le provee de propiedades antioxidantes al interactuar con radicales libres presentes en la célula, convirtiéndolos en compuestos más estables. Un efecto beneficioso adicional de la astaxantina es su capacidad para preservar la estructura de la membrana citoplasmática, ya que contribuye en la inhibición de la peroxidación lipídica, brindando estabilidad y protección a las células (Ambati y col., 2014).

El Isopentil-pirofosfato (IPP) es un importante precursor en la síntesis de carotenoides y esteroides (Figura 1), proviene de la vía del mevalonato (MVA) y desencadena una serie de reacciones que conducen a la formación de diversos compuestos esenciales. El ergosterol, también conocido como ergosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol, es el producto final de la vía de esteroides en hongos y desempeña un papel crucial en las membranas celulares, regulando su fluidez y permeabilidad, y actuando como modulador

de algunas proteínas, similar a las funciones que cumple el colesterol en células animales (Loto y col., 2012).

La síntesis de IPP a través de la vía del MVA comienza con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA por la enzima acetoacetil-CoA tiolasa, dando origen a acetoacetil-CoA; luego, se condensa con otra molécula de acetil-CoA, produciendo 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) mediante la acción de la enzima HMG-CoA sintasa, codificada por el gen *HMGS*. Posteriormente, la enzima HMG-CoA reductasa cataliza la conversión del HMG-CoA a MVA mediante dos reacciones de reducción. El MVA es fosforilado por una MVA quinasa (MVK) formándose MVA-5-fosfato (MVA-P), el cual sufre una nueva fosforilación mediante la fosfomevalonato quinasa (PMK) originando MVA-5-pirofosfato (MVA-PP). Finalmente, el MVA-PP se convierte en IPP, un intermediario compuesto por 5 átomos de carbono (C5), a través de la acción de la enzima pirofosfomevalonato descarboxilasa (MVD) (Miziorko, 2011). El IPP luego se transforma en el isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP), mediante la enzima IPP isomerasa.

Posteriormente, una molécula de DMAPP se condensa con otro IPP, resultando en geranil-pirofosfato (GPP, C10). Luego, se adiciona un segundo IPP a GPP, dando origen a farsenil-pirofosfato (FPP, C15). Hasta este punto, la vía de síntesis de ergosterol y astaxantina son compartidas; sin embargo, ambas vías divergen cuando el FPP, en la ruta de síntesis de carotenoides y por acción de la enzima GGPP sintasa (codificada por el gen *crtE*), se une con un tercer IPP para dar origen a geranilgeranil-pirofosfato (GGPP, C20),

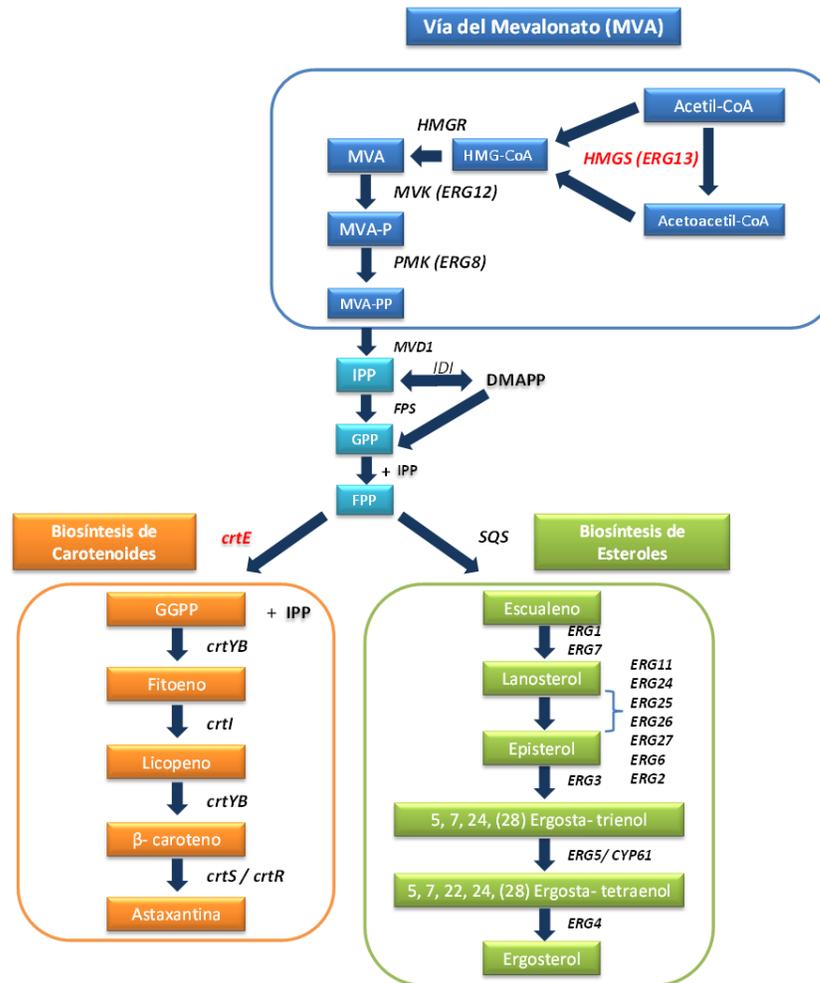
mientras que en la ruta del ergosterol se adiciona otra molécula de FPP, obteniendo escualeno (Alcaíno y col., 2014).

En general, la síntesis de GGPP puede ocurrir a través de 3 sistemas diferentes, dependiendo del organismo en cuestión; i) En el primer sistema, la enzima GGPP sintasa codificada por gen *crtE* produce GGPP a partir de DMAPP, ii) el segundo sistema se basa en la acción de dos enzimas: la FPP sintasa (codificada por gen *FPS*) y la GGPP sintasa (gen *crtE*). En este sistema, se forma FPP a partir de DMAPP mediante la FPP sintasa, y luego la GGPP sintasa (gen *crtE*) cataliza la conversión de FPP en GGPP. iii) En el tercer sistema, ambos (i) y (ii) actúan en paralelo para formar GGPP (Figura 3). En el caso específico de *X. dendrorhous*, la producción de GGPP ocurre mediante el segundo sistema, donde ambos genes, *crtE* y *FPS*, son cruciales para la síntesis de GGPP. Estos genes representan buenos candidatos para favorecer la producción de astaxantina en este organismo (Alcaíno y col., 2014).

La condensación de 2 moléculas de GGPP da origen al fitoeno, el primer carotenoide sintetizado, el cual es incoloro y es producido por una enzima bifuncional fitoeno- $\beta$ -caroteno sintasa codificada por el gen *crtYB*. Luego de sufrir 4 desaturaciones mediadas por la enzima fitoeno desaturasa codificada por el gen *crtI*, el fitoeno se transforma en licopeno (Verdoes y col., 1999). La ciclación de ambos extremos del licopeno produce  $\beta$ -caroteno a través de la actividad  $\beta$ -caroteno sintasa de la enzima bifuncional fitoeno- $\beta$ -caroteno sintasa. Luego, la adición de un grupo ceto en las posiciones 4 y 4', y un grupo hidroxilo en las posiciones 3 y 3' de ambos anillos  $\beta$ -ionona terminales del  $\beta$ -caroteno da origen a la astaxantina (De la fuente y cols., 2010; Alcaíno y

col., 2008; Loto y col., 2012). En el caso de *X. dendrorhous*, la síntesis de astaxantina a partir de  $\beta$ -caroteno es catalizada por un sistema citocromo P450 que involucra a la enzima astaxantina sintasa (CrtS) que es una citocromo P450 codificada por el gen *crtS* (Ojima y col., 2006), y a la enzima citocromo P450 reductasa (denominada CrtR en *X. dendrorhous*) requerida para la actividad de CrtS para la oxigenación del sustrato ( $\beta$ -caroteno) (Alcaíno y cols., 2008). En este sistema, la enzima astaxantina sintasa CrtS requiere de la citocromo P450 reductasa CrtR para formar astaxantina desde  $\beta$ -caroteno (Gutiérrez y col., 2015).

Las enzimas pertenecientes a la familia de las citocromo P450 han sido estudiadas por las diversas funciones que cumplen en el metabolismo de compuestos orgánicos, tanto en bacterias como humanos, y son conocidas por catalizar reacciones de oxidación, hidroxilación y desmetilación, entre otras; además de estar involucradas en procesos de síntesis de esteroides, desintoxicación, síntesis de pigmentos y metabolitos secundarios (Guengerich y col., 2008). Actualmente, *X. dendrorhous* es el único organismo descrito capaz de producir astaxantina mediante un sistema citocromo P450, e interesantemente, la sobreexpresión del gen *crtS* no favorece el contenido total de carotenoides, pero sí aumenta la proporción de astaxantina respecto a los otros carotenoides (Contreras y col., 2013). Adicionalmente, la interrupción del gen *crtR* bloquea la síntesis de astaxantina y los mutantes acumulan  $\beta$ -caroteno, pero dicha mutación no altera la viabilidad celular (Alcaíno y col., 2008).



**Figura 1. Biosíntesis de carotenoides y esteroides.** Las diferentes rutas de biosíntesis se encuentran delimitadas por recuadros de diferentes colores: en recuadro naranja, se muestra la biosíntesis de carotenoides; en recuadro verde, la biosíntesis de esteroides; y en recuadro azul, la MVA. Los nombres de los genes que codifican las enzimas que catalizan cada paso se encuentran en cursiva. Abreviaturas de los metabolitos involucrados en las rutas: HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA), MVA (Ácido mevalónico), MVA-P (mevalonato-5-fosfato), MVA-PP (mevalonato-5pirofosfato), IPP (isopentenil-pirofosfato), DMAPP (dimetilalil-pirofosfato), GPP (geranil pirofosfato), FPP (farnesil-pirofosfato) y GGPP (geranilgeranil pirofosfato). Genes y sus códigos: *HMGS/ERG13* (DI059433.1), *HMGR* (AJ884949), *MVK*, *PMK*, *MVD1*, *IDI* (DQ235686), *FPS* (DI032788.1, patente US 6872556 B2). Genes que controlan la ruta de síntesis de astaxantina: *crtE* (DQ012943), *crtYB* (DQ016503), *crtI* (Y15007), *crtS/crtR* (EU713462/EU884133) (Figura modificada de Loto y col., 2012).

### 3. Síntesis de Ergosterol

Los esteroides son componentes estructurales de las membranas celulares en eucariontes, que regulan su espesor, fluidez y permeabilidad (Loto y col., 2012; Zhang y Rao., 2010). Son los principales lípidos encargados de regular la fluidez y permeabilidad de las membranas celulares de células eucariotas (Moon y col., 2012). El ergosterol es el principal esteroide en levaduras, y su síntesis comienza con la condensación de dos moléculas de FPP formando escualeno (Figura 1). En la vía de esteroides, participan dos enzimas citocromo P450: *CYP51/ERG11* (Leiva y col., 2015) y *CYP61/ERG5* (Loto y col., 2012).

Antecedentes experimentales demuestran que la interrupción del gen *CYP61*, que codifica una citocromo P450 que participa en uno de los últimos pasos de la vía de esteroides, provoca un aumento en los niveles de transcritos del gen *HMGR*. Los cambios de expresión del gen *HMGR* están relacionados con la vía de regulación de la expresión génica SREBP (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein*), debido a que se han identificado secuencias SRE (*Sterol Regulatory Element*) en su región promotora (Loto, 2015; González, 2016; Gutiérrez y col., 2019), que son secuencias esenciales para la unión del factor de transcripción SREBP. Cabe mencionar que en mutantes del gen *cyp61* se detectaron incrementos en los niveles de esteroides y carotenoides producidos, causando así una coloración más rojiza en estas, sugiriendo regulación por esteroides de ambas vías a través de la activación del homólogo de SREBP en la levadura (Loto y col., 2012).

#### 4. Vía SREBP en mamíferos

La vía *Sterol Regulatory Element-Binding Protein* (SREBP) regula la homeostasis de lípidos y ha sido extensamente estudiada en mamíferos debido a su implicancia en la regulación de la síntesis de colesterol, principal esteroide de mamíferos, y su importancia en la salud. En esta vía, el elemento principal corresponde al factor transcripcional SREBP, que se sintetiza como un precursor inactivo anclado a la membrana del retículo endoplásmico (Bien y Espenshade., 2010; Nohturfft y col., 1998b).

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), estas isoformas se sintetizan como proteínas precursoras inactivas que residen en la membrana del retículo endoplasmático (RE). Las isoformas SREBP-1a y SREBP-1c principalmente activan la transcripción de genes requeridos para la síntesis de ácidos grasos, mientras que SREBP-2 activa la transcripción de genes requeridos para la síntesis de colesterol (Sato, 2010).

Las proteínas SREBPs se caracterizan por contener dos segmentos transmembrana separados por un *loop* dejando a los dominios N- y C-terminal orientados hacia el citoplasma (Hua y col., 1996). El dominio N-terminal de SREBP posee un motivo con cierre de leucina bHLH-Zipp (*basic Helix-Loop-Helix leucine zipper*), que contiene un residuo de tirosina en lugar de arginina que le permite diferenciarse de otros factores de transcripción que poseen motivo bHLH, otorgándole la posibilidad de unirse a secuencias SRE (Rawson, 2003; Osborne y Espenshade, 2009). En el otro extremo de la proteína, se

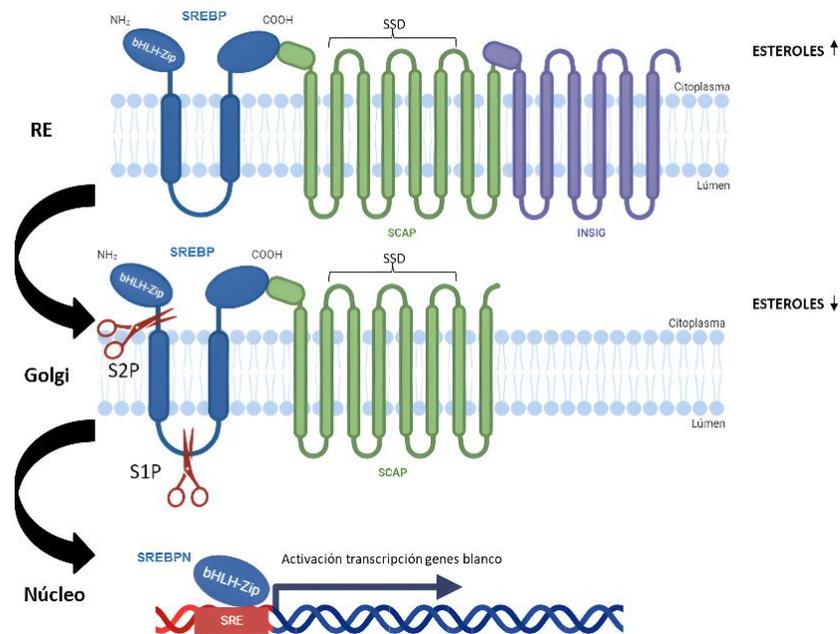
encuentra el dominio C- terminal, el cual posee función regulatoria al interactuar con la proteína SCAP (*SREBP Cleavage-Activating Protein*) que detecta los niveles de esteroides en la célula (Matsuda y col., 2001; Moon y col., 2012; Sakai y col., 1998).

La proteína SCAP, conformada por dos dominios, un N- terminal que posee 8 segmentos transmembrana, de los cuales 5 de ellos detectan esteroides (dominio *Sterol Sensing Domain*, SSD), interactúa con SREBP y es capaz de unir esteroides si los niveles celulares de éstos son elevados, reteniendo a SREBP en el retículo endoplasmático debido a la interacción de SCAP con la proteína INSIG (Figura 2). Es gracias al C-terminal de SCAP, constituido por múltiples repeticiones de triptófano y aspartato (motivos WD40), que se produce la interacción proteína-proteína entre SREBP y SCAP (Rawson, 2003; Moon J., 2017). Sin embargo, cuando los niveles de esteroides disminuyen, SCAP cambia su conformación al no unir esteroides, interrumpiendo su interacción con INSIG permitiendo así la movilización del complejo SCAP-SREBP hacia el aparato de Golgi. INSIG es una proteína que interactúa específicamente con las hélices de transmembrana de SCAP, donde se encuentra el dominio SSD (Figura 2). Posee dos isoformas, INSIG-1, la cual es blanco de SREBP, y por tanto su expresión se induce en deficiencia de colesterol, mientras que INSIG-2 se expresa de manera constitutiva (Yang y col., 2002; Goldstein y col., 2006; Rawson, 2003).

En el aparato de Golgi, SREBP es cortado secuencialmente por las proteasas S1P y S2P. S1P es una serina proteasa insertada en el aparato de Golgi por un fragmento transmembrana, dejando un dominio catalítico orientado hacia el lumen del Golgi (Dhingra y Cramer, 2017; Rawson y col., 1997). Por otro lado, S2P es una metaloproteasa

altamente hidrofóbica que se encuentra en la membrana del aparato de Golgi y que está implicada en la regulación de la expresión génica mediante proteólisis de factores transcripción (Rawling y Barrett., 2013). En primer lugar, S1P realiza un corte en el *loop* de SREBP ubicado en el lumen del aparato de Golgi y luego de ello, S2P corta a SREBP en el primer segmento de transmembrana, liberando al dominio N-terminal (SREBPN, factor de transcripción activo) que viaja hacia el núcleo y cumple su rol en la regulación de la transcripción de los genes blanco (Rawson y col., 1997; Duncan y col., 1998; Dhingra y Cramer, 2017).

En el núcleo, SREBPN reconoce y se une a secuencias SRE (*Sterol Regulatory Elements*) en la región promotora de sus genes blanco, promoviendo así la transcripción de genes relacionados con la homeostasis de lípidos (Figura 2) (Bien y Espenshade, 2010).



**Figura 2. Vía SREBP en mamíferos.**

Cuando los niveles de esteroides son altos, SREBP se mantiene unida al complejo SCAP-INSIG, sin embargo, cuando estos niveles disminuyen, SCAP interrumpe su interacción con INSIG, movilizándolo el complejo SREBP-SCAP hacia el aparato de Golgi donde SREBP es procesado por las proteasas S1P y S2P, liberando la forma activa (SRBEPN). Esta forma activa viaja al núcleo, donde se une a las regiones SREs (*Sterol Regulatory Elements*), promoviendo la transcripción de genes relacionados con la síntesis de colesterol. bHLH-Zip representa el motivo cierre de leucina y de unión a ADN en el dominio N-terminal de SREBP.

#### 4.1. Vía SREBP en hongos

La vía SREBP también ha sido descrita en algunos hongos como *Schizosaccharomyces pombe*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus*. En hongos, se ha descrito a Sre1 como un activador transcripcional, requerido para la mantención de la homeostasis de esteroides en la célula, homólogo a SREBP de mamíferos (Carrillo-Muñoz y col., 2006). En la levadura ascomicete *S. pombe* se han identificado las proteínas Sre1 y Sre2 (homólogos de SREBP-1a) y Scp1 (homólogo de SCAP) (Hughes y col., 2005). Al igual que en mamíferos, el factor de transcripción 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 (Watson y col., 1989; Kelly y col., 1995). Por otro lado, en el hongo patógeno basidiomicete *C. neoformans* también se han identificados homólogos funcionales 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 ocurre en respuesta a bajas concentraciones de esteroides celulares y de hipoxia, y también se ha descrito que Scp1 es necesaria para esta activación, ya que probablemente Sre1 y Scp1 forman un complejo similar al descrito entre SREBP y SCAP de mamíferos (Chang y col., 2007). Interesantemente, a diferencia de la levadura

ascomicete *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), mientras que en *S. pombe* la activación de Sre1 ocurre a través de la ubiquitinación por E2 Ubc4 y la ligasa DscE3, luego es reclutado por la proteína Cdc48, que actúa como un adaptador de sustrato para que una proteasa denominada como Rbd2 realice la escisión de Sre1 (Hwang y col., 2016).

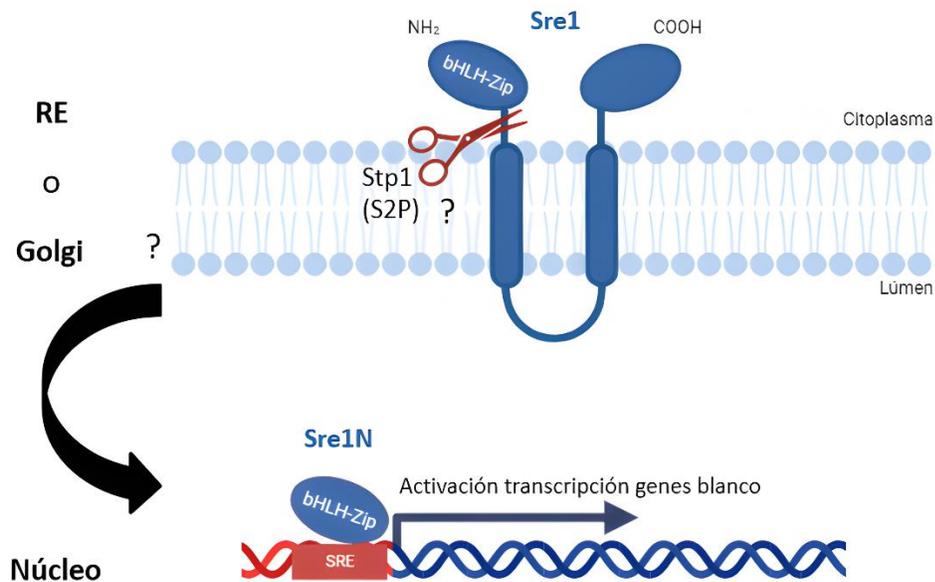
#### **4.2. Vía SREBP en *Xanthophylomyces dendrorhous***

En *X. dendrorhous*, investigaciones recientes llevadas a cabo en el laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile han identificado genes homólogos de la vía SREBP (Figura 3). Además, mediante análisis de *western blot*, se ha demostrado que Sre1 se encuentra en su forma completa en la cepa silvestre CBS6938 de *X. dendrorhous* (sin escisiones proteolíticas), sin embargo, bajo las mismas condiciones de cultivo, Sre1 se encuentra procesada (en su forma activa) en la cepa mutante *cyp61<sup>-</sup>*, regulando genes relacionados con la biosíntesis de carotenoides y ergosterol (Gómez y col., 2020b; Gutiérrez y col., 2019). Uno de los genes identificados de la vía es el homólogo del gen de SREBP, denominado *SRE1*, que codifica a una proteína (Sre1) de 783 aminoácidos, y al igual que SREBP en mamíferos, Sre1 contiene un motivo *bHLH* en su dominio N-terminal que conserva un residuo de tirosina que lo diferencia de otros factores de transcripción *bHLH* (Gutiérrez y col., 2019). Sre1 también presenta dos regiones de transmembrana en su secuencia aminoacídica, lo que sugiere que se ancla en la membrana del RE similar a lo descrito en células de mamífero.

A través de análisis transcriptómicos, se han identificado diversos genes blancos de Sre1 pertenecientes a la ruta de biosíntesis de esteroides (*ERG6*, *ERG7*, *ERG25*, *CYP51*) y de la MVA (*HMGS* y *HMGR*) (González, 2016; Gutiérrez y col., 2019). González (2016) y posteriormente Gutiérrez y col., (2019) también identificaron al menos dos sitios SREs en la región promotora del gen *HMGS* (SRE1: CGTCTCCTGAC y SRE2: TGTAACACCAC en sentido 5' a 3', ubicadas a 584-574 pb y 232-220 rbo arriba del codón de inicio de traducción, respectivamente). Además, hay evidencias de que Sre1 regula la expresión del gen de una citocromo p450 (*crtS*), que codifica la enzima astaxantina sintasa, debido a que ante la ausencia de Sre1, *crtS* disminuye sus niveles de transcritos (González., 2016). En otro estudio, mediante ensayos ChIP-exo, se demostró que Sre1 estaría involucrado principalmente en la regulación de genes de la ruta de síntesis de ergosterol y carotenoides en *X. dendrorhous*, mediante la regulación de genes relacionados con la MVA, y se identificaron dos genes diana, *crtE* y *crtR* del factor de transcripción Sre1 (Gómez y col., 2020b). Además, de acuerdo a los niveles de transcritos en *X. dendrorhous*, se ha evidenciado un aumento en la expresión relativa de los genes *HMGR* y *HMGS*, que controlan la ruta del MVA, *CYP61* de la biosíntesis de ergosterol y *crtS* de la biosíntesis de carotenoides en cepas que expresan la forma activa de Sre1 (Sre1N) (Gutiérrez y col., 2019; González, 2016).

Investigaciones recientes también han descrito el gen de una metaloproteasa de la familia M50, denominado *STP1* que codifica una proteína Stp1 de 620 aminoácidos homóloga a la proteasa S2P de mamíferos, y cuya delección provoca una disminución en la producción de esteroides y carotenoides en los mutantes *cyp61*<sup>-</sup>. Mediante ensayos de

*western blot* se demostró que la activación de Sre1 en *X. dendrorhous* depende del gen *STP1*, ya que en mutantes de *STP1* no se observa la forma activa de Sre1 y la expresión de genes blanco de Sre1 disminuye (Gómez y col., 2020 a, b).



**Figura 3. Vía SREBP en *X. dendrorhous*.** El homólogo de SREBP en *X. dendrorhous*, denominado Sre1, es procesado por un homólogo de S2P en mamíferos, denominado Stp1. Stp1 realiza un corte proteolítico permitiendo que el dominio N-terminal de Sre1, que contiene un motivo de cierre de leucina (bHLH-Zip), viaje hasta el núcleo donde se une a regiones promotoras de genes diana activando su transcripción. Actualmente, no se conoce con certeza dónde ocurre el corte proteolítico por Stp1 o la posible existencia de una segunda proteína de corte involucrada en el proceso. (Figura adaptada de Gómez y col., 2021).

De esta manera Sre1 no solo regula la expresión de genes biosintéticos de esteroides en *X. dendrorhous*, sino que también participa en la regulación de la síntesis de carotenoides al regular genes de la MVA, y de los genes carotenogénicos *crtE*, *crtS* y *crtR*. Además, se ha observado que Sre1 es regulado por Stp1, mediante escisión proteolítica.

Todos estos antecedentes contribuyen a un mejor entendimiento del funcionamiento de la vía SREBP en *X. dendrorhous* y su incidencia en la homeostasis de esteroides y carotenoides.

### **Importancia de los genes *HMGS* y *crtE***

El gen *HMGS*, ha sido ampliamente estudiado como un blanco de la vía SREBP debido a su posición temprana en la MVA (Figura 1). Investigaciones han demostrado que este gen muestra cambios significativos en sus niveles de transcritos ante modificaciones que afectan la vía de síntesis de carotenoides y esteroides, por ejemplo, una cepa construida que expresa solo el dominio activador de transcripción (Sre1N) ha mostrado un aumento en los niveles de transcritos de *HMGS* de entre 40 a 45 veces en la cepa mutante *cyp61-*, en comparación con cepas silvestres, mientras que la delección del gen *SRE1* ha llevado a una disminución en sus niveles de transcritos (González., 2016; Gutiérrez y col., 2019). Además, se ha observado que la delección del gen que codifica la metaloproteasa *Stp1* también disminuye los niveles de transcritos de *HMGS* en una cepa mutante del gen *CYP61*, donde ya se ha visto, mediante *western blot*, que la vía SREBP está activa (Gómez y col., 2020b), lo que sugiere la importancia de *HMGS* en la regulación de la MVA mediada por la vía SREBP en *X. dendrorhous*. Por otra parte, mediante ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA), se investigó la interacción proteína-ADN, y los resultados obtenidos confirmaron que la proteína Sre1 se une *in vitro* a dos sitios en la región promotora del gen *HMGS*. Estos hallazgos sustentan la conclusión de que *HMGS* es un blanco directo de Sre1 (Gutiérrez y col., 2019).

En cuanto al gen *crtE*, su papel en la síntesis de carotenoides también ha sido estudiado. La expresión de los genes *crtE*, *crtI* y *crtYB* de *X. dendrorhous* ha permitido la producción de carotenoides en *S. cerevisiae*, especialmente  $\beta$ -caroteno, junto con la sobreexpresión del dominio catalítico de HMG-CoA (*tHMG1*) de *S. cerevisiae* (Verwaal y col., en 2007). Estudios adicionales han demostrado que la sobreexpresión del gen *crtE* en *X. dendrorhous* incrementa la producción de carotenoides totales, y sus niveles de transcritos aumentarían entre 1 a 2 veces, demostrando ser un candidato prometedor para mejorar su producción (Alcaíno y col., 2014; Hara y col., 2014). Además, recientemente se ha identificado al gen *crtE* como blanco del factor de transcripción Sre1, cuya región promotora porta un sitio SRE en la hebra antisentido, lo que sugiere una conexión con la regulación de síntesis de carotenoides (Gómez y col., 2020b). Sin embargo, es importante destacar que en estudios previos realizados en la levadura *S. pombe* se ha observado que las secuencias SRE identificadas en diferentes genes como *SRE1*, *HEM13*, *ERG3* y *OSM1*, en la hebra antisentido, muestran una afinidad muy baja o nula en condiciones *in vitro* (Todd y col., 2006).

Basado en los antecedentes previos que sugieren que las rutas de síntesis de carotenoides y esteroides comparten mecanismos de regulación, y que la interrupción de la producción de ergosterol favorece la síntesis de ambos tipos de metabolitos (Loto y col., 2012), esta tesis tiene como objetivo evaluar si al favorecer la expresión del gen carotenogénico *crtE* reemplazando su promotor por el del gen *HMGS* (portador de sitios SREs y regulado por Sre1) se favorece aún más la síntesis de carotenoides. Para ello se utilizarán dos mutantes que contienen el factor de transcripción Sre1 activo: una cepa

*cyp61<sup>-</sup>* (que no produce ergosterol, pero que sobreproduce otros esteroides y carotenoides) y la cepa Sre1N (que sólo expresa la forma activa de Sre1 y sobreproduce carotenoides). Cabe señalar que el producto génico de *crtE* cataliza el paso de bifurcación entre la síntesis de carotenoides y de esteroides. Una vez obtenidos los mutantes, se realiza un análisis fenotípico en cuanto a la producción de carotenoides y esteroides para investigar los efectos de estas modificaciones genéticas en la producción de ambos tipos de metabolitos.

## **Hipótesis**

Al reemplazar el promotor del gen *crtE*, que codifica la GGPP sintasa que cataliza el primer paso específico de la síntesis de carotenoides, por el promotor del gen *HMGS* que codifica la HMG-CoA sintasa de la vía del mevalonato y que es fuertemente inducido por el factor de transcripción Sre1, se favorecerá la síntesis de carotenoides en mutantes de *Xanthophyllomyces dendrorhous* que sintetizan la forma activa de Sre1.

## **Objetivos**

### **Objetivo general:**

Estudiar el efecto en la producción de carotenoides en *X. dendrorhous* al reemplazar el promotor del *crtE* por el promotor del gen *HMGS* que posee sitios de unión del factor de transcripción Sre1 en la cepa silvestre y en mutantes que poseen a Sre1 en su forma activa.

### **Objetivos específicos:**

1. Determinar si existe variación en los niveles de transcritos del gen *crtE* al reemplazar su promotor nativo por el promotor del gen *HMGS* en la cepa silvestre y en las mutantes *cyp6I* y *Sre1N* de *X. dendrorhous*.
2. Evaluar fenotípicamente las cepas mutantes obtenidas en cuanto al contenido y composición de carotenoides y esteroides respecto a sus parentales.

## **Materiales y Métodos**

### **1. Materiales**

#### **1.1 Microorganismos**

##### **1.1.1. Bacterias**

Para los experimentos de clonado se utilizó la cepa DH5 $\alpha$  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 durante 12 a 14 h. Para la selección de colonias transformantes, se utilizó medio LB semi-sólido (agar 1,5%) suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/ml) y Xgal (120  $\mu$ g/ml).

##### **1.1.2. Levaduras**

Para los experimentos de transformación por recombinación homóloga, se utilizaron cepas silvestres y mutantes de *X. dendrorhous*, las 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 semi-sólido (agar 1,5%) suplementado con higromicina B (35  $\mu$ g/ml) y/o zeocina (50  $\mu$ g/ml).

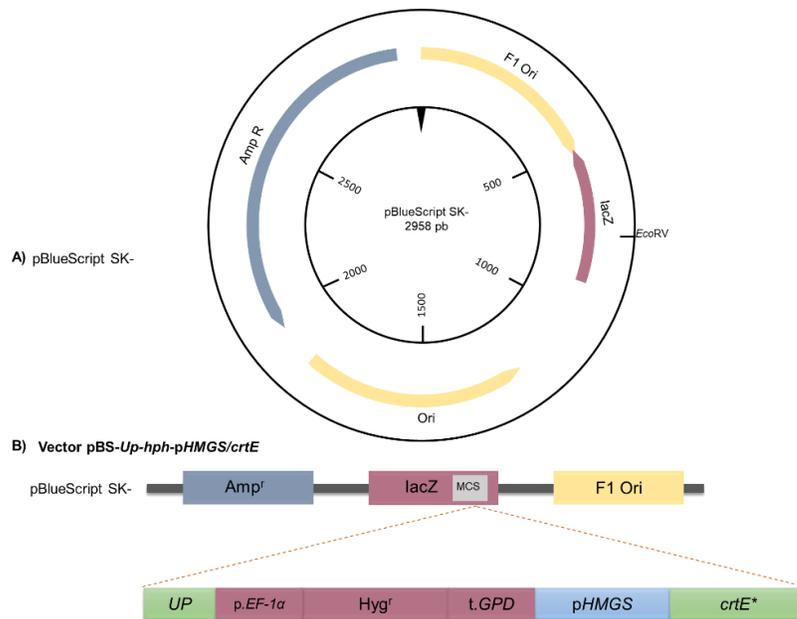
#### **1.2. Análisis de la región promotora del gen *HMGS***

Se analizaron aproximadamente 1000 nucleótidos río arriba del codón de inicio de la traducción del gen *HMGS*, correspondiente a uno de los genes implicados en el

comienzo de la MVA (Figura 3), con el objetivo de identificar y confirmar las posibles secuencias SRE descritas por González, (2016) y Gutiérrez, (2019). La secuencia génica se obtuvo a partir de la base de datos en GenBank de NCBI para *X. dendrorhous*, y se analizaron utilizando el Programa SnapGene Viewer 6.1.1 y Geneious Prime Versión 2022.2.2. Para predecir los sitios de unión del factor de transcripción se utilizaron los programas JASPAR (Mathelier y col., 2013) (<http://jaspar.genereg.net/>) y TFBIND (Tsunoda y Takagi, 1999) (<http://tfbind.hgc.jp/>).

### **1.3. Plásmidos, cepas, enzimas y ácidos nucleicos**

Los plásmidos y cepas utilizadas en este trabajo se describen en las Tablas 1 y 2, respectivamente. Dentro de los plásmidos utilizados, se destacan pBlueScript SK- (Stratagene), el cual se usó para integrar el módulo que contiene el promotor del gen *HMGS* y el gen *crtE*, en el sitio de policlonamiento múltiple MCS (Figura 4).



**Figura 4. Vector pBS-*Up-hph-pHMGS/crtE*.** A) Plásmido pBlueScript SK- (pBS). B) Plásmido pBS-*Up-hph-pHMGS/crtE* que corresponde a pBS portador del fragmento de ADN para transformar *X. dendrorhous* en su sitio de clonamiento múltiple (MCS). Este fragmento contiene: un módulo de resistencia a higromicina ( $\text{Hyg}^r$ ) en rojo que incluye al promotor del gen *EF-1 $\alpha$*  (*P.EF-1 $\alpha$* ) y un terminador de la transcripción (*t.GPD*) para seleccionar transformantes en *X. dendrorhous*, la región promotora de 1012 pb del gen *HMGS* (*pHMGS*) en azul para dirigir la expresión de *crtE* en los transformantes, y las regiones *UP* y *crtE\** en verde para permitir el reemplazo de la región promotora del gen *crtE* por la del gen *HMGR* mediante recombinación homóloga en el levadura. La región *UP*, corresponde a 512 pb de la secuencia río arriba de la región promotora del gen *crtE* y *crtE\** corresponde a 863 pb de la secuencia del gen *crtE*, específicamente la zona comprendida entre el exón 1 hasta 81 pb del exón 4.

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: ADN ligasa T4, endonucleasas de restricción, transcriptasa reversa Maxima, *PfuUltraII* Fusion HS ADN polimerasa, *Taq* ADN polimerasa, DNasa I, y RNasa A, T4 *polynucleotide Kinase*, *FastAP Thermosensitive alkaline phosphatase*, obtenidas desde Agilent Technologies, Thermo Scientific 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**

<b>Plásmido</b>	<b>Descripción</b>	<b>Referencia</b>
pBlueScript SK-	ColE1 ori; Amp <sup>r</sup> ; vector de clonación con marcador de selección colonias transformantes recombinantes (azules-blancas).	Stratagene.
pBS-pHMGS/ <i>crtE</i>	Plásmido pBlueScript SK- que en el sitio <i>EcoRV</i> porta el módulo con el promotor del gen <i>HMGS</i> (pHMGS) y parte del gen <i>crtE</i> (hasta el exón 4).	Este trabajo.
pBS- <i>Up</i> -pHMGS/ <i>crtE</i>	Plásmido pBlueScript SK- que en el sitio <i>EcoRV</i> porta el módulo con el promotor del gen <i>HMGS</i> (pHMGS) y parte del gen <i>crtE</i> (hasta el exón 4) y una región <i>Up</i> , río arriba del promotor nativo de <i>crtE</i> .	Este trabajo.
pBS- <i>Up</i> - <i>hph</i> -pHMGS/ <i>crtE</i>	Plásmido pBlueScript SK- que en el sitio <i>EcoRV</i> porta el módulo con el promotor del gen <i>HMGS</i> (pHMGS) y parte del gen <i>crtE</i> (hasta el exón 4), una región <i>Up</i> río arriba de pHMGS y el módulo del gen que otorga resistencia a Higromicina B ( <i>hph</i> ).	Este trabajo.
pBS- <i>hph</i> -pHMGS/ <i>crtE</i>	Plásmido pBlueScript SK- que en el sitio <i>EcoRV</i> porta el módulo con el promotor del gen <i>HMGS</i> (pHMGS) y parte del gen <i>crtE</i> (hasta el exón 4) y el módulo del gen que otorga resistencia a Higromicina B ( <i>hph</i> ).	Este trabajo.

**Tabla 2. Cepas generadas y utilizadas en este trabajo**

<b>Cepa</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Referencia</b>
<i>E. coli:</i> DH5α	Amp <sup>s</sup>	Sambrook y col., 2001
<i>X. dendrorhous:</i> CBS6938	Cepa parental silvestre.	ATCC 96594
CBS. <i>cyp61</i> <sup>-</sup>	Cepa parental (Zeo <sup>r</sup> ) derivada de la cepa CBS6938. El locus del gen <i>CYP61</i> se interrumpió con un módulo que otorga resistencia a zeocina ( <i>Sh ble</i> ).	Loto y col., 2012
CBS. <i>SRE1N</i> .FLAG	Transformante (Hyg <sup>r</sup> ) derivado de la cepa CBS6938. El locus <i>SRE1</i> se reemplazó por una versión del gen <i>SRE1</i> que sólo expresa la forma activa de Sre1 (Sre1N).	Gutiérrez., 2016a,b.
CBS. <i>pHMGS/crtE</i>	Transformante (Hyg <sup>r</sup> ) derivado de la cepa CBS6938, donde se reemplazó el promotor de <i>crtE</i> por el promotor de <i>HMGS</i> .	Este trabajo.
CBS <i>cyp61</i> <sup>-</sup> . <i>pHMGS/crtE</i>	Transformante (Zeo <sup>r</sup> /Hyg <sup>r</sup> ) derivado de la cepa CBS <i>cyp61</i> <sup>-</sup> , donde se reemplazó el promotor de <i>crtE</i> por el promotor de <i>HMGS</i> .	Este trabajo.
CBS. <i>SRE1N</i> .FLAG. <i>pHMGS/crtE</i>	Transformante (Zeo <sup>r</sup> /Hyg <sup>r</sup> ) derivado de la cepa CBS. <i>SRE1N</i> .FLAG, , donde se reemplazó el promotor de <i>crtE</i> por el promotor de <i>HMGS</i> .	Este trabajo.

Amp<sup>s</sup> = sensible a antibiótico ampicilina; Hyg<sup>r</sup> = resistente a antibiótico higromicina B; Zeo<sup>r</sup> = resistente a antibiótico zeocina; ATCC = *American type culture Collection*.

**Tabla 3. Partidores generados y utilizados en este trabajo.**

N°	Identificación	Secuencia (5' - 3')	Dirección
<b>Construcción de módulo sin resistencia a Higromicina B</b>			
<b>Región flanqueante río arriba (UP), Promotor del HMGS (pHMGS) y gen <i>crtE</i>:</b>			
1	FwUp**	GTTGGACGAATGTAGCCG	D
2	RvUp*	GTTCGAACTGGGTTAACCA TCAAGGAGAGTACTCTCG	R
3	FwHmgs	CCAGTTCGAACGAGAGTAT CGT	D
4	Fhmg*s*	CTCCTTGATGGTTAACCCA GTTCGAACGAGAGTATCGT	D
5	RvHmgs	TCGCGTAATCCATAACTGG ATATCTAGATTGAGAT	R
6	Fwcrte	ATATCCAGTTATGGATTAC GCGAACATCCTC	F
7	Rvcrte**	GGAGGAATTACAGGCATGG GT	R
<b>Módulo de Higromicina B:</b>			
8	Gpd.F	ACGGTTCTCTCCAAACCCT C	D
9	H.out.R	TCCATCACAGTTTGCCAGT G	R
10	P.tef.F	GGCTCATCAGCCGACAGTT CA	D
11	Hyg.Rev.In**	TGTCAAGCACTTCCGGAAT CG	R
12	Int.Hyg.F**	GTGTCACGTTGCAAGACCT G	D
<b>Partidores para evaluación de pBS-<math>\Delta</math>Up-<i>hph</i>-pHMGS/<i>crtE</i></b>			

N°	Identificación	Secuencia (5' - 3')	Dirección
13	FwUp2**	GAATCCAACACAAGCTGG A	D
14	FwHmgs2**	GATTGACCTTGAGTACGCG G	D
15	RvHmgs2**	CGGCCAAGGTATGTAAGTT C	R
16	Rvcrte2	CCAACAACGTTCTGGATGA C	R
<b>Partidores externos para evaluación en pBS:</b>			
17	M13Fw	GTAAAACGACGGCCAGT	D
18	M13Rv	GTCATAGCTGTTTCCTG	R
<b>Evaluación transformación de <i>X. dendrorhous</i></b>			
19	FwD2check	AGACCGAGGAGAAGGTTTC ATG	D
20	Hyg.Rev.In	Ver n° 11	R
21	FUP2	CTTAAAAGCTCGCACTGGT C	D
22	FwHmgs2	Ver n° 14	D
23	crtE.out.F1	ATGACTCTTGCCGGCGATT TGA	D
24	R1.crtE	AAGCTGGACAAAGTCTCTA C	R
25	Rvcrte2	Ver n° 16	R
<b>Partidores para secuenciación de módulo en pBS-<math>\Delta</math>Up-hph-pHMGS/crtE</b>			
26	FwUp.Sc	GTTGGACGAATGTAGCCG	D
27	RvHyg.Sc	GTCGGCTGATGAGCCGAT	R
28	FwHMGS.Sc	CCATCATCTCCGTCATCT	D
29	RvHMGS.Sc	CCGACTCAGTAGAGTTCT	R
30	FwHMGS2.Sc	CAGAGTACACCGTATCGA	D

N°	Identificación	Secuencia (5' - 3')	Dirección
31	RvertE.Sc	TACGGTTCAAGGAGCACG	R
32	FwertE.Sc	CGTGCTCCTTGAACCGTAT	D
33	FwertE2.Sc	CGCTAGCTTATTGTGAGTC	D
34	RvertE2.Sc	AGACTCACAATAAGCTAGC	R
35	RvertE3.Sc	CTCTTGATAAGCCAGAAAG	R
<b>PCR en tiempo real (qPCR)</b>			
36	mActF-RT	CCGCCCTCGTGATTGATAA	F
37	mActR-RT	TCACCAACGTAGGAGTCCT	R
38	mcrtEF-RT	TGTTGGCATGCTACATAACC	F
39	mcrtER-RT	GTTGGGCGAAGCTTGAAGA	R
40	hmgsRT2-F	AAGCAGGTTGAGCCTGGAA	F
41	HmgrsRT2-R	AAAGCGGTTGAGCTCTTGA	R

Partidores D = Directo; R = Reverso. \* Partidores con una secuencia *HpaI* agregada, remarcada en negro. \*\* Partidores intermedios del módulo de construcción.

## 2. Métodos

La extracción de ácidos nucleicos, su purificación y reacciones enzimáticas (digestión y ligado de ADN), entre otras técnicas ocupadas, se realizaron de acuerdo con métodos estandarizados (Sambrook y col., 2001) e instrucciones de los proveedores de los kits y de las enzimas, mientras que la transformación de *X. dendrorhous* incluyó protocolos adaptados y optimizados en el Laboratorio de Genética de la Universidad de Chile.

### 2.1. Extracción y purificación de ácidos nucleicos

La purificación de ADN plasmídico se realizó con el kit Gene JET Plasmid Miniprep Kit de acuerdo con las indicaciones del proveedor (ThermoScientific). Las reacciones de ligado entre el ADN plasmídico digerido y el ADN inserto (módulo) se realizaron con la enzima ADN ligasa T4 también siguiendo las indicaciones del proveedor.

La purificación de ADN a partir de geles de agarosa se realizó mediante el método de perlas de sílice (Boyle y col., 1995). Los fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en gel de agarosa (1 %) en buffer TAE (1X). Las bandas fueron visualizadas bajo luz UV en un transiluminador, cortadas con un bisturí y depositadas en tubos Eppendorf a los cuales se agregó 3 volúmenes de KI 6 M (en relación a la masa del trozo de gel en gramos) a cada uno. Para disolver el gel de agarosa, se incubó a 55°C durante 10 min. Luego se añadió 10 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 ADN se recuperó de las perlas de sílice agregando y suspendiendo en 20 µl de agua estéril. Se centrifugó por 10 s y el sobrenadante con el ADN se depositó en un tubo Eppendorf nuevo y el rendimiento se evaluó en un gel de agarosa (1%).

La extracción de ADN genómico de levadura se realizó mediante perlas de vidrio (Sambrook y col., 2001). Se obtuvo un pellet de células proveniente desde un cultivo en medio sólido o líquido, que se suspendió en 500 µl de buffer TE (Tris-HCl 25 mM, EDTA

10 mM, pH 8) y 100  $\mu$ l de perlas de vidrio de 0,5 mm. Se llevó al molidor de células Mini-Beadbeater-16 (BioSpec) por 3 min, se agregó 500  $\mu$ l 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 500  $\mu$ l de cloroformo: alcohol isoamílico en una proporción 24:1, se homogenizó en vórtex y centrifugó a 10.000 x g por 5 min. Se recuperó la fase acuosa y el ADN se precipitó con un volumen 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 ADN se lavó con un volumen de etanol al 70%. Finalmente, el pellet se secó a 37°C durante 30 min y se suspendió en 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada para su utilización.

Para la extracción de ARN de la levadura, se tomó 1 ml de un cultivo de levadura y se depositó en tubos Eppendorf de 2 ml, luego se centrifugaron por 5 min a 14.000 x g. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se suspendió en 200  $\mu$ l de buffer de lisis (acetato de Na<sup>+</sup> 0,002 M pH 5,5, SDS 0,5%, EDTA 1mM, en agua DEPC 0,1%). Se agregó 100  $\mu$ l de perlas de vidrio de 0,5 mm y se llevó al molidor de células durante 3 min. Luego, se agregó 800  $\mu$ l de solución TriReagent (Life Technologies), se llevó al molidor por 3 min y se incubó en hielo por 10 min. A continuación, se agregó 200  $\mu$ l de cloroformo, se agitó manualmente por 15 s y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Se centrifugó a 14.000 x g durante 10 min en centrífuga refrigerada a 4°C y se recuperó la fase acuosa. Esta última se depositó en dos tubos Eppendorf y se le agregó a cada uno 250  $\mu$ l de agua estéril y 550  $\mu$ l 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 en 20 µl de agua estéril. Finalmente, las muestras obtenidas se cuantificaron mediante el equipo Qubit TM 4 fluorometer, utilizando el Qubit<sup>TM</sup> RNA BR Assay Kit de Thermofisher.

## **2.2. Amplificación de ADN por PCR, síntesis de ADNc (RT) y PCR en tiempo real (qPCR)**

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

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl que incluyó: buffer de PCR 1X (KCl 500 mM, Tris-HCl 200 mM pH 8,4), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 1 µM de cada partidor, 1 U de enzima ADN polimerasa y entre 10-20 ng de ADN molde; para el PCR de colonia, se suspendió una colonia en la reacción como ADN 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), 30 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 ADNc ≤ 1 kb utilizando *Pfu* ADN polimerasa,

y 3 min con *Taq* ADN polimerasa). Luego de los ciclos, se prolongó por 10 min a 72°C y finalmente la reacción se mantuvo a 4°C.

Para la síntesis de ADNc, las muestras de ARN se trataron con DNasa I de acuerdo con las indicaciones del proveedor de la enzima. La reacción de RT se realizó con la enzima Maxima Reverse Transcriptase (ThermoScientific) en un volumen final de 20 µl. Se utilizó un determinado volumen de ARN (5 µg) y se le agregó agua estéril hasta completar 11 µl. A esta mezcla se le añadió 2 µl del mix 1:1 de oligo-dT (25 µM) 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 µl de una mezcla 4:2 de buffer RT 5X y DTT (0,1M), más 1 µl 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 ADNc de cada gen se realizó una reacción de PCR como se indica en la sección correspondiente.

Para las reacciones de qPCR se utilizó la mezcla de reacción de PCR según las especificaciones del Kit Sso Advanced Universal IT SYBR Green Smx (BIO RAD) que incluyó: 10 µl de mezcla del kit, 8 µl de agua estéril, 1 µl de ADNc y 1 µl de mezcla de partidores directo y reverso (10 µM). 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 C1000 touch thermal cycler CFX96 Real Time System de BIO RAD. 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).

### **2.3. Secuenciación de módulo contenido en el vector pBS- $\Delta$ Up-hph-pHMGS/crtE**

Se purificó ADN plasmídico mediante el Gene JET Plasmid Miniprep Kit (ThermoScientific) de acuerdo con las indicaciones del proveedor exclusivamente para enviar a secuenciar a la Empresa Macrogen, utilizando partidores específicos (Tabla 3) de la región que contiene el módulo construido con *UP*, *pHMGS* y el gen *crtE* desde el exón 1 hasta 81 pb del exón 4. Las secuencias fueron ensambladas, alineadas y analizadas con el programa Geneious Prime Versión 2022.2.2. Además, mediante BLAST y BLASTn se compararon las secuencias obtenidas con las de la base de datos GenkBank de NCBI para el gen *HMGS*, locus: MK368600 que sirvió para analizar su región promotora, y para el gen *crtE*, locus: DQ012943 utilizada para analizar la región de recombinación río arriba (*UP*) y los exones.

### **2.4. 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 ADN de interés.

#### **2.4.1. Transformación de *E. coli***

Para preparar células electrocompetentes de *E. coli*, se inoculó medio LB con un cultivo de 14 h de *E. coli* DH5 $\alpha$  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 en glicerol al 10% (v/v); la suspensión de células se fraccionó en alícuotas de 40 µl 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 ADN transformante en un volumen no mayor a 4 µl. 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 µF, 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 µl, 150 µl y 225 µl en placas con medio LB suplementadas con el antibiótico ampicilina (100 µg/ml), y se incubó a 37°C hasta la aparición de colonias.

#### **2.4.2. 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 en 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, MgCl<sub>2</sub> 1 mM). El pellet celular se suspendió con solución STM y se almacenó en hielo para su uso durante el mismo día.

Para la transformación, a una alícuota de 70-100 µl de células electrocompetentes se le agregó 10 µl de ADN transformante (10-15 µg). Se electroporó en el equipo BioRad Gene Pulser X Cell bajo las siguientes condiciones: 125 µF, 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.

## **2.5. Extracción de carotenoides y esteroides, y análisis por RP-HPLC**

### **2.5.1. Extracción de Carotenoides**

La extracción de carotenoides se llevó a cabo según el método de extracción con acetona (An y col., 1989). Para colectar células, se tomó 15 ml de un cultivo de levadura crecido en medio YM líquido a 22°C con agitación constante. Se centrifugó a 4.000 x g durante 5 min, eliminando el sobrenadante y rescatando el pellet, el cual se lavó con 10 ml de agua destilada. Luego se suspendió el pellet con 1 ml de agua libre de endonucleasas, 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. Se centrifugó a 4.000 x g por 5 min y se recuperó el sobrenadante. Las extracciones con acetona se repitieron hasta que el extracto celular quedó incoloro. Finalmente, se agregó 1/5 de volumen de éter de petróleo al tubo que contenía los sobrenadantes colectados, se mezcló y centrifugó por 5 min a 4.000 x g. Se recuperó la fase superior, correspondiente al éter de petróleo con los carotenoides, la cual se transfirió a un tubo de vidrio y se midió 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:

$$\frac{\mu g \text{ de pigmentos}}{g \text{ de peso seco}} = \frac{vol. \text{ éter} \times Abs \times 100}{21 \times peso \text{ seco} \times C}$$

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

Se dejó evaporar todo el éter de petróleo del extracto de carotenoides y se suspendió en 200 µl de acetona. La composición de pigmentos se determinó 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). 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 con sus tiempos de retención y espectro de absorción de acuerdo a estándares.

### 2.5.2. Extracción de Esteroles

Se colectó 5 ml de un 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:

$$\frac{\mu g \text{ de esteroides}}{g \text{ de muestra}} = \frac{\text{vol. éter} \times \text{Abs} \times Cc}{11900 \times \text{peso seco (g)}}$$

Dónde: vol. éter = volumen de éter de petróleo recuperado en ml; Abs = absorbancia medida a 280 nm; 11.900 = coeficiente de extinción molar de ergosterol en acetona en M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>; Cc = constante de conversión de unidades μg/g equivalente a 10<sup>4</sup>.

Para determinar la composición de esteroides mediante RP-HPLC, se dejó secar totalmente el éter de petróleo y se suspendió en 200 μl de acetona. Como fase móvil se usó metanol: H<sub>2</sub>O en proporción 97:3 (v/v), con flujo 1 ml/min en condiciones isocráticas.

Los esteroides fueron reconocidos de acuerdo a sus tiempos de retención y espectro de absorción de acuerdo a estándares.

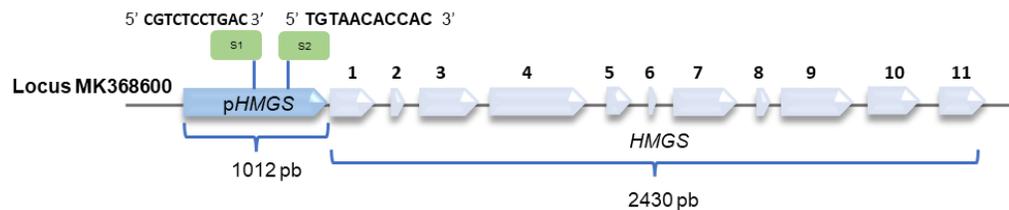
## Resultados

### 1. Análisis bioinformático de la secuencia promotora del gen *HMGS*.

A partir de los resultados de los análisis de regiones SREs en secuencias promotoras y los análisis transcriptómicos realizados por González (2016) y Gutiérrez y col. (2019), respectivamente, se identificó un homólogo de SREBP denominado *SRE1*. Además, se detectaron sitios SRE en diferentes genes de la MVA, carotenogénesis y síntesis de esteroides (Gómez y col., 2020b). En base a estos antecedentes, se realizó una búsqueda de secuencias SRE en la región promotora del gen *HMGS* en *X. dendrorhous* (Gutiérrez y col., 2019) utilizando las bases de datos de JASPAR y TBFIND. Se seleccionaron dos secuencias encontradas por ambas herramientas, las cuales se detallan en la Tabla 4. Estas secuencias elegidas se consideraron para delimitar la región promotora del gen *HMGS* tomando en cuenta 1.012 pb (Figura 5) para ser utilizadas en posteriores experimentos. Es importante mencionar que las secuencias SRE encontradas corresponden únicamente a aquellas ubicadas en la hebra sentido (5' a 3'), debido a que en la levadura *S. pombe* se ha observado que las secuencias SRE identificadas en diferentes genes como *SRE1*, *HEM13*, *ERG3* y *OSM1* en la hebra antisentido muestran una afinidad muy baja o nula en condiciones *in vitro* (Todd y col., 2006).

**Tabla 4. Posibles secuencias de unión a Sre1 (SRE) identificadas con los programas TFBIND y JASPAR para una misma posición.**

Gen	Secuencia 5' -3'	Posición 5' -3'	Predictor
<i>HMGS</i>	CGTCTCCTGAC	584-574 pb	TFBIND/JASPAR
	TGTAACACCAC	232- 220 pb	TFBIND/JASPAR



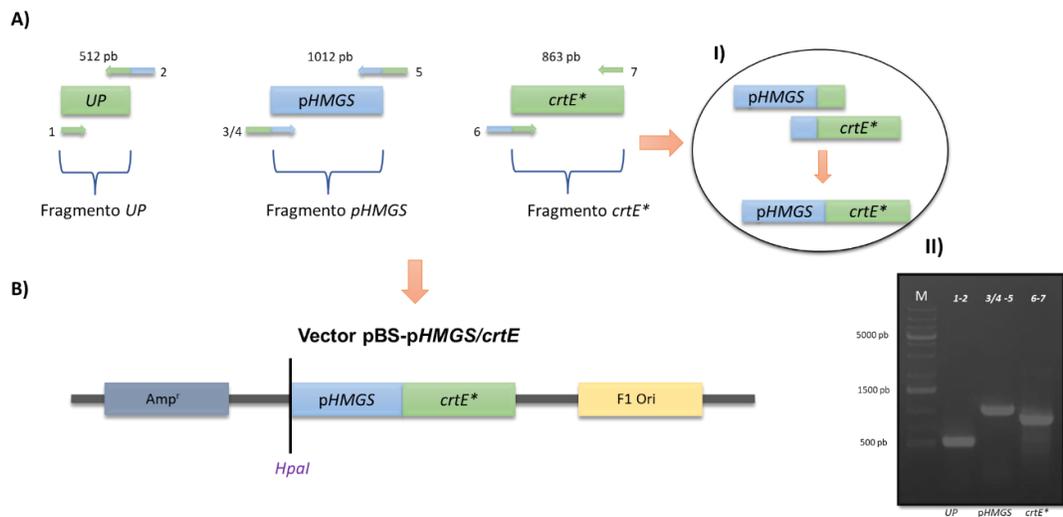
**Figura 5. Representación del gen *HMGS* de *X. dendrorhous*.** La figura muestra el gen *HMGS* representado por el locus MK368600 y su región promotora, el cual tiene una longitud total de 4.820 pares de base (pb); la región codificante del gen *HMGS* de *X. dendrorhous* se extiende a lo largo de 2.430 pb, abarcando tanto intrones como exones, numerados secuencialmente del 1 al 11. Para este estudio se definió una región promotora de 1.012 pb (*pHMGS*), a partir de una búsqueda específica de secuencias Sre1 (SRE). Estas secuencias SRE se identificaron en la dirección 5' a 3' y se designaron como S1 y S2, representadas en cuadros verdes en la figura.

## 2. Construcción de Módulos para la transformación de *X. dendrorhous*

### 2.1. Construcción de vectores con módulo para la modificación del promotor del gen *crtE* por el promotor del gen *HMGS* (*pHMGS*)

Para evaluar el efecto del reemplazo del promotor del gen *crtE* por *pHMGS* en *X. dendrorhous*, se diseñó y construyó un módulo utilizando como base el vector pBlueScript

SK- (pBS). Se generaron diversos fragmentos de ADN mediante PCR a partir de ADN genómico (ADNg) de *X. dendrorhous*. Estos fragmentos incluyen: i) una región de ADN de 512 pb río arriba de la región promotora del gen *crtE*, denominada *UP*, ii) un fragmento de 863 pb del gen *crtE* (*crtE\**), que actúa como la región de ADN río abajo del módulo, permitiendo la recombinación homóloga en el genoma de la levadura para reemplazar el promotor nativo del gen *crtE*, iii) y la región promotora (*pHMGS*) del gen *HMGS* de 1.012 pb (Figura 6 A). Cada uno de estos fragmentos fue verificado mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 6 II). Los fragmentos *pHMGS* y *crtE\** se unieron mediante *Overlap Extension PCR* (OE-PCR) dando origen a un fragmento de 1.875 pb que se verificó en gel de agarosa (Figura 6 A, B) utilizando partidores específicos (Tabla 3). Para llevar a cabo el OE-PCR, se incluyó en el diseño de los partidores reversos de *UP* y de *pHMGS* y partidores directos de *pHMGS* y de *crtE\** (2, 4, 5 y 6 de la Tabla 3; Figura 6 A) 10 bases complementarias a los extremos de los fragmentos a unir (Figura 6 A, I). Además, los partidores directo de *pHMGS* y reverso de *UP* (2 y 4, Tabla 3) añaden un sitio de restricción *HpaI* en las regiones *pHMGS* y *UP*, respectivamente (Figura 6 B y 7 A).

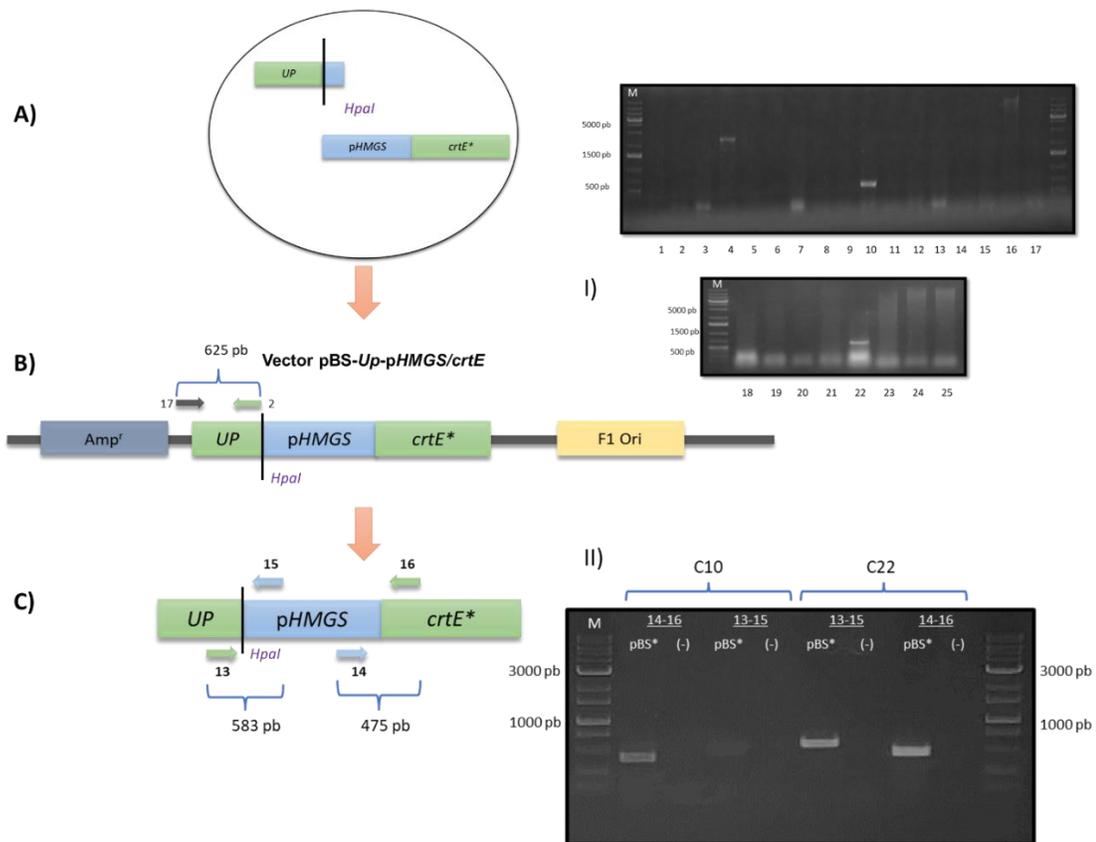


**Figura 6. Representación del vector pBS-pHMGS/crtE y su análisis.** En la figura se ilustra la construcción y análisis del vector. **A)** Se amplificaron los fragmentos de interés; una región río arriba del promotor del gen *crtE* (*UP*), la región promotora del gen *HMGs* (*pHMGS*), y una porción desde el exón 1 hasta 81 pb del exón 4 del gen *crtE* (*crtE\**). **I)** Se diseñaron partidores específicos (Tabla 3), con el objetivo de generar amplicones con 10 bases de complementariedad, permitiendo la unión entre *pHMGS* y *crtE\** mediante OE-PCR. **II)** Se confirmó la amplificación de cada fragmento mediante electroforesis en gel de agarosa. Los números asociados a cada carril representan a los partidores utilizados en las reacciones de PCR, el ADN molde proviene de la cepa silvestre *X. dendrorhous CBS6938*. **B)** Representación del vector pBS-pHMGS/crtE con el sitio de restricción *HpaI* añadido río arriba de *pHMGS*. Los partidores utilizados se destacan como flechas y como pares numéricos en las ilustraciones, y como pares numéricos en las imágenes de los geles de agarosa. M=marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder.

El fragmento *UP* no logró unirse a los restantes por este procedimiento, por lo tanto, se procedió a clonar el fragmento *pHMGS* y *crtE\** en el vector pBS SK- (Figura 6 B), el cual previamente fue digerido con la enzima de restricción *EcoRV* en el sitio de clonamiento múltiple (MCS, *Multiple Cloning Site sequence*) (Figura 4, A), y desfosforilado con la enzima fosfatasa alcalina (FastAp) para impedir su recircularización. Posteriormente ambas enzimas fueron inactivadas mediante calor a 75°C durante 5 min, para no alterar los siguientes pasos. Mediante la acción de la enzima T4 ADN ligasa se

ligó el fragmento de ADN p.*HMGS-crtE\**, previamente fosforilado con la enzima T4 PNK, al vector para su posterior replicación y manipulación. Este se transformó en la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante electroporación y se seleccionó y analizó mediante PCR de colonia, obteniendo un resultado positivo con el vector pBS-p*HMGS/crtE*, el cual fue evaluado con partidores específicos (Tabla 3).

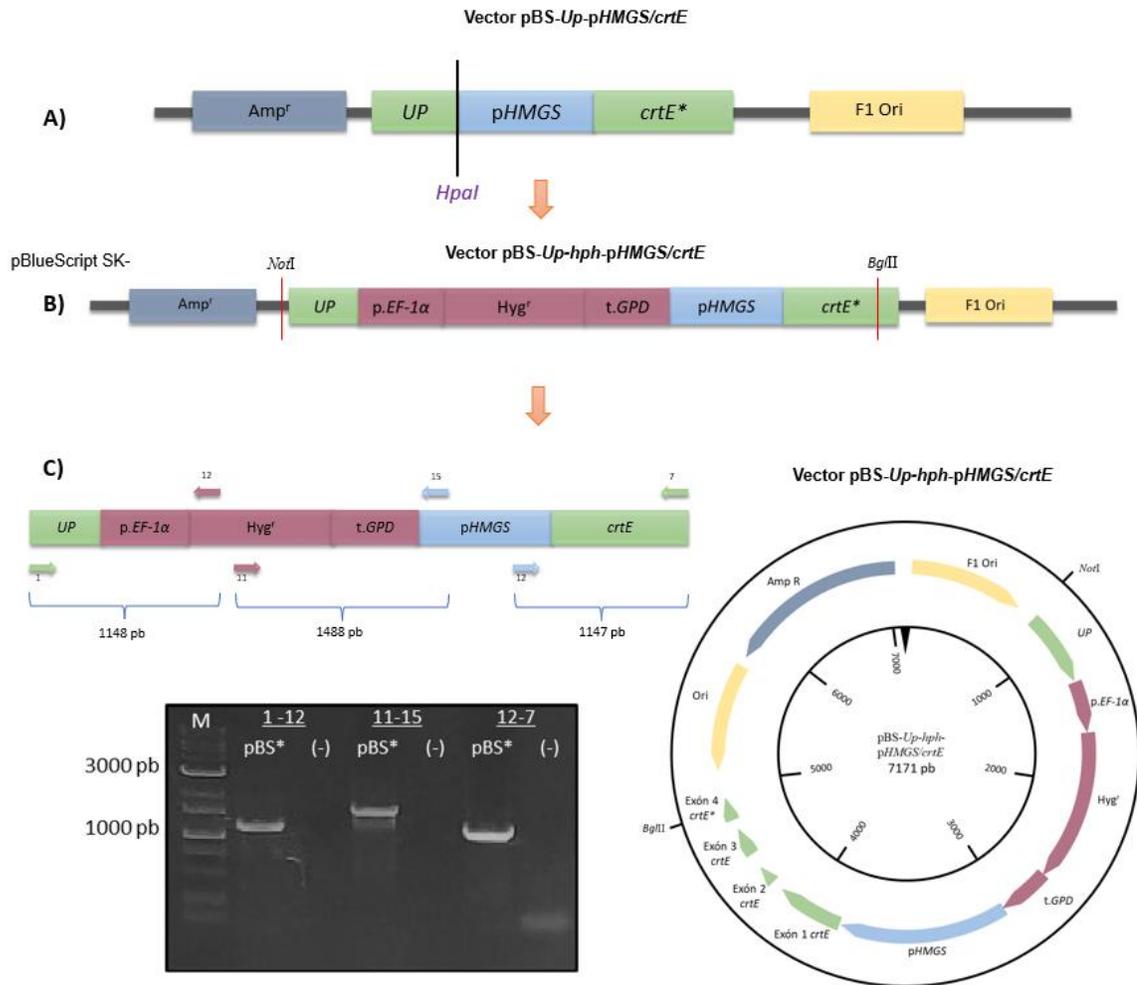
A partir de esta colonia se aisló ADN plasmidial mediante el Gene JET Plasmid Miniprep Kit, se obtuvo el plásmido pBS-p*HMGS/crtE*, y debido a que el partidador directo de p*HMGS* agregó un sitio de digestión enzimática *HpaI* (romo), este se linealizó con esta enzima, seguido por tratamiento con la enzima fosfatasa alcalina (FastAp) para impedir la recircularización del plásmido. Luego se ligó el fragmento *Up* utilizando la enzima T4 ADN ligasa, el cual previamente fue fosforilado con la T4 PNK. Se transformaron células de *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante electroporación y se obtuvieron dos positivos, denominados C10 y C22 portadores del módulo *UP- pHMGS/crtE\** (Figura 7 B, I, II), previo análisis de 25 transformantes por PCR de colonia, con el uso de partidores numerados como 17 y 2 (Tabla 3, Figura 7 B, I), los plásmidos se purificaron para luego ser analizados mediante PCR con partidores específicos (Figura 7 C, Tabla 3) corroborando su correcta inserción (Figura 7 C, II), consiguiendo el vector pBS-*Up-pHMGS/crtE*.



**Figura 7. Representación y análisis del vector pBS-Up-pHMGS/crtE.** En la figura se ilustra la construcción y análisis del vector. **(A)** Región río arriba del promotor del gen *crtE* (*UP*), amplificada por PCR añadiendo un sitio de restricción *HpaI*, junto a *pHMGS/crtE\** conseguida mediante OE-PCR. **(B)** Representación del vector pBS-Up-pHMGS/crtE con el sitio de restricción *HpaI* agregado río abajo de *UP*, junto a los partidores utilizados para evaluación mediante PCR de colonia, **I)** en donde se seleccionaron dos colonias positivas (C10 y C22), las cuales fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa; en la imagen los números sobre cada carril representan a los partidores 17-2 (Tabla 3) utilizados en las reacciones de PCR. **(C)** Análisis del módulo que contiene *Up-pHMGS/crtE\**, para lo cual se amplificó mediante PCR utilizando partidores específicos (Tabla 3); **II)** en la imagen del gel de agarosa los números sobre cada carril representan a los partidores utilizados en las reacciones de PCR. El ADN molde proviene de las dos colonias positivas (C10 y C22) que contienen el módulo *Up-pHMGS/crtE*. (-) representa el control sin ADN. 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 imágenes de los gels de agarosa.

Se añadió un sitio *HpaI* en el partidor reverse de *UP* (Figura 7 A y 8 A), lo que permitió la incorporación de un módulo que confiere resistencia a higromicina B (*hph*)

en este sitio (Figura 8 B, C). Después de verificar el vector resultante, pBS-*Up-pHMGS/crtE*, el módulo de *hph* fue agregado. El módulo *hph* fue amplificado utilizando partidores específicos (Tabla 3), simultáneamente el vector pBS-*Up-pHMGS/crtE* fue digerido con la enzima *HpaI* (Figura 8 A), y luego se ligó con la enzima T4 ADN ligasa. Finalmente, células de *E. coli* DH5 $\alpha$  fueron transformadas mediante electroporación y se seleccionaron transformantes aleatoriamente. Estos transformantes fueron analizados mediante PCR de colonia, uno de ellos mostró un resultado positivo para el vector pBS-*Up-hph-pHMGS/crtE*, el cual fue verificado mediante amplificación por PCR utilizando partidores ubicados en zonas intermedias de cada fragmento (Tabla 3, Figura 8). Este enfoque no solo permitió confirmar la inserción del *hph*, sino que también proporcionó información temprana sobre la orientación del módulo *Up-hph-pHMGS/crtE* en el vector pBS (Figura 8), la cual se respaldó posteriormente mediante análisis de secuenciación.



**Figura 8. Representación del análisis del vector pBS-Up-hph-pHMGS/crtE.** A) Se utilizó la enzima de restricción *HpaI* para digerir el plásmido pBS-Up-pHMGS/crtE\* e insertar el fragmento *hph*. B) Se obtuvo el vector modificado con el módulo de resistencia a Higromicina B, denominado pBS-Up-hph-pHMGS/crtE\*. C) La verificación del vector se realizó mediante la amplificación de tres regiones diferentes con partidores específicos (detallados en Tabla 3). En la imagen del gel de agarosa, los números en la parte superior de los carriles indican los partidores usados en las reacciones de PCR. El ADN molde provino del vector que contenía el módulo *Up-pHMGS/crtE\**. La Figura muestra el Plásmido pBS-Up-hph-pHMGS/crtE con su orientación correspondiente, composición detallada y sitios de restricción enzimática (*NotI* en la región *Up* y *BglII* en la región del exón 4) para el proceso de digestión y posterior purificación del fragmento de ADN transformante de las cepas utilizadas en el estudio: cepa silvestre *CBS6938* y las cepas mutantes *CBS.cyp61* y *CBS.SREIN.FLAG* de *X. dendrorhous*. M=marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder. (-) representa en control sin ADN. Los partidores utilizados están señalados con flechas y números en las figuras, así como pares numéricos en la imagen del gel de agarosa.

## 2.2. Análisis de la secuenciación de módulo en el Vector pBS-Up-hph-pHMGS/crtE

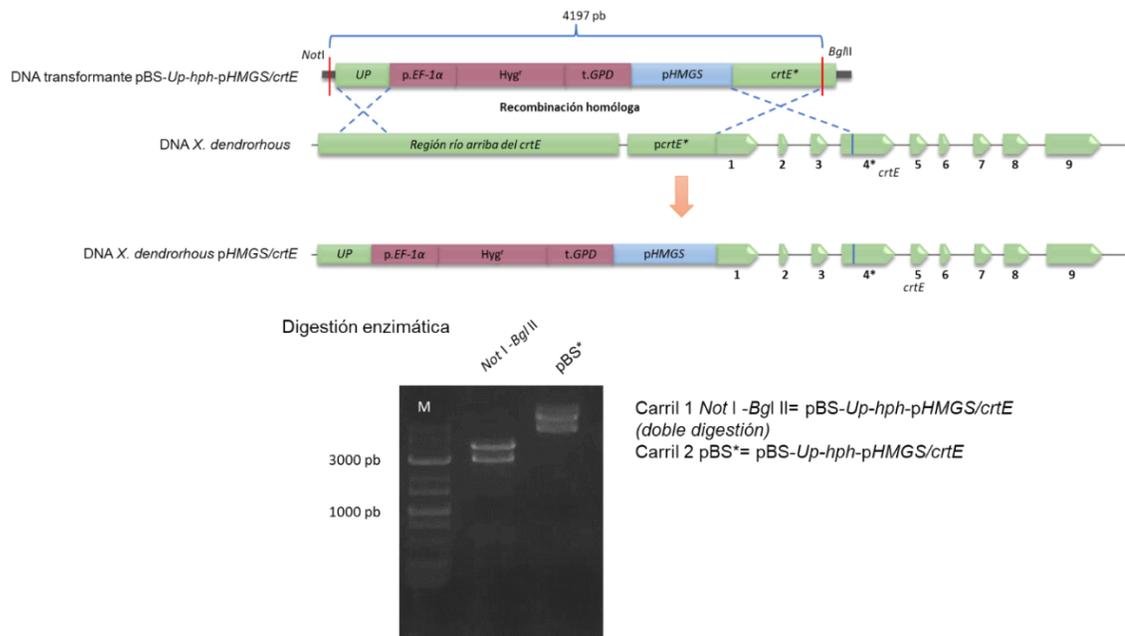
Con el propósito de verificar la correcta construcción de las secuencias diseñadas y manipuladas en este estudio, se procedió a secuenciar el plásmido pBS-Up-hph-pHMGS/crtE (Figura 8). Se diseñaron partidores específicos para amplificar las regiones de interés; *Up*, pHMGS y gen *crtE*\* del módulo (detallados en la Tabla 3), los datos de secuenciación presentados en formato ABIF, fueron evaluados empleando el software bioinformático Geneious Prime Versión 2022.2.2. Inicialmente, se realizó un proceso de limpieza de las secuencias en los extremos (*Trimming*). Este paso tuvo como objetivo eliminar bases con calidad de lectura (*reads*) deficiente, fragmentos que pertenezcan al vector, secuencias altamente repetidas o cualquier posible contaminante, debido a que estas regiones pueden interferir con el ensamblaje. Posteriormente, se llevó a cabo un ensamblaje de *novo* utilizando las secuencias depuradas que compartían regiones comunes. Esto permitió identificar solapamientos (*overlaps*) entre las lecturas, los cuales dieron lugar a la formación de dos contigs, denominados contig 1 y contig 2.

Las lecturas de las secuencias generadas *in silico* se alinearon contra pBS-Up-hph-pHMGS/crtE. Las que conforman el contig 1, cuya secuencia consenso generó coincidencia con las regiones comprendidas entre el terminador del gen *hph* (t.GPD) y el exón 4 del gen *crtE*, mostraron la mayor profundidad (8 lecturas), mientras que las lecturas del contig 2 generaron coincidencia con la región río arriba del gen *crtE* denominada UP. Las lecturas de las secuencias de los contigs alineados con pBS-Up-hph-pHMGS/crtE mostraron un 97,5% de identidad.

En relación a la región *pHMGS*, se identificó una similitud del 100% con respecto al molde de referencia. Los fragmentos de PCR y la secuencia promotora del gen *HMGS* molde fueron obtenidos a partir de la cepa *CBS6938*.

### **3. Transformación de la cepa silvestre *CBS6938* y las cepas mutantes *CBS.cyp61<sup>-</sup>* y *CBS.SREIN.FLAG* de *X. dendrorhous* con módulo de reemplazo del promotor del gen *crtE* por el del *HMGS***

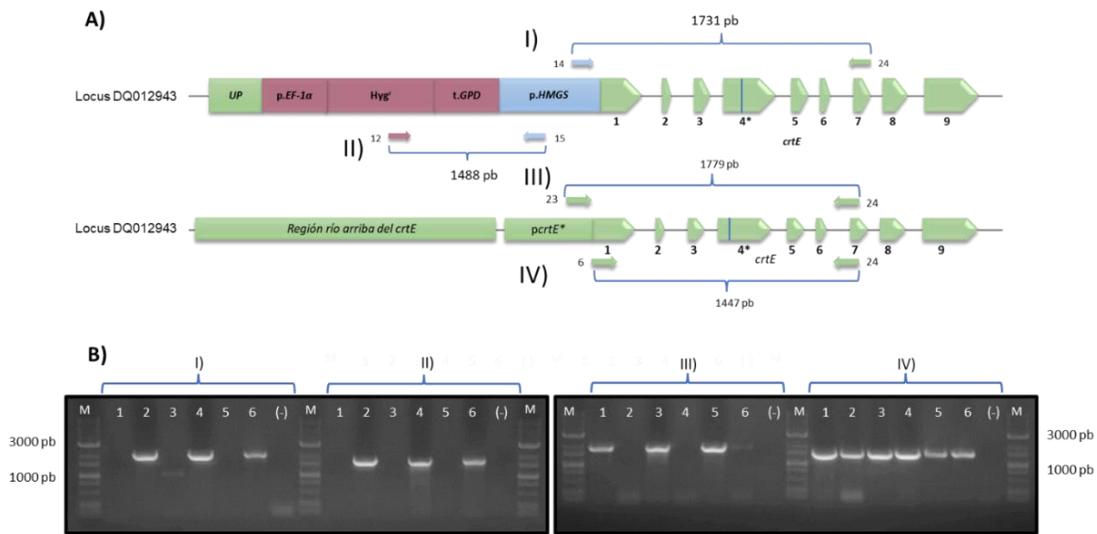
Para estudiar la funcionalidad del gen *crtE* bajo la dirección de *pHMGS* en relación a la producción de carotenoides y esteroides en *X. dendrorhous*, se construyeron las cepas *CBS.pHMGS/crtE*, *CBS.cyp61<sup>-</sup>.pHMGS/crtE* y *CBS.SREIN.FLAG.pHMGS/crtE* a partir de la cepa *CBS6938* (sensible a zeocina e higromicina B), *CBS.cyp61<sup>-</sup>* (sensible a higromicina B) y *CBS.SREIN.FLAG* (sensible a higromicina B), respectivamente, utilizando ADN del vector *pBS-Up-hph-pHMGS/crtE* construido previamente (Figura 9). Mediante doble digestión enzimática con *NotI* y *BglII* se liberó el módulo *Up-hph-pHMGS/crtE* del plásmido, el cual porta un módulo que otorga resistencia a higromicina B entre la región *UP*, y *pHMGS*, que permitió posteriormente la selección de colonias positivas, mientras que las regiones *UP* y *crtE\** que comprenden los exones 1, 2, 3 y 32 pb del exón 4 del gen *crtE*, permitieron el reemplazo del promotor del gen *crtE* nativo mediante un evento de doble recombinación homóloga en *X. dendrorhous* (Figura 9).



**Figura 9. Representación del vector pBS-Up-hph-pHMGS/crtE y su proceso de digestión enzimática e integración del ADN transformante en el genoma de *X. dendrorhous*.** El vector pBS-Up-hph-pHMGS/crtE fue digerido con las enzimas *NotI* y *BglIII* liberando un fragmento de 4.197 pb correspondientes al ADN transformante. Este se integra en el ADN genómico de *X. dendrorhous* mediante un evento de doble recombinación homóloga (representado en las líneas punteadas y azules) reemplazando el promotor nativo del gen *crtE* por el promotor del gen *HMGS*, junto a la incorporación de un módulo de resistencia a higromicina B para selección de recombinantes. En la imagen, en el carril 1 se observa la digestión enzimática con *NotI* y *BglIII* simultáneamente permitiendo la liberación del ADN de 4.197 pb para transformar a *X. dendrorhous*. El carril 2 corresponde a pBS-Up-hph-pHMGS/crtE sin digerir. M= marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder.

Una vez que se transformaron las diferentes cepas: *CBS6938*, *CBS.cyp61* y *CBS.SREIN.FLAG*, las células se incubaron a 22°C, durante 72 h en placas YM-agar suplementadas con antibiótico (higromicina B, 35 ug/ml), como resultado se obtuvieron colonias transformantes de *X. dendrorhous*. Se seleccionaron 3 colonias de cada cepa, que poseían el mayor tamaño y se cultivaron nuevamente en placas YM-agar, para llevar a cabo la extracción de ADN genómico con el fin de confirmar la exitosa sustitución del promotor nativo del gen *crtE* por el del promotor del gen *HMGS* (pHMGS/crtE) (Figura

10). Los mutantes obtenidos fueron denominados como: *CBS.pHMGS/crtE*, *CBS.cyp61<sup>-</sup>.pHMGS/crtE* y *CBS.SREIN.FLAG.pHMGS/crtE* derivados de las cepas parentales *CBS6938*, *CBS.cyp61<sup>-</sup>* y *CBS.SREIN.FLAG*, respectivamente. La Figura 10 muestra la inserción del módulo de reemplazo del promotor del gen *crtE* por *pHMGS* en las 3 cepas estudiadas y se comparó con las cepas parentales, las cuales poseen su promotor nativo.



**Figura 10. Representación y verificación de la integración del ADN transformante con el módulo *Up-hph-pHMGS/crtE* en el genoma de *X. dendrorhous*.** La integración del módulo que contiene el promotor del gen *HMGS*, en el locus DQ012943 del gen *crtE*, sustituyendo al promotor nativo del gen *crtE*, se verificó utilizando como control el ADN de las cepas parentales: *CBS6938* y las mutantes *CBS.cyp61<sup>-</sup>* y *CBS.SREIN.FLAG*. Cada numeral romano (I, II, III y IV) corresponde a una reacción de PCR utilizada para evaluar la correcta inserción, señalando el tamaño del producto amplificado en número de pares de bases (pb). La reacción III solo amplifica en las cepas parentales, mientras que la reacción IV corresponde a un control positivo. **A)** En la ilustración se representa el producto resultante con el módulo, *Up-hph-pHMGS/crtE* integrado en la región de interés, comparado con el locus DQ012943 del gen *crtE* sin modificación de su promotor. **B)** La imagen de los geles de agarosa muestra la verificación mediante PCR de la inserción del módulo *Up-hph-pHMGS/crtE*. Los números (1 al 6) asignados al ADN molde corresponden a las siguientes muestras: *CBS6938* (1), *CBS.cyp61<sup>-</sup>* (3) y *CBS.SREIN.FLAG* (5) para las cepas parentales, y para las cepas transformantes: *CBS.pHMGS/crtE* (2), *CBS.cyp61<sup>-</sup>.pHMGS/crtE* (4) y *CBS.SREIN.FLAG.pHMGS/crtE*

(6). M= marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder. (-) Carril que representa el control negativo de la reacción de PCR sin ADN.

#### **4. Evaluación del efecto del reemplazo del promotor nativo del gen *crtE* por el promotor del gen *HMGS* en las cepas construidas de *X. dendrorhous*.**

En todos los ensayos presentados a continuación, las cepas mutantes obtenidas en este trabajo se evaluaron en comparación a las parentales de las que derivan.

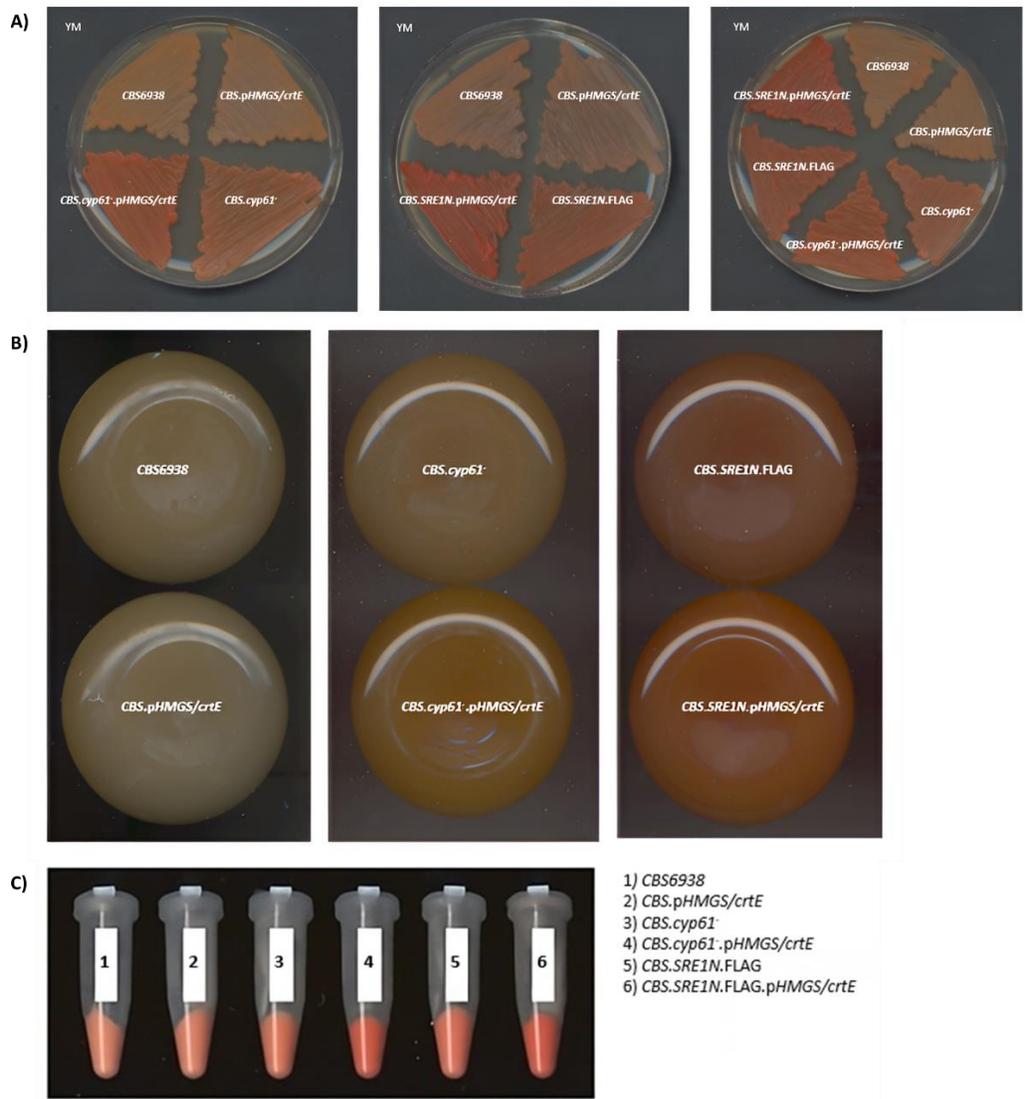
Una vez completado el proceso de selección de transformantes en medio YM-agar semisólido, y después de su confirmación mediante PCR, se procedió a realizar los ensayos con las cepas parentales y mutantes cultivados en medio YM líquido, llevando a cabo una curva de crecimiento durante 5 días a 22°C con agitación constante. Después de 120 h de crecimiento, se extrajeron muestras para su posterior análisis en cuanto fenotipo de color, producción de carotenoides y esteroides y extracción de ARN para evaluar los niveles de transcritos del gen *crtE*. La cantidad de carotenoides y esteroides fue evaluada mediante la medición de la absorbancia a 474 nm y 280 nm, respectivamente; mientras que la composición de carotenoides se analizó utilizando cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC).

#### **4.1. Fenotipo de las cepas transformantes**

##### **4.1.1. Fenotipo de color**

Para evaluar el efecto de las modificaciones genéticas en las cepas transformantes en cuanto a su fenotipo de color, se realizaron tres ensayos de manera simultánea. i) Se sembraron en medio YM semi-sólido las cepas generadas en este estudio: *CBS.pHMGS/crtE*, *CBS.cyp61.pHMGS/crtE* y *CBS.SRE1N.FLAG.pHMGS/crtE*, junto a

sus respectivas cepas parentales (Figura 11, A). ii) Además, todas las cepas se cultivaron en matraces con medio YM-líquido (Figura 11, B). iii) Por último, se recolectó un pellet de cada cepa cultivada en medio YM-líquido, y se transfirió a tubos Eppendorf de 1,5 ml, eliminando el sobrenadante (Figura 11, C). En todos los ensayos, ilustrados en la Figura 11 A, B y C, se observó lo siguiente: la cepa *CBS.cyp61.pHMGS/crtE* presentó un aumento en su pigmentación con respecto a la cepa parental *CBS.cyp61*; de manera similar, la cepa *CBS.SREIN.FLAG.pHMGS/crtE* evidenció un cambio de coloración más intenso, con respecto a su parental *CBS.SREIN.FLAG*; en contraste, la cepa *CBS.pHMGS/crtE* no presentó cambios en su pigmentación en comparación a la cepa silvestre *CBS6938*.



**Figura 11. Comparación de fenotipos de color entre las cepas mutantes de *X. dendrorhous* y sus parentales. A) Placas YM (agar 1,5%) incubadas a 22°C durante 72 h. Se muestran las cepas *CBS6938*, *CBS.pHMGS/crtE*, *CBS.cyp61<sup>-</sup>*, *CBS.cyp61<sup>-</sup>.pHMGS/crtE*, *CBS.SRE1N.FLAG*, y *CBS.SRE1N.FLAG.pHMGS/crtE*. B) Cepas incubadas en medio YM-líquido a 22°C, con agitación constante durante 120 h. C) Pellets obtenidos a partir de las cepas cultivadas en medio YM-líquido a 22°C durante 120 h, enumerados del 1 al 6 para cada cepa en estudio. Donde: *CBS6938*= cepa parental silvestre; *CBS.pHMGS/crtE*= mutante de reemplazo de promotor de *crtE* derivado de *CBS6938*; *CBS.cyp61<sup>-</sup>*= cepa parental en donde el gen *CYP61* se encuentra interrumpido por un módulo que otorga resistencia al antibiótico zeocina; *CBS.cyp61<sup>-</sup>.pHMGS/crtE*= mutante de reemplazo de promotor de *crtE* derivado de *CBS.cyp61<sup>-</sup>*; *CBS.SRE1N.FLAG*= cepa parental mutante derivado de *CBS6938* en donde el alelo de *SRE1* fue reemplazado por un alelo que sólo expresa la forma activa, *SRE1N*;**

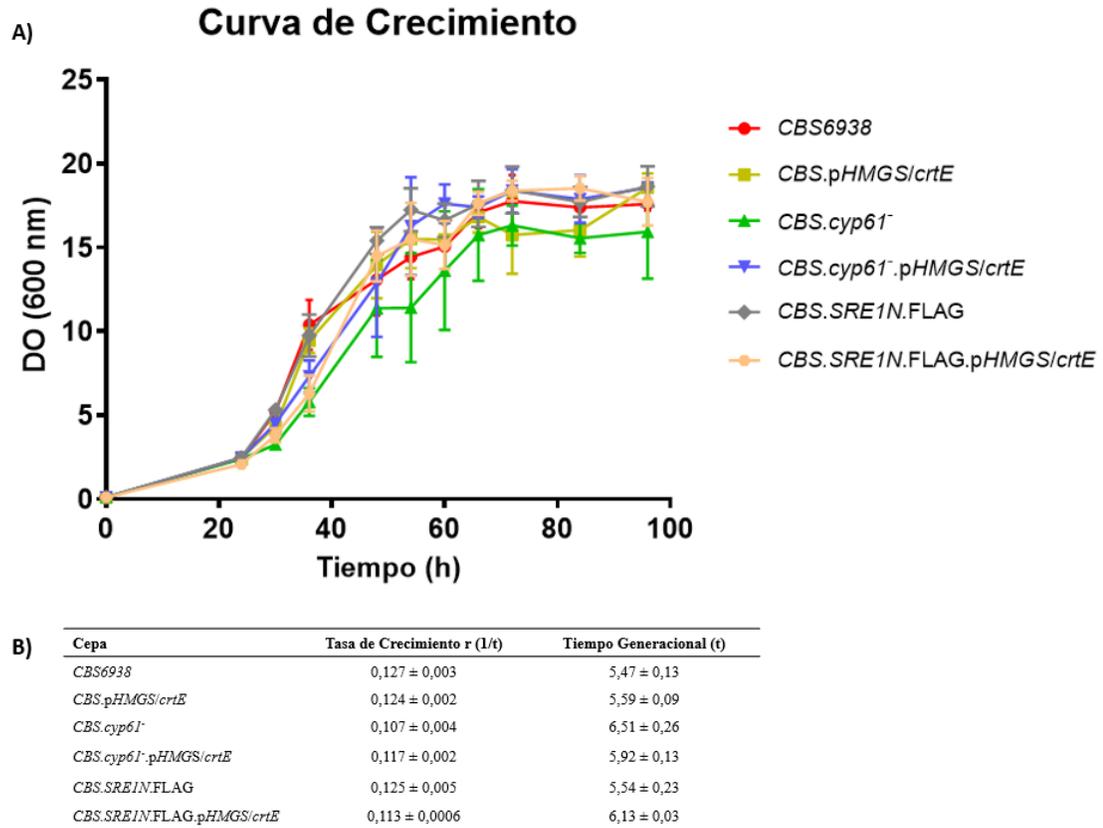
*CBS.SRE1N.FLAG.pHMGS/crtE*= mutante de reemplazo de promotor de *crtE* derivado de SRE1N; *CBS.SRE1N.FLAG*.

#### 4.2. Crecimiento en medio YM-líquido

Con el objetivo de evaluar el crecimiento de las cepas obtenidas en este estudio; *CBS.pHMGS/crtE*, *CBS.cyp61.pHMGS/crtE*, *CBS.SRE1N.FLAG.pHMGS/crtE*, se realizó una curva de crecimiento a partir de un inóculo de cada una de las cepas mutantes y sus respectivas cepas parentales. En este procedimiento las cepas fueron cultivadas en medio YM-líquido a 22°C manteniendo una agitación constante durante 48 h. Al finalizar este período, se registró la densidad óptica (DO) a 600 nm, a partir de estos datos se calculó la cantidad de volumen necesaria para inocular matraces con medio YM-líquido con el objetivo de lograr una DO inicial (t=0) de 0,1, además se realizó un análisis microscópico de muestras de cada cepa descartando contaminaciones (Anexo I).

Las curvas de crecimiento se realizaron por triplicado, cultivando simultáneamente las cepas en medio YM-líquido. Se registró la densidad óptica (DO) a 600 nm cada 12 h, y al cabo de 120 h (Figura 12, A) se colectaron células para los análisis de carotenoides, esteroides y evaluación de niveles de transcritos, las cuales fueron almacenadas a -80°C. Los parámetros cinéticos del crecimiento de las cepas se estudiaron utilizando los puntos registrados durante la fase exponencial. Se calculó la tasa de crecimiento ( $r$ ) y el tiempo generacional ( $t$ ), cabe mencionar que esta aproximación se basó en la recomendación de medir un mínimo de 10 puntos durante la fase exponencial (Zwietering y col., 1990). Estos datos permitieron realizar una comparación del crecimiento entre las cepas mutantes y sus respectivas parentales (Figura 12, B). Los

resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros cinéticos evaluados entre las cepas *CBS.pHMGS/crtE*, *CBS.cyp61<sup>-</sup>.pHMGS/crtE*, *CBS.SRE1N.FLAG.pHMGS/crtE*, con respecto a sus parentales (p-valor<0,01).

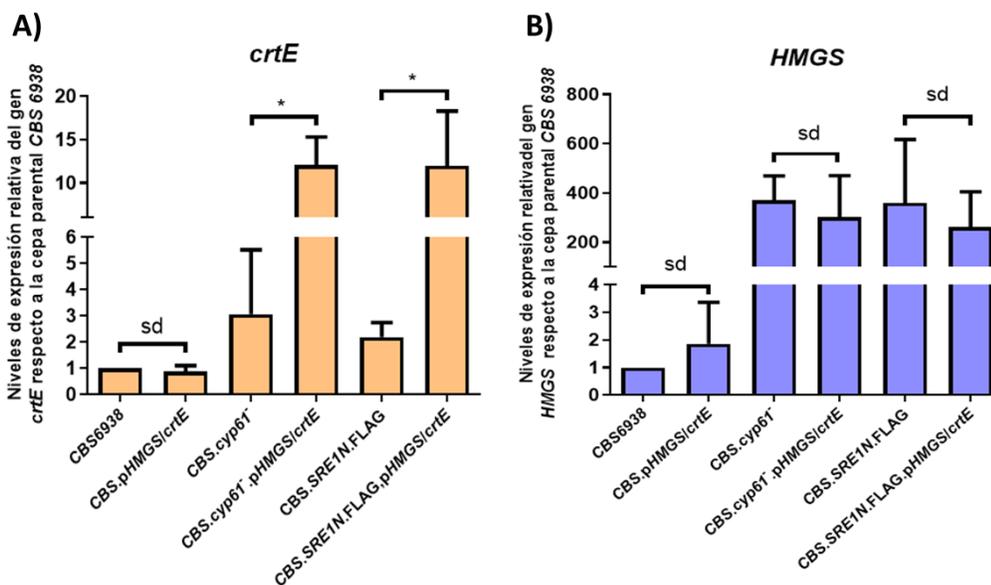


**Figura 12. Curvas de crecimiento y parámetros cinéticos en cuanto a tasa de crecimiento ( $r$ ) y tiempo generacional ( $t$ ) de cada cepa mutante y parental. A)** Curvas de crecimiento de cultivos simultáneos en triplicado, los valores son el promedio  $\pm$  desviación estándar. Las cepas se cultivaron en medio YM-líquido a 22°C en agitación constante y fueron monitoreadas a 600 nm durante 120 h de crecimiento. **B)** Parámetros cinéticos de crecimiento. Se determinaron los valores en cuanto a tasa de crecimiento ( $r$ ) y tiempo generacional ( $t$ ), a partir de la DO, según Zwietering y col., (1990). Los valores son el promedio  $\pm$  desviación estándar del triplicado de cada cepa en estudio.

#### 4.3. Análisis de la expresión a nivel de los transcritos del gen *crtE* en cepas parentales y mutantes.

Con el propósito de confirmar posibles variaciones en los niveles de transcritos del gen *crtE* después de reemplazar su promotor por el del gen *HMGS*, se evaluó los niveles de transcritos del gen *crtE* en las cepas mutantes obtenidas en este trabajo en comparación con sus respectivas parentales. A modo de control, se estudiaron los niveles de transcritos del gen del *HMGS* (Figura 15), cuyos niveles de transcritos han mostrado aumentar con la activación de la vía SREBP (González., 2016) en las cepas *CBS.cyp61<sup>-</sup>* y *CBS.SREIN.FLAG*, para evaluar si el cambio de promotor en el gen *crtE* afectó los niveles de transcritos de *HMGS*. Para normalizar los datos, se midieron los niveles de transcritos del gen *ACT* (*Actina*) de *X. dendrorhous*. Se seleccionó este gen debido a que probablemente no está regulado por la vía SREBP, debido a que desempeña una función diferente, y carece de elementos SRE en su región promotora (Wery y col., 1996).

Se detectaron cambios estadísticamente significativos en los niveles de transcritos del gen *crtE* en las cepas *CBS.cyp61<sup>-</sup>.pHMGS/crtE* y *CBS.SREIN.FLAG.pHMGS/crtE*. Estos niveles aumentaron en más de tres veces en comparación con sus cepas parentales (p-valor<0,05). En contraste, la mutante *CBS.pHMGS/crtE* no presentó cambios significativos respecto a la cepa parental *CBS6938* (Figura 15, A). Por otro lado, al evaluar los niveles de transcritos del gen control, *HMGS*, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las cepas mutantes y sus parentales (\*p-valor<0,05). Estos resultados coinciden con la tendencia previamente descrita por González (2016) en las cepas *CBS.cyp61<sup>-</sup>* y *CBS.SREIN.FLAG* y las mutantes generadas en este trabajo (Figura 15, B).



**Figura 15. Niveles de transcritos de los genes *crtE* y *HMGS* en las cepas parentales y mutantes, determinados mediante RT-qPCR.** Se analizaron los niveles de transcritos en las cepas *CBS6938*, *CBS.pHMGS/crtE*, *CBS.cyp61*, *CBS.cyp61.pHMGS/crtE*, *CBS.SRE1N.FLAG* y *CBS.SRE1N.FLAG.pHMGS/crtE* luego de 120 h de cultivo. **A)** Niveles de transcritos del gen *crtE* y **B)** niveles de transcritos del gen *HMGS*. Se normalizaron con respecto al gen de *Actina* (*ACT*). Los valores corresponden al promedio de 3 réplicas, y las barras de error representan la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de ANOVA y t-Student (\*p-valor<0,05) comparando cada mutante con su cepa parental.

#### 4.4. Análisis de cantidad y composición de carotenoides

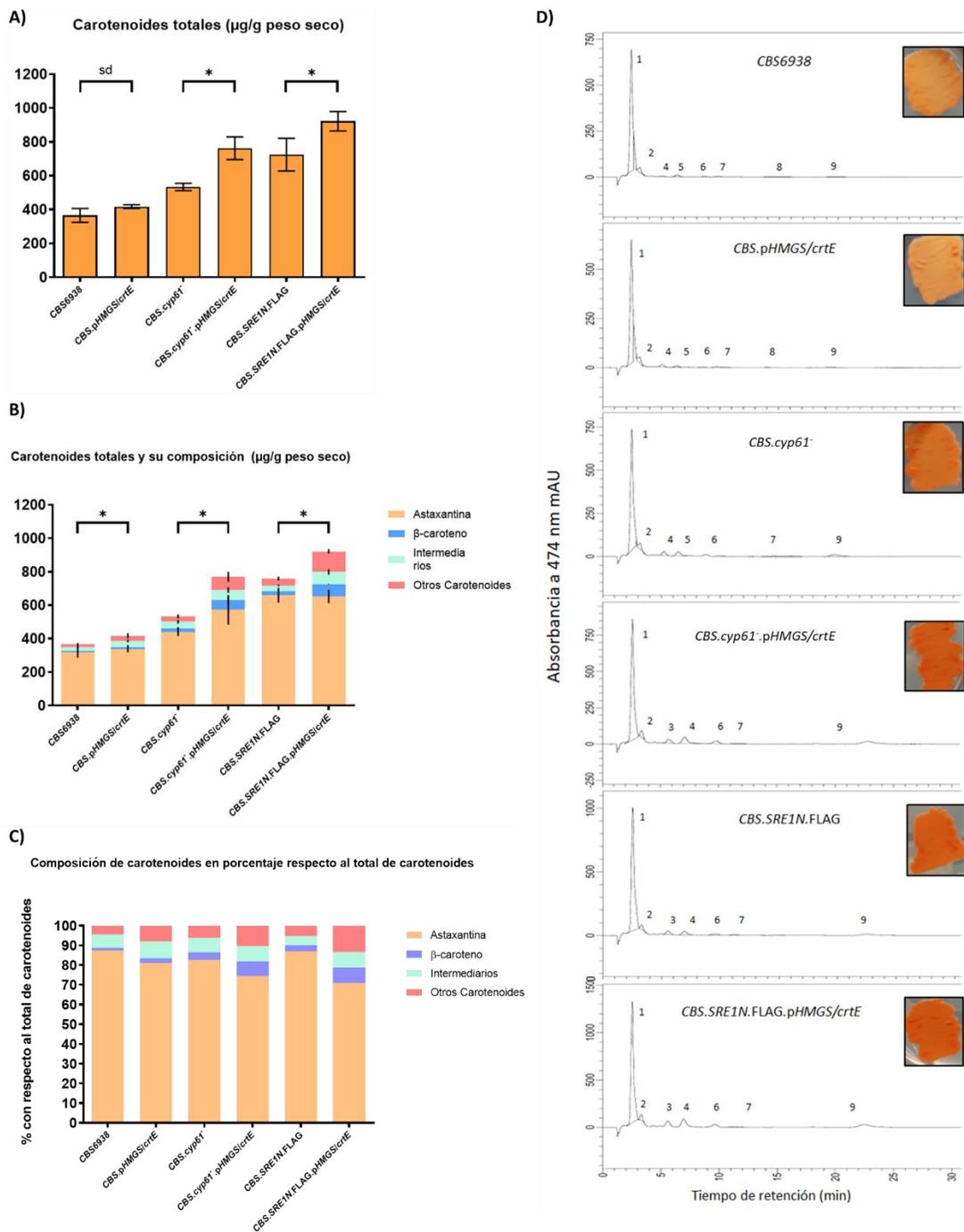
Se colectaron 15 ml de cultivo de cada triplicado de las cepas en estudio luego de 120 h de incubación (fase estacionaria de crecimiento), y se procedió a realizar el análisis en cuanto a la producción de carotenoides. Se determinó la cantidad total de carotenoides producidos por cada cepa y su composición se analizó mediante RP-HPLC (Figura 13, D). Estos datos se agruparon y graficaron de la siguiente manera: astaxantina,  $\beta$ -caroteno, intermediarios de la síntesis de astaxantina desde  $\beta$ -caroteno (phoenicoxantina, OH-equinenona y equinenona) y otros carotenoides (monocíclicos: toruleno, OH-K-toruleno,

cantaxantina y OH-K- $\gamma$ -caroteno) (Figura 13, Tabla 5). La comparación entre las cepas parentales y sus mutantes reveló que entre *CBS6938* y *CBS.pHMGS/crtE* no se observaron diferencias estadísticamente significativas en términos de la cantidad de carotenoides totales (Figura 13, A). Tampoco hubo diferencias en la producción de astaxantina,  $\beta$ -caroteno y otros carotenoides; sin embargo, se identificó una leve diferencia en la cantidad de intermediarios, con un p-valor=0,047 (p-valor<0,05) (Figura 13, B). En relación al porcentaje de producción, se evidenció un cambio en la proporción de astaxantina, que disminuyó de un 87,5% a un 81,1% (Figura 13, C; Tabla 5). Esto podría estar relacionado con el ligero aumento en la cantidad de intermediarios producidos.

Entre las cepas *CBS.cyp61<sup>-</sup>* y *CBS.cyp61<sup>-</sup>.pHMGS/crtE*, se identificaron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad total de carotenoides producidos (Figura 13, A). Esta diferencia se reflejó en la cantidad de astaxantina,  $\beta$ -caroteno, intermediarios de la síntesis de astaxantina y otros carotenoides, los que aumentaron significativamente en la cepa *CBS.cyp61<sup>-</sup>.pHMGS/crtE* (p-valor<0,05) (Figura 13, B). Es relevante señalar que debido al aumento de hasta dos o tres veces (Tabla 5) en la producción de  $\beta$ -caroteno, intermediarios y otros carotenoides, la proporción de astaxantina disminuyó de un 82,5% a un 74,4%, <a pesar de que la cantidad total de astaxantina en la cepa *CBS.cyp61<sup>-</sup>.pHMGS/crtE* es mayor que en la cepa parental *CBS.cyp61<sup>-</sup>* (Figura 13, C; Tabla 5).

Esta tendencia se repitió entre las cepas *CBS.SREIN.FLAG* y *CBS.SREIN.FLAG.pHMGS/crtE*. En la cepa mutante, la cantidad de  $\beta$ -caroteno, intermediarios y otros carotenoides aumentó significativamente, sin embargo, la cantidad de astaxantina no mostró cambios significativos (p-valor<0,05) (Figura 13, B). A nivel porcentual, se

observó una situación análoga a la descrita anteriormente: a pesar de que la cantidad total de astaxantina producida se mantuvo similar entre la cepa parental y la mutante, su proporción disminuyó de un 87% a un 70,7%, debido al incremento significativo en los otros pigmentos detectados ( $\beta$ -caroteno de un 3,1% a un 8,0%, intermediarios de un 4,6% a un 7,9% y otros carotenoides de 5,4% a un 13,4%) (Figura 13, C; Tabla 5).



**Figura 13. Producción y composición de carotenoides totales en las cepas parentales y mutantes.** La extracción de carotenoides se realizó en fase estacionaria, luego de 120 h de cultivo en triplicado para cada cepa. Se determinó la cantidad de carotenoides a 474 nm. **A)** Cantidad de carotenoides totales, normalizados en relación al peso seco de la levadura, expresada en µg/g peso seco. **B)** Carotenoides totales y su composición, normalizada en relación al peso seco de la levadura, expresada en µg/g peso seco,

determinados a 474 nm y 465 nm. Se consideran los carotenoides más abundantes: astaxantina,  $\beta$ -caroteno, intermediarios de la síntesis de astaxantina desde  $\beta$ -caroteno (phoenicoxantina, OH-equinenona y equinenona) y otros carotenoides (monocíclicos: toruleno, OH-K-toruleno, y otros: como cantaxantina y OH-K- $\gamma$ -caroteno). **C**) Composición de carotenoides en relación al 100% de carotenoides producidos por cada cepa. Los valores corresponden al promedio de los datos en triplicado y las barras de error a la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó mediante t-Student (\*p-valor<0,05), comparando cada cepa parental con su mutante. **D**) Análisis de composición de carotenoides mediante RP-HPLC de las cepas en estudio. Los números indican los diferentes carotenoides encontrados: 1: astaxantina; 2: phoenicoxantina; 3: OH-K- $\gamma$ -caroteno; 4: cantaxantina; 5: OH-K-toruleno; 6: OH-equinenona; 7: equinenona; 8: toruleno; 9:  $\beta$ -caroteno.

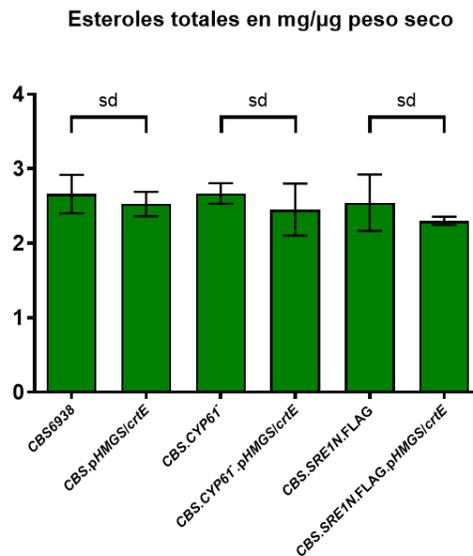
**Tabla 5. Cantidad y composición de carotenoides de las cepas parentales y sus respectivas cepas mutantes de *X. dendrorhous* en ppm ( $\mu\text{g/g}$  peso seco de la levadura).**

Carotenoide	<i>CBS6938</i>	<i>CBS. pHMGS/crtE</i>	<i>CBS.cyp61-</i>	<i>CBS.cyp61-. pHMGS/crtE</i>	<i>CBS.SREIN. FLAG</i>	<i>CBS.SREIN. FLAG. pHMGS/crtE</i>
Astaxantina	320,0 $\pm$ 34,8 <b>(87,6 <math>\pm</math> 3,3)</b>	339,0 $\pm$ 21,6 <b>(81,1 <math>\pm</math> 3,6)</b>	440,1 $\pm$ 24,2 <b>(82,5 <math>\pm</math> 2,9)</b>	572,7 $\pm$ 88,6* <b>(74,2 <math>\pm</math> 7,6)</b>	659,8 $\pm$ 44,0 <b>(86,9 <math>\pm</math> 1,8)</b>	652,0 $\pm$ 40,3 <b>(70,7 <math>\pm</math> 1,5)</b>
Phoenicoxantina **	15,4 $\pm$ 2,9 <b>(4,2 <math>\pm</math> 0,5)</b>	23,7 $\pm$ 2,3* <b>(5,7 <math>\pm</math> 0,5)</b>	21,9 $\pm$ 7,6 <b>(4,1 <math>\pm</math> 1,3)</b>	24,7 $\pm$ 8,4 <b>(3,2 <math>\pm</math> 0,9)</b>	16,4 $\pm$ 1,9 <b>(2,2 <math>\pm</math> 0,3)</b>	22,0 $\pm$ 2,5 <b>(2,4 <math>\pm</math> 0,1)</b>
OH-equinona **	4,2 $\pm$ 2,6 <b>(1,1 <math>\pm</math> 0,6)</b>	7,5 $\pm$ 4,0* <b>(1,8 <math>\pm</math> 1,0)</b>	9,9 $\pm$ 2,4 <b>(1,9 <math>\pm</math> 0,5)</b>	30,7 $\pm$ 7,8* <b>(4,0 <math>\pm</math> 1,2)</b>	9,4 $\pm$ 2,8 <b>(1,2 <math>\pm</math> 0,4)</b>	40,3 $\pm$ 9,2* <b>(4,3 <math>\pm</math> 0,8)</b>
Equinenona **	6,0 $\pm$ 2,3 <b>(1,6 <math>\pm</math> 0,5)</b>	5,7 $\pm$ 1,3 <b>(1,4 <math>\pm</math> 0,3)</b>	7,6 $\pm$ 0,9 <b>(1,4 <math>\pm</math> 0,2)</b>	5,1 $\pm$ 0,6* <b>(0,7 <math>\pm</math> 0,1)</b>	9,0 $\pm$ 0,5 <b>(1,2 <math>\pm</math> 0,0)</b>	10,1 $\pm$ 3,7 <b>(1,1 <math>\pm</math> 0,4)</b>
$\beta$ -caroteno	4,5 $\pm$ 1,9 <b>(1,2 <math>\pm</math> 0,5)</b>	9,2 $\pm$ 4,2* <b>(2,2 <math>\pm</math> 1,1)</b>	21,6 $\pm$ 6,5 <b>(4,1 <math>\pm</math> 1,3)</b>	57,2 $\pm$ 27,3* <b>(7,5 <math>\pm</math> 4,0)</b>	23,4 $\pm$ 1,6 <b>(3,1 <math>\pm</math> 0,3)</b>	73,7 $\pm$ 1,6* <b>(8,0 <math>\pm</math> 0,4)</b>
Fitoeno	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Otros carotenoides	15,5 $\pm$ 8,4 <b>(4,2 <math>\pm</math> 2,0)</b>	32,7 $\pm$ 15,1* <b>(7,8 <math>\pm</math> 3,7)</b>	32,7 $\pm$ 11,3 <b>(6,1 <math>\pm</math> 2,1)</b>	79,4 $\pm$ 11,3* <b>(10,4 <math>\pm</math> 4,1)</b>	40,9 $\pm$ 12,1 <b>(5,4 <math>\pm</math> 1,6)</b>	123,6 $\pm$ 13,4* <b>(13,4 <math>\pm</math> 2,2)</b>
Total carotenoides	366 $\pm$ 41,1 <b>(100)</b>	417,8 $\pm$ 10,4 <b>(100)</b>	533,6 $\pm$ 21,8 <b>(100)</b>	769,9* $\pm$ 63,3 <b>(100)</b>	758,8 $\pm$ 37,1 <b>(100)</b>	921,8 $\pm$ 57,6 <b>(100)</b>

La tabla presenta el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas biológicas. ND= no detectado. \*\* Intermediarios de la síntesis de astaxantina desde  $\beta$ -caroteno; Otros carotenoides: toruleno, OH-k-toruleno, cantaxantina y OH-K- $\gamma$ -caroteno. Los datos en negrita y entre paréntesis corresponden al porcentaje de cada uno respecto al total de carotenoides. El análisis estadístico se realizó mediante t-Student (\*p-valor<0,05) comparando cada cepa mutante con su respectiva parental. En la tabla se indican las diferencias significativas de las cepas mutantes respecto a la cepa parental (\*).

#### 4.5. Análisis de la cantidad de esteroides

A pesar de que el reemplazo del promotor nativo del gen *crtE* por el promotor del *HMGS* (*pHMGS*) afectó principalmente a las cepas mutantes generadas en este estudio, *CBS.cyp61.pHMGS/crtE* y *CBS.SRE1N.FLAG.pHMGS/crtE* derivadas de las parentales *CBS.cyp61* y *CBS.SRE1N.FLAG* en términos de producción y composición de carotenoides (Figura 13, Tabla 5), se observó que este cambio no afectó la cantidad total de esteroides, y aunque se notó una leve disminución ésta no fue estadísticamente significativa (\**p*-valor<0,05) (Figura 14). Por lo tanto, la modificación del promotor del gen *crtE* no afectó la síntesis de esteroides en estas cepas.



**Figura 14. Producción de esteroides en las cepas parentales y mutantes.** La extracción de esteroides se realizó en fase estacionaria, al cabo de 120 h de cultivo, en triplicado para cada cepa. La cantidad de esteroides totales se determinó mediante una medición a 282 nm. Los valores corresponden al promedio de datos de tres cultivos independientes, y las barras de error indican la desviación estándar. Los datos se normalizaron con respecto al peso seco de la levadura. El análisis estadístico se realizó mediante t-Student (*p*-valor<0,05), comparando cada cepa mutante con su respectiva parental, en donde sd: sin diferencias significativas.

## Discusión

La vía SREBP ha sido ampliamente estudiada en diversos microorganismos, tales como *S. pombe*, *A. fumigatus* y *C. neoformans*, y cumple un rol de activación de la transcripción, similar a lo observado en mamíferos, para mantener de homeostasis de esteroides en la célula (Carrillo-Muñoz y col., 2006). La activación de la vía SREBP ha sido descrita en hongos filamentosos y levaduras, y se cree que también estaría regulada por los niveles de oxígeno celular, como por la disminución en los niveles de esteroides en la célula. En el Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, se ha demostrado que esta vía está presente en *X. dendrorhous* y es operativa, donde se designó como Sre1 al factor de transcripción de la vía SREBP (Gutiérrez y col., 2019). Además, se han confirmado algunos genes blanco de la regulación por Sre1 involucrados en la vía del MVA, síntesis de ergosterol y de carotenoides (Gómez y col., 2020b). Considerando que mutaciones en genes relacionados con la MVA, biosíntesis de carotenoides y/o la biosíntesis de esteroides, podrían tener un impacto en la producción total de pigmentos y/o ergosterol, el objetivo de esta tesis consistió en estudiar el efecto en la producción de carotenoides y esteroides en mutantes de *X. dendrorhous* que expresan el gen *crtE* (que controla el primer paso específico de la síntesis de carotenoides) bajo el promotor del gen *HMGS* (gen de la MVA). La elección de este promotor se basó en investigaciones previas de González. (2016), Gutiérrez y col. (2019) y recientemente de Gómez y col. (2020b); quienes identificaron la presencia de al menos dos sitios de unión de la proteína Sre1 en el promotor de *HMGS*. Además, los niveles de transcrito de *HMGS* aumentan en cepas que poseen al factor Sre1 en su forma activa, los que disminuyen

alcanzando los niveles de la cepa silvestre cuando se elimina el gen de Sre1, confirmando que el gen *HMGS* es regulado por Sre1 (Gutiérrez y col., 2019). De esta manera, el gen *HMGS* ha sido utilizado como indicador de activación de la vía SREBP en *X. dendrorhous*.

Interesantemente el gen *crtE* también es blanco de Sre1, sin embargo, la secuencia identificada (Gómez y col. 2020b) se encuentra ubicada en la hebra antisentido (3' a 5'), lo que ha demostrado una afinidad muy baja o nula en condiciones *in vitro* en la levadura *S. pombe*, con secuencias SRE identificadas en diferentes genes como *SRE1*, *HEM13*, *ERG3* y *OSMI* en la hebra antisentido (Todd y col., 2006).

Tomando en consideración los antecedentes es que se planteó como hipótesis que la expresión del gen *crtE* bajo la dirección del promotor del gen *HMGS* en cepas que poseen la vía SREBP activa favorecerá la síntesis de carotenoides.

Para confirmar que no hubiera actualizaciones en cuanto a los datos sobre los sitios de unión de Sre1 en el promotor de *HMGS*, se realizó una búsqueda en las plataformas TBFIND y JASPAR, confirmando los mismos resultados previamente descritos, en cuanto a las secuencias y sitios encontrados.

Para evaluar el efecto del reemplazo de promotor nativo del gen *crtE* por el promotor del gen *HMGS*, se construyó un módulo que contenía 1.012 pb de la región promotora del *HMGS* y una porción del gen *crtE*, desde el codón de inicio de la traducción en el exón 1 hasta parte del exón 4 (32 pb). Esta porción actuó como una región río abajo (*DOWN*) para permitir la recombinación para reemplazar el promotor de dicho gen.

Además, se incorporó un gen de resistencia a Higromicina B para seleccionar a los transformantes, y una región río arriba (*UP*) del promotor del gen *crtE*, que también funcionó como una región de recombinación. El módulo construido fue analizado, y no se identificaron mutaciones en los exones del *crtE*, que pudieran potencialmente alterar el marco de lectura o a la proteína codificada. Del mismo modo, no se observaron alteraciones en la región del promotor *HMGS* que pudieran afectar los sitios de unión de Sre1. Con estos resultados se pudo continuar con el siguiente paso en la investigación.

Se transformó la levadura *X. dendrorhous* con el módulo previamente construido y analizado, las cepas *CBS6938* (cepa silvestre), *CBS.cyp61<sup>-</sup>* (mutante que no produce ergosterol, pero sí es sobreproductora de carotenoides, Loto y col., 2012) y *CBS.SREIN.FLAG* (mutante que solo expresa la forma activa de Sre1 (su dominio N-terminal) y por ello sobreproduce carotenoides, Gutiérrez y col., 2019). Mediante ensayos de *western blot* se había confirmado que las cepas *CBS.cyp61<sup>-</sup>* y *CBS.SREIN.FLAG* poseen al factor de transcripción Sre1 en su forma activa (Gómez y col., 2020b).

En este trabajo, se obtuvieron las siguientes cepas transformantes; *CBS.cyp61<sup>-</sup>.pHMGS/crtE* y *CBS.SREIN.FLAG.pHMGS/crtE*. Se observaron cambios detectables a simple vista en cuanto a su fenotipo de color en comparación con las cepas parentales, *CBS.cyp61<sup>-</sup>* y *CBS.SREIN.FLAG*, respectivamente. Estos cambios se manifestaron en términos de brillo y una intensificación de la pigmentación, que se tornó más rojiza. Por otro lado, la cepa mutante *CBS.pHMGS/crtE*, que deriva de la cepa silvestre (*CBS6938*), no presentó alteraciones visibles en su pigmentación, ni en su aspecto de brillo. Esto era esperable, debido a que su parental, la cepa *CBS6938*, no presenta la vía SREBP activada

bajo las condiciones de cultivo utilizadas a diferencia de las cepas *CBS.cyp61<sup>-</sup>* y *CBS.SREIN.FLAG* (Gutiérrez y col., 2019). Además, la mutación generada en este trabajo no consistió en activar la vía SREBP, sino más bien en favorecer la síntesis de carotenoides en cepas con la vía SREBP activada. En consecuencia, el reemplazo de promotor en el gen *crtE* no provocó modificaciones a nivel visual en la cepa *CBS6938*, no obstante, este cambio sí tuvo un efecto en las cepas *CBS.cyp61<sup>-</sup>* y *CBS.SREIN.FLAG*.

Los análisis de crecimiento realizados en las cepas mutantes *CBS.pHMGS/crtE*, *CBS.cyp61<sup>-</sup>.pHMGS/crtE* y *CBS.SREIN.FLAG.pHMGS/crtE* no revelaron diferencias estadísticamente significativas en comparación a las cepas parentales; sin embargo, al realizar comparaciones entre las cepas mutantes y entre las cepas parentales se observaron sutiles diferencias en términos de tasa de crecimiento y tiempo generacional. Estas diferencias, no fueron estadísticamente significativas.

Desde los cultivos utilizados para construir las curvas de crecimiento de las tres cepas parentales y sus transformantes, que fueron realizados en triplicado para cada cepa, luego de 120 h de cultivo se colectaron muestras para extracciones de ARN, carotenoides y esteroides. Este procedimiento se realizó en fase estacionaria de la curva, en donde se observó una mayor pigmentación en las cepas parentales y mutantes en comparación a su aspecto en la fase exponencial. Este hallazgo concuerda con las observaciones previas realizadas por Lodato y col. (2007), Alcaíno y col. (2016) y Córdova y col. (2016), en donde se demuestra que la producción de carotenoides se induce en la fase estacionaria a medida que se agota la glucosa del medio que tiene un efecto represor sobre la carotenogénesis en la levadura *X. dendrorhous*.

El gen *crtE*, involucrado en la síntesis de GGPP, ha sido estudiado en *X. dendrorhous*, demostrando ser un candidato prometedor para mejorar la producción de carotenoides (Alcaíno y col., 2014), es así como se ha demostrado que la sobreexpresión de este gen conduce a un aumento en la síntesis de carotenoides (Hara y col., 2014; Alcaíno y col., 2014). Sin embargo, en el contexto de este estudio, se optó por una estrategia diferente. En lugar de centrarse en la sobreexpresión directa del gen *crtE*, se evaluó reemplazar su promotor por el del gen *HMGS* que presenta sitios SRE. De esta manera, a partir de las muestras de ARN extraídas se analizaron los niveles de transcrito del gen *crtE* para evaluar si el cambio de promotor por el promotor *HMGS* (*pHMGS/crtE*) efectivamente tiene un efecto. Los niveles de transcrito se evaluaron mediante RT-qPCR, lo que reveló cambios estadísticamente significativos en los niveles de transcrito del gen *crtE* en las cepas mutantes *CBS.cyp61<sup>-</sup>.pHMGS/crtE* y *CBS.SRE1N.FLAG.pHMGS/crtE*. Estas cepas experimentaron un incremento de hasta cuatro veces en los niveles de transcritos de *crtE* en comparación con las cepas parentales *CBS.cyp61<sup>-</sup>* y *CBS.SRE1N.FLAG*, respectivamente. Sin embargo, no se observaron diferencias al comparar la cepa *CBS6938* y su mutante *CBS.pHMGS/crtE*. Estos resultados respaldarían los hallazgos previos que han demostrado la importancia de los sitios SRE, debido a que la activación de la vía SREBP incrementa la expresión del gen *HMGS*, como fue observado por González. (2016) y luego por Gutiérrez y col. (2019), quienes detectaron y comprobaron la presencia de sitios de unión SRE en la región promotora, localizada aproximadamente 1000 pb río arriba del codón de inicio del marco de lectura del *HMGS*. Además, los resultados indican que el reemplazo del promotor del gen *crtE* por el

promotor del gen *HMGS* que posee sitios SRE, solo provoca cambios en la expresión de *crtE* en las cepas que poseen la vía SREBP activa.

Para confirmar que la sustitución del promotor no afectara la expresión del gen nativo *HMGS*, se evaluaron sus niveles de transcritos en las cepas obtenidas. Los niveles de transcritos en las cepas mutantes *CBS.cyp61<sup>-</sup>.pHMGS/crtE* y *CBS.SREIN.FLAG.pHMGS/crtE*, mostraron una ligera disminución en comparación a sus respectivas cepas parentales; sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. En contraste, al comparar las cepas mutantes *CBS.cyp61<sup>-</sup>.pHMGS/crtE* y *CBS.SREIN.FLAG.pHMGS/crtE* con la cepa parental *CBS6938*, se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas. La única excepción fue la cepa mutante *CBS.pHMGS/crtE*, la cual mostró un leve aumento en los niveles de transcrito de *HMGS* en relación con la cepa parental, pero este incremento no fue estadísticamente significativo. Estos hallazgos coinciden con lo reportado en otros estudios, donde también se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de transcritos del gen *HMGS*, por ejemplo, Venegas (2018) y Gutiérrez y col. (2019) observaron diferencias significativas entre la cepa *CBS6938* y *CBS.cyp61<sup>-</sup>*. De manera similar, Gutiérrez y col. (2019) detectó diferencias significativas entre la cepa *CBS6938* y *CBS.SREIN.FLAG*. Por lo tanto, el incremento en los niveles de transcritos del gen *crtE* no afectó los niveles de transcritos del gen *HMGS*, sugiriendo que el gen *HMGS* no es regulado por los metabolitos producidos río abajo del paso catalizado por la enzima GGPP sintasa codificada por *crtE*.

Se evaluó fenotípicamente a las cepas mutantes y parentales en relación a la producción y composición de carotenoides. La cepa construida en este trabajo,

*CBS.pHMGS/crtE* no presentó cambios significativos en la cantidad total de carotenoides en comparación con la cepa parental *CBS6938*. Por otro lado, las cepas mutantes *CBS.cyp61<sup>-</sup>.pHMGS/crtE* y *CBS.SRE1N.FLAG.pHMGS/crtE*, mostraron un incremento en la producción de carotenoides totales con diferencias estadísticamente significativas en comparación a *CBS6938* y a sus respectivas cepas parentales *CBS.cyp61<sup>-</sup>* y *CBS.SRE1N.FLAG*. Estos resultados son consistentes con hallazgos previos que describen cambios en la producción de carotenoides debido a mutaciones en genes relacionados con la MVA, la vía de los esteroides y/o los carotenoides. Por ejemplo, se ha documentado un aumento de hasta dos veces en la producción de carotenoides totales en la cepa *CBS.cyp61<sup>-</sup>* con respecto a *CBS6938*, mientras que la eliminación del gen *SRE1* en la cepa *CBS.cyp61<sup>-</sup>* resultó en una disminución en la producción de carotenoides (Gutiérrez., 2019). En estudios similares, Venegas. (2018), observó que la cepa *CBS.cyp61<sup>-</sup>* produce una mayor cantidad de carotenoides totales que la cepa *CBS6938* y otras cepas mutantes. Esto es coherente con investigaciones anteriores que han demostrado que la cepa *CBS.cyp61<sup>-</sup>* no produce ergosterol y es sobreproductora de carotenoides, por lo que este fenómeno podría estar relacionado con un mecanismo dependiente de esteroides. Además, se ha demostrado que la vía SREBP se activa en levaduras y organismos superiores a través de un mecanismo regulado por los niveles de esteroides en la célula (Horton y col., 2003; Hughes y col., 2005; Chang y col., 2007; Gutiérrez y col., 2019). En el caso de la cepa *CBS.SRE1N.FLAG*, en la que se reemplazó el gen de *Sre1* por una versión del gen que sólo expresa la forma activa de *Sre1*, también se ha comprobado que presenta un aumento en la producción de carotenoides totales en comparación con la cepa *CBS6938*, e incluso supera a *CBS.cyp61<sup>-</sup>* (Gutiérrez y col., 2019).

Se ha evidenciado que la sobreexpresión del gen *crtE* en cepas que sobreexpresan genes de la MVA (genes *acaT*, *HMGS* y *HMGR*), conduce a un aumento en la síntesis de carotenoides totales (Hará y col., 2014). Un hallazgo similar fue presentado por Alcaíno y col. (2014), quienes compararon la producción de carotenoides entre la cepa parental UCD 67-385 y diferentes mutantes, una de las cuales contenía una copia adicional del gen *crtE*. Esta modificación resultó en un aumento en la cantidad total de carotenoides, con respecto a la cepa parental. Adicionalmente, se ha observado que la regulación de genes como *crtS* y *crtR*, que están involucrados en la conversión de  $\beta$ -caroteno en astaxantina, puede influir en la composición de carotenoides. Cuando se han detectado bajos niveles de transcritos de los genes carotenogénicos *crtS* y *crtR*, se ha visto un aumento en la fracción de carotenoides intermediarios y una disminución en la fracción de astaxantina (Gómez., 2016). En conjunto, estos hallazgos sugieren que la modificación o alteración de genes, tales como el *crtE*, *crtYB*, *crtR* o *crtS*, en conjunto con alguno de los genes involucrados en la MVA, *HMGS* y/o *HMGR*, podría promover un aumento en la producción de carotenoides totales. Esta tendencia sería más marcada en cepas con la vía SREBP activada, como es el caso de *CBS.cyp61* y *CBS.SREIN.FLAG*, y consecuentemente en las mutantes *CBS.cyp61.pHMGS/crtE* y *CBS.SREIN.FLAG.pHMGS/crtE* que derivan de estas cepas.

Además de los análisis de carotenoides totales, se llevó a cabo un análisis de la composición. En este contexto, se observó que la cepa *CBS.pHMGS/crtE* no presentó variaciones significativas con relación a la cepa *CBS6938*, sin embargo, la cepa mutante *CBS.cyp61.pHMGS/crtE* mostró diferencias significativas en comparación con su cepa

parental *CBS.cyp61*. En este caso, la cantidad de astaxantina aumentó, pero su proporción respecto al total de carotenoides disminuyó debido al incremento de intermediarios tales como  $\beta$ -caroteno, OH-equinenona, y carotenoides monocíclicos, como Toruleno, OH-k-toruleno, Cantaxantina y OH-K- $\gamma$ -caroteno. Esta situación se asemeja con un estudio en el cual se eliminó el gen *STP1*, que codifica una proteasa involucrada en el corte proteolítico del factor de transcripción Sre1 para su activación en la cepa *CBS.cyp61*, donde también se observó un aumento en la proporción de intermediarios y una reducción en la proporción de astaxantina, posiblemente debido a una disminución en la expresión de los genes *crtS* y *crtR* regulados por Sre1 (Gómez., 2016). En cuanto a la cepa mutante *CBS.SREIN.FLAG.pHMGS/crtE* se evidenciaron resultados similares a los descritos cuando se comparó con su cepa parental *CBS.SREIN.FLAG*: se observó un aumento en la producción de  $\beta$ -caroteno, OH-equinenona y los carotenoides monocíclicos, pero los niveles de astaxantina no presentaron cambios significativos en términos de cantidad. Estos resultados señalan que la modificación realizada en el gen *crtE*, favorece la producción total de carotenoides en cepas que poseen la vía SREBP activa (*CBS.cyp61*.*pHMGS/crtE* y *CBS.SREIN.FLAG.pHMGS/crtE*). Sin embargo, este incremento no se reflejó de la misma manera en la producción de astaxantina, acumulándose una mayor cantidad de carotenoides intermediarios en la conversión desde  $\beta$ -caroteno hacia astaxantina, así como de carotenoides monocíclicos. Como estrategia para favorecer la producción de astaxantina en estas cepas, se sugiere sobreexpresar genes implicados en la etapa final de la síntesis de carotenoides, tales como el gen *crtS* de la astaxantina sintasa, el gen *crtR*, o ambos junto con la modificación realizada al gen *crtE*. Actualmente existen investigaciones al respecto, donde la sobreexpresión del gen *crtS* conduce a un incremento

en los niveles de transcritos, lo que a su vez resulta en un aumento en la producción de astaxantina, al mismo tiempo que se reduce la fracción de carotenoides intermediarios en *X. dendrorhous* (Contreras y col., 2013). Por otro lado, la interrupción del gen *crtR* (mediante la inserción de un cassette entre los exones 1 y 2), en las cepas *CBS6938* y UCD 67-385, bloquea la producción de astaxantina (Alcaíno y col., 2008). Del mismo modo, Gutiérrez y col. (2015) observaron en mutantes con el gen *crtR* interrumpido, la acumulación de  $\beta$ -caroteno en lugar de la producción de astaxantina. Esto indica que los genes *crtS* y *crtR* desempeñan un papel esencial en el flujo hacia la síntesis de astaxantina.

Por otra parte, también se evaluó la producción de esteroides en las cepas *CBS.pHMGS/crtE*, *CBS.cyp61<sup>-</sup>.pHMGS/crtE* y *CBS.SREIN.FLAG.pHMGS/crtE*, y se comparó respecto a sus cepas parentales. Los resultados no mostraron cambios significativos en la producción de esteroides, señalando que la modificación efectuada sobre el promotor del gen *crtE* no alteró la producción éstos. Tampoco se detectaron diferencias significativas entre la cepa parental *CBS6938* y las cepas *CBS.cyp61<sup>-</sup>* y *CBS.SREIN.FLAG*. Estos resultados contrastan con algunos estudios anteriores en los que las cepas *CBS.cyp61<sup>-</sup>* y *CBS.SREIN.FLAG* exhibían un leve fenotipo de sobreproducción de esteroides (Venegas., 2018; Gutiérrez y col., 2019). A pesar de estas discrepancias, en ningún caso se ha observado una disminución de esteroides en las cepas *CBS.cyp61<sup>-</sup>* y *CBS.SREIN.FLAG* en comparación con la cepa *CBS6938*. Es importante considerar que estas diferencias podrían deberse a las condiciones experimentales, las cuales pueden variar en diferentes estudios.

## Conclusiones

- El reemplazo del promotor nativo del gen *crtE* por el del gen *HMGS* no produjo cambios en el crecimiento de *X. dendrorhous* cultivada en medio YM líquido o semisólido, ni en la producción de esteroides.
- La modificación realizada favoreció la producción de carotenoides y alteró su composición en las cepas obtenidas que derivan de cepas parentales que poseen la vía SREBP activa.
- Se confirmó un aumento en los niveles de transcritos del gen *crtE* en las mutantes de este trabajo obtenidas a partir de cepas parentales que poseen la vía SREBP activa, lo que podría estar favoreciendo la producción de carotenoides en ellas.
- El aumento en la producción de carotenoides y en los niveles de transcritos del gen *crtE*, no afectó los niveles de transcritos del gen *HMGS* sugiriendo que *HMGS* no es regulado por los metabolitos producidos río abajo del paso catalizado por el producto génico de *crtE*.
- En base a lo demostrado en este estudio, es posible incrementar la producción de carotenoides reemplazando promotores de genes carotenogénicos por promotores de genes regulados por el factor de transcripción Sre1 en cepas que presentan la vía SREBP activa.

## Bibliografía

- Adrio, J.L. y Veiga, M. 1995. Transformation of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnology Techniques*. 9, 509-512.
- Ambati, R. R., Phang, S. M., Ravi S., y Aswathanarayana, y R. G. 2014. Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its comercial aplicaciones-A review. *Marine Drugs*. 12(1), 128-152.
- 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*. *BioMed Central Microbiology*. 8,169.
- Alcaíno, J., Romero, I., Niklitschek, M., Sepúlveda, D., Rojas, M. C., Baeza, M., y Cifuentes, V. 2014. Functional characterization of the *Xanthophyllomyces dendrorhous* farnesyl pyrophosphate synthase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase encoding genes that are involved in the synthesis of isoprenoid precursors. *PLoS One*. 9, e96626.G.
- Alcaíno, J., Bravo, N., Córdova, P., Marcoleta, A. E., Contreras, G., Barahona, S., Sepúlveda, D., Fernández-Lobato, M., Cifuentes, V., y Baeza, M. 2016. The involvement of Mig1 from *Xanthophyllomyces dendrorhous* in catabolic repression: an active mechanism contributing to the regulation of carotenoid production. *PLoS One*. 11(9), e0162838.
- An, G.H., Schuman, D.B. y Johnson, E. A. 1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* with increased astaxanthin content. *Applied and Environmental Microbiology*. 55, 116-124.
- Armstrong, G. A. 1994. Eubacteria show their true colors: genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *Journal of Bacteriology*. 176, 4795-4802.
- Bien, C., Chang, Y., Nes W., Kwon-Chung, K., y Espenshade, P. 2009. *Cryptococcus neoformans* site-2 protease is required for virulence and survival in the presence ofazole drugs. *Molecular Microbiology*. 74(3), 672-690.
- Bien, C. M., y Espenshade, P. J. 2010. Sterol regulatory element binding proteins in fungi: hypoxic transcription factors linked to pathogenesis. *Eukaryotic Cell*. 9(3), 352-359.
- Carrillo-Muñoz, A. J., Giusiano, G., Ezkurra, P. A., y Quindos, G. 2006. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Revista Española de Quimioterapia*. 19(2), 130-139.
- Córdova, P., Alcaíno, J., Bravo, N., Barahona, S., Sepúlveda, D., Fernández-Lobato, M., Baeza, M., y Cifuentes, V., 2016. Regulation of carotenogenesis in the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*: the role of the transcriptional co-repressor complex Cyc- Tup1 involved in catabolic repression. *Microbial cell factories*. 15(1), 193.
- Chang, Y., Bien, C., Lee, H., Espenshade, P., y Kwon-Chung, K. 2007. Stp1p, a regulator of oxygen sensing and sterol homeostasis, required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*. 64(3), 614-629.

- Cheng, B., Yuan, Q., Sun, X., y Li, W. 2010. Enhanced production of coenzyme Q10 by overexpressing HMG-CoA reductase and induction with arachidonic acid in *Schizosaccharomyces pombe*. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 160, 523- 531.
- Chomczynski, P., y Sacchi, N. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*. 1, 581-585.
- Chun, C., Liu, O., y Madhani, H., 2007. Responses to hypoxia during infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathogens*. 3(2), e22.
- De la Fuente, J.L., Rodríguez-Sáiz, M., Schleissner, C., Díez, B., Peiro, E., y Barredo, J.L. 2010. High-titer production of astaxanthin by the semi-industrial fermentation of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of Biotechnology*. 148(2-3), 144-146.
- Dhingra, S., y Cramer, R. A. 2017. Regulation of Sterol Biosynthesis in the Human Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*: Opportunities for Therapeutic Development. *Frontiers in microbiology*. 8, 92.
- Duncan, E., Davé, U., Sakai, J., Goldstein, J., y Brown, M. 1998. Second-site cleavage in sterol regulatory element-binding protein occurs at transmembrane junction as determined by cysteine panning. *Journal of Biological Chemistry*. 273(28), 17801-17809.
- Miziorko, H. M. 2011. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 505, 131-143.
- Gárate, C. S. 2017. Estudio y caracterización del gen *OFD1* de la levadura carotenogénica *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis para optar al título profesional de Ingeniera en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Goldstein, J. L., DeBose-Boyd, R. A., y Brown, M. S. 2006. Protein sensors for membrane sterols. *Cell*. 124(1), 35-46.
- Gómez, M. 2016. 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 para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Gómez, M., Gutiérrez, M., González, A. M., Gárate-Castro, C., Sepúlveda, D., Barahona, S., Baeza, M., Cifuentes, V., y Alcaíno, J. 2020, a. Metallopeptidase Stp1 activates the transcription factor Sre1 in the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of Lipid Research*. 61(2), 229-243.
- Gómez, M., Campusano, S., Gutiérrez, M. S., Sepúlveda, D., Barahona, S., Baeza, M., Cifuentes, V., y Alcaíno, J. 2020, b. Sterol regulatory element-binding protein Sre1 regulates carotenogenesis in the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of Lipid Research*. 61(12), 1658-1674.
- Gómez, M., Baeza, M., Cifuentes, V., y 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.

González, A. M. 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 profesional de Ingeniera en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Guengerich, F. P., 2008. Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. *Chemical Research in Toxicology*. 21(1), 70-83.

Gutiérrez, M. 2019. Caracterización de la vía SREBP dependiente de los niveles de ergosterol y oxígeno en la biosíntesis de carotenoides y ergosterol en *X. dendrorhous*. Tesis para optar al grado de Doctor en ciencias con mención en Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Gutiérrez, M. S., Campusano, S., González, A. M., Gómez, M., Barahona, S., Sepúlveda, D., Espenshade, P. J., Fernández-Lobato, M., Baeza, M., Cifuentes, V., y Alcaíno, J. 2019. Sterol Regulatory Element-Binding Protein (Sre1) Promotes the Synthesis of Carotenoids and Sterols in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 586.

Gutiérrez, M. S., Rojas, M. C., Sepúlveda, D., Baeza, M., Cifuentes, V., y Alcaíno, J. 2015. Molecular characterization and functional analysis of cytochrome b5 reductase (CBR) encoding genes from the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *PLoS One*. 10(10), 1-17.

Hara, Y. K., Morita, T., Mochizuki, M., Yamamoto, K., Ogino, C., Araki, M., y Kondo, A. 2014. Development of a multi-gene expression system in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Microbial Cell Factories*. 13, 175.

Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., y Pease, L. R. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*. 77 (1), 51-59.

Horton, J. D., Shah, N. A., Warrington, J. A., y Goldstein, J. L., 2003. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proceedings of the National Academy Sciences*. 100 (21), 12027-12032.

Hua, X., Sakai, J., Brown, M., y 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.

Hu, Z-C, Zheng, Y-G, Wang, Z, y Shen, Y-C. 2005. Effect of sugar-feeding strategies on astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 21, 771-775.

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

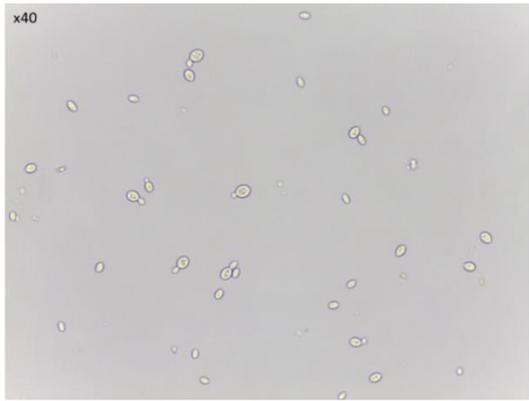
- Hwang, J., Ribbens, D., Raychaudhuri, S., Cairns, L., Gu, H., Frost, A., Urban, S., y Espenshade, P. J., 2016. A golgi rhomboid protease Rbd2 recruits Cdc48 to cleave yeast SREBP. *The EMBO Journal*. 35, 2332-2349.
- Kelly, S., Lamb, D., Corran, A., Baldwin, B., y Kelly, D. 1995. Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the formation of 14 alpha-methylergosta-8,24(28)-dien-3 beta,6 alpha-diol. *Biochemical Biophysical Communications*. 207(3), 910-915.
- Lodato, P., Alcaíno, J., Barahona, S., Niklitschek, M., Carmona, M., Wozniak, A., Baeza, M., Jiménez, A., y Cifuentes, V. 2007. Expression of the carotenoid biosynthesis genes in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biological Research*. 40(1), 73-84.
- 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. S., Barahona, S., Sepúlveda, D., Martínez-Moya, P., Baeza, M., Cifuentes, V., y Alcaíno, J. 2012. Enhancement of carotenoid production by disrupting the C-22-sterol desaturase gene (*CYP61*) in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BioMed Central Microbiology*. 12, 235.
- Mathelier, A., Zhao, X., Zhang, A. W., Parcy, F., Worsley-Hunt, R., Arenillas, D. J., Buchman, S., Chen, C., Chou, A., Lenasescu, H., Lim, J., Shyr, C., Tan, G., Zhou, M., Lenhard, B., Sandelin, A., y Wasserman, W. W. 2013. JASPAR 2014. An extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Research*. 1-6.
- Matsuda, M., Korn, B., Hammer, R., Moon, Y., Komuro, R., Horton, J., Goldstein, J., Brown, M., y Shimomura, I. 2001. SREBP cleavage activating protein (SCAP) is required for increased lipid synthesis in liver induced by cholesterol deprivation and insulin elevation. *Genes & Development*. 15(10), 1206-1216.
- Moon, Y. A. 2017. The SCAP/SREBP Pathway: A Mediator of Hepatic Steatosis. *Endocrinology and Metabolism*. 32(1), 6-10.
- Moon, Y. A., Liang, G., Xie, X., Frank-kamenetsky, M., Fitzgerald, K., Koteliansky, V., Brown, M. S., Goldstein, J. L., y Horton, J. D. 2012. The Scap/SREBP pathway is essential for developing diabetic fatty liver and carbohydrate-induced hypertriglyceridemia in animals. *Cell Metabolism*. 15(2), 240-246.
- März, U. 2022. *The global market for carotenoids*. Business Communications. Report Code: FOD025G. [<https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/carotenoids-global-market-report-fod025g>]. (visitado en octubre 22-2022).
- Nohturfft, A., Brown, M. S., y Goldstein, J. L., 1998. Topology of SREBP cleavage-activating protein, a polytopic membrane protein with a sterol-sensing domain. *Journal of Biological Chemistry*. 273, 17243-17250.

- Ojima, K., Breintenbach, J., Visser, H., Setoguchi, Y., Tabata, K., Hoshino, T., van den Berg, J., y Sandmann, G., 2006. Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a  $\beta$ -carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. *Molecular Genetics and Genomics*. 275(2), 148-158.
- Osborne, T.F. y Espenshade, P. J. 2009. Evolutionary conservation and adaptation in the mechanism that regulates SREBP action: what a long, strange tRIP it's been. *Genes & Development*. 23(22), 2578-2591.
- Párraga, A., Bellsollell, L., Ferré-D'Amaré, A. R., y Burley, S. K. 1998. Co-crystal structure of sterol regulatory element binding protein 1a at 2.3 Å resolution. *Structure* (London, England: 1993). 6(5), 661-672.
- Rawlings, N., y Barrett, A. 2013. Introduction: metallopeptidases and their clans. En: Rawlings N, Salvesen G (eds)., *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Amsterdam Elsevier. pp. 325-370.
- Rawson, R. B. 2003. The SREBP pathway—insights from insects and insects. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 4(8), 631-640.
- Rawson, R. B., Zelenski, N. G., Nijhawan, D., Ye, J., Sakai, J., Hasan, M. T., Chang, T. Y., Brown, M. S., y Goldstein, J. L. 1997. Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs. *Molecular Cell*. 1(1), 47-57.
- Sakai, J., Nohturfft, A., Goldstein, J., y 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. *Journal of Biological Chemistry*. 273(10), 5785-5793.
- Schroeder, W. A., y Johnson, E. A. 1995. Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 14, 502-507.
- Sambrook, J., y Russell, D. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Shang, F., Wen, S., Wang, X., y Tan, T. 2006. Effect of nitrogen limitation on the ergosterol production by fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*. 122, 285-292.
- Smith, S. J., y Parks, L. W. 1993. The *ERG3* gene in *Saccharomyces cerevisiae* is required for the utilization of respiratory substrates and in heme-deficient cells. *Yeast*. 9, 1177-1187.
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman G., Alsarraj M., y Nguyen, M. 2010. A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*. 50(4), S1-S5.

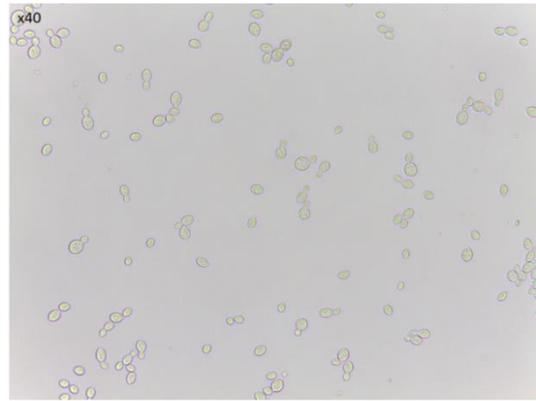
- Todd, B. L., Stewart, E. V., Burg, J. S., Hughes, A. L., y Espenshade, P. J. 2006. Sterol regulatory element binding protein is a principal regulator of anaerobic gene expression in fission yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 26(7), 2817-2831.
- Tsunoda, T., y Takagi, T. 1999. Estimating transcription factor bindability on DNA. *Bioinformatics*. 15(7), 622-630.
- Yamane, Y., Higashida, K., Nakashimada, Y., Kakizono, T., Nishio, N. 1997. Influence of oxygen and glucose on primary metabolism and astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in batch and fed-batch cultures: kinetic and stoichiometric analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 63, 4471-4478.
- Yang, T., Espenshade, P. J., Wright, M. E., Yabe, D., Gong, Y., Aebersold, R., Goldstein, J. L., y Brown, M. S. 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.
- Venegas, M., Barahona, S., González, A. M., Sepúlveda, D., Zúñiga, G. E., Baeza, M., Cifuentes, V., y Alcaíno, J. 2020. Phenotypic Analysis of Mutants of Ergosterol Biosynthesis Genes (*ERG3* and *ERG4*) in the Red Yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Frontiers in Microbiology*. 11, 1312.
- Verdoes, J. C., Misawa, N., y van Ooyen, A. J. 1999. Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnology and Bioengineering*. 63(6), 750-755.
- Watson, P., Rose, M., Ellis, S., England, H., y Kelly, S. 1989. Defective sterol C5-6 desaturation and azole resistance: a new hypothesis for the mode of action of azole antifungals. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 164(3), 1170-1175.
- Wery, J., Dalderup, M. J. M., Ter Linde, J., Boekhout, T., y Van Ooyen, A. J. J. 1996. Structural and phylogenetic analysis of the actin gene from the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Yeast*, 12(7), 641-651.
- Zhang, Y., Rao, R. 2010. Beyond ergosterol: Linking pH to antifungal mechanisms. *Virulence*. 1(6), 551-554.
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., y Van't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*. 56, 1875-1881.

## **Anexos**

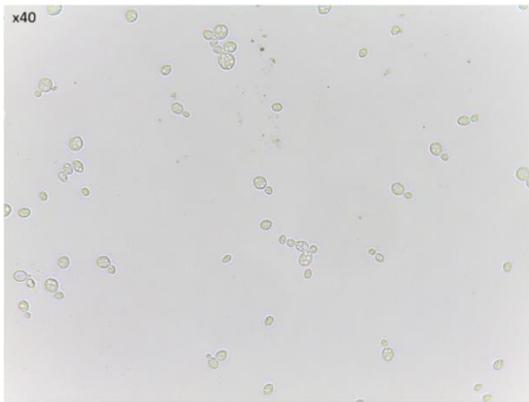
**Anexo I.** Microscopía Óptica (x40) de los inóculos de las cepas estudiadas. Para asegurar la integridad del proceso y evitar posibles contaminaciones durante la curva de crecimiento se realizó un análisis microscópico de muestras de cada cepa usadas como inóculo. Esto se llevó a cabo utilizando un microscopio óptico Leica ICC50 HD a un aumento x40. Las imágenes fueron digitalizadas con el programa Leica LAS EZ, 2017. En la imagen las cepas parentales se encuentran en el lado izquierdo, mientras que las cepas mutantes están al lado derecho.



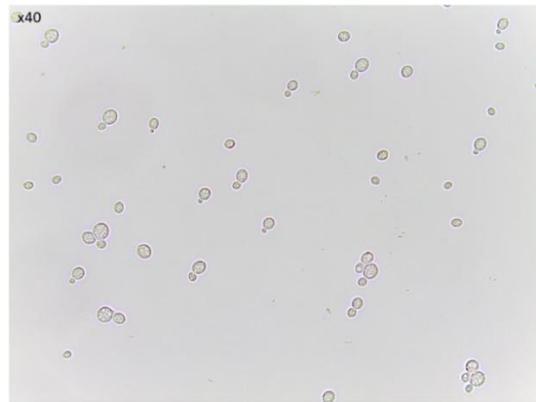
CBS.CYP61-



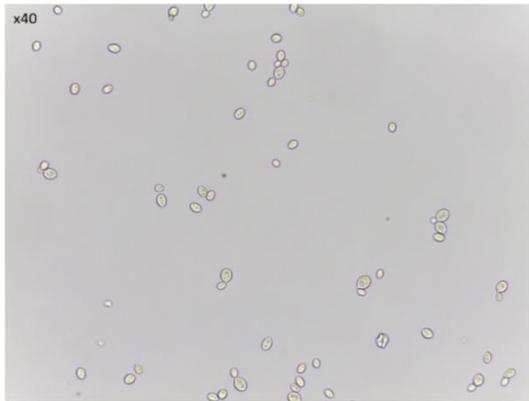
CBS.CYP61-pHMGs/crtE



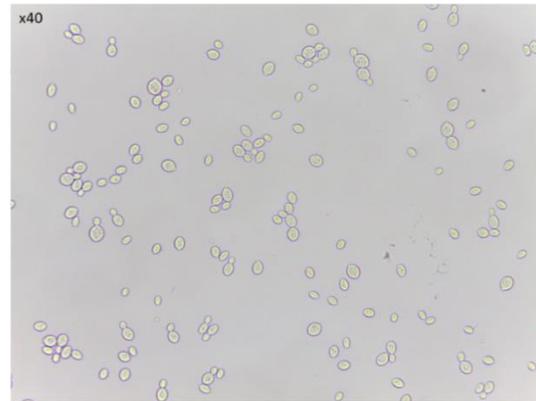
CBS.SRE1N.FLAG



CBS.SRE1N.FLAG-pHMGs/crtE



CBS 6938



CBS-pHMGs/crtE