



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

**“ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN *OFD1* DE
LA LEVADURA CAROTENOGÉNICA
Xanthophyllomyces dendrorhous”**

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

CARLA SOLANGE GÁRATE CASTRO

Director del Seminario de Título:

Dra. Jennifer Alcaíno Gorman

Co-Director del Seminario de Título:

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán

Mayo 2017

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr(ta)**:

CARLA SOLANGE GÁRATE CASTRO

“ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN *OFD1* DE LA LEVADURA CAROTENOGÉNICA *Xanthophyllomyces dendrorhous*”

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

Dra. Jennifer Alcaíno Gorman
Director Seminario de Título

.....

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán
Co-Director Seminario de Título

.....

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Claudia Stange Klein
Presidente Comisión

.....

Dra. Julieta Orlando
Evaluador

.....

Santiago de Chile, 25 de mayo de 2017.

BIOGRAFÍA



Nací un 11 de febrero de 1993 en Santiago, Chile. Mis padres fueron, Ana María Castro y Carlos Gárate. Además tengo una hermana, Ana Gárate, quien es diecisiete años mayor. Crecí en un ambiente con mucho amor, en una casa con un gran patio, llena de árboles frutales y diferentes mascotas, como gallinas, conejos, patos, hámster, pececitos, perros y gatos, entre los que puedo recordar. Durante el día me acompañaba mi mamá, ella hacía los quehaceres de la casa, jugaba conmigo y me ayudaba en las tareas. Por las noches esperaba ansiosa que llegara mi papá de su trabajo, quien era auxiliar de farmacia, razón por la cual sabía mucho sobre ciencias. Él siempre me contaba de su trabajo, en tanto yo leía sus revistas sobre salud que le llegaban mensualmente. Fue esta conexión la que hizo surgir mi curiosidad y pasión por las ciencias.

Estudí en el colegio Jean Jacques de la comuna de Independencia desde kínder (1998) hasta sexto básico (2004), año en que lamentablemente falleció mi mamá. El dolor de su pérdida fue muy grande, sin embargo el apoyo de mi familia, me permitió seguir adelante. Para ese entonces ya había nacido mi sobrino, Giancarlo Vergara, lo que me convirtió en una tía muy joven. Continué mis estudios en el Liceo Rosa Ester Alessandri Rodríguez (REAR), también comuna de Independencia, desde séptimo básico (2005) hasta cuarto medio (2010). De aquella época también tengo muy lindos recuerdos. Aproveché todas las oportunidades que se me presentaron para emprender nuevos desafíos, siempre junto a mi mejor amiga, Alejandra Hesse.

En el año 2008 cuando estaba en tercero medio comencé una relación con mi pololo, Leonardo Manquean, quien me ha apoyado desde entonces. Siempre me ha aconsejado y animado, en las cosas cotidianas y en las grandes decisiones. Es un gran compañero de vida y su apoyo fue fundamental cuando nuevamente sufrí una pérdida importante. En el año 2011 cuando entré a la Universidad de Chile a estudiar Licenciatura en Ciencias con mención en Biología, falleció mi papá. Y aunque el dolor apareció de nuevo, el apoyo de mis seres queridos me ayudó a sanar. Mi hermana pasó a ser mi segunda mamá. Ella junto a mi cuñado y mi sobrino, me apoyan y regalonean. Mientras que los padres de Leonardo, me han acogido como una hija.

A la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular ingresé el año 2013, cuando me cambié por transferencia interna. Durante todos esos años de universidad conocí muchas personas, cada una con su propia forma de ver la vida, lo que me permitió expandir mi propia visión de la vida y abrir el camino para formar nuevos lazos.

DEDICATORIA

... A mi **madre**, que con su amor y paciencia me enseñó el sentido de la vida.

... A mi **padre**, que con su amor y perseverancia me enseñó la resiliencia.

... A mi **hermana**, que con su amor y altruismo nunca me desampara.

... A mi **sobrino**, que con su amor y ternura me regala amor incondicional.

... A mi **cuñado**, que con su amor y alegría me integra como familia.

... A los **padres de Leonardo**, que con su amor y preocupación me acogen como hija.

... A mis **amigos**, que con su amor y singularidad me acompañan en el camino.

... A **Leonardo**, que me da amor... y es mi amor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile por recibirme como una integrante más del equipo de trabajo. Me permitió crecer y desarrollarme como profesional desde el primer día que llegué al laboratorio. Fueron seis años de aprendizaje, en primera instancia como pasante y luego como tesista.

Agradezco a los profesores, la Dra. Jennifer Alcaíno (Directora Seminario de Título) y el Dr. Víctor Cifuentes (Co-Director Seminario de Título), que me apoyaron e incentivaron a sacar lo mejor de mí, reconociendo mis capacidades y ayudándome a corregir mis debilidades.

Agradezco a cada uno de los integrantes del laboratorio por enseñarme y ayudarme tanto en lo práctico como en lo humano. A Dony, Salvador, Rafael, estudiantes de pregrado y postgrado.

Agradezco al Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. En particular a Juan Carlos Cáceres por colaborar en el proceso de modelamiento por homología de *Ofd1* junto con el Dr. Ricardo Cabrera.

Agradezco al Dr. Peter Espenshade por sus comentarios respecto a este seminario de título y a su laboratorio: Espenshade Lab, Center for Metabolism and Obesity Research, Department of Cell Biology de la Universidad Johns Hopkins, Estados Unidos, por colaborar en el objetivo de complementación heteróloga.

Agradezco el financiamiento que permitió desarrollar este seminario de título. El proyecto **FONDECYT 1160202**, titulado: "Regulation of the Biosynthesis of Isoprenoids in the Red Yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*: Structural and Functional Organization of the Sterol Responsive Element Binding Protein (SREBP) Regulatory Mechanism" (Investigador Responsable: Dra. Jennifer Alcaíno).

Finalmente, agradezco a la Dirección de Asuntos Estudiantiles (DAE) por colaborar en el financiamiento de la asistencia al XXXVIII Congreso Chileno de Microbiología de la Sociedad de Microbiología de Chile (2016), realizado en la ciudad de Valdivia. En modalidad comunicación libre panel, con el trabajo titulado: "Estudio de la delección del gen *OFD1* en la levadura carotenogénica *Xanthophyllomyces dendrorhous*".

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vii
INDICE DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	1
1. Isoprenoides	1
2. Vía SREBP.....	8
3. Ofd1	10
4. Hipótesis	12
5. Objetivo General	13
6. Objetivos específicos	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
1. Cepas, plásmidos y condiciones de cultivo.....	14
2. Extracción y análisis de ácidos nucleicos	18
3. Transformación por electroporación.....	24
4. Extracción de carotenoides y esteroides en <i>X. dendrorhous</i>	26
5. Ensayo de Western blot	28
RESULTADOS.....	30
1. Aislamiento y análisis bioinformático de <i>OFD1</i> y la proteína deducida Ofd1	30
2. Obtención de cepas mutantes $\Delta ofd1$ en <i>X. dendrorhous</i>	38
3. Caracterización fenotípica de las cepas mutantes $\Delta ofd1$ de <i>X. dendrorhous</i>	45
4. Ensayo de complementación heteróloga en <i>S. pombe</i>	57
DISCUSIÓN	61
CONCLUSIONES	70
BIBLIOGRAFÍA	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas generadas y utilizadas en este trabajo.....	16
Tabla 2. Plásmidos generados y utilizados.....	17
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados	22
Tabla 4. Composición de carotenoides de las cepas mutantes y parentales de <i>X. dendrorhous</i> en porcentaje analizadas por RP-HPLC.....	50
Tabla 5. Composición de esteroides de las cepas mutantes y parentales de <i>X. dendrorhous</i> en porcentaje analizadas por RP-HPLC.....	50

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la vía del mevalonato y biosíntesis de astaxantina y ergosterol.	3
Figura 2. Vía SREBP humano y <i>S. pombe</i> .	9
Figura 3. Regulación oxígeno-dependiente del factor de transcripción Sre1 mediante Ofd1 en <i>S. pombe</i> .	11
Figura 4. Estructura del gen <i>OFD1</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	30
Figura 5. Alineamiento de secuencias Ofd1 deducida de <i>X. dendrorhous</i> , Ofd1 de <i>S. pombe</i> y proteína nuclear de <i>C. neoformans</i> .	32
Figura 6. Perfil de residuos conservados del modelo por homología obtenido de la proteína Ofd1 de <i>X. dendrorhous</i> .	34
Figura 7. Sitio activo de la proteína Ofd1 de <i>X. dendrorhous</i> .	36
Figura 8. Árbol filogenético de proteínas homólogas a Ofd1 de <i>X. dendrorhous</i> .	37
Figura 9. Obtención de la región homóloga río arriba y abajo del gen <i>OFD1</i> para la construcción del módulo de recombinación.	39
Figura 10. Obtención del vector pBS_FragAB-Ofd1.	40
Figura 11. Obtención de los vectores pBS_FragAB-Ofd1_Hyg y pBS_FragAB-Ofd1_Zeo, que contienen los módulos de recombinación.	42
Figura 12. Verificación de la recombinación del gen <i>OFD1</i> por el módulo de resistencia a zeocina.	44
Figura 13. Comparación fenotípica entre las cepas mutantes $\Delta ofd1$ y sus parentales.	46
Figura 14. Curvas de crecimiento.	47
Figura 15. Análisis de carotenoides y esteroides totales producidos por las cepas CBS-6938, CBS-6938 $\Delta ofd1$, CBS- <i>cyp61</i> ⁻ , CBS- <i>cyp61</i> ⁻ $\Delta ofd1$, CBS- <i>SRE1N</i> y CBS- <i>SRE1N</i> $\Delta ofd1$.	49

Figura 16. Análisis de los niveles de transcrito de los genes <i>HMGR</i> y <i>PDC</i> en las cepas mutantes $\Delta ofd1$ y parentales.....	52
Figura 17. Ensayo de crecimiento en anaerobiosis.....	55
Figura 18. Ensayo de crecimiento en presencia de $CoCl_2$	56
Figura 19. Ensayo de crecimiento en presencia de azoles.....	56
Figura 20. Obtención del vector PSLF102_ <i>OFD1</i> (Xd).	58
Figura 21. Análisis de complementación mediante Western blot.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil-CoA	Acetil-Coenzima A
Acetoacetil-CoA	Acetoacetil-Coenzima A
cDNA	DNA complementario
CTD	Dominio carboxilo terminal
D.O.	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
E	Exón
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A
NTD	Dominio amino terminal
ORF	Marco abierto de lectura
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ppm	Partes por millón
RP-HPLC	Cromatografía líquida en fase reversa
RT	Transcripción reversa
SDS	Dodecilsulfato sódico
Sp	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
TAE	Buffer Tris-acetato-EDTA
TE	Buffer Tris-EDTA
UV	Luz ultravioleta
Xd	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>

RESUMEN

Xanthophyllomyces dendrorhous es una levadura basidiomicete que sintetiza astaxantina, un carotenoide de interés biotecnológico. La síntesis de este pigmento se produce a partir de metabolitos de la ruta del mevalonato, que también son necesarios para la síntesis de esteroides. La regulación de las rutas biosintéticas de carotenoides y esteroides se encuentran relacionadas. A su vez, ambas rutas han manifestado estar reguladas por la vía SREBP, la cual en mamíferos regula los niveles de colesterol en la células. En hongos la vía SREBP se encuentra conservada, como en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* donde el factor de transcripción Sre1N regula la síntesis de esteroides y la respuesta a hipoxia. En el núcleo, los niveles de Sre1N son regulados por la proteína Ofd1 de manera oxígeno-dependiente, ya que esta proteína inhibe la unión de Sre1N al DNA y promueve su degradación proteosómica en presencia de oxígeno. El objetivo de este trabajo fue caracterizar y estudiar el posible gen de Ofd1 de *X. dendrorhous* mediante la construcción de cepas que carecen de dicho gen y ensayos de complementación en *S. pombe*.

Mediante análisis bioinformático se identificó el posible gen *OFD1* de *X. dendrorhous*, se dedujo la proteína y se realizó un modelo tridimensional por homología. Se comprobó la conservación del motivo HXD/E...H en el sitio activo, característico de las 2-oxoglutarato oxigenasas. Se realizó la delección del gen *OFD1* en tres cepas de *X. dendrorhous*: CBS-6938 (silvestre), CBS-*cyp61*⁻ (mutante que no produce ergosterol y sobre produce carotenoides) y CBS-*SRE1N* (mutante que expresa solo la forma activa del factor de transcripción Sre1). Se evaluó el fenotipo de las mutantes Δ *ofd1* respecto a sus parentales mediante análisis de carotenoides y esteroides totales por espectrofotometría, en tanto la composición de ambos tipos de

metabolitos se determinó por RP-HPLC. También se realizó un análisis de expresión mediante RT-qPCR del gen *HMGR*, el cual posiblemente es regulado por Sre1 en *X. dendrorhous*. Además, se estudió el fenotipo de crecimiento de la levadura en presencia de los azoles clotrimazol y ketoconazol, en la presencia de cloruro de cobalto (compuesto que imita las condiciones de hipoxia) y en anaerobiosis. Los resultados indican que el producto génico de *OFD1* no regularía los niveles de Sre1N en el núcleo debido a que no hubo cambio de fenotipo en ningún caso, por lo que *OFD1* no participaría en la vía SREBP de *X. dendrorhous*. Adicionalmente, los ensayos de complementación heteróloga del gen *OFD1* de *X. dendrorhous* en una cepa mutante para este gen en *S. pombe*, también indican que *Ofd1* de *X. dendrorhous* no regularía los niveles de Sre1N, ya que no se observaron cambios en los niveles de Sre1N de *S. pombe* mediante Western blot.

En conclusión, el gen *OFD1* de *X. dendrorhous* no participa en la regulación del factor transcripcional Sre1N como se había planteado. Posiblemente exista otro mecanismo de regulación aún no descrito.

ABSTRACT

Xanthophyllomyces dendrorhous is a basidiomycete yeast that synthesizes astaxanthin, a carotenoid of biotechnological interest. The astaxanthin synthesis is produced through mevalonate pathway metabolites, which are also necessary for sterol synthesis. The regulation of the carotenoid and sterol biosynthesis is related. At the same time, both pathways have been shown to be regulated by the SREBP pathway, which in mammal cells controls cholesterol levels. In fungi as well as in the yeast *Schizosaccharomyces pombe* the SREBP pathway is conserved. Particularly in the yeast, the transcription factor Sre1N regulates the sterol synthesis and the hypoxia response. In the nucleus, the levels of Sre1N are controlled by the Ofd1 protein in an oxygen-dependent way, due to the fact that this protein acts inhibiting the binding of Sre1N to DNA and promoting its proteosomal degradation under oxygen availability. The aim of this work was to characterize and study the possible *Ofd1* gene in *X. dendrorhous* through strain construction lacking this gene and complementation assays in *S. pombe*.

Bioinformatic analysis shown the possible *X. dendrorhous OFD1* gene, the protein was deduced and a three-dimensional homology model was performed. The 2-oxoglutarate oxygenases characteristic motif HXD/E ... H was identified at the active site. Deletion of the *OFD1* gene was done in three *X. dendrorhous* strains: CBS-6938 (wild-type), CBS-*cyp61*⁻ (mutant that does not produce ergosterol and over produces carotenoids) and CBS-*SRE1N* (mutant expressing only the active form of transcription factor Sre1). Carotenoid and total sterol content was measured spectrophotometrically, while carotenoid and total sterol composition was determined by RP-HPLC. Expression analysis of *HMGR* gene, which is possibly regulated by Sre1 in *X. dendrorhous*, was also performed by RT-qPCR. In addition, the phenotype of the yeast growing in the

presence of the azole clotrimazole and ketoconazole, was studied in the presence of cobalt chloride (simulating hypoxic conditions) and in anaerobiosis. The results indicate that the *OFD1* gene product would not regulate the levels of Sre1N in the nucleus because there was no change in yeast phenotype, so that *OFD1* would not participate in the *X. dendrorhous* SREBP pathway. In addition, heterologous complementation assays of *X. dendrorhous OFD1* gene in a mutant strain for this gene in *S. pombe* also indicate that *X. dendrorhous* Ofd1 would not regulate Sre1N levels, due to the fact that no changes were observed in the levels of *S. pombe* Sre1N by Western blot.

In conclusion, the *OFD1* gene of *X. dendrorhous* does not participate in the regulation of Sre1N transcription factor as was previously proposed. There may be another regulation mechanism not described yet.

INTRODUCCIÓN

1. Isoprenoides

Los isoprenoides o terpenos corresponden a un grupo de compuestos orgánicos presentes en arqueas, bacterias y eucariontes. Éstos son fundamentales en diferentes procesos biológicos. Algunos ejemplos de compuestos isoprenoides son las quinonas, dolicoles, esteroides, pigmentos carotenoides, entre muchos otros (Chang y col., 2013). Las quinonas se caracterizan por su reactividad química, la cual está dada por las propiedades de electrofilia y actividad redox (Tu y col., 2011). Éstas participan en procesos biológicos donde ocurren reacciones de óxido-reducción, como la ubiquinona (Q), la cual forma parte del proceso de transporte de electrones en la membrana interna de la mitocondria, donde se reduce y se convierte en ubiquinol (QH₂) (Hirst & Roessler, 2016). En tanto, el dolicol es un lípido poliisoprenoide que se localiza en las membranas. Su función corresponde al transporte de azúcares, permitiendo el proceso de glicosilación de proteínas en el retículo endoplasmático (Cantagrel & Lefeber, 2011). Por otra parte, los esteroides son constituyentes importantes de la membrana celular que regulan su fluidez y permeabilidad, además son precursores de hormonas en mamíferos y plantas (Lepesheva & Waterman, 2007). Finalmente, los pigmentos carotenoides son compuestos naturales de colores naranjos, amarillos y rojos que tienen propiedades antioxidantes (Armstrong, 1994).

El precursor universal de los isoprenoides, el isopentenil pirofosfato (IPP) y su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP) son sintetizados mediante la vía del mevalonato (MVA) en eucariontes (Figura 1) y arqueas; sin embargo, existe una segunda vía de síntesis de IPP independiente a la del MVA, la vía del metileritrol fosfato (MEP) presente en plantas, eubacterias y parásitos protistas (Eisenreich y col.,

2004; Chang y col., 2013). En la vía del MVA, la síntesis del IPP y DMAPP comienza con la condensación de dos moléculas de **acetil-CoA** mediante la enzima acetoacetyl-CoA tiolasa dando origen al **acetoacetyl-CoA**, el cual se condensa con una molécula de acetil-CoA produciendo **HMG-CoA** mediante la acción de una HMG-CoA sintasa. 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 segunda fosforilación mediante una fosfomevalonato quinasa (PMK) originando MVA-5-difosfato (**MVA-PP**). Finalmente, el MVA-PP mediante la acción de una pirofosfomevalonato decarboxilasa (MVD) se convierte en isopentenil pirofosfato (**IPP**) (Miziorko 2011).

Entonces, el IPP proveniente de la vía del mevalonato es utilizado en el inicio de la biosíntesis de los isoprenoides. Mediante la isopentenil fosfato isomerasa, el IPP es convertido en DMAPP, luego ambos productos se condensan para formar geranyl pirofosfato (**GPP**) el cual corresponde al precursor de los monoterpenos (terpenos de 10 carbonos). Al GPP se une una segunda molécula de IPP generando farnesil pirofosfato (**FPP**), el precursor de los sesquiterpenos (terpenos de 15 carbonos). Cuando al FPP se adiciona una tercera molécula de IPP se produce geranylgeranyl pirofosfato (**GGPP**), el precursor de los diterpenos (terpenos de 20 carbonos), en tanto la condensación de dos moléculas de FPP da origen al **escualeno**, el precursor de los triterpenos (terpenos de 30 carbonos) como los **esteroles**. La condensación de dos moléculas de GGPP produce **fitoeno**, el precursor de los **carotenoides** (tetraterpenos, terpenos de 40 carbonos) (Alcaíno y col., 2014).

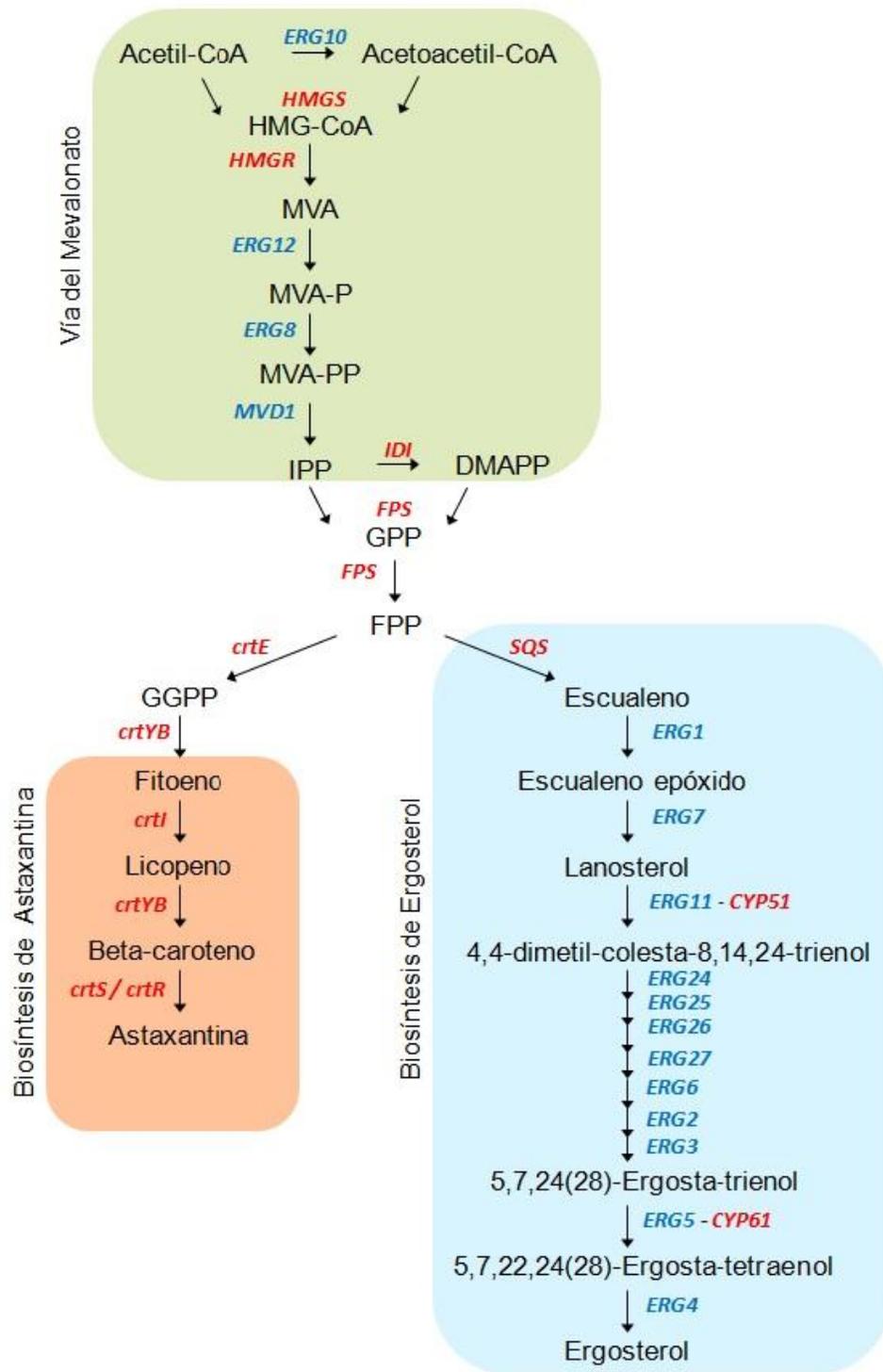


Figura 1. Esquema de la vía del mevalonato y biosíntesis de astaxantina y ergosterol. Los metabolitos se indican en letras negras, donde: HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA), MVA (mevalonato), MVA-P (mevalonato-5-fosfato), MVA-PP (mevalonato-5-pirofosfato), IPP (isopentenil pirofosfato), DMAPP (dimetilalil pirofosfato), GPP (geranil pirofosfato), FPP (farnesil pirofosfato) y GGPP (geranilgeranil pirofosfato). Las flechas representan los pasos catalíticos, adyacentes se destacan los

genes que controlan cada paso en *X. dendrorhous* (rojo) y *S. cerevisiae* (azul). Cada ruta está destacada por colores diferentes: Vía del mevalonato (verde), biosíntesis de astaxantina (naranja) y biosíntesis de ergosterol (celeste). (Modificado de Loto y col., 2012).

1.1 Esteroles

Los esteroides son compuestos orgánicos importantes en la estructura de las membranas de eucariontes, y regulan su fluidez y permeabilidad (Zhang y Rao., 2010). En mamíferos esta función estructural la desempeña el colesterol, el cual también es el precursor de las hormonas esteroidales: glucocorticoides, mineralcorticoides y hormonas sexuales (Miller, 2016). La vitamina D es otro ejemplo de esteroide con función reguladora en mamíferos, ya que es esencial en el proceso de mineralización de los huesos y en la homeostasis del calcio y fósforo (Costanzo & Knoblovits, 2016).

En plantas, los esteroides también cumplen funciones importantes: el fitoesteroide es un componente de la membrana celular, los brasinoesteroides (hormona vegetal) regulan el crecimiento vegetal y algunas toxinas con estructura triterpénica participan en el mecanismo de defensa contra patógenos (Croteau y col., 2000).

Las principales diferencias entre los esteroides que son sintetizados en mamíferos, plantas y hongos se relacionan con el número y posición de los dobles enlaces y los grupos metilo en la molécula (Iwaki y col., 2008).

El esteroide que regula las propiedades de fluidez y permeabilidad de la membrana en hongos es el ergosterol (ergosta-5 α ,22-trien-3 β -ol), el cual es el principal esteroide en hongos (incluyendo las levaduras) y corresponde al producto final de la vía de biosíntesis de esteroides (Arthington-Skaggs y col., 1996; Iwaki y col., 2008). El precursor en la síntesis del ergosterol es el escualeno y se forma por la condensación de dos moléculas de FPP (Figura 1). Luego, el escualeno se convierte en lanosterol por reacciones de ciclación. Finalmente el lanosterol origina al ergosterol después de

una serie de reacciones químicas entre las cuales participan enzimas citocromo P450 (P450s), la CYP51 (lanosterol-14-demetilasa) y CYP61 (C-22 esterol desaturasa) (Loto y col., 2012). Las P450s pertenecen a la superfamilia de las hemoproteínas monooxigenasas que se encuentran presentes en todos los dominios de la vida, y su función está relacionada con el metabolismo oxidativo (Degtyarenko & Archakov, 1993). Ambas P450s, CYP51 y CYP61, son cruciales en la síntesis de ergosterol, por esta razón los estudios clínicos contra las infecciones fúngicas han dirigido sus esfuerzos en desarrollar compuestos que afecten a enzimas P450s. Este es el caso de los azoles, los cuales son agentes que se unen a la proteína CYP51 e impiden la síntesis de ergosterol, lo cual afecta a la membrana celular. Ejemplos de compuestos azólicos son el itraconazol, fluconazol, ketoconazol, clotrimazol, entre otros (Parker y col., 2014).

1.2 Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos terpenoides naturales de 40 átomos de carbono lipo-solubles (colorantes naturales) que van desde el amarillo al rojo-anaranjado. Son sintetizados por algas, plantas, algunos hongos y bacterias, mientras que los animales deben incorporar estas moléculas esenciales en su dieta, ya que en general son incapaces de sintetizarlos *de novo* (Goodwin, 2011). Los carotenoides presentan propiedades antioxidantes atribuidas a su estructura y se consideran como compuestos bioactivos que reducen el riesgo de enfermedades degenerativas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, degeneración macular (Mata-Gómez y col., 2014) y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Wang y col., 2008). Además de los beneficios para la salud humana, los carotenoides presentan gran interés en el área de la industria, donde son utilizados como colorante de alimentos,

suplemento alimenticio para animales (particularmente en la industria del salmón) y considerado como nutraceutico (Wang y col., 2014).

La industria del salmón es una actividad económicamente atractiva que presenta altos niveles de industrialización y bajos niveles de riesgos dentro de la gama de productos que ofrece la acuicultura. Cerca del 70% de la producción de salmones es obtenida por el cultivo en cautiverio, en tanto, el resto de la producción corresponde a la pesca. Entre los países más importantes en la producción de salmones destacan Noruega, Chile, Escocia y Canadá. En 2015 la oferta total de salmones cultivados superó los 2,2 millones de toneladas (Harvest, 2016) y se proyecta que para el año 2030 esta industria abastecerá el 62% de los peces utilizados para el consumo humano (Msangi y col., 2013). El consumo de salmón se caracteriza por su alto valor nutritivo, ya que aporta micronutrientes, ácidos grasos como el omega 3, proteínas de alta calidad y vitaminas (Harvest, 2016).

Uno de los aspectos más relevantes en la producción de salmones en la acuicultura es la incorporación del carotenoide astaxantina en la dieta de los peces, debido a que este pigmento le otorga el color salmón característico a la carne (Higuera-Ciapara y col., 2006). La astaxantina (3,3'-dihydroxy- β,β' -carotene-4,4'-dione) es una xantófila, carotenoide con grupos funcionales oxigenados en su estructura, producida por algas (*Haematococcus pluvialis*, *Chlorella zofingiensis* y *Chlorococcum*), por la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*, y de forma sintética (Ambati y col., 2014).

En la acuicultura se favorece el uso de la astaxantina producida sintéticamente ya que su precio en el mercado es menor que las obtenidas naturalmente. Sin embargo, durante el proceso de síntesis química se producen 3 estereoisómeros de astaxantina, de los cuales sólo uno (estereoisómero no esterificado) es más accesible

para ser absorbido. Esta forma de astaxantina es producida por la levadura *X. dendrorhous* (Rodríguez-Sáiz y col., 2010), por lo cual, se considera como un microorganismo interesante biotecnológicamente para optimizar la producción de astaxantina.

La biosíntesis de astaxantina en *X. dendrorhous* (Figura 1) comienza con el precursor de los isoprenoides el IPP, proveniente de la vía del mevalonato, el cual se transforma en GGPP luego de una serie de reacciones, descritas anteriormente. La condensación de 2 moléculas de GGPP da origen al fitoeno, el cual sufre 4 desaturaciones y se transforma en licopeno. La ciclación de ambos extremos del licopeno produce beta-caroteno y finalmente la adición de un grupo ceto y un hidroxilo en ambos anillos terminales, da origen a la astaxantina (Loto y col., 2012).

Debido que la síntesis de ergosterol y carotenoides comparten el intermediario FPP, se han realizado estudios para determinar cómo estas dos vías interactúan en *X. dendrorhous*. Se observó que la mutación en el gen *CYP61* de la vía de síntesis de ergosterol, afecta de manera positiva la producción de carotenoides. Esta mutación bloquea la producción de ergosterol y se observó que los niveles de transcrito del gen *HMGR* de la vía del MVA aumentan (Loto y col., 2012). Posiblemente lo anterior se deba a que la mutación evita la regulación por feedback negativo por ergosterol sobre la expresión de *HMGR* y este cambio contribuye de manera positiva en la producción de carotenoides. Por este antecedente, estudiar la vía de regulación de esteroides podría contribuir a la comprensión en la producción de carotenoides en *X. dendrorhous*. Relacionado con lo anterior, se ha descrito un mecanismo de regulación de esteroides a través de la vía SREBP, la cual está presente tanto en mamíferos

(regulación de la síntesis de colesterol) como en hongos (regulación de la síntesis de ergosterol).

2. Vía SREBP

La vía de regulación por colesterol en mamíferos depende del factor de transcripción SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*) (Figura 2). La proteína SREBP es sintetizada en una forma precursora inactiva, la cual permanece anclada en la membrana del retículo endoplasmático debido a la interacción con la proteína Scap (*SREBP cleavage activating protein*) la cual detecta los niveles de esteroides celulares. Cuando los niveles de colesterol son suficientes, la proteína Scap une colesterol y a su vez, interactúa con la proteína INSIG (*Insulin Induced Gene 1*), por lo cual SREBP permanece en su forma inactiva anclado a la membrana del retículo endoplasmático. Cuando disminuyen los niveles de colesterol, Scap ya no lo une provocando un cambio conformacional por lo que deja de interactuar con INSIG permitiendo que el complejo SREBP-Scap se transporte hacia el aparato de Golgi mediante vesículas COPII. En el aparato de Golgi, se producen 2 cortes proteolíticos mediante proteasas que liberan la forma activa de SREBP (N-terminal, SREBPN) donde se encuentra el dominio de unión a DNA bHLH-LZ (*basic-helix-loop-helix leucine zipper*) del factor transcripcional. La forma activa es translocada al núcleo donde regula la expresión de sus genes blancos (de síntesis y consumo de lípidos) por la unión a los sitios SRE (*Sterol Regulatory Element*) en la región promotora de dichos genes (Espenshade, 2006).

Elementos de esta ruta se encuentran conservados en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* la cual ha sido ampliamente estudiada. Se ha descrito un mecanismo de respuesta a bajas concentraciones de oxígeno (hipoxia) donde bajo

esta condición, los niveles de esteroides disminuyen, el complejo Sre1-Scp1 (homólogos de SREBP y Scap, respectivamente) detecta esta disminución, se activa el factor de transcripción Sre1 mediante corte proteolítico en el aparato de Golgi que libera a Sre1N y éste viaja al núcleo donde interactúa con los sitios SRE en el DNA (Hughes y col, 2005) promoviendo la transcripción de genes relacionados con la ruta de síntesis de esteroides, ubiquinona, grupo hemo y esfingolípidos (Todd y col., 2006), y el propio gen *SRE1*.

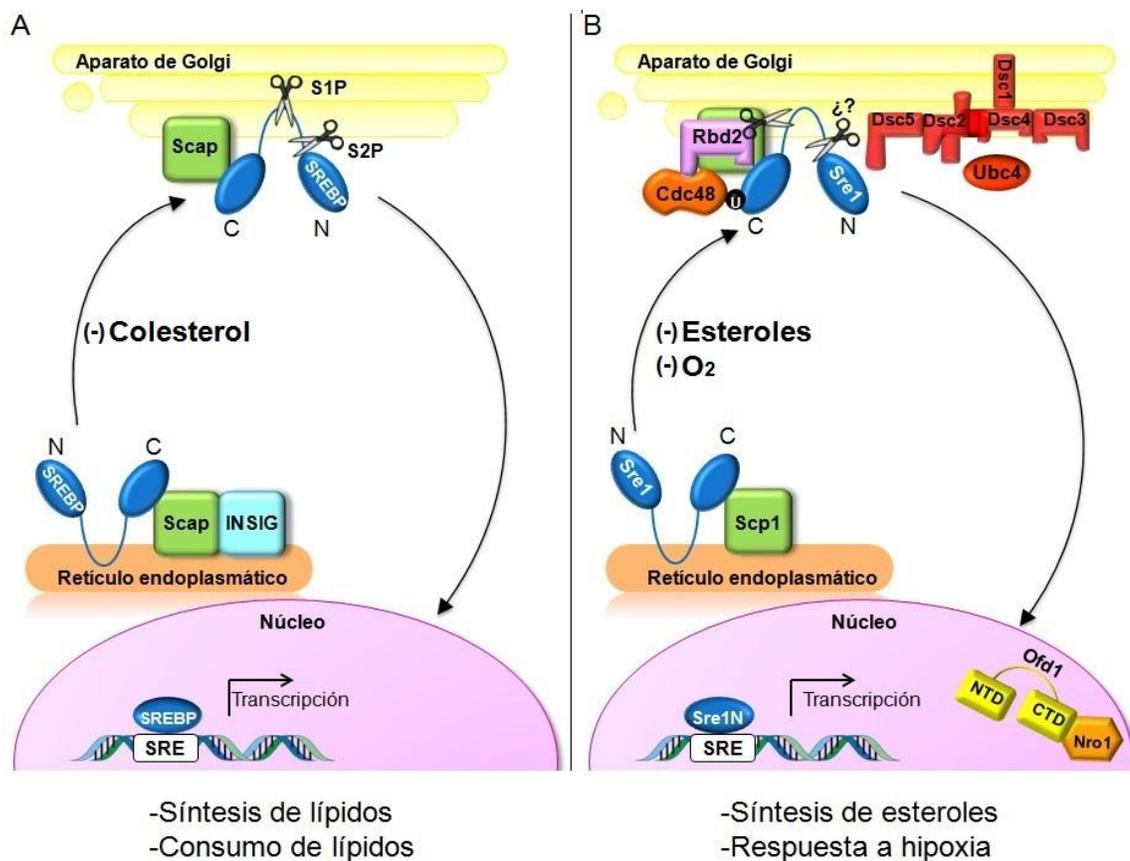


Figura 2. Vía SREBP en humano y *S. pombe*. (A) Representación de la vía SREBP en humano. Cuando los niveles de colesterol son suficientes, el complejo SREBP-Scap es retenido en el retículo endoplasmático interactuando con la proteína INSIG, pero cuando los niveles de colesterol disminuyen, el complejo SREBP-Scap es translocado al aparato de Golgi, donde sufre dos cortes proteolíticos: la proteína S1P corta la región de SREBP que se encuentra en el lumen, mientras S2P permite liberar el dominio N-terminal, que corresponde al factor de transcripción en su forma activa. Éste viaja al núcleo donde interactúa con sitios SRE (*Sterol Regulatory Element*) promoviendo la transcripción de genes relacionados con la síntesis y consumo de lípidos. (B) Representación de la vía SREBP en la levadura *S. pombe*. Cuando los niveles de oxígeno son suficientes, el complejo Sre1-Scp1 se mantiene retenido en el retículo

endoplasmático, por lo cual no se producen los cortes proteolíticos que activan al factor de transcripción, además la proteína Ofd1 regula de manera negativa los niveles de Sre1N presentes en el núcleo. En condiciones de bajos niveles de oxígeno y esteroides, el complejo Sre1-Scp1 se transloca al aparato de Golgi donde es ubiquitinado (U) por acción del complejo DSC E3 ligasa (DSC1, 2, 3 y 4) y E2 Ubc4. El factor Sre1 ubiquitinado es reclutado por la proteína Cdc48 y cortado por la proteína Rbd2. El proceso que permite el corte de la región N-terminal de Sre1 es aún desconocido. El factor de transcripción en su forma activa (Sre1N) viaja al núcleo donde promueve la transcripción de genes relacionados con la síntesis de esteroides y la respuesta a hipoxia. En tanto la proteína Nro1 interactúa con Ofd1, inhibiendo su interacción con Sre1N.

Existe un segundo mecanismo por el cual el oxígeno regula los niveles de Sre1N. En condiciones de normoxia, Sre1N es degradado mediante el sistema de degradación proteosomal (Bien & Espenshade, 2010), proceso donde participa la proteína Ofd1 (2-Oxoglutarato- Fe (II) Dioxigenasa), la cual acelera la degradación de Sre1N generando una rápida respuesta en presencia de oxígeno (Hughes & Espenshade, 2008).

3. Ofd1

La proteína Ofd1 pertenece a la familia de las prolil hidroxilasas, las cuales catalizan la hidroxilación de residuos de prolina como una modificación postraducciona de proteínas (Horita y col., 2015); sin embargo, Ofd1 en *S. pombe* no requiere del proceso de hidroxilación para regular la estabilidad de Sre1N (Lee y col., 2011). La proteína Ofd1 (Figura 3) presenta dos dominios unidos mediante un linker; i) el dominio N-terminal detecta los niveles de oxígeno y es donde se encuentra el ión hierro característico de esta proteína, mientras que ii) el dominio C-terminal, es el que acelera la degradación de Sre1N de manera oxígeno-dependiente (Hughes & Espenshade, 2008). En ausencia de oxígeno, el dominio C-terminal de Ofd1 interactúa con la proteína Nro1 (*Negative regulator of Ofd1*) impidiendo su interacción con Sre1, por lo cual los niveles del factor de transcripción se mantienen estables y promueve la transcripción de sus genes blanco. Además, la proteína Nro1 actúa como una importina

α , ya que forma un complejo con Ofd1 que permite la entrada de éste al núcleo. La presencia de oxígeno desestabiliza esta interacción permitiendo que Ofd1 interactúe con Sre1N (Yeh y col., 2011). En esta condición de normoxia, Ofd1 produce la disminución de los niveles de Sre1N de dos formas: primero i) inhibe la interacción de Sre1N con el DNA y segundo, ii) acelera su degradación (Porter y col., 2012).

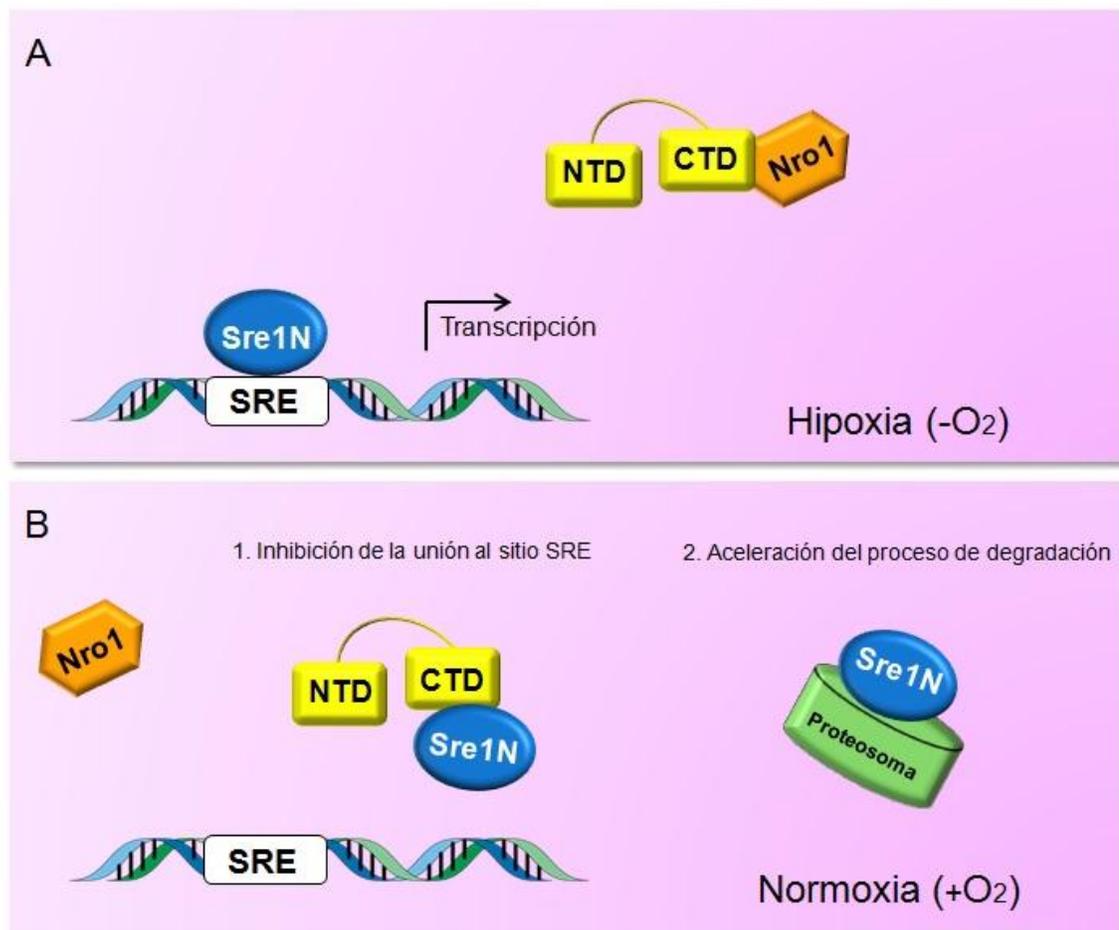


Figura 3. Regulación oxígeno-dependiente del factor de transcripción Sre1 mediante Ofd1 en *S. pombe*. El dominio amino terminal (NTD) de la proteína Ofd1 detecta los niveles de oxígeno y regula la interacción del dominio carboxilo terminal (CTD) con la proteína Nro1 y el factor de transcripción activo (Sre1N). (A) En condiciones de hipoxia la proteína Nro1 interactúa con el CTD de Ofd1, permitiendo que el factor de transcripción se una a su sitio SRE en el DNA y promueva la transcripción de sus genes blanco. (B) En presencia de oxígeno, se interrumpe la interacción de Nro1 con el CTD de Ofd1, y comienza a interactuar con Sre1N. La proteína Ofd1 regula rápidamente los niveles de Sre1N en presencia de oxígeno mediante dos formas: Inhibe la unión de Sre1N al DNA ^[1] y promueve la aceleración de su degradación vía proteosomal ^[2].

La vía SREBP no ha sido descrita en *X. dendrorhous*; sin embargo, estudios previos del laboratorio han permitido la identificación del gen *SRE1* en el genoma de la levadura. La delección de este gen en el mutante CBS-*cyp61* reveló una disminución en la producción de carotenoides, recuperando los niveles alcanzados por la cepa silvestre (Gutiérrez, 2016). A su vez, en esta levadura también se ha identificado un posible gen *OFD1* de 2.532 pb. La importancia del estudio de este gen en *X. dendrorhous* radica en la relación que existe entre la síntesis de ergosterol y la producción de carotenoides, donde el bloqueo de la síntesis de ergosterol muestra un aumento en la producción de carotenoides, como también en los niveles de transcritos del gen *HMGR* (de la vía del MVA) (Loto y col., 2012), gen que es regulado por la vía SREBP en humanos y en otros organismos. De ésta forma, la vía SREBP podría regular la carotenogénesis en la levadura *X. dendrorhous*.

Por los antecedentes expuestos, en este Seminario de título se propuso caracterizar el gen *OFD1* identificado y estudiar el efecto de su delección en *X. dendrorhous*, evaluando los niveles de transcrito de genes posiblemente regulados por Sre1N, además del efecto en la producción de carotenoides y esteroides, como el crecimiento en presencia de azoles (compuestos que inhiben la síntesis de ergosterol).

4. Hipótesis

El gen *OFD1* identificado en *Xanthophyllomyces dendrorhous* participa en la regulación del activador transcripcional Sre1N regulando la biosíntesis de esteroides y carotenoides en la levadura.

5. Objetivo General

Caracterizar y estudiar el gen *OFD1* de *Xanthophyllomyces dendrorhous* en su participación como regulador del activador transcripcional Sre1N para la biosíntesis de esteroides y carotenoides.

6. Objetivos específicos

1. Identificar y analizar bioinformáticamente las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de *Ofd1* de *X. dendrorhous* y generar un modelo tridimensional por homología de la proteína.
2. Realizar la delección de *OFD1* en 3 cepas de *X. dendrorhous*: CBS-6938 (silvestre), CBS-*cyp61*⁻ (mutante que no produce ergosterol y sobre produce carotenoides) y CBS-*SRE1N* (mutante que expresa solo la forma activa del factor de transcripción Sre1).
3. Caracterizar las cepas generadas en 2. y sus parentales evaluando: i) los niveles de esteroides y carotenoides producidos, ii) la expresión de *SRE1* y genes posiblemente regulados por Sre1 y iii) el crecimiento en presencia de azoles y en condiciones que imitan hipoxia.
4. Realizar estudios de complementación del gen *OFD1* de *X. dendrorhous* en la cepa PEY873 (*Sre1N Δofd1*, mutante que expresa solo la forma activa del factor de transcripción Sre1 y carece del gen *OFD1*) de *S. pombe*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas, plásmidos y condiciones de cultivo

Se realizaron experimentos de clonado en *E. coli* DH5 α , para lo cual se cultivó en medio *Lysogeny Broth* (LB) (Tryptona 1%, Extracto de levadura 0,5%, NaCl 0,5%) a 37°C. Los medios de cultivo líquido fueron suplementados con ampicilina (100 μ g/ml), incubados con agitación constante, y utilizados para la extracción de DNA plasmídico. Para la selección de colonias transformantes y recombinantes se utilizó medio semi-sólido (cultivo en placa) con 1,5% de Bacto-agar suplementado con ampicilina (100 μ g/ml) y X-gal 20 mg/ml.

Para los experimentos realizados en *X. dendrorhous*, las cepas se cultivaron a 22°C en medio YM (Extracto de levadura 0,3%, Extracto de malta 0,3%, Bactopeptona 0,5%) suplementado con glucosa 1%. La selección de colonias transformantes se realizó en medio YM semi-sólido con agar al 1,5%, suplementado con higromicina B (35 μ g/ml) y/o zeocina (40 μ g/ml). Se realizaron curvas de crecimiento por triplicado de las cepas de *X. dendrorhous* estudiadas en medio YM líquido con agitación constante. Se evaluó el crecimiento por determinación de la densidad óptica del cultivo a 600 nm en un espectrofotómetro V-630 UV-VIS (Jasco) a diferentes tiempos.

Los experimentos de complementación realizados en *S. pombe* requirieron el uso de dos medios de cultivo diferentes. Para la propagación de la levadura se utilizó el medio YES (Glucosa 3% y Extracto de levadura 0,5%) suplementado con 0,0225% de lisina, histidina, leucina, adenina y uracilo (este último no se adicionó en el medio de cultivo de las cepas que contenían el plásmido PSLF102). Para la transformación se utilizó el medio mínimo Edinburgh (EMM) (Ftalato ácido de potasio 0,3%, Fosfato de

sodio dibásico 0,22%, Cloruro de amonio 0,5%, Glucosa 2%, Stock de sal 1X, Stock de vitaminas 1X y Stock de minerales 1X) suplementado con 0,0225% de lisina, histidina, leucina y adenina. Las cepas de *S. pombe* fueron incubadas a 30°C.

Los análisis de fenotipo de las cepas de *X. dendrorhous* estudiadas se realizaron en medio YM semi-sólido. Para ello se sembró un césped de cada cepa (D.O.₆₀₀ de 15) y se incorporó un filtro sobre el cual se adicionaron 5 µl de clotrimazol (300 µg/ml) o ketoconazol (400 µg/ml), correspondientes a la concentración stock, luego las placas fueron incubadas a 22°C hasta la aparición de un halo de inhibición del crecimiento. También se realizaron dos ensayos en anaerobiosis. Primero se utilizó el sistema de incubación anaeróbica Anaerocult® (Merck), el cual crea un ambiente anaeróbico en una jarra de anaerobiosis. Se sembraron las cepas en estudio en dos placas con medio YM semi-sólido por la técnica de microgota con dilución seriada y se incubaron durante 24 h a 22°C. Luego se incorporó una de las placas dentro de la jarra con el sistema Anaerocult® y se mantuvieron durante 24 h a 22°C en anaerobiosis. Se retiró la placa de la jarra y se registraron los cambios de ambas placas mediante fotografías a las 24, 48 y 120 h luego de retirar de anaerobiosis. El segundo experimento de anaerobiosis, se realizó con el compuesto cloruro de cobalto (CoCl₂), el cual imita las condiciones de hipoxia (Lee y col., 2007). Se sembraron las cepas en estudio por la técnica de microgota con dilución seriada en una placa con medio YM sólido y en otra suplementada con CoCl₂ (0,4 mM), ambas fueron incubadas a 22°C.

Las cepas de *E. coli*, *X. dendrorhous* y *S. pombe* utilizadas en este trabajo se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas generadas y utilizadas en este trabajo

Cepa	Descripción	Referencia
DH5 α	Cepa de <i>E. coli</i> sensible a ampicilina.	Sambrook & Russell, 2001
CBS-6938	Cepa de <i>X. dendrorhous</i> silvestre.	ATCC 96594
CBS-6938 $\Delta ofd1$	Transformante que deriva de CBS-6938 en el que se reemplazó el gen <i>OFD1</i> por un módulo de resistencia a zeocina.	Este trabajo
CBS- <i>cyp61</i> ⁻	Cepa transformante que deriva de CBS-6938, en el que se interrumpió el gen <i>CYP61</i> con un módulo de resistencia a higromicina B.	Loto y col., 2012
CBS- <i>cyp61</i> ⁻ $\Delta ofd1$	Transformante que deriva de CBS- <i>cyp61</i> ⁻ en el que se reemplazó el gen <i>OFD1</i> por un módulo de resistencia a zeocina.	Este trabajo
CBS-SRE1N	Cepa transformante que deriva de CBS-6938 en el que se reemplazó el gen <i>SRE1</i> por la región de dicho gen que sólo codifica el dominio amino terminal de Sre1 (Sre1N) fusionado a 3xFLAG (MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK) en su extremo C-terminal además de un módulo de resistencia a higromicina B.	Gutiérrez, 2016
CBS-SRE1N $\Delta ofd1$	Transformante que deriva de CBS-SRE1N en el que se reemplazó el gen <i>OFD1</i> por un módulo de resistencia a zeocina.	Este trabajo
PEY873	Cepa auxótrofa (h- leu1 -32 ura4-D18 ade6-M210 his3-D1) de <i>S. pombe</i> en que se reemplazó el gen <i>SRE1</i> por la región de dicho gen que codifica solo el dominio amino terminal. Además se reemplazó el gen <i>OFD1</i> por un módulo de resistencia a Kanamicina.	Hughes & Espenshade, 2008
PEY873+PSLF102	Cepa transformante de <i>S. pombe</i> PEY873 que posee el plásmido PSLF102, utilizada como control, ya que contiene el vector sin inserto.	Este trabajo
PEY873+PSLF102_ <i>OFD1</i> (Xd)	Cepa transformante de <i>S. pombe</i> PEY873 que posee el plásmido PSLF102_ <i>OFD1</i> (Xd) (vector que contiene inserto en el promotor CaMV la región codificante del gen <i>OFD1</i> de <i>X. dendrorhous</i>).	Este trabajo
PEY873+PSLF102_ <i>OFD1</i> (Sp)	Cepa transformante de <i>S. pombe</i> PEY873 que posee el plásmido PSLF102_ <i>OFD1</i> (Sp) (vector que contiene inserto en el promotor CaMV el gen <i>OFD1</i> de <i>S. pombe</i>).	Este trabajo

ATCC: American Type Culture Collection

Para el clonado realizado en *E. coli* DH5 α se utilizó el plásmido pBluescript II SK⁻ (pBS) que permite la selección de transformantes mediante la discriminación de colonias transformantes recombinantes (blancas) de las transformantes (azules) en un

medio suplementado con ampicilina y Xgal. Los plásmidos utilizados y generados en este trabajo se muestran en la Tabla 2. El vector pBS se utilizó para el clonado del cDNA de *OFD1* y del gen *OFD1*, lo que permitió que fueran secuenciados. También se utilizó para generar los módulos para la recombinación homóloga en *X. dendrorhous*, al intercambiar el gen *OFD1* por un módulo de resistencia a higromicina B o zeocina.

Para realizar los estudios de complementación en *S. pombe* se utilizó el vector de expresión PSLF102, en el cual se clonó el cDNA de *OFD1* de *X. dendrorhous* y el gen *OFD1* de *S. pombe* de manera independiente. El vector PSLF102 permite su propagación en *E. coli* y la selección se realiza por resistencia a ampicilina. Este vector contiene la secuencia nucleotídica del gen *URA4* (orotidina 5'-fosfatodecarboxilasa Ura4) de *S. pombe*, por lo cual se utilizó una cepa de esta levadura auxótrofa para uracilo, facilitando la selección por crecimiento en medio mínimo en esta levadura.

La reacción de ligado entre los diferentes vectores y fragmentos de DNA clonados se realizó con la enzima DNA ligasa T4 (Promega) en un volumen final de 20 μ l, relación inserto-vector 5:1

Tabla 2. Plásmidos generados y utilizados

Plásmido	Descripción	Referencia
pBluescript II SK ⁻ (pBS)	Vector de clonado en <i>E. coli</i> . Posee secuencia de resistencia ampicilina y el gen de la β -galactosidasa en el MCS (Multiple Cloning Site).	Agilent Technologies
pBS_cDNA-Ofd1-Xd	Vector pBS que tiene inserto el cDNA de <i>OFD1</i> .	Este trabajo
pBS_Gen-Ofd1-Xd	Vector pBS que tiene inserto el gen <i>OFD1</i> .	Este trabajo
pBS_FragAB-Ofd1	Vector pBS que contiene la región río arriba (583 pb) y abajo (535 pb) del ORF de <i>OFD1</i> .	Este trabajo
pBS_FragAB-Ofd1_Hyg	Vector pBS_FragAB-Ofd1 que contiene un módulo de resistencia a Higromicina B, entre la región río arriba y río abajo.	Este trabajo
pBS_FragAB-Ofd1_Zeo	Vector pBS_FragAB-Ofd1 que contiene un módulo de resistencia a Zeocina, entre la región	Este trabajo

	río arriba y río abajo.	
PSLF102	Vector de expresión en <i>S. pombe</i> . Posee el promotor CaMV y los marcadores ampR y ura4+.	ATCC
PSLF102_ <i>OFD1</i> (Xd)	Vector PSLF102 que tiene inserta la región codificante del gen <i>OFD1</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	Este trabajo
PSLF102_ <i>OFD1</i> (Sp)	Vector PSLF102 que tiene inserto el gen <i>OFD1</i> de <i>S. pombe</i> .	Este trabajo

ATCC: American Type Culture Collection

2. Extracción y análisis de ácidos nucleicos

2.1. Extracción de DNA

La extracción de DNA plasmídico desde *E. coli* se realizó mediante el kit *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (ThermoScientific) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. El DNA plasmídico obtenido se almacenó a -20°C hasta su utilización.

La extracción de DNA genómico desde la levadura *X. dendrorhous* se realizó mediante ruptura mecánica (Sambrook & Russell, 2001). Se utilizó un pellet celular obtenido desde un cultivo en medio sólido. El pellet se suspendió en 600 µl de buffer TE (Tris-HCl 25 mM y EDTA 10 mM; pH 8), luego se adicionó 100 µl de microesferas de vidrio de 0,5 mm de diámetro y 600 µl de fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1). La mezcla se llevó al molidor de células Mini-Beadbeater-16 (BioSpec) durante 3 min y posteriormente se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se le adicionó un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se homogeneizó y centrifugó a 14.000 rpm por 2 min. Se recuperó la fase acuosa superior y se precipitó el DNA agregando 2 volúmenes de etanol absoluto frío, manteniendo la mezcla a -20°C durante 1 h. Luego se centrifugó por 10 min a 14.000 rpm, se eliminó el sobrenadante y el pellet se dejó secar a 37°C durante 5 min. Finalmente, el DNA se

suspendió en 100 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM; pH 8) más RNasa (34 µg/ml). El DNA genómico obtenido se almacenó a -20°C hasta su utilización.

2.2. Extracción de RNA de *X. dendrorhous*

La extracción de RNA se realizó a partir de un pellet celular obtenido desde 2-10 ml de cultivo. El pellet se suspendió en 200 µl de buffer de lisis (acetato de sodio 0,5 M pH 5,5, SDS 10%, EDTA 0,5 M pH 8) y se agregó 100 µl de microesferas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. La mezcla se mantuvo en vórtex durante 7 min y se adicionó 800 µl de la solución TriReagent (Life Technologies). Nuevamente, la mezcla se mantuvo en vórtex durante 7 min y se homogeneizó a temperatura ambiente en un *Intelli Mixer RM-2L large* (ELMI) durante 10 min a 8 rpm. Luego se adicionó 200 µl de cloroformo y se homogeneizó a temperatura ambiente en el *Intelli Mixer* durante 10 min a 8 rpm. Se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 min a 4°C en centrifuga refrigerada. Se rescató la fase acuosa y se agregó 250 µl de agua y se homogeneizó. Luego se agregó 550 µl de isopropanol y se homogeneizó a temperatura ambiente en el *Intelli Mixer* durante 10 min a 8 rpm. Se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 min a 4°C y luego el pellet se lavó con 1 ml de etanol 70% para posteriormente centrifugar 6 min a 14.000 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante, el pellet se dejó secar y se suspendió en 30 µl de agua libre de nucleasas. El RNA obtenido se almacenó a -80°C hasta su utilización.

2.3. Purificación de DNA desde geles de agarosa

Los fragmentos de DNA obtenidos mediante PCR o digestión se evaluaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TAE (Tris 40 mM, ácido acético 40 mM, EDTA 1mM, pH 8) 1X, teñidos con *SafeView Nucleic Acid Stain* (NBS

Biologicals) a una concentración final de 1X. Las bandas de DNA se visualizaron en un transiluminador UV, se cortaron con un bisturí y se transfirieron a un tubo Eppendorf. Luego, se adicionó 300 µl de KI 6 M y se incubó a 55 °C por 10 min hasta que la agarosa se disolvió completamente. La mezcla se transfirió a una columna con una membrana de sílica EconoSpin (Epoch Life Science) y se centrifugó a 14.000 rpm durante 2 min. Se descartó el líquido y la columna se lavó 2 veces con 500 µl de New Wash (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, EDTA 2,5 mM, Etanol 50% v/v). Se adicionó 15 µl de agua y se incubó durante 2 min, luego se centrifugó a 14.000 rpm durante 2 min. El DNA purificado quedó en el sobrenadante del tubo y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

2.4. Reacciones de PCR

Las reacciones de PCR se realizaron con la enzima *Taq* DNA polimerasa (purificada en el Laboratorio de Genética) para amplificar el fragmento A y el fragmento B, correspondiente a la zona río arriba y abajo del *ORF* de *OFD1*, respectivamente; además del análisis de clones. En cambio, para amplificar el gen y cDNA de *OFD1* utilizados para clonar en pBS y secuenciar, se utilizó *Pfu* DNA polimerasa (Agilent Technologies).

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl con buffer de PCR 1X (Tris-HCl 200 mM pH 8,4, KCl 500 mM), MgCl₂ 2 mM, buffer de carga BCP 1X (Rojo cresol 100 mM, Glicerol 8,3%), 200 µM de cada deoxinucleótido (dNTP), 1 µM de cada partidor, 1U de enzima y 10-20 ng de DNA molde.

Se utilizó un termociclador Applied Biosystem 2720 con el siguiente programa para PCR estándar: denaturación inicial a 94°C por 3 min (en el caso de PCR de colonia fue durante 5 min), 35 ciclos de denaturación a 94°C por 30 s, alineación de

partidores a 55°C por 30 s, y la elongación a 72°C por 3-4 min, finalmente la reacción se mantuvo a 4°C.

El PCR de elongación (OE-PCR, *Overlap Extension* PCR) utilizado para sobrelapar el fragmento A y B, se realizó en un volumen final de 25 µl con 1U de *Pfu* DNA polimerasa (Agilent Technologies), buffer *Pfu* 1X, cada dNTP a 200 µM y 100 ng de cada fragmento de DNA. Se utilizó el siguiente programa: denaturación inicial a 94°C por 1 min, luego 10 ciclos de denaturación a 94°C por 30 s, alineamiento de partidores a 55°C por 45 s, elongación a 72°C por 90 s, finalmente la reacción se mantuvo a 4°C. Luego la mezcla de reacción obtenida se amplificó en una reacción de PCR estándar con *Pfu* DNA polimerasa (Agilent Technologies).

La reacción de RT se realizó en un volumen final de 20 µl. Se utilizó una mezcla de un cierto volumen de RNA (5 µg) y agua estéril hasta completar 11 µl. Se agregó 1 µl de oligo-dT (25 µM) y 1 µl de una mezcla de dNTPs (10 mM) y se incubó a 65°C por 5 min. Luego, se adicionó 1 µl de la enzima *Maxima Reverse Transcriptase* (ThermoScientific), 4 µl de buffer RT 5X y 2 µl de DTT (0,1 M). Se incubó a 37°C por 52 min y a 70°C por 15 min, dejando enfriar hasta 4 °C.

El PCR cuantitativo (qPCR) en tiempo real se realizó en el equipo Mx 3000P (Stratagene). Se utilizó 10 µl del Kit SensiMix SYBR Green I (Quantance), 8 µl de agua, 1 µl de una mezcla de partidor directo y reverso (10 µM) y 1 µl de cDNA. Se utilizaron partidores con eficiencia mayor al 95% determinada en curvas estándares con un coeficiente de correlación $R^2 \geq 0,99$. Los Ct (*threshold cycle*) obtenidos se normalizaron respecto al gen de β -actina *ACT* (Genbank: X89898.1) de *X. dendrorhous*.

Los oligonucleótidos utilizados en las diferentes reacciones de PCR fueron sintetizados por *Integrated DNA Technologies* y se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados

N°	Nombre	Secuencia (5' - 3')	Dirección
1	PC-cDNA-Ofd1.Fwd.1	ATGACGACCAAGCGATCACCG	D
2	PC-cDNA-Ofd1.Rev	TTAAGCGTCCTGCGAGGAAGC	R
3	Psec Ofd1 1 fwd	ACGTGGAAGGTTGAAGCACAG	D
4	Psec Ofd1 2 fwd	GAGGACTGGGTGGTTTAGTTG	D
5	Psec Ofd1 3 fwd	CTTCACAGATGTCACTTGCTC	D
6	Psec Ofd1 4 fwd	ATTGAGGGTGAAGAGGGCTAC	D
7	Psec Ofd1 5 rev	ATCAAGCCCATCGGCTTTGTC	R
8	Psec Ofd1 6 rev	AACCTACAAGAGGGGACTGAG	R
9	Psec Ofd1 7 rev	CCTCACCGATCAAACCTTCAGG	R
10	Psec Ofd1 8 rev	TAGAGGTAACGAGTGGTCGC	R
11	Up Ofd1 rev	TCTATCGCGGGTTAACTCTGATGTGTACGATTCCATTC	R
12	Down Ofd1 fwd	ACACATCAGAGTTAACCCGCGATAGATAAAAATAAAAG	D
13	Up Ofd1 fwd 1	GATTCCTCTTGATCTTCGCC	D
14	Up Ofd1 fwd 2	CTGATGCCCTTTCTTGCTG	D
15	Down Ofd1 rev 1	CGTCCATACCGTCTTGATGCG	R
16	Down Ofd1 rev 2	GTGCTCGATAGACTGCAATGG	R
17	PEFForEV	GATATCGGCTCATCAGCCGACAGTT	D
18	pEFrev0	TTTGAAGCTGTTTCGAGATAG	R
19	gpdTF	ACGGTTCTCTCCAAACCCTC	D
20	GPDHtRev	ATCATGAGAGATGACGGAG	R
21	P.TEFR	GGTGAAGCTGTTTCGAGATAGA	R
22	H-out.F	CTCGATGAGCTGATGCTTTG	D
23	H-out.R	CACTGGCAAACCTGTGATGGA	R
24	Zeo.F	GACTTCGTGGAGGACGACTT	D
25	Zeo.R	GTGACCCTGTTCATCAGCG	R
26	CYP61+dF	AAAGCCGAAAAGGAGAGAG	D
27	CYP61dw2.R	AGGAGGCAGAGTGGTTGAGA	R
28	SRE1.Fw	ATGGAAGACCTGTTTGAAG	D
29	SRE1.Rv	TCAGCGTTTTGATGGGCC	R
30	3_up.FW	CGTTTGAAGGGACGGAAGGA	D
31	SRE1-Del_out.Rv	TGTGACAGACGAGACCAAGAACAG	R
32	M13 Fw	TGAAAACGACGGCCAGT	D
33	M13 Rv	GGAAACAGCTATGACCATG	R
34	mactF-RT	CCGCCCTCGTGATTGATAAC	D
35	mactR-RT	TCACCAACGTAGGAGTCCTT	R

36	HMGR_Real_2_F	GGCCGATCGCTATATATCCGTTT	D
37	HMGR_Real_2_R	ATCCAGTTGATGGCAGAAGGCT	R
38	pdCRT2_F	TGCCGACCTGTTTACTTGACCT	D
39	pdCRT2_R	TGGGATCGACACTGTCCCTGTA	R
40	PC-cDNA-Ofd1.Fwd.2	TTTTTTGTTAACATGACGACCAAGCGATCACCG	D
41	PC-cDNA-Ofd1.Rev	TTTTTTGCATGCTTAAGCGTCCTGCGAGGAAGC	R
42	CaMV_2_F	GAAACCTCCTCGGATTCCAT	D
43	Ura4_R	TGCTCCTACAACATTACCAC	R
44	SP-PC-DNA-Ofd1.Fwd2	TTTTTTGTTAACATGGGGGATACTCAACAACCA	D
45	SP-PC-DNA-Ofd1.Rev	TTTTTTGCATGCTTACTCAGCAACGGGATTCCA	R

D: Partidor directo y R: Partidor reverso

2.5. Análisis bioinformático

2.5.1. Secuenciación y análisis del gen *OFD1*

Se realizó la secuenciación del cDNA y gen de *OFD1* insertados en el vector pBS mediante el servicio externo de Macrogen Inc. a través de electroforesis capilar. Las secuencias obtenidas se analizaron con la herramienta Contig Express. Luego se realizó la determinación de la estructura exón-intrón mediante la herramienta AlignX. Ambas herramientas pertenecientes al programa Vector NTI v11.5.

2.5.2. Modelamiento 3D

Se realizó un modelo por homología de la proteína *Ofd1* deducida del gen *OFD1* de *X. dendrorhous*. Para esto se buscó en la base de datos RCSB Protein Data Bank estructuras de secuencia similar a la proteína deducida utilizando la herramienta BLASTp (McWilliam y col., 2013). Así, se identificaron dos proteínas OGFOD1 (28% de identidad y 57% de cobertura) de *H. sapiens* (PDB ID: 4NHX) y Tpa1p (31% de identidad y 95% de cobertura) de *S. cerevisiae* (PDB ID: 4NHK). La secuencia *Ofd1* y las secuencias encontradas se alinearon mediante el programa ClustalW2 (Goujon y

col., 2010; Larkin y col., 2007; McWilliam y col., 2013). Luego se generaron los modelos con el programa Modeller 9.14 (Eswar y col., 2008) utilizando el alineamiento anterior y las estructuras moldes OGFOD1 (PDB id. 4NHX) y Tpa1p (PDB id. 4NHK). Se obtuvieron 10 modelos utilizando el método de función variable, métodos de gradiente conjugado y simulaciones de dinámica molecular con alineamiento simulado. La calidad de los modelos se determinó por la correlación entre la estructura y la secuencia local a través del programa VERIFY 3D (Eisenberg y col., 1997). Se obtuvo un modelo para el cual un 84,72% de los aminoácidos fueron bien evaluados. Finalmente, se realizó un perfil de residuos conservados utilizando el servidor ConSurf (Landau y col., 2005).

3. Transformación por electroporación

3.1. Transformación por electroporación en *E. coli*

Las células electrocompetentes se prepararon a partir de un inóculo de *E. coli* DH5 α crecido en medio LB con ácido nalidíxico (15 μ g/ml) a 37°C hasta una D.O.₆₀₀ de 0,4-0,6 (Sambrook & Russell, 2001). Las células se cosecharon por centrifugación (refrigerada) durante 5 min a 10.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con 250 ml de agua estéril. El pellet se suspendió en 1 ml de glicerol 10% y se centrifugó por 3 min a 3.000 g. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se suspendió en 1,5 ml de glicerol 10%. Las células en glicerol se dividieron en alícuotas de 40 μ l en tubos Eppendorf estériles y se congelaron a -80°C hasta su uso.

Para la electroporación, una alícuota de células electrocompetentes se mezcló con 3,8 μ l del DNA plasmídico y se transfirieron a una cubeta de electroporación de 2 mm. Se aplicó un pulso de 2.500 V, 25 μ F y 200 Ω . Se agregó 1 ml de medio LB y se

incubó durante 1 h a 37°C. Posteriormente, las células se sembraron en LB semi-sólido selectivo.

3.2. Transformación por electroporación en *X. dendrorhous*

La obtención de células electrocompetentes de *X. dendrorhous* se llevó a cabo mediante el protocolo descrito por Adrio y Veiga (Adrio & Veiga, 1995). Se utilizó un cultivo de 100 ml medio YM con la cepa de *X. dendrorhous* a electroporar crecida a 22°C hasta una D.O.₆₀₀ de 4-5. Las células se cosecharon por centrifugación durante 3 min a 4.000 rpm, se suspendieron en 25 ml de una solución filtrada de buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,0 con DTT 25 mM y se incubaron a 22°C por 15 min. Luego, las células se centrifugaron 3 min a 4.000 rpm, se descartó el sobrenadante y se lavó dos veces con 25 ml de la solución STM (sacarosa 270 mM, Tris HCl pH 7,5 10 mM y MgCl₂ 1 mM) previamente enfriada. El pellet obtenido se suspendió en 300 µl de STM y se alicuotó 60 µl en tubos Eppendorf estériles. Las células electrocompetentes de *X. dendrorhous* obtenidas fueron inmediatamente utilizadas. Para electroporar, una alícuota se mezcló con 6 µl de DNA transformante (10 µg). Se utilizó una cubeta de 2 mm y las condiciones de electroporación fueron: 450 V, 125 µF y 600 Ω. Luego se agregó 1 ml de YM y se incubó durante 4 h a 22°C. Posteriormente, las células se sembraron en medio YM semi-sólido con los respectivos antibióticos para seleccionar a los transformantes.

3.3. Transformación por electroporación en *S. pombe*

Para la obtención de células electrocompetentes de *S. pombe* se utilizó el protocolo detallado por Sabatino y Forsburg (Sabatino & Forsburg, 2010). Se utilizó un cultivo de 50 ml de medio mínimo con la levadura *S. pombe* en fase exponencial

(D.O.₆₀₀ de 0,4-1,0). Las células se cosecharon en un tubo tipo Falcón estéril, centrifugando durante 3 min a 4.000 rpm. Los pasos siguientes se realizaron con material previamente enfriado. Las células se lavaron con 25 ml de agua estéril, se centrifugaron por 3 min a 4.000 rpm y se descartó el sobrenadante. Luego se lavaron con 12,5 ml de sorbitol 1M frío, se centrifugó por 3 min a 4.000 rpm y se descartó el sobrenadante. Las células obtenidas se suspendieron en 200 µl de sorbitol 1M frío y se alicuotaron 40 µl en tubos Eppendorf estériles. La alícuota se mezcló con 3 µl de DNA plasmidial (100 ng) y se incubó en hielo durante 5 min. Luego se transfirió la mezcla a una cubeta de 2 mm y se procedió a dar el pulso eléctrico en las siguientes condiciones: 2,3 KV, 25 µF y 200 Ω. Inmediatamente se agregó 0,9 ml de sorbitol 1M frío a la cubeta, se transfirió la mezcla a un tubo Eppendorf estéril y se centrifugó durante 4 min a 6.000 rpm a 4°C. Las células se lavaron con 1 ml de agua estéril fría repitiendo el paso de centrifugación en frío y se suspendieron en 1 ml de sorbitol 1M frío. Inmediatamente las células se sembraron en medio mínimo selectivo sólido.

4. Extracción de carotenoides y esteroides en *X. dendrorhous*

4.1. Extracción de carotenoides

La extracción de carotenoides se realizó mediante el método de extracción con acetona (An & col., 1989). Se utilizó 15 ml de cultivo y se centrifugó durante 5 min a 4.000 rpm. Las células cosechadas se lavaron con 10 ml de agua destilada. El pellet se suspendió en 1 ml de agua destilada y se agregó 500 µl de perlas de vidrio de 0,5 mm. Se molieron durante 3 min y se centrifugaron por 5 min a 14.000 rpm. Se recuperó la fase líquida y se agregó 2 ml de acetona al resto celular; nuevamente, las células se molieron y centrifugaron, y se recuperó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió hasta que el pellet celular quedó blanco. Al volumen recuperado se le agregó la quinta

parte del volumen de éter de petróleo y se agitó en vórtex durante 10 s. Se centrifugó durante 5 min, se recuperó la fase superior y luego, se determinó la absorbancia a 474 nm. La cantidad de pigmentos fue normalizada respecto al peso seco de la levadura en 1 ml cultivo por triplicado. La determinación de pigmentos obtenidos se realizó mediante la siguiente fórmula:

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

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

4.2. Extracción de esteroides

Las células en 5 ml de un cultivo de *X. dendrorhous* se cosecharon por centrifugación durante 5 min a 4.000 rpm. Posteriormente, se realizó un lavado con 5 ml de agua. Al pellet se agregó una solución de 16 ml de etanol 60% con 4 g de KOH, se suspendió e incubó durante 2 h a 80°C. Luego se dejó enfriar y se agregó 5 ml de éter de petróleo, se llevó al vórtex durante 10 s y se centrifugó por 5 min. Se recuperó el sobrenadante y el procedimiento se repitió una vez más agregando 5 ml de éter de petróleo, llevando al vórtex, centrifugando y recuperando el sobrenadante. La cuantificación de esteroides se realizó midiendo la absorbancia a 280 nm, normalizando por peso el seco de levadura utilizando la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g esteroides/g muestra} = \frac{\text{vol. éter} \times A \times 10000}{11.900 \times \text{peso seco}}$$

Donde: vol. éter = volumen de éter de petróleo recuperado (ml); A = es la absorbancia medida a 280 nm; 11.900 = coeficiente de extinción molar de ergosterol en acetona en 1/M cm; 10000 = conversión de unidades µg/g.

5. Ensayo de Western blot

Los ensayos de Western blot para evaluar la complementación de *OFD1* de *X. dendrorhous* en *S. pombe* fueron realizados por el laboratorio del Dr. Peter Espenshade en Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA. Para ello se utilizaron anticuerpos de conejo anti-Sre1 IgG, anti-Ofd1 IgG y anti-Dsc5 IgG junto con el anticuerpo secundario de conejo conjugado con la peroxidasa proveniente del rábano picante (*horseradish peroxidase*). Se realizó el protocolo descrito por Hughes y colaboradores (Hughes y col., 2005). Las cepas fueron crecidas en medio YES y se utilizó un número de 2×10^7 células para realizar la lisis. Se agregó una solución de lisis (NaOH 27 mM y 2-mercaptoetanol 1% (v/v)) y se mantuvo en hielo durante 5 min. Las proteínas fueron precipitadas con ácido tricloroacético 6,4% y se lavaron con acetona. Luego se solubilizaron con 100 µl con buffer de lisis SDS (Tris-HCl 10 mM (pH 6,8), NaCl 100 mM, SDS 1% (p/v), EDTA 1mM, EGTA 1mM) junto con inhibidores de proteasas (ALLN 25 µg/ml (Calbiochem), leupeptina 10 µg/ml, aprotinina 2 µg/ml, pepstatina A 5 µg/ml, PMSF 0,5 µM y DTT 1mM). La concentración de proteínas se determinó mediante un kit de BCA (Pierce). Se mezcló la muestra (50 µg) con 0,25 volúmenes de buffer de carga SDS 5x y se calentó durante 5 min a 100°C. Se realizó un SDS-PAGE al 10% y se transfirió a una membrana de Hybond-C extra (Amersham Biosciences). Luego se realizó el paso de bloqueo de la membrana con leche en polvo sin grasa (5% p/v) en PBS-T (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, Tween 20 0,05% (v/v), pH 7.4). Se incubó la membrana con el

anticuerpo primario (anti-Sre1 dilución 1:2, anti-Ofd1 dilución 1:10.000, anti-Dsc5 dilución 1:10.000) y se lavó con PBS-T. Posteriormente se agregó el anticuerpo secundario y se realizó un lavado con PBS-T. El paso de la detección del inmunoblot, se realizó con el kit SuperSignal CL-HRP (Pierce), el cual se basa en un sustrato sensible quimioluminiscente que permite detectar la peroxidasa del anticuerpo secundario, junto con la película autoradiográfica Blue Bio film (Denville Scientific).

RESULTADOS

1. Aislamiento y análisis bioinformático de *OFD1* y la proteína deducida *Ofd1*

El gen *OFD1* de *X. dendrorhous* se identificó mediante análisis de la base de datos genómica y transcriptómica de esta levadura disponible en el Laboratorio de Genética, utilizando la secuencia del gen *OFD1* de *S. pombe* depositada en la base de datos *PomBase* [SPBC6B1.08c] para la búsqueda. Luego de identificar al posible gen, se diseñaron partidores específicos (1 y 2, tabla 3) para su amplificación mediante PCR desde DNA genómico y la región codificante utilizando cDNA de la cepa CBS-6938 de *X. dendrorhous*. Los fragmentos de DNA obtenidos (2.532 pb para el gen *OFD1* y 1.947 pb para el ORF de *OFD1*) se insertaron en el sitio *EcoRV* del plásmido pBluescript II SK⁻ (pBS), obteniéndose los vectores pBS_Gen-Ofd1-Xd (5.493 pb) y pBS_cDNA-Ofd1-Xd (4.908 pb), los cuales fueron secuenciados utilizando los partidores 4, 5, 6, 7, 8, 9, 32 y 33 (tabla 3). El análisis de las secuencias obtenidas permitió determinar la organización estructural del gen, el cual está compuesto por 7 exones de 294, 197, 324, 79, 672, 252, 129 pb y 6 intrones de 92, 88, 96, 125, 79 y 105 pb (Figura 4).

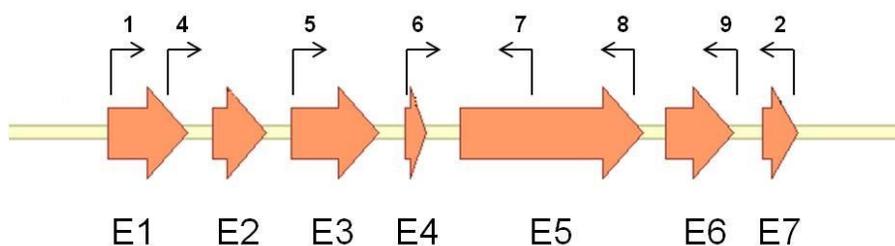


Figura 4. Estructura del gen *OFD1* de *X. dendrorhous*. Representación de la organización estructural del gen *OFD1* (2.532 pb) compuesto por 7 exones (flechas naranjas) y 6 intrones. Se indica con flechas negras los sitios de unión de los partidores utilizados para su secuenciación.

Utilizando la secuencia codificante del gen *OFD1* de *X. dendrorhous* se dedujo que la proteína Ofd1 es de 648 aminoácidos. Tiene un peso molecular aproximado de 71,15 kDa y un punto isoelectrico (pI) de 4,59 (Gasteiger y col., 2005). La proteína Ofd1 de *X. dendrorhous* presenta un 33% de identidad de secuencia con un 92% de cobertura con la proteína Ofd1 (NP_596087) de *S. pombe*, la cual contiene 515 aminoácidos. También presenta un 44% de identidad de secuencia con 97% de cobertura con la proteína nuclear (XP_566748.1) de *Cryptococcus neoformans* de 678 aminoácidos, la cual fue propuesta como posible Ofd1 en la caracterización de la vía SREBP en *C. neoformans*; sin embargo, la delección del gen CNA04020 (el cual codificaría la proteína Ofd1 de *C. neoformans*) no afectó los niveles de factor transcripcional Sre1 bajo 21% o 1% de oxígeno, como se esperaba (Chang y col., 2009). Se realizó un alineamiento con las secuencias aminoacídicas de la proteína Ofd1 deducida de *X. dendrorhous*, la proteína Ofd1 de *S. pombe* y la proteína nuclear de *C. neoformans* (Figura 5). Se determinó que existe una conservación del motivo HXD/E...H, el cual es característico de las 2-OG oxigenasas, donde 3 de esos residuos de aminoácidos son los que coordinan con el cofactor Fe²⁺: histidina (H)- aspártico (D)- histidina (H) (Clifton y col., 2006). Esos residuos de aminoácido en la proteína Ofd1 de *X. dendrorhous* corresponderían a H170, D172 y H253.

También se realizó un análisis de predicción de localización subcelular para la proteína Ofd1 de *X. dendrorhous*. Para comparar los resultados obtenidos, también se realizó el análisis de predicción a la proteína Ofd1 de *S. pombe*, la cual ha sido caracterizada y descrita su localización principalmente en el núcleo y levemente en el citosol (Matsuyama y col., 2006; Hughes & Espenshade, 2008). Mediante el servidor *PredictProtein*, utilizado para analizar secuencias aminoacídicas de los tres dominios

<i>S. pombe</i>	-----MG-----DTQQPTVLDRFAPHALDTSEAE RLSREYH KNGPYNHVVI	41
<i>X. dendrorhous</i>	---MITKRSP-SPIDNAAK KLK PSASQPADFNPHLFDPAQTATLAKEYQSAGPYKHSVV	56
<i>C. neoformans</i>	M PA A V R E R S P S S P S G R A A K S R N N T E H-AVLS S I N H P S A E Q V A A Y R E K Y V N A A P F K H A V L	30
<i>S. pombe</i>	RPLINDILLRNVRKEL-----MENIH FTEKVT DIYRVWQTGDLANLDG--LDKK	88
<i>X. dendrorhous</i>	ESLFSDDLLKQVLI EVNSKDDGGEGGLGGLV GWGMK ETDIYKINQ SFDLSSLSPEHL PQE	116
<i>C. neoformans</i>	S D L L S D L L E G V V E S K K F G M R G E E G S L P G W G E Q K E T D I Y K I H Q T P D L S S L S P E H L P D E	119
<i>S. pombe</i>	E Q N M L K Y L R Q V R D A L Y S E E F R S H V Q K I T G C G P L S A S K K D L S V N V Y S K G C H L M N H D D V I G T	148
<i>X. dendrorhous</i>	R L D K L P A L C Q L K E A L Y S S K F R N W V R E V T G C G P L S Q K K V D G S T R Y T K G C H L L I H D D V I S T	176
<i>C. neoformans</i>	T L E A L P L L T R L K D A L Y S Q E F R N L V R Q V T G C G P L S G T K T D L S A A L Y T K G S H L L I H D D S I S T	179
<i>S. pombe</i>	RCISYILYLVEPD-----EGWKPEYGGALRLFP TLQPSF -----	182
<i>X. dendrorhous</i>	RRISWILYLPSS-----AWPTS Y GGALELYPALPTDPV PF SPE	214
<i>C. neoformans</i>	R L I S Y I L Y L P Y S I E E A P E S Q N V A L Q R S T N G K F L K G W D P A W G G S L E L F S V E T G E E V G ----	235
<i>S. pombe</i>	-----PAADFCHSIPPQ W N Q L S F F R V K P G H S F H D V E E V Y V D K ---PRMAIS GW FH	229
<i>X. dendrorhous</i>	N P P K T W R E E T G S D V F P T K V I P P K W G Q F V F F E V Q P G K S Y H S V E E V V A P E G V V R Q S I S G W F H	274
<i>C. neoformans</i>	-P-----P S V K R F A K V S A T W G Q I V F F E V Q P G R S Y H S V E E V V I D E G R R R F S V S G W F H	285
<i>S. pombe</i>	Y P Q P G E P G Y D A N Y C D N T V S T L Q S L T M K Q M D L E L P R F S Y Y P -----V V K P E P L S K Q D T D I L	284
<i>X. dendrorhous</i>	K P I E G E E G Y E G P E Q E G L A S S L---Q Q I T Q S P L S S V L T P Y P E D S E V P L P G T S L T P D E I T F L	331
<i>C. neoformans</i>	R P V E G E E G Y A P I D K E K E Q K Q L S S L A Q I T A A P S -M P F T P Y N-----T T P P P G L K P S D I A F L	339
<i>S. pombe</i>	SNYINPLYLTPDGI E K L S K R F F Q D S V I V L V E F L N Q E F A N T L L K R I I D A E R Q -----	335
<i>X. dendrorhous</i>	K P Y F H P Q Y L Q R S T L S L S Q Q F G E Q S F L L L E K F L H P T L A K E L E G L I A A R D K A D G L D L A S R Q	391
<i>C. neoformans</i>	S N Y L S P S Y L T V A T L E R L S G F V E A S E I V L H N F L Q E L A A K L K A E T E G V D K D Q ---A S Y	395
<i>S. pombe</i>	---PTPMHSSEVSFPW K T A I P H K H R Y L Y L D H E E F G P D -----II--LPMDL	377
<i>X. dendrorhous</i>	G G L V P S M T V G E V E G W H V V G P S T R Q R F L S D E P E G A T S F D P T G S P S S S P S L L S T L L T V	451
<i>C. neoformans</i>	E G L L P P Q E L G E G -D G W I I Q G P S S K H R Y L N L T S L T-----I S T P I V Q S I H N V L	441
<i>S. pombe</i>	Q R L P A F Q R W I Q L V S G L P L R S F H Q V G R R F R P G S D F T L A T N D I---A L L E A T L C L S P G T G I	434
<i>X. dendrorhous</i>	L P S Q A F R T W L A L I T G F V P M A R R L E A R R F R P G L D Y T L A R G E D E --E V R L D F R L G L T P G E K W	509
<i>C. neoformans</i>	F P S E A F R A W L S V V S L A P T G H R N E A R R F R N G L D Y T L A N G E G K D G A R L D V S L G M T---W W	498
<i>S. pombe</i>	AN-----TDNGAYDIYMI G DE D PD V DA V Y-----	459
<i>X. dendrorhous</i>	ED-----K E G G E E W G G W E A Y L A P P D D D -D D P A V Y Q S S K A Q A A Q H S H A D G E E C S H D---	558
<i>C. neoformans</i>	A D V P A G S D E E D A L V E N G G W E A Y L A A P D E D- E D P T V Y Q S S V A K K A V K E S H Q E P K E P N G K K V	557
<i>S. pombe</i>	-----RGDQQD S I L L S L P A A W	476
<i>X. dendrorhous</i>	-----H L K D -----G E T N G D A A E D E D D D E D D G P L L T S Q P S F	590
<i>C. neoformans</i>	E E K S K P Q A N G S S E K K D G P S I S I G G Q E L F D P D Q F S P S D F S D S E A G D E D D G P L L T Q P V A F	617
<i>S. pombe</i>	N V F S L V Y R D E G V L Q F V K Y V S R Q A E S S R W D I Y S Q W N P V A E-----	515
<i>X. dendrorhous</i>	N S V M I V M R D A K V M K F T K Y L S A A A P G C R W D I G G E W E I G A V E A E S D D E D E G E E A S S Q---D	647
<i>C. neoformans</i>	N K L L L V L R D P G V M K F V K Y L G A N A P G S R W D V S G E F E V G V L E E E P A E D G A P E A E G S G E G K A D	677
<i>S. pombe</i>	-	---
<i>X. dendrorhous</i>	A	648
<i>C. neoformans</i>	A	678

Figura 5. Alineamiento de secuencias Ofd1 deducida de *X. dendrorhous*, Ofd1 de *S. pombe* y proteína nuclear de *C. neoformans*. El alineamiento de secuencias se realizó mediante Clustal Omega. Se utilizó la secuencia de la proteína Ofd1 deducida de *X. dendrorhous*, Ofd1 (NP_596087) de *S. pombe* y proteína nuclear tipo Ofd1 (XP_566748.1) de *C. neoformans*. Los asteriscos destacan los residuos conservados en las tres secuencias aminoacídicas. Los residuos están coloreados según sus propiedades fisicoquímicas: rojo (pequeños hidrofóbicos, incluido aromáticos), azul (residuos ácidos), magenta (residuos básicos) y verde (residuos con grupo hidroxilo, sulfidrido o amino). El motivo característico de las 2-OG oxigenasas (HXD/E...H) conservado se destaca en marco negro.

de la vida, se determinó que la localización subcelular de ambas proteínas es nuclear, con una puntuación de 25 para Ofd1 de *X. dendrorhous* y 37 para Ofd1 de *S. pombe*, siendo la puntuación (0) no confiable y (100) confiable (Goldberg y col., 2012). También se utilizó el servidor *PSORT II Prediction*, recomendado para análisis de secuencias de animales y levaduras. Se obtuvo una probabilidad de localización citoplasmática de 60,9% para Ofd1 de *X. dendrorhous* y 73,9% para Ofd1 de *S. pombe* (Nakai & Horton., 1999).

Se realizó un modelamiento por homología de la proteína Ofd1 de *X. dendrorhous* a través de una colaboración con el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Se utilizó el software Modeller 9.15 junto con la información de la estructura cristalográfica disponible de dos proteínas pertenecientes al dominio de las oxoglutarato/hierro dependiente dioxigenasa, al cual pertenece Ofd1. Este dominio se caracteriza por catalizar la oxidación de un sustrato orgánico, utilizando como cofactor el hierro ferroso (Fe^{2+}) localizado en su sitio activo y como sustrato el 2-oxoglutarato (2OG) (Aravind & Koonin, 2001). Entonces, se utilizó la proteína OGFOD1 (28% de identidad y 57% de cobertura) de *Homo sapiens* (PDB: 4NHX), la cual corresponde a una prolil 3-hidroxilasa que cataliza la 3-hidroxilación del residuo de prolina 62 de la pequeña subunidad del ribosoma RPS23, regulando el término de la traducción de proteínas (Horita y col., 2015). La otra proteína utilizada fue Tpa1p (31% de identidad y 95% de cobertura) de *S. cerevisiae* (PDB: 4NHK). Esta proteína corresponde a una prolina 4-hidroxilasa, la cual al igual que OGFOD1, hidroxila un residuo de prolina (Pro-64) de la pequeña subunidad del ribosoma RPS23 (Kim y col., 2010). Se obtuvieron 10 modelos, los cuales fueron evaluados por correlación entre la estructura y la secuencia

local mediante el programa VERIFY 3D, determinando que el mejor modelo obtuvo un 84,72% de los aminoácidos bien evaluados. Finalmente se realizó un perfil de residuos conservados mediante el servidor ConSurf (Figura 6). La visualización del modelo obtenido permite distinguir tanto la región amino terminal (NTD) como carboxilo terminal (CTD), así como el linker entre ambos dominios en la proteína Ofd1 de *X. dendrorhous*. Se observa una región ácida, la cual no pudo ser integrada al modelo correctamente por falta de información, por esta razón sobresale de la estructura. Se ha propuesto que esta región podría estar implicada en la interacción proteína-proteína con Nro1 en *S. pombe* (Horita y col., 2015).

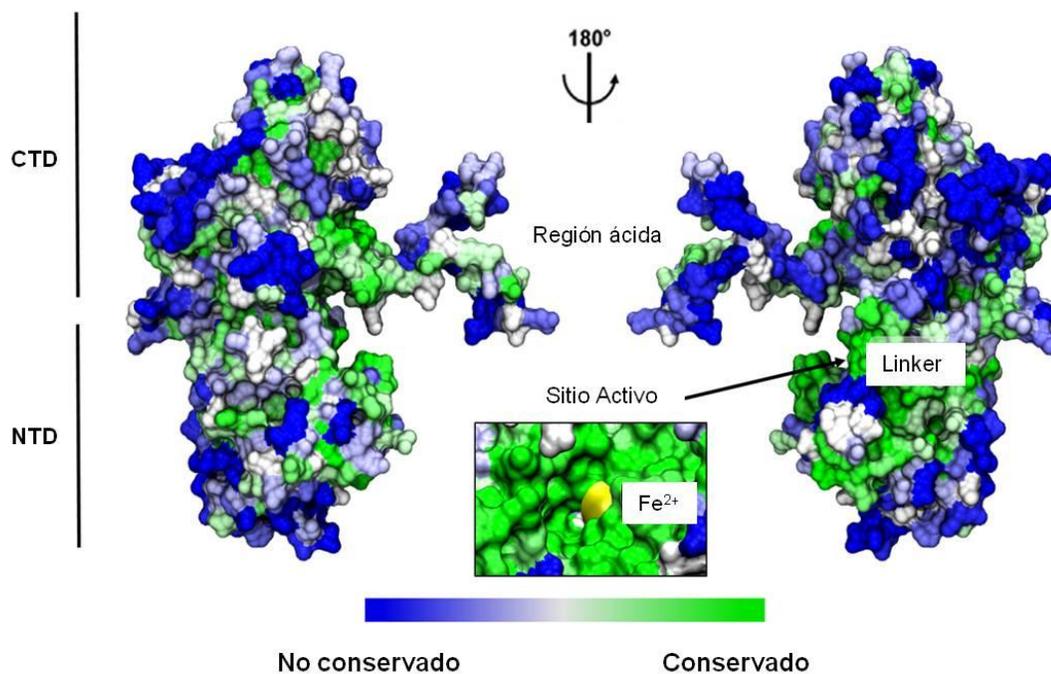


Figura 6. Perfil de residuos conservados del modelo por homología obtenido de la proteína Ofd1 de *X. dendrorhous*. Se utilizó el software Modeller 9.15 para generar el modelo por homología de la proteína Ofd1 de *X. dendrorhous* utilizando como molde las proteínas OGFOD1 (PDB: 4NHX) y Tpa1p (PDB: 4NHK). El perfil de residuos conservados se realizó con el servidor ConSurf. En el extremo izquierdo se destacan las regiones correspondientes al dominio amino terminal (NTD) y dominio carboxilo terminal (CTD). Se observa en detalle el sitio activo donde se encuentra el hierro ferroso (Fe^{2+}). En una barra de colores en la zona inferior de la figura se especifica el grado de residuos conservados; azul (no conservado) y verde (altamente conservado).

Posteriormente, se observó que existe alta conservación de residuos de aminoácidos en el sitio activo donde se encuentra el hierro ferroso (Fe^{2+}). Por esta razón se realizó un alineamiento múltiple de secuencias con proteínas homólogas a Ofd1 de diferentes organismos (Figura 7A). Se presenta la región del sitio activo donde se observa que los residuos de aminoácidos que componen el motivo HXD/E...H, que coordinan con el cofactor Fe^{2+} , se encuentran totalmente conservados. También se conservan residuos que han sido descritos como característicos de las prolil hidroxilasas (leucina y arginina) y la arginina que se enlaza con el 2-oxoglutarato (Horita y col., 2015). También se realizó una visualización en detalle del sitio activo (Figura 7B) del modelo por homología generado para Ofd1 de *X. dendrorhous*, donde se destacan los residuos altamente conservados mencionados anteriormente. Los residuos que coordinan con el hierro ferroso: Histidina 170, Aspártico 172 y Histidina 253, los residuos característicos de las prolil hidroxilasas: Leucina 167 y Arginina 177, y el residuo que se enlaza al 2-oxoglutarato: Arginina 266.

Finalmente se realizó un análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas empleadas en el alineamiento de la figura 7. Para ello, se construyó un árbol filogenético (Figura 8) por el método de *neighbor-joining* (Saitou & Nei, 1987) con un bootstrap de 1.000 réplicas en el software MEGA 7 (Kumar y col., 2016). A partir de este árbol se determinó que la proteína Ofd1 de *X. dendrorhous* agrupó con las proteínas de hongos, particularmente con basidiomicetes, división a la que pertenece *X. dendrorhous*.

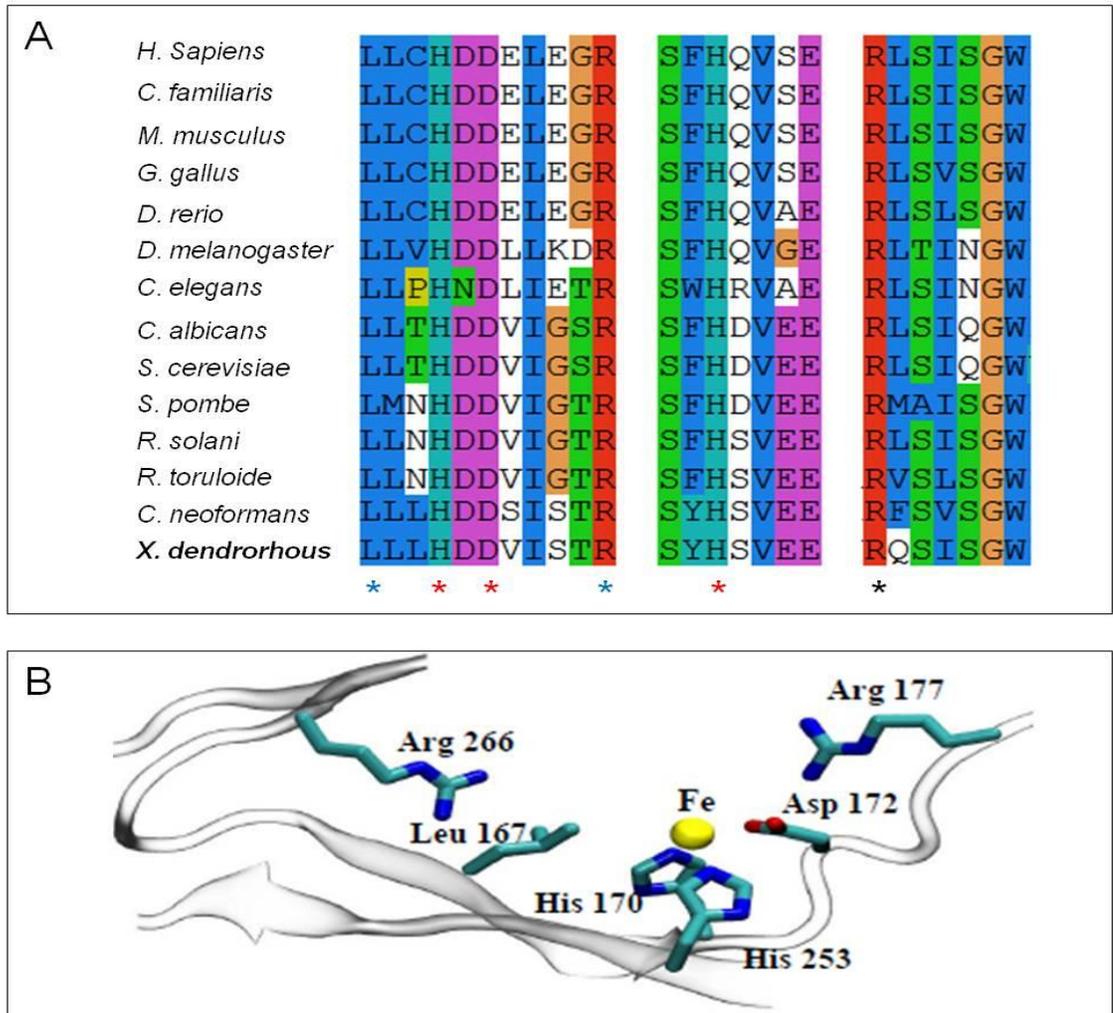


Figura 7. Sitio activo de la proteína Ofd1 de *X. dendrorhous*. (A) Alineamiento múltiple de secuencias de proteínas homólogas a Ofd1 de diferentes organismos realizado con Clustal Omega: *Homo sapiens* (NP_060703.3), *Canis familiaris* (XP_535297.2), *Mus musculus* (XP_006531116.1), *Gallus gallus* (XP_414062.4), *Danio rerio* (NP_955983.1), *Drosophila melanogaster* (NP_733061.1), *Caenorhabditis elegans* (NP_495088.1), *Candida albicans* (XP_711467.1), *Saccharomyces cerevisiae* (NP_010969.1), *Schizosaccharomyces pombe* (NP_596087.1), *Rhizoctonia solani* (KEP52714.1), *Rhodospiridium toruloide* (EMS20028.1), *Cryptococcus neoformans* (XP_777912.1) y *Xanthophyllomyces dendrorhous*. En asterisco rojo se indican los residuos que coordinan con el hierro ferroso, en asterisco celeste los residuos característicos de las prolil hidroxilasas y el asterisco negro corresponde al residuo que se enlaza al 2-oxoglutarato. (B) Visualización del sitio activo del modelo de Ofd1 de *X. dendrorhous*, se destaca en amarillo el hierro ferroso. También se muestran los residuos que coordinan con el hierro ferroso: His170, Asp172 y His253, los residuos característicos de las prolil hidroxilasas: Leu167 y Arg177, y el residuo que se enlaza al 2-oxoglutarato: Arg266.

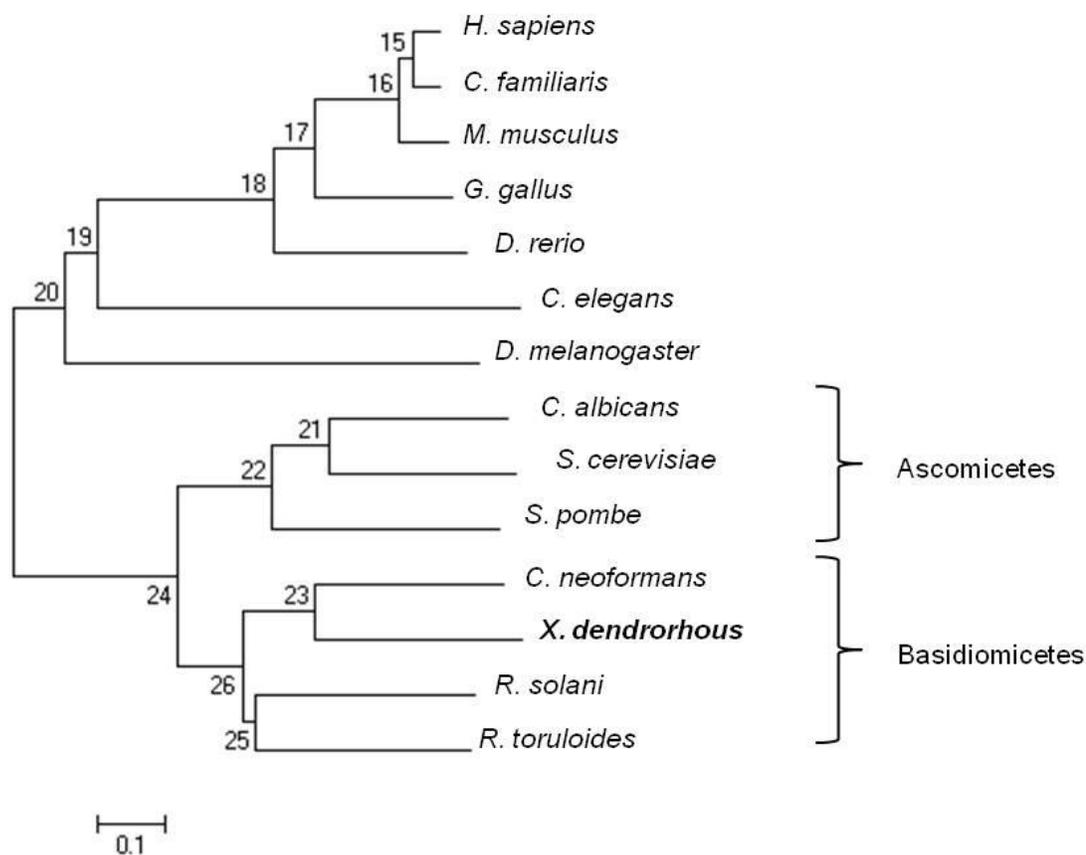


Figura 8. Árbol filogenético de proteínas homólogas a Ofd1 de *X. dendrorhous*. Los números en los nodos indican el porcentaje de respaldo para esos nodos luego de 1.000 repeticiones de análisis *bootstrap*. Secuencias aminoacídicas utilizadas: *Homo sapiens* (NP_060703.3), *Canis familiaris* (XP_535297.2), *Mus musculus* (XP_006531116.1), *Gallus gallus* (XP_414062.4), *Danio rerio* (NP_955983.1), *Drosophila melanogaster* (NP_733061.1), *Caenorhabditis elegans* (NP_495088.1), *Candida albicans* (XP_711467.1), *Saccharomyces cerevisiae* (NP_010969.1), *Schizosaccharomyces pombe* (NP_596087.1), *Rhizoctonia solani* (KEP52714.1), *Rhodospiridium toruloide* (EMS20028.1), *Cryptococcus neoformans* (XP_777912.1) y *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Se indica las secuencias de proteínas provenientes de organismos ascomicetes y basidiomicetes.

2. Obtención de cepas mutantes $\Delta ofd1$ en *X. dendrorhous*

2.1. Construcción de vector para reemplazo del gen *OFD1*

Para realizar la delección del gen *OFD1* en *X. dendrorhous* se construyó un módulo de recombinación, el cual contenía un módulo que confiere resistencia a antibiótico en *X. dendrorhous*, flanqueado por las regiones homólogas río arriba y río abajo del gen. Para ello se amplificó mediante PCR la región río arriba del gen *OFD1*: FragA de 586 pb, y la región río abajo: FragB de 535 pb. Ambos segmentos fueron unidos mediante OE-PCR, por lo cual se añadió una extensión de solapamiento de 20 pb a los partidores utilizados (11 y 12, Tabla 3) para amplificar ambos fragmentos (señalado en rojo en el esquema de la Figura 9A). La unión de FragA con FragB originó un amplificado de 1.121 pb denominado FragAB.

La región FragAB obtenida fue ligada al vector pBluescript II SK⁻ (pBS) digerido con *EcoRV* y replicado en *E. coli* DH5 α , obteniéndose el vector pBS_FragAB-Ofd1 (Figura 10A). Se seleccionaron las colonias de *E. coli* resistentes a ampicilina blancas y mediante PCR de colonia se determinaron cuáles contenían la región FragAB como inserto, utilizando los partidores que amplifican dicha región (13 y 15, Tabla 3). Luego se purificó el DNA plasmídico de estas colonias y se analizó por PCR, escogiendo aquella que cumplió con el patrón de bandas esperado (Figura 10B). Además se secuenció el vector pBS_FragAB-Ofd1 con los partidores universales M13 (32 y 33, tabla 3), para corroborar que no hubiera errores en la secuencia.

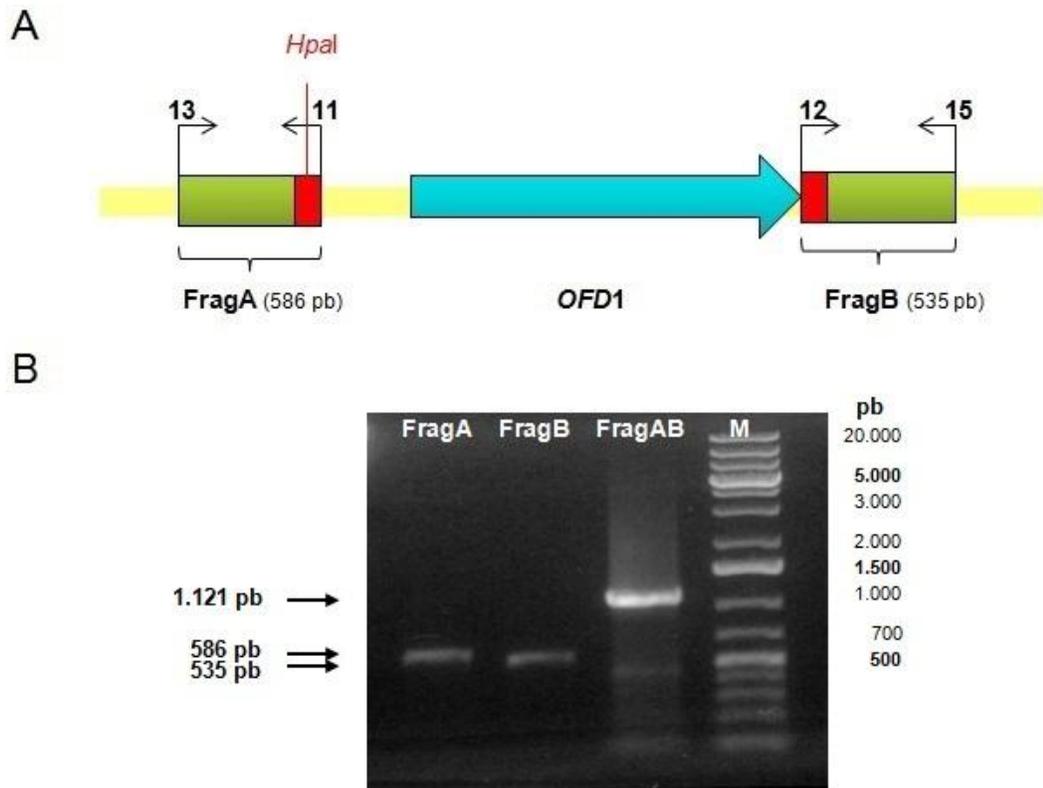


Figura 9. Obtención de la región homóloga río arriba y abajo del gen *OFD1* para la construcción del módulo de recombinación. (A) Representación del gen *OFD1* en el genoma de *X. dendrorhous*. El gen está indicado como flecha celeste, las regiones amplificadas para construir el módulo de recombinación: FragA y FragB, se muestran en cuadros verdes, en tanto la región de solapamiento está coloreada de color rojo en cada fragmento. Los partidores utilizados están señalados por las flechas negras. (B) Amplificación por PCR de la región río arriba del gen, FragA (586 pb), río abajo, FragB (535 pb) y el producto de solapamiento de ambos fragmentos unidos mediante OE-PCR, FragAB (1.121 pb). El carril M corresponde al marcador de peso molecular 1Kb, donde el tamaño de las bandas generadas por el marcador se indican a la derecha.

La región FragA contenía un sitio de reconocimiento de corte de la enzima *HpaI*, el cual fue utilizado para digerir el plásmido pBS_FragAB-Ofd1, linealizándolo. Al vector lineal se le ligó un módulo que confiere resistencia al antibiótico Zeocina o a Higromicina B. Estos módulos tienen un promotor constitutivo EF-1 α (promotor del factor de elongación 1 α) y el terminador de la transcripción GPD (terminador del gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), ambos de *X. dendrorhous* (Niklitschek y col., 2008).

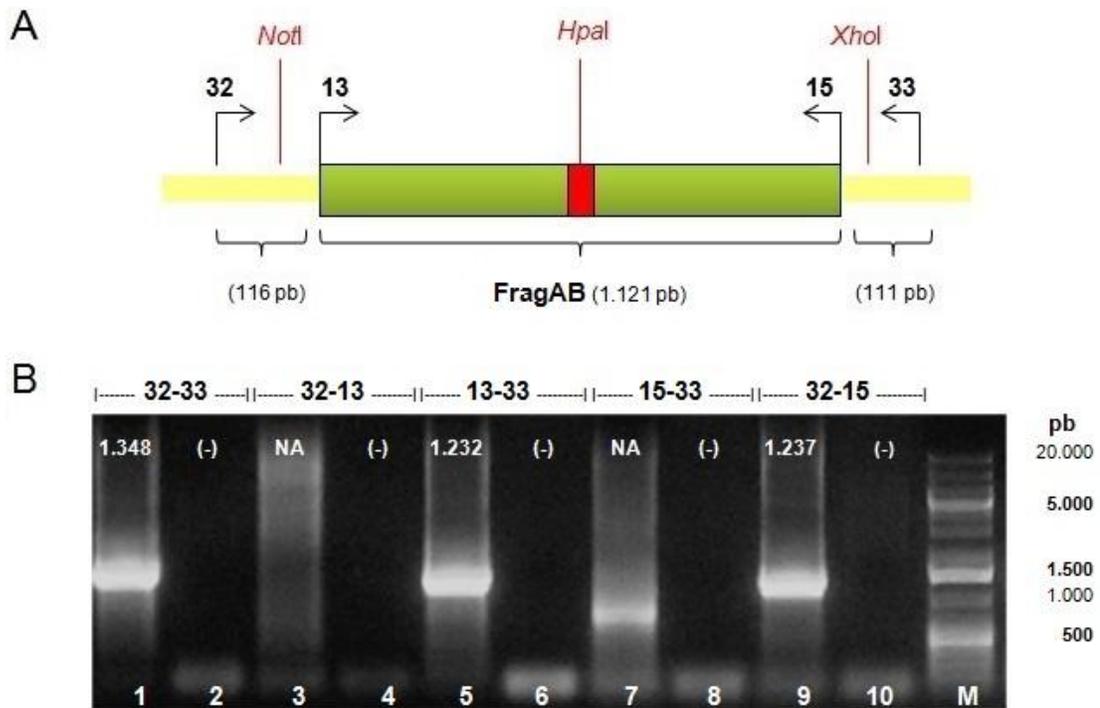


Figura 10. Obtención del vector pBS_FragAB-Ofd1. (A) Representación del vector pBS_FragAB-Ofd1. En cuadro verde se presenta la región FragAB ligada al vector pBluescript II SK⁻ (pBS) (amarillo), con la región de solapamiento coloreada roja, donde se encuentra el sitio de reconocimiento de corte de la enzima *HpaI*. En la zona superior se indican con flechas negras los primarios utilizados para analizar el vector pBS_FragAB-Ofd1 y en la zona inferior los tamaños de cada región. Además se destacan los sitios de corte de las enzimas *NotI* y *XhoI* utilizadas para liberar la construcción. (B) Análisis de la orientación del inserto en el vector pBS_FragAB-Ofd1 por PCR. Carril 1: amplificado del inserto con los primarios universales M13. Los amplificadores obtenidos en los carriles 5 y 9 corroboran la inserción del segmento FragAB en el sentido representado en A), apoyando este resultado en los carriles 3 y 7 (orientación contraria) no hay amplificado (NA) o es inespecífico. Los carriles 2, 4, 6, 8 y 10 corresponden al control negativo de cada reacción de PCR. El carril M corresponde al marcador de peso molecular 1Kb, el tamaño de las bandas generadas por el marcador se indican a la derecha. En la región superior en negro se indican los primarios utilizados y en blanco los tamaños (pb) esperados de cada amplificado.

Mediante el ligado del vector pBS_FragAB-Ofd1 lineal con el módulo que confiere resistencia a higromicina B se obtuvo el vector pBS_FragAB-Ofd1_Hyg (Figura 11 A), en tanto el ligado con el módulo de resistencia a Zeocina, se obtuvo el vector pBS_FragAB-Ofd1_Zeo (Figura 11 C), al transformar *E. coli* DH5 α con los productos de la reacción de ligado seleccionando colonias que fueran resistentes a ampicilina. Todas las colonias obtenidas eran blancas ya que el gen de la β -galactosidasa ya se había interrumpido al insertar el FragAB, por lo cual fue necesario analizar por PCR de

colonia alrededor de 90 colonias con los partidores que amplifican los módulos de resistencia a antibiótico (17 y 20, tabla 3), hasta determinar alguna que tuviera como inserto los módulos de resistencia a antibiótico. Se extrajo DNA plasmídico de las colonias escogidas que dieron positivo en el análisis por PCR de colonia, y se realizó un PCR analizando específicamente cada componente del módulo de recombinación de los vectores pBS_FragAB-Ofd1_Hyg y pBS_FragAB-Ofd1_Zeo. El patrón de bandas obtenido en el análisis por PCR del vector pBS_FragAB-Ofd1_Hyg (Figura 11B) no fue lo esperado, obteniéndose amplificados inespecíficos en algunos casos. En tanto, el patrón de bandas del vector pBS_FragAB-Ofd1_Zeo fue correcto y se usó para transformar a *X. dendrorhous*.

2.2 Transformación de *X. dendrorhous*

Se transformaron las cepas: CBS-6938 (silvestre), CBS-*cyp61*⁻ (mutante que no produce ergosterol y sobre produce carotenoides) y CBS-*SRE1N* (mutante que expresa solo la forma activa del factor de transcripción Sre1). Estas cepas fueron utilizadas con el propósito de caracterizar el efecto de la delección del gen *OFD1* tanto en la cepa silvestre, como en cepas en que la vía SREBP estaría activa (CBS-*cyp61*⁻ y CBS-*SRE1N*) y en el caso particular de la cepa CBS-*SRE1N*, donde no existe la primera regulación por oxígeno de la vía SREBP (corte de Sre1 en el aparato de Golgi, que permite la liberación de la forma activa del factor de transcripción). El uso de estas dos últimas cepas podría favorecer el fenotipo esperado: aumento de esteroides y carotenoides, en las mutantes $\Delta ofd1$, si es que este gen participa en la vía SREBP regulando los niveles de Sre1.

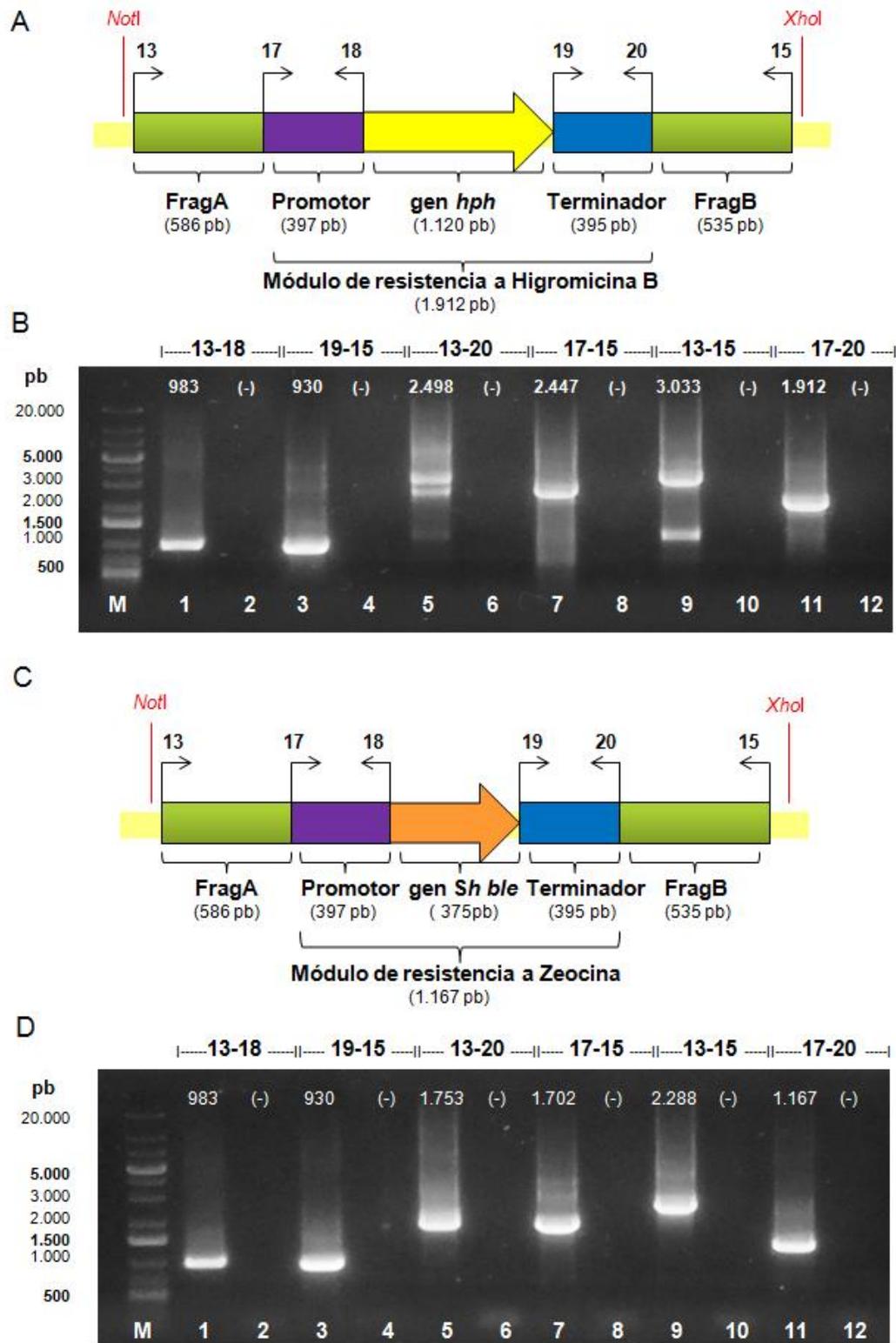


Figura 11. Obtención de los vectores pBS_FragAB-Ofd1_Hyg y pBS_FragAB-Ofd1_Zeo, que contienen los módulos de recombinación. (A) y (C) corresponden a la representación de los vectores

pBS_FragAB-Ofd1_Hyg y pBS_FragAB-Ofd1_Zeo, respectivamente. En cuadro verde la región del FragA y FragB, en morado el promotor EF 1- α , en celeste el terminador GPD, en amarillo el gen *hph* (resistencia a higromicina) y en naranja el gen *Sh ble* (resistencia a Zeocina). En la zona superior se indican los partidores utilizados para analizar por PCR los vectores y abajo el detalle de los componentes de los vectores con sus respectivos tamaños, además se destaca los sitios de corte de las enzimas *NotI* y *XhoI* utilizadas para liberar la construcción. (C) y (D) corresponden al análisis por PCR de los vectores pBS_FragAB-Ofd1_Hyg y pBS_FragAB-Ofd1_Zeo, respectivamente. Los carriles 2, 4, 6, 8, 10 y 12 corresponden al control negativo de cada reacción de PCR. El carril M corresponde al marcador de peso molecular 1Kb, el tamaño de las bandas generadas por el marcador se indican a la izquierda. En la región superior en negro se indican los partidores utilizados y en blanco los tamaños (pb) esperados de cada amplificado.

Para obtener los módulos de recombinación necesarios para la transformación se realizó la digestión del vector pBS_FragAB-Ofd1_Zeo con las enzimas *NotI* y *XhoI* que permiten liberar el módulo de recombinación (FragA - resistencia a antibiótico - FragB). Luego se transformaron las tres cepas de *X. dendrorhous* con el producto de esta digestión. Se obtuvieron de 1 a 2 colonias totales resistentes a zeocina por cada cepa transformada, éstas fueron seleccionadas y se analizaron por PCR. Las mutantes obtenidas fueron denominadas CBS-6938 $\Delta ofd1$, CBS-*cyp61* $\Delta ofd1$ y CBS-SRE1N $\Delta ofd1$. El detalle del análisis de las cepas obtenidas y de sus parentales se muestra en la Figura 12, donde se observa que las cepas $\Delta ofd1$ obtenidas tanto para CBS-6938, CBS-*cyp61* y CBS-SRE1N, no presentan el gen *OFD1*, en su lugar se encuentra el módulo de resistencia a zeocina.

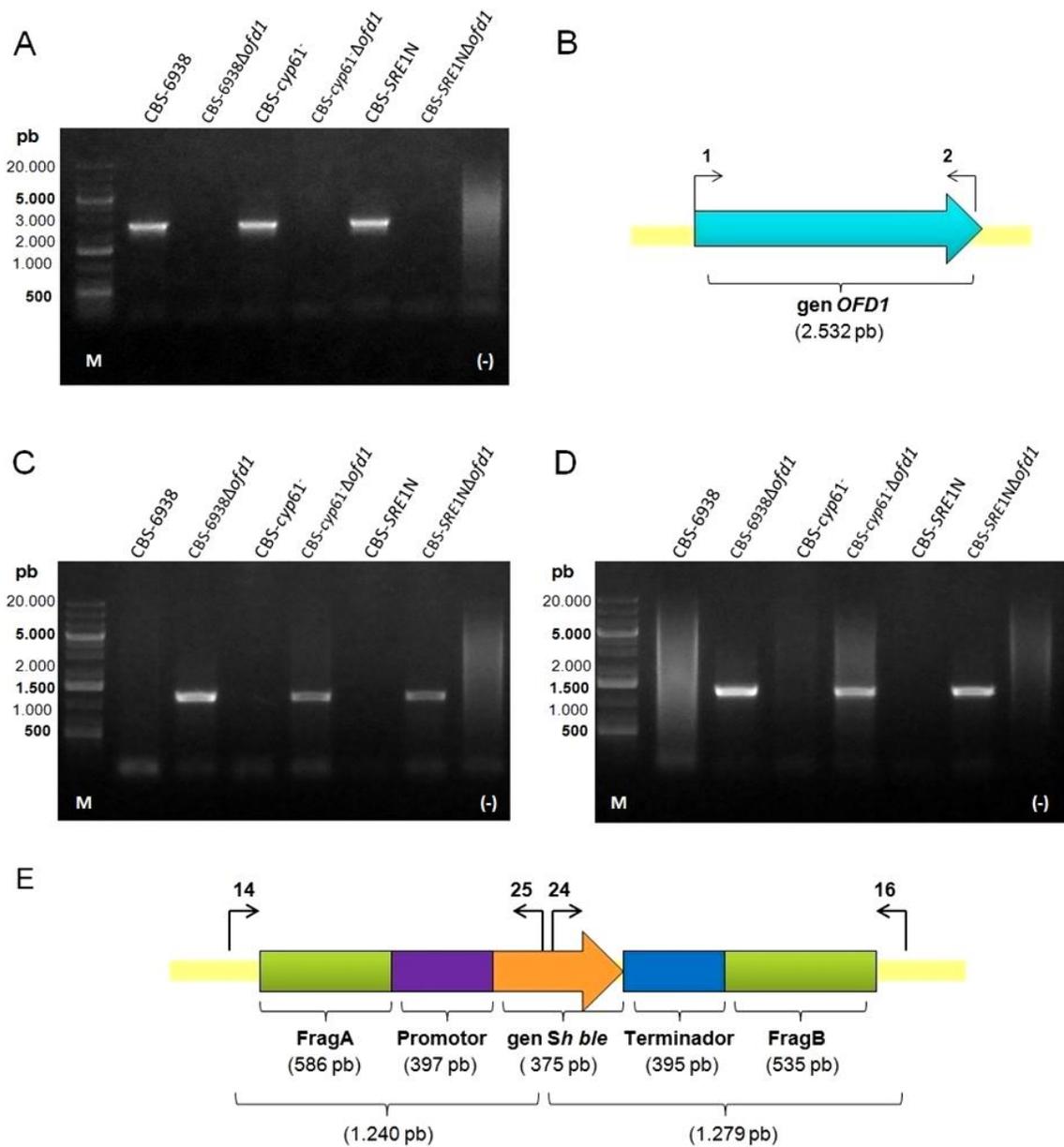


Figura 12. Verificación de la recombinación del gen *OFD1* por el módulo de resistencia a zeocina. (A), (C) y (D) Análisis por PCR de las cepas CBS-6938, CBS-6938 Δ *ofd1*, CBS-*cyp61*⁻, CBS-*cyp61* Δ *ofd1*, CBS-SRE1N y CBS-SRE1N Δ *ofd1*. En (A) se utilizaron los partidores que amplifican el gen *OFD1* (partidores: 1-2, amplificado: 2.532 pb), en (C) los partidores que amplifican desde la región río arriba del *fragA* al interior del gen *Sh ble* de resistencia a zeocina (partidores: 14-25, amplificado: 1.240 pb) y en (D) los partidores que amplifican desde la mitad del gen *Sh ble* a la región externa del *FragB* (partidores: 24-16, amplificado: 1.279 pb). El carril 7 corresponde al control negativo de la reacción de PCR y el carril M corresponde al marcador de peso molecular 1Kb, el tamaño de las bandas generadas por el marcador se indican a la izquierda. (B) y (E) corresponden a la representación del gen *OFD1* en el genoma y la inserción del módulo de resistencia a zeocina, respectivamente. En la zona superior se indican los partidores utilizados para el análisis por PCR y abajo el detalle de los componentes con sus respectivos tamaños.

3. Caracterización fenotípica de las cepas mutantes $\Delta ofd1$ de *X. dendrorhous*

Para estudiar el efecto de la delección del gen *OFD1* en las cepas CBS-6938 $\Delta ofd1$, CBS-*cyp61* $\Delta ofd1$ y CBS-*SRE1N* $\Delta ofd1$, respecto a sus parentales se evaluó la coloración en medio sólido, se realizaron curvas de crecimiento por triplicado, se determinó la cantidad de carotenoides y esteroides totales producidos, así como su composición por RP-HPLC, se estudió la expresión génica mediante RT-qPCR y el crecimiento tanto en condiciones de hipoxia como en presencia de azoles.

3.1. Fenotipo de las cepas en estudio

Para evaluar si la delección del gen *OFD1* produjo un cambio fenotípico a simple vista, se sembraron los 6 cepas en estudio: parentales (CBS-6938, CBS-*cyp61* Δ y CBS-*SRE1N*) junto a las mutantes obtenidas (CBS-6938 $\Delta ofd1$, CBS-*cyp61* $\Delta ofd1$ y CBS-*SRE1N* $\Delta ofd1$) en medio semi-sólido (Figura 13). En este ensayo no se observaron cambios en la textura, crecimiento ni pigmentación, al comparar cada cepa mutante $\Delta ofd1$ con su parental.

Luego se realizaron dos experimentos de curvas de crecimiento, el primero de ellos incluyó las cepas CBS-6938, CBS-6938 $\Delta ofd1$, CBS-*cyp61* Δ y CBS-*cyp61* $\Delta ofd1$ (Figura 14A) cultivadas en paralelo y en triplicados, y el segundo experimento a las cepas CBS-6938, CBS-6938 $\Delta ofd1$, CBS-*SRE1N* y CBS-*SRE1N* $\Delta ofd1$ (Figura 14B), también cultivadas en triplicados simultáneamente. En cada experimento se incluyó la cepa CBS-6938, ya que ésta es la parental de todas las cepas en estudio y no se observó diferencias en las curvas de crecimiento de las cepas.

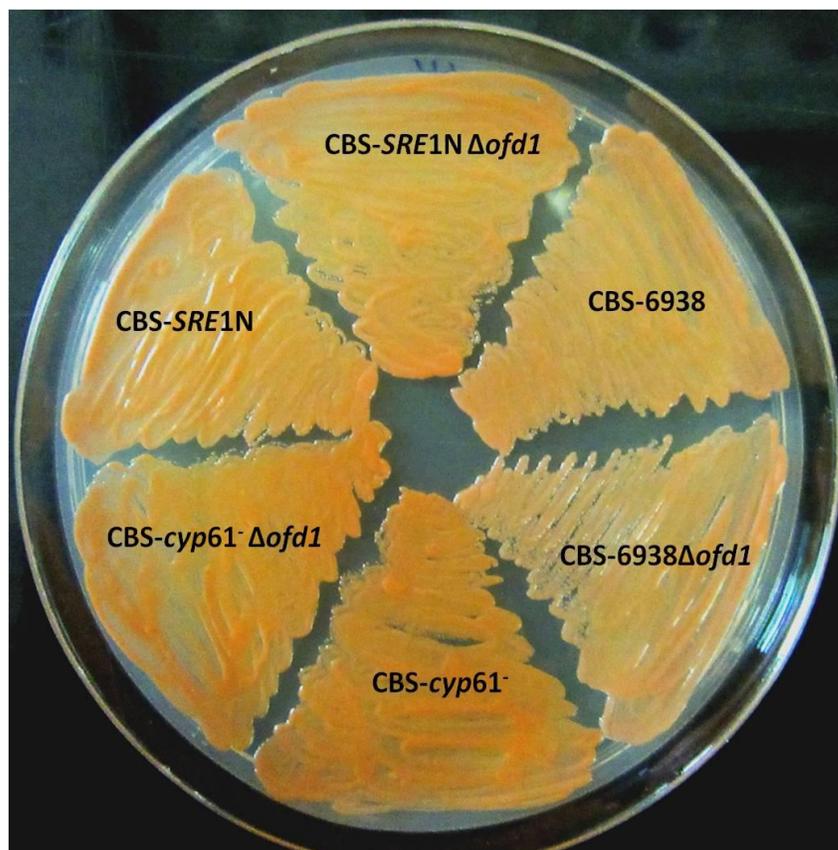


Figura 13. Comparación fenotípica entre las cepas mutantes $\Delta ofd1$ y sus parentales. Cepas CBS-6938, CBS-6938 $\Delta ofd1$, CBS-*cyp61*⁻, CBS-*cyp61*⁻ $\Delta ofd1$, CBS-SRE1N y CBS-SRE1N $\Delta ofd1$ sembradas en placa con medio YM sólido. Las cepas mutantes obtenidas $\Delta ofd1$ no presentaron cambios a simple vista respecto a sus parentales.

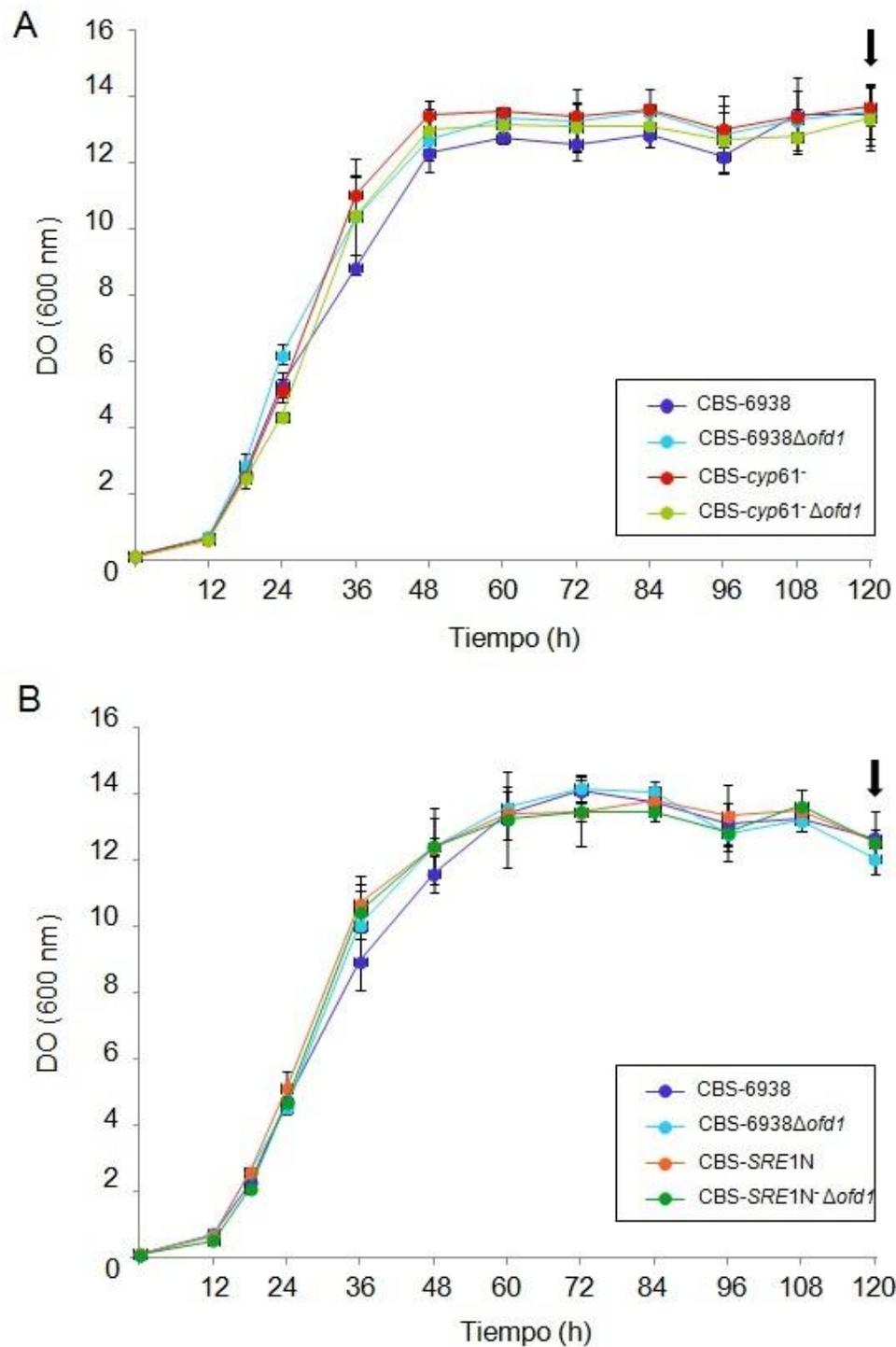


Figura 14. Curvas de crecimiento. (A) Cepas: CBS-6938, CBS-6938 Δ ofd1, CBS-cyp61⁻ y CBS-cyp61⁻ Δ ofd1. (B) Cepas: CBS-6938, CBS-6938 Δ ofd1, CBS-SRE1N y CBS-SRE1N Δ ofd1. Todas las curvas se realizaron por triplicado en medio YM líquido a 22°C con agitación constante. Se tomó una muestra a las 120 h de cultivo, en la fase estacionaria (flecha negra). Se midió la D.O. a 600 nm y se graficó respecto al tiempo. Ninguna presentó cambios significativos en el crecimiento.

3.2. Análisis de cantidad y composición de carotenoides y esteroides

Se realizó extracción de carotenoides y esteroides para cada triplicado de las 6 cepas en estudio a partir de las curvas de crecimiento realizadas previamente, luego de 120 h de cultivo. Se determinó la cantidad total producida tanto de carotenoides como de esteroides (Figura 15) y al comparar a los parentales con su respectivo mutante $\Delta ofd1$, sólo se observó un cambio significativo en la cantidad de esteroides producidos entre las cepas CBS-*cyp61*⁻ (6,1 mg/g de peso seco) y CBS-*cyp61*⁻ $\Delta ofd1$ (7,0 mg/g de peso seco), siendo esta última la que produjo más (Figura 15D).

Además, se determinó la composición de carotenoides (Tabla 4) y esteroides (Tabla 5) por RP-HPLC. Los cambios en la composición entre las cepas CBS-6938 y CBS-6938 $\Delta ofd1$ fueron significativos para la equinenona y licopeno, ambos disminuidos en la mutante CBS-6938 $\Delta ofd1$. Entre las cepas CBS-*cyp61*⁻ y CBS-*cyp61*⁻ $\Delta ofd1$ fue significativa la disminución de OH-K-toruleno, equinenona y licopeno en la mutante CBS-*cyp61*⁻ $\Delta ofd1$. En cambio entre las cepas CBS-SRE1N y CBS-SRE1N $\Delta ofd1$, fue significativo la disminución de cantaxantina en la mutante CBS-SRE1N $\Delta ofd1$. En tanto la composición de esteroides no se vió afectada para ninguna de las cepas comparando cada mutante $\Delta ofd1$ con su parental.

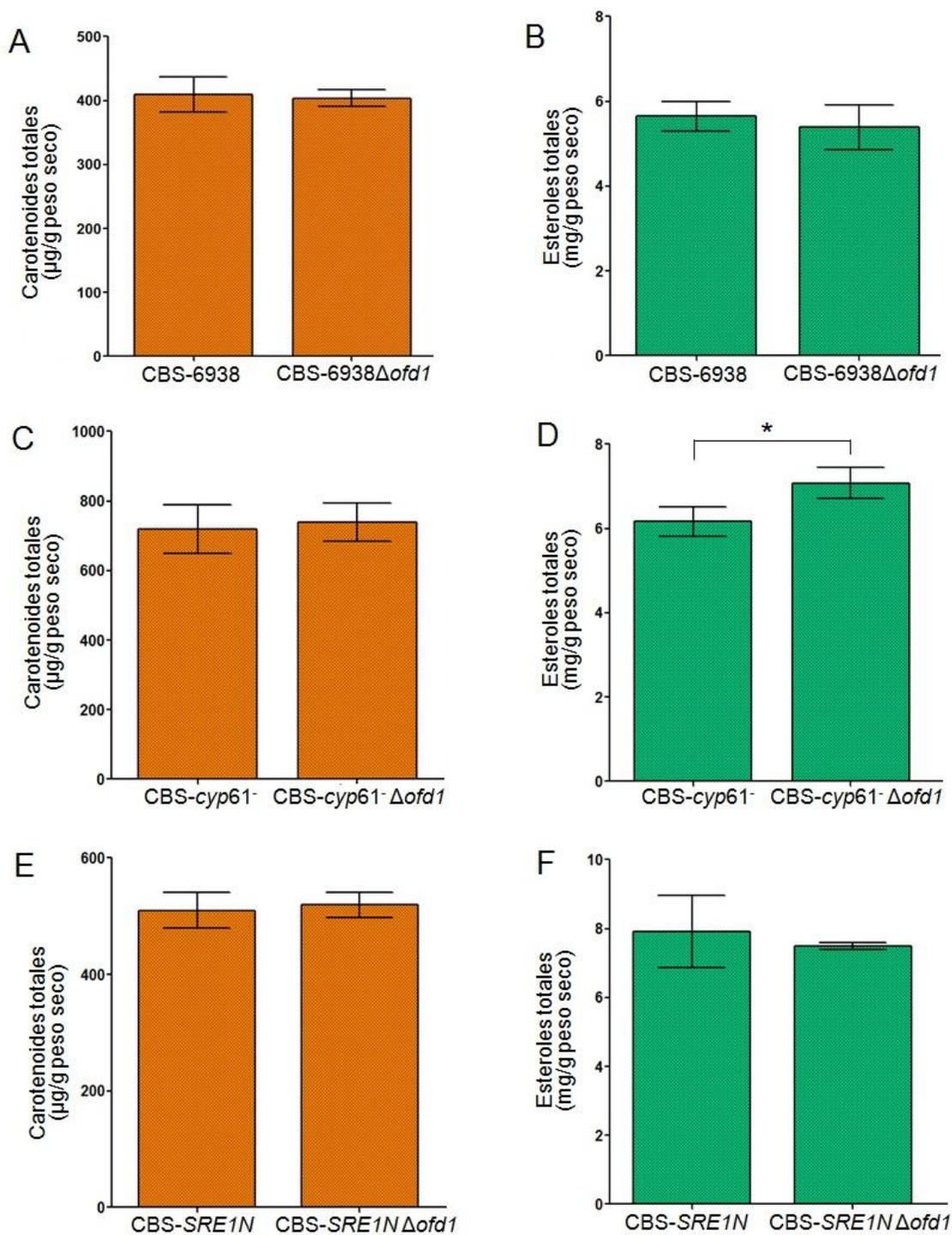


Figura 15. Análisis de carotenoides y esteroides totales producidos por las cepas CBS-6938, CBS-6938 Δ ofd1, CBS-*cyp61*⁻, CBS-*cyp61*⁻ Δ ofd1, CBS-SRE1N y CBS-SRE1N Δ ofd1. Las extracciones de ambos tipos de metabolitos se realizaron a partir de cultivos en fase estacionaria (120 h de cultivo). Se determinó la cantidad de carotenoides (medidos a 474 nm) y de esteroides (medidos a 282 nm). Los datos se normalizaron respecto al peso seco de levadura. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba t-Student (*: $p < 0.05$).

Tabla 4. Composición de carotenoides de las cepas mutantes y parentales de *X. dendrorhous* en porcentaje analizadas por RP-HPLC

	CBS-6938	CBS-6938 $\Delta ofd1$	CBS- <i>cyp61</i> ⁻	CBS- <i>cyp61</i> ⁻ $\Delta ofd1$	CBS-SRE1N	CBS-SRE1N $\Delta ofd1$
Astaxantina	55,2 ± 2,7	58,9 ± 0,1	61,2 ± 1,2	65,1 ± 2,5	61,0 ± 0,6	63,5 ± 1,7
Fenicoxantina	17,8 ± 1,7	17,0 ± 1,7	12,7 ± 0,4	11,5 ± 1,2	15,0 ± 0,9	15,7 ± 1,2
Cantaxantina	2,9 ± 0,6	3,0 ± 0,7	2,2 ± 0,2	2,1 ± 0,1	4,1 ± 0,6	2,7 ± 0,5*
OH-k-toruleno	6,4 ± 0,9	4,8 ± 0,5	6,5 ± 0,4	5,7 ± 0,2*	9,3 ± 0,2	7,6 ± 1,5
OH-equinenona	6,5 ± 0,9	4,9 ± 1,6	4,6 ± 0,3	4,2 ± 0,4	4,3 ± 0,8	4,3 ± 0,8
Equinenona	1,3 ± 0,1	3,3 ± 0,9*	2,8 ± 1,1	0,8 ± 0,1*	1,0 ± 0,6	1,7 ± 0,1
Licopeno	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,1**	1,5 ± 0,1	0,9 ± 0,2**	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,4
B-caroteno	5,3 ± 1,3	4,5 ± 1,4	6,7 ± 0,6	7,0 ± 0,5	2,4 ± 0,1	1,7 ± 0,8
Fitoeno	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ND ₁	3,3 ± 0,9	2,7 ± 0,5	1,8 ± 0,5	2,7 ± 0,6	1,7 ± 0,2	1,8 ± 0,1
Porcentaje total	100	100	100	100	100	100

Se presenta el promedio (n=3) del porcentaje (negrita) ± desviación estándar de los cultivos. ND: no detectado y ND₁: carotenoide no determinado. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba t-Student (*: p < 0.05; **: p < 0.01). En la tabla se indican las diferencias significativas de las cepas mutantes $\Delta ofd1$ respecto a sus parentales.

Tabla 5. Composición de esteroides de las cepas mutantes y parentales de *X. dendrorhous* en porcentaje analizadas por RP-HPLC

	CBS-6938	CBS-6938 $\Delta ofd1$	CBS- <i>cyp61</i> ⁻	CBS- <i>cyp61</i> ⁻ $\Delta ofd1$	CBS-SRE1N	CBS-SRE1N $\Delta ofd1$
Ergosterol	97,3 ± 0,7	97,6 ± 0,2	ND	ND	96,3 ± 1,2	97,1 ± 0,2
ND ₁	2,7 ± 0,7	2,4 ± 0,2	22,0 ± 2,7	21,8 ± 2,8	3,7 ± 1,2	2,9 ± 0,2
ND ₂	ND	ND	78,0 ± 2,7	78,2 ± 2,8	ND	ND
Porcentaje total	100	100	100	100	100	100

Se presenta el promedio (n=3) del porcentaje (negrita) ± desviación estándar de los cultivos. ND: no detectado y ND₁ y ND₂: esterol no determinado. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba t-Student (*: p < 0.05; **: p < 0.01). En la tabla se indican las diferencias significativas de las cepas mutantes $\Delta ofd1$ respecto a sus parentales.

3.3. Análisis de expresión en las cepas mutantes y parentales

Para estudiar si la delección del gen *OFD1* afectó la expresión génica de genes de la vía de síntesis de carotenoides y esteroides como se había propuesto en este trabajo, se estudió la expresión del gen *HMGR* (Figura 16 A, C y E), el cual codifica a la HMG-CoA reductasa que participa en la vía del mevalonato convirtiendo el HMG-CoA en MVA por dos reacciones de reducción. Como control se utilizó el gen *PDC* (Figura 16 B, D y F) de la piruvato descarboxilasa, cuya expresión no cambió en un mutante Δ *sre1* obtenido en el Laboratorio de Genética, indicando que ese gen no sería regulado por la vía SREBP en *X. dendrorhous* y por lo tanto no debería verse afectado en su expresión por la delección del gen *OFD1* si el producto de este gen regula a Sre1 en esta levadura. Los datos fueron normalizados respecto a los niveles de transcrito del gen de actina.

Se observó que no hubo cambios significativos en la expresión del gen *HMGR* y *PDC* en las CBS-6938 vs CBS-6938 Δ *ofd1*, ni en las cepas CBS-SRE1N vs CBS-SRE1N Δ *ofd1*. En tanto en las cepas CBS-*cyp61*⁻ vs CBS-*cyp61*⁻ Δ *ofd1*, se observó una disminución significativa en esta última cepa tanto en los niveles de transcrito del gen *HMGR* como *PDC*.

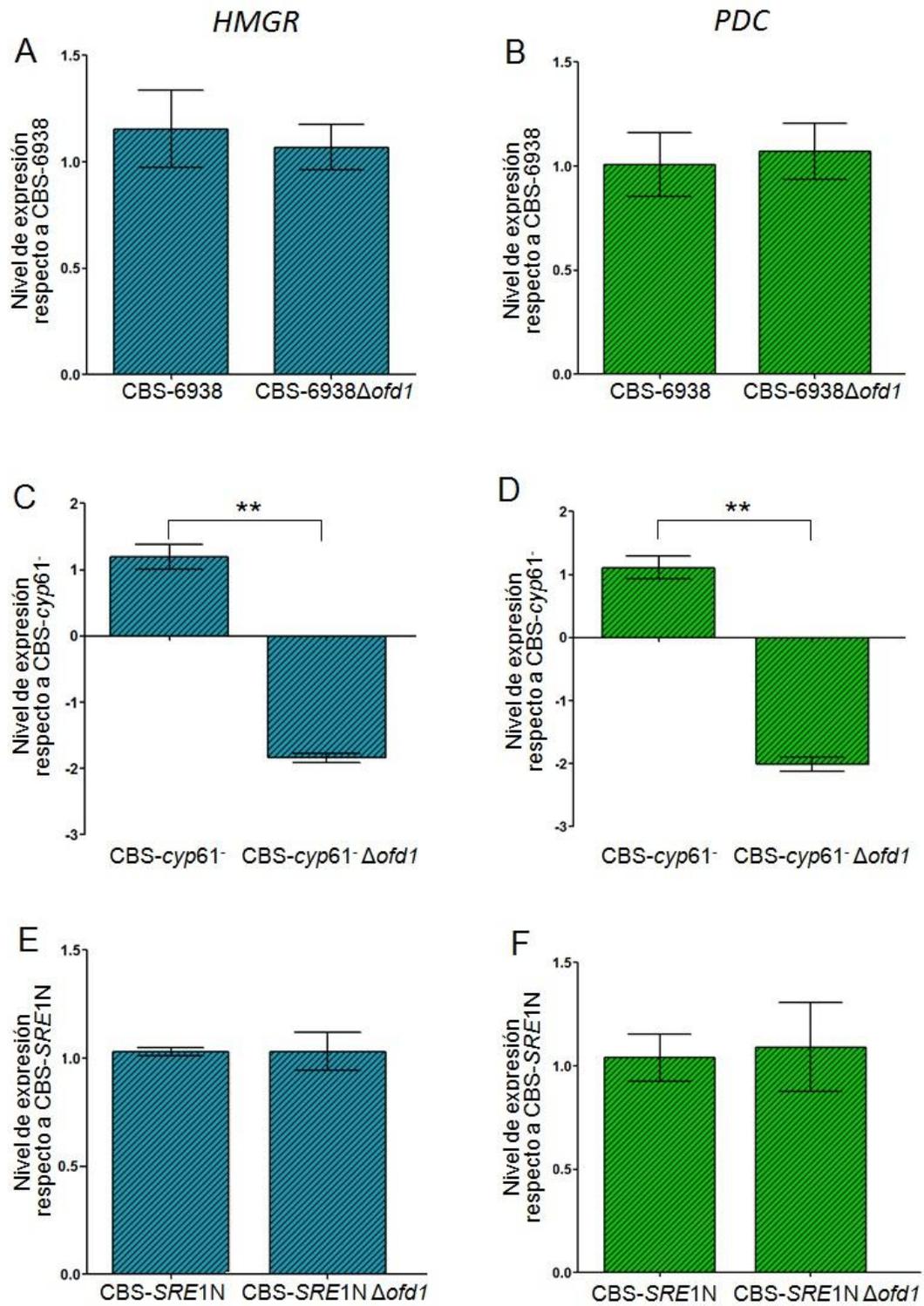


Figura 16. Análisis de los niveles de transcrito de los genes *HMGR* y *PDC* en las cepas mutantes Δ *ofd1* y parentales. Se determinaron los niveles de transcrito de los genes *HMGR* y *PDC* mediante RT-qPCR luego de 120 h de cultivo y fueron normalizados por el gen *ACT*. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba t-Student (**: $p < 0.01$).

3.4. Análisis del crecimiento en condiciones de hipoxia y en azoles

Considerando que la proteína Ofd1 regula los niveles del factor transcripcional Sre1N dependiendo de los niveles de oxígeno en *S. pombe*, se estudió el efecto de la delección de este gen bajo condiciones anaeróbicas en las cepas parentales (CBS-6938, CBS-*cyp61*⁻ y CBS-*SRE1N*) y mutantes obtenidas (CBS-6938 Δ *ofd1*, CBS-*cyp61*⁻ Δ *ofd1* y CBS-*SRE1N* Δ *ofd1*). Si el producto del gen en estudio en este seminario cumple la misma función que la proteína Ofd1 en *S. pombe*, el factor de transcripción Sre1 debería acumularse al someter las cepas a hipoxia. Luego, al retornar a normoxia debería promoverse la degradación de Sre1 mediante Ofd1 en las cepas parentales, y de manera contraria, debería mantenerse estable por la ausencia de la acción de Ofd1 en las cepas mutantes Δ *ofd1*, provocando que aumente la expresión de genes blanco de Sre1, implicados en la vía de síntesis de esteroides y carotenoides, evidenciando un cambio de fenotipo en coloración o textura entre las cepas parentales y mutantes.

Las cepas parentales y mutantes Δ *ofd1* fueron sembradas por la técnica de la microgota con dilución seriada en medio YM semi-sólido y se sometió a anaerobiosis (Figura 17) en una jarra durante 24 h, dejando un control en normoxia. Se realizó un seguimiento luego de 24, 48 y 120 h de retorno a normoxia y no se observó cambios en la textura, crecimiento, ni pigmentación al comparar cada cepa mutante Δ *ofd1* respecto a su parental. También se realizó un experimento con el compuesto cloruro de cobalto (CoCl₂) (Figura 18), el cual ha sido reportado como un agente que imita las condiciones de hipoxia. Se sembró por la técnica de microgota con dilución seriada las 6 cepas en estudio en un medio semi-sólido con el compuesto y sin el compuesto (como control). En este ensayo tampoco se observaron cambios entre las cepas mutantes Δ *ofd1* respecto a sus parentales, pero se afectó el crecimiento en todas las

cepas en presencia de cloruro de cobalto. Finalmente, se estudió si la presencia de azoles, que tienen como blanco inhibir la síntesis de ergosterol, tendría algún efecto sobre las cepas en estudio (mutante $\Delta ofd1$ respecto a su parental). En presencia de azoles la vía SREBP se activa como respuesta a la ausencia de ergosterol. Si el producto del gen *OFD1* estudiado en este seminario, cumple la misma función que *Ofd1* en *S. pombe*, entonces la activación de la vía SREBP producto de la presencia de azoles junto con la delección del gen *OFD1* debería tener como efecto en las cepas mutantes $\Delta ofd1$ mayores niveles de Sre1, por lo tanto deberían ser más resistentes a la presencia de azoles que sus parentales.

Las cepas fueron sembradas por la técnica de microgota en presencia de diferentes concentraciones de ketoconazol o clotrimazol (datos no mostrados), pero no se observaron cambios, por lo cual se procedió a realizar los estudios con las concentraciones stock disponible en el laboratorio de cada compuesto. Para ello se realizó un césped de cada cepa en medio YM semi-sólido y se agregó el compuesto azólico sobre un filtro en la placa (Figura 19). Se observó el tamaño del halo de inhibición del crecimiento en cada caso y no se observaron diferencias evidentes en ningún caso entre mutantes $\Delta ofd1$ respecto a su parental.

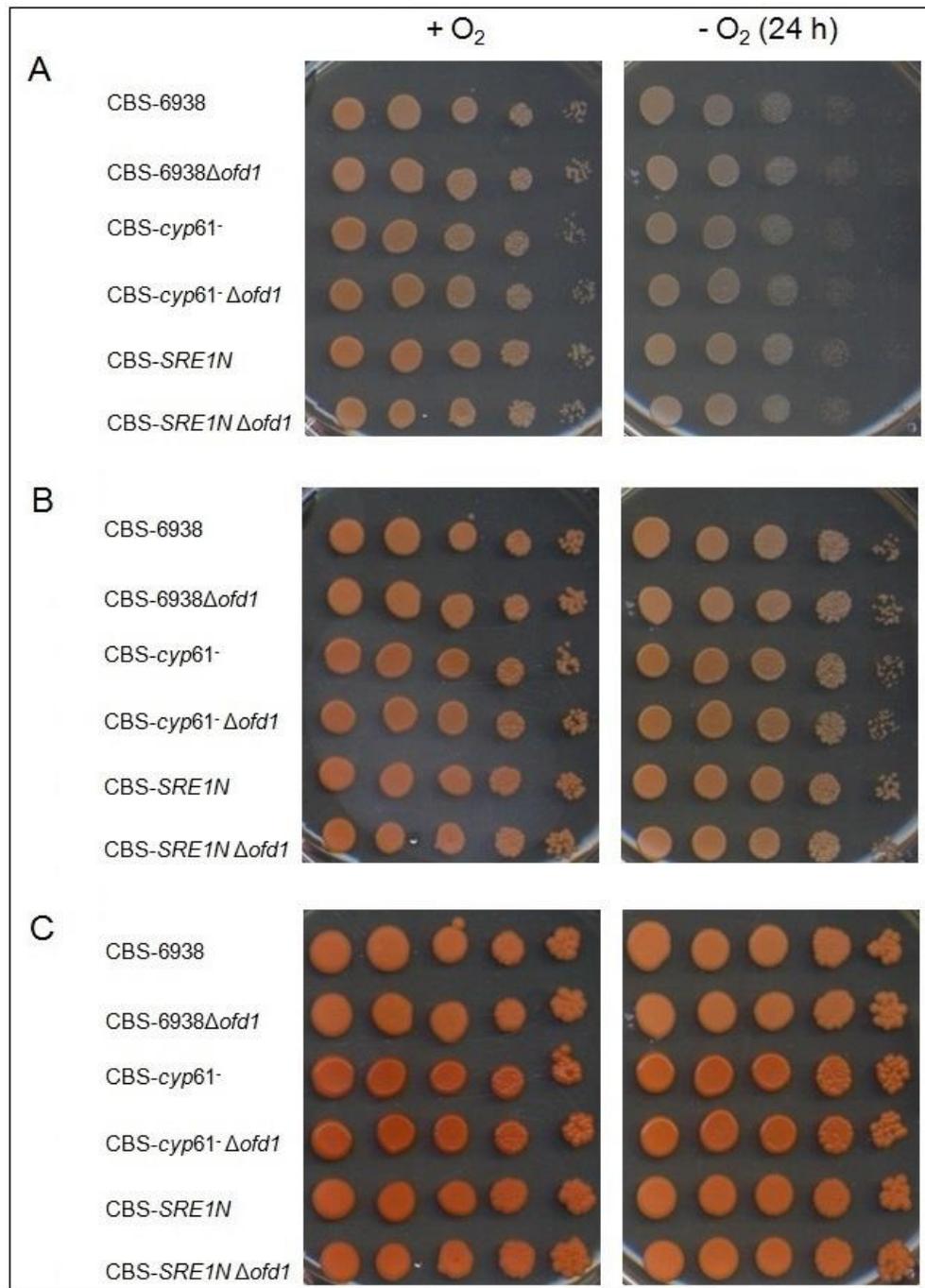


Figura 17. Ensayo de crecimiento en anaerobiosis. Se sembraron diluciones seriadas (izquierda a derecha: sin diluir, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}) de las cepas mutantes y parentales. La placa de la derecha se expuso a anaerobiosis durante 24 h, en tanto la placa de la izquierda siempre estuvo en normoxia. Se realizó un seguimiento luego de retornar a normoxia luego de 24 h (A), 48 h (B) y 120 h (C).

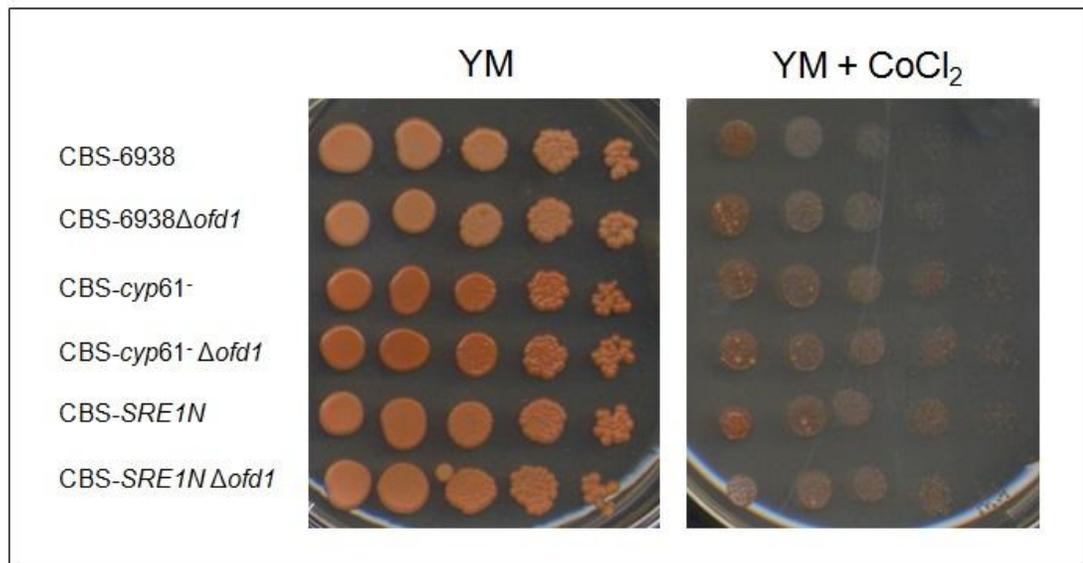


Figura 18. Ensayo de crecimiento en presencia de CoCl_2 . Se sembraron diluciones seriadas (izquierda a derecha: sin diluir, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}) de las cepas mutantes y parentales, en medio YM y en medio YM suplementado con CoCl_2 (0,4 mM).

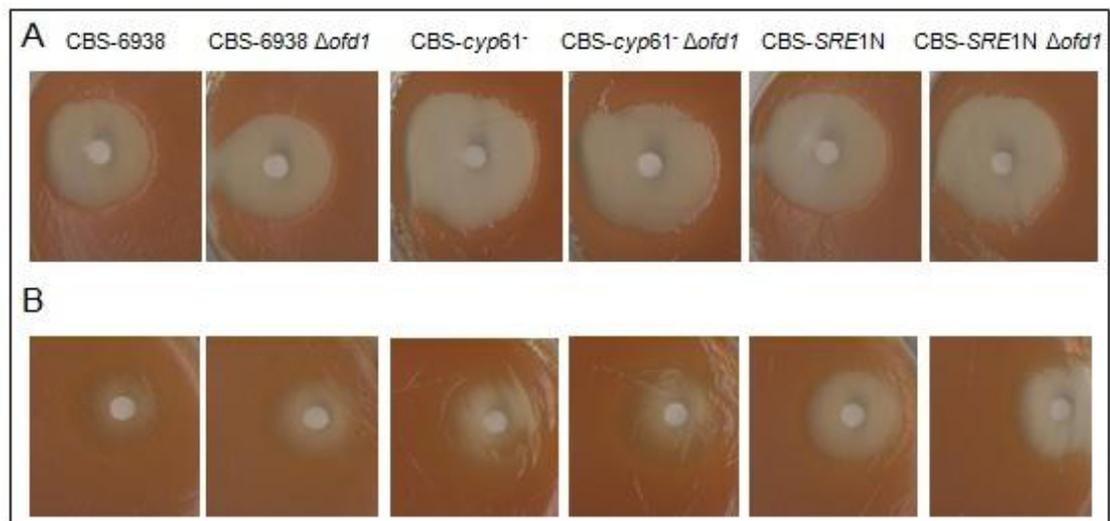


Figura 19. Ensayo de crecimiento en presencia de azoles. Se realizó un césped con cada cepa en una placa con medio YM sólido y se incorporó (A) ketoconazol (400 µg/ml) o (B) clotrimazol (300 µg/ml), sobre un filtro estéril en la placa.

4. Ensayo de complementación heteróloga en *S. pombe*

4.1. Construcción de los vectores de expresión

Para evaluar si el gen *OFD1* de *X. dendrorhous* complementa en *S. pombe*, se insertó el gen *OFD1* de *X. dendrorhous* en un vector de expresión de *S. pombe*. Posteriormente se integró este plásmido en una cepa mutante de *S. pombe* (PEY873) que expresa sólo la forma activa del factor de transcripción Sre1 (Sre1N) y carece del gen *OFD1* endógeno. Se utilizó el plásmido pBS_cDNA-Ofd1-Xd como molde para amplificar el cDNA de *OFD1* utilizando partidores en cuyos extremos se agregó secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción (*HpaI* partidor directo y *SphI* partidor reverso, 40 y 41 tabla 3, respectivamente). Estos sitios permitieron insertar el gen *OFD1* de forma sitio dirigida en el plásmido de expresión PSLF102, permitiendo que la inserción se realizara en el sentido de la expresión. Se realizó doble digestión con las enzimas *HpaI* y *SphI*, tanto al producto de PCR obtenido como al vector PSLF102. Ambos productos de la digestión fueron purificados y posteriormente ligados. Se transformó *E. coli* con el ligado obtenido y se sembró la transformación en medio selectivo con ampicilina. Se seleccionaron 15 colonias que fueron capaces de crecer en el medio selectivo para ser analizadas mediante PCR de colonia. Se utilizaron los partidores (40 y 41, tabla 3) con que se amplificó el cDNA para ser insertado en el vector PSLF102. Se escogió una colonia que dio positiva al PCR y se le extrajo DNA plasmidial. Finalmente se corroboró mediante PCR (Figura 20) la inserción del cDNA de *OFD1* y el sentido en que se clonó el inserto. El plásmido obtenido se denominó PSLF102_*OFD1*(Xd). Siguiendo esta metodología, se construyó el plásmido PSLF102_*OFD1*(Sp), a partir de DNA genómico de *S. pombe* con los

partidores 44 y 45, tabla 3. Ambos plásmidos fueron secuenciados y no se encontraron errores en la secuencia del inserto.

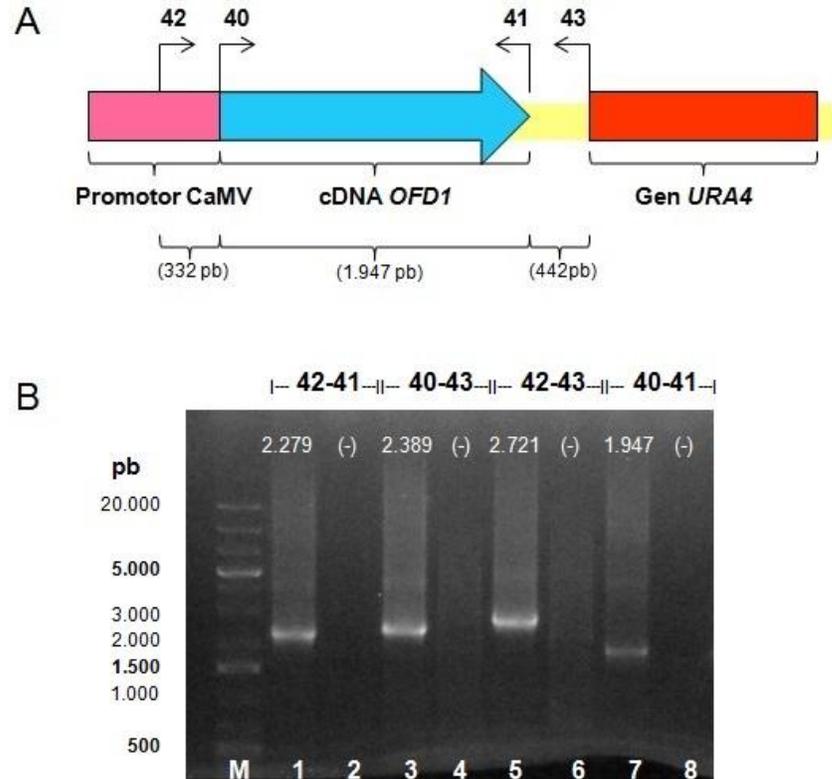


Figura 20. Obtención del vector PSLF102_ *OFD1*(Xd). (A) Representación del vector PSLF102_ *OFD1* (Xd). El cuadro rosado representa el promotor constitutivo CaMV, en tanto el cuadro rojo corresponde al gen *URA4* que codifica la orotidina 5'-fosfato decarboxilasa (importante en la biosíntesis de uracilo) permitiendo complementar cepas auxotrófas para uracilo. Este gen se utiliza como marcador para la selección de las colonias que adquieren el vector. La flecha celeste representa el cDNA de *OFD1* de *X. dendrorhous* inserto. En la zona superior se indican con flechas negras los partidores utilizados para analizar el vector PSLF102_ *OFD1*(Xd) y en la zona inferior los tamaños de cada región. (B) Análisis de la orientación del inserto en el vector PSLF102_ *OFD1*(Xd). El carril M corresponde al marcador de peso molecular 1Kb, el tamaño de las bandas generadas por el marcador se indican a la izquierda. En la región superior en negro se indican los partidores utilizados y en blanco los tamaños (pb) esperados de cada amplificado.

4.2. Análisis de complementación mediante Western blot

La cepa PEY873 de *S. pombe* expresa solo la forma activa de Sre1 y carece del gen *OFD1* endógeno, razón por la que acumula el factor de transcripción en presencia de oxígeno, a diferencia de la cepa silvestre. Si el gen *OFD1* de *X. dendrorhous*

complementa en *S. pombe*, entonces se restauraría el fenotipo silvestre, degradándose Sre1N en presencia de oxígeno.

La transformación de la cepa PEY873 de *S. pombe* con los vectores PSLF102, PSLF102_*OFD1*(Xd) y PSLF102_*OFD1*(Sp) junto con el análisis de Western blot fue realizado por investigadores del Espenshade Lab, Center for Metabolism and Obesity Research, Department of Cell Biology de la Universidad Johns Hopkins, Estados Unidos. Este grupo de investigadores dirigidos por el Dr. Peter Espenshade, ha caracterizado la vía SREBP en la levadura *S. pombe* y en el hongo *Cryptococcus neoformans*, entre otros trabajos. Ellos poseen la colección de cepas que permitieron la caracterización de la vía SREBP en los organismos mencionados anteriormente, en particular la cepa PEY873 requerida en este seminario de título, además de los anticuerpos anti-Sre1, anti-Ofd1 y anti-Dsc5 de *S. pombe* necesarios para realizar el Western blot. Por esta razón, el grupo de Espenshade Lab mediante una colaboración con este trabajo, realizó el ensayo de complementación en *S. pombe*.

Los plásmidos PSLF102_*OFD1*(Xd) y PSLF102_*OFD1*(Sp) fueron enviados al Espenshade Lab, donde realizaron la integración de éstos y del vector PSLF102 en la cepa PEY873, cada uno por separado, mediante transformación por electroporación. Debido a que la cepa es auxótrofa para uracilo y el vector contiene el gen *URA4* (importante para la biosíntesis de uracilo) seleccionaron las cepas transformantes capaces de crecer en un medio mínimo. Para realizar el Western blot, se utilizaron 2 colonias de la cepa PEY873+PSLF102 (cepa que contiene el vector vacío), 3 colonias de PEY873+PSLF102_*OFD1*(Xd) (cepa que contiene el vector con el cDNA de *OFD1* de *X. dendrorhous*), y 3 colonias PEY873+PSLF102_*OFD1*(Sp) (cepa que contiene el vector con el gen *OFD1* de *S. pombe*, permitiendo la restauración del fenotipo

silvestre). Las cepas fueron crecidas en medio YES a 30°C, cosechadas y lisadas mediante lisis alcalina, para realizar el Western blot. Se utilizaron anticuerpos anti-Sre1 para determinar si la presencia de *Ofd1* de *X. dendrorhous* afecta los niveles del factor de transcripción, anti-*Ofd1* como control de la presencia de la proteína y anti-Dsc5 como control de carga normalizador. El ensayo de Western blot (Figura 21) reveló que la presencia del gen *OFD1* de *X. dendrorhous* en la cepa de *S. pombe* que carece de su *OFD1* endógeno no afectó los niveles de la proteína Sre1, manteniéndose igual que la cepa con el vector vacío. En tanto, la cepa que posee una copia del gen *OFD1* de *S. pombe* en el vector de expresión, restaura el fenotipo silvestre, produciéndose la degradación de Sre1. Por lo que aparentemente el gen *OFD1* de *X. dendrorhous* no complementaría en *S. pombe*.

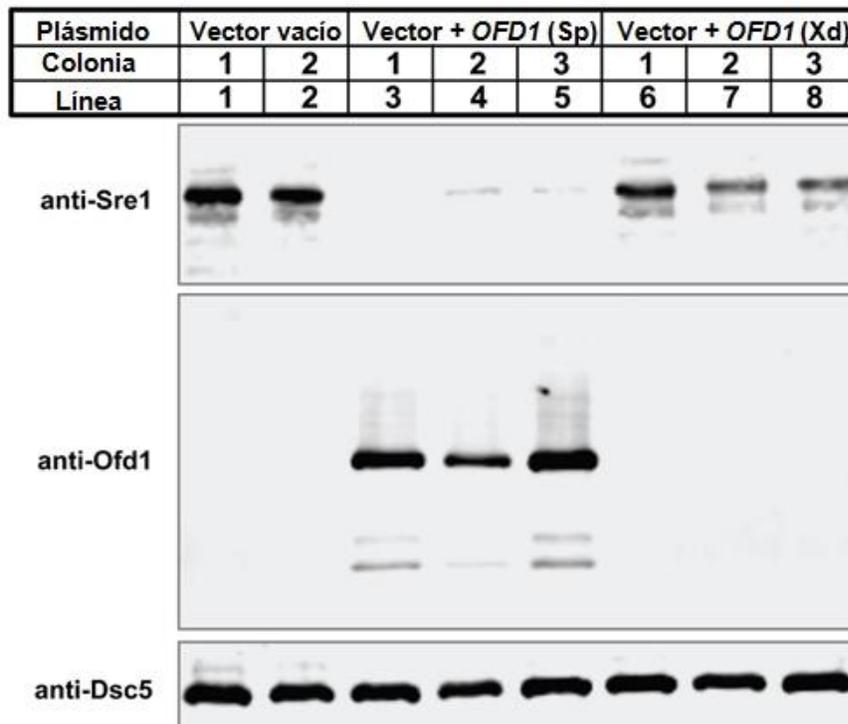


Figura 21. Análisis de complementación mediante Western blot. Se utilizó 50 µg de extracto celular de las cepas PEY873+PSLF102 (vector vacío), PEY873+PSLF102_ *OFD1*(Sp) y PEY873+PSLF102_ *OFD1* (Xd) para realizar el análisis de Western blot con los respectivos anticuerpos: anti-Sre1 (dilución 1:2), anti-*Ofd1* (dilución 1:10.000) y anti-Dsc5 (dilución 1:10.000).

DISCUSIÓN

En este seminario de título se estudió y caracterizó el gen *OFD1* de *X. dendrorhous*, proponiendo que la proteína codificada por este gen participaría en la vía de regulación SREBP en la levadura. La vía SREBP no ha sido descrita previamente en *X. dendrorhous*; sin embargo, estudios en el laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, han demostrado que dicha vía estaría operativa en la levadura regulando genes relacionados con la biosíntesis de carotenoides y ergosterol, y que sería activada por los niveles de ergosterol y oxígeno (Gutiérrez, 2016).

Los análisis bioinformáticos realizados en este trabajo permitieron caracterizar el gen *OFD1* y la posible proteína Ofd1 (2-Oxoglutarato-Fe (II) Dioxigenasa) deducida de esta levadura. Se verificó si Ofd1 de *X. dendrorhous* presenta los dos dominios de esta proteína unidos mediante un linker: el dominio amino terminal (NTD) donde se encontraría un átomo de hierro ferroso (Fe^{2+}) y el dominio carboxilo terminal (CTD). Mediante el análisis del perfil de residuos conservados y alineamiento múltiple se determinó que existe alta conservación de residuos de aminoácidos en el sitio activo de Ofd1 (NTD), en particular el motivo HXD/E...H que coordina con el hierro ferroso. Este motivo es característico de las 2-oxoglutarato oxigenasas, razón por la cual es uno de los criterios utilizados para predecir la existencia de muchas 2-OG oxigenasas aún no descritas (McDonough y col., 2010). Esta familia de proteínas cataliza la hidroxilación de diversos sustratos, regulando el metabolismo, la transcripción, traducción y modificación y reparación del DNA (Falnes y col., 2007; Kaelin & Ratcliffe., 2008; Katz y col., 2014). Algunos ejemplos de proteínas pertenecientes a esta familia son OGFOD1 (*H. sapiens*), Tpa 1p (*S. cerevisiae*) y Sud1 (*D. melanogaster*), las cuales

comparten un 28, 31 y 44% de identidad de secuencia con 57, 95 y 6% de cobertura, respectivamente, con la proteína Ofd1 deducida de *X. dendrorhous*. En el sitio activo de estas proteínas (motivo HXD/E...H) se cataliza la hidroxilación de un residuo de prolina en la proteína RPS23, donde el hierro ferroso participa como cofactor y el 2-oxoglutarato como cosustrato. Es importante tener en cuenta que RPS23 forma parte de la subunidad menor del ribosoma, por lo cual esta modificación permite la regulación del término de la traducción (Horita y col., 2015). Una proteína perteneciente a la familia de las 2-oxoglutarato oxigenasas que no requiere catalizar la hidroxilación de un sustrato para regular su blanco es Ofd1 de la levadura *S. pombe*, la cual comparte un 33% de identidad de secuencia con 92% de cobertura con la proteína Ofd1 deducida de *X. dendrorhous*. Su función es regular los niveles del factor transcripcional Sre1N en el núcleo de manera oxígeno dependiente. La región NTD de Ofd1 detecta los niveles de oxígeno y regula la interacción del CTD con las proteínas Sre1N y Nro1. En presencia de oxígeno el CTD interactúa con Sre1N impidiendo su unión al DNA y promoviendo su degradación proteosomal; en ausencia de oxígeno el CTD interactúa con Nro1, permitiendo que Sre1N promueva la transcripción de sus genes blanco. Se ha comprobado que la acción de Ofd1 sobre Sre1N es independiente a su capacidad de hidroxilación y que la función del sitio activo sería detectar los niveles de oxígeno para regular las interacciones del CTD (Hughes & Espenshade, 2008). Considerando estos antecedentes, la proteína Ofd1 deducida de *X. dendrorhous* pertenece a la familia de las 2-oxoglutarato oxigenasas. Ahora bien, si el sitio activo es capaz de actuar produciendo la hidroxilación de un sustrato es desconocido hasta el momento.

Para evaluar la funcionalidad del gen *OFD1* de *X. dendrorhous* se realizó la delección del gen en tres cepas de esta levadura: CBS-6938 (silvestre), CBS-*cyp61*⁻ (mutante que no produce ergosterol y sobre produce carotenoides) y CBS-*SRE1N* (mutante que expresa solo la forma activa del factor de transcripción Sre1). Estudios previos realizados en el laboratorio de Genética, revelaron que la delección del gen *SRE1* en las cepas CBS-6938 y CBS-*cyp61*⁻ produjo una disminución en los niveles de ergosterol, restauró el fenotipo silvestre en la cepa CBS-*cyp61*⁻ Δ *sre1*, producto de la disminución en la cantidad de carotenoides totales y afectó la composición de carotenoides, debido a una disminución en los niveles de astaxantina y acumulación de intermediarios (Gutiérrez, 2016). En dichos estudios también se construyó una cepa que no requiere de la activación de Sre1 por cortes proteolíticos en el aparato de Golgi, al expresar sólo el dominio amino terminal del factor de transcripción. Esta cepa (CBS-*SRE1N*) manifestó un aumento en la producción de ergosterol y carotenoides respecto a la cepa silvestre. Considerando que Sre1 en *X. dendrorhous* podría regular la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de carotenoides y ergosterol, además de la función que cumple *Ofd1* en *S. pombe* (promover la rápida degradación de Sre1N en presencia de oxígeno) se planteó la siguiente hipótesis: Si el gen *OFD1* identificado en *X. dendrorhous* participa en la regulación del activador transcripcional Sre1 entonces, la delección de *OFD1* en esta levadura incrementará los niveles de transcritos de genes de la biosíntesis de esteroides y carotenoides regulados por Sre1, promoviendo la producción de estos compuestos en la levadura.

Contrario a lo que se esperaba, la delección del gen *OFD1* en las tres cepas mencionadas no produjo cambios de fenotipo a simple vista respecto a la textura, crecimiento o pigmentación. Análisis más detallados en los que se evaluó la cantidad

de esteroides y carotenoides totales, tampoco evidenciaron cambios en las cepas mutantes $\Delta ofd1$ respecto a sus parentales, excepto en la cepa CBS-*cyp61* $\Delta ofd1$; sin embargo, la diferencia observada no es realmente considerable biológicamente. La composición de esteroides no arrojó diferencias significativas entre las cepas analizadas, en tanto la composición de pigmentos varió levemente en algunos casos, pero no fue constante para todas las cepas. En cuanto a los análisis de expresión realizados por RT-qPCR en que se midieron los niveles del gen *HMGR* (blanco regulado por Sre1 en *X. dendrorhous*) (González, 2016), éstos no revelaron diferencias en la expresión de dicho gen que participa en la vía del mevalonato, que da origen al intermediario común a la biosíntesis de astaxantina y ergosterol en *X. dendrorhous* (Loto y col., 2012). Es así como el conjunto de resultados obtenidos en el análisis de esteroides y carotenoides en las cepas mutantes $\Delta ofd1$ sugiere que la delección del gen *OFD1* no afectó la producción de estos metabolitos como se había propuesto.

Cepas mutantes $\Delta sre1$ y $\Delta scp1$ de la vía SREBP en *C. neoformans* son hipersensibles a drogas antifúngicas azoles, ya que la deficiencia en la capacidad de regular la vía SREBP de estas mutantes contribuye a potenciar la acción de los azoles (inhibir la síntesis de ergosterol) (Chang y col., 2009). Además son sensibles al cloruro de cobalto ($CoCl_2$), el cual es un agente que imita las condiciones de hipoxia (Lee y col., 2007). Ensayos realizados con los azoles ketoconazol y clotrimazol en las mutantes $\Delta ofd1$ de *X. dendrorhous*, no mostraron diferencias en el crecimiento de dichas cepas respecto a las parentales. Se esperaba que la ausencia de *Ofd1* permitiera la estabilización de Sre1N en núcleo y por consiguiente, una mayor influencia en la regulación de sus genes blanco permitiendo que fueran más resistentes a los azoles. Respecto a los ensayos en hipoxia y en presencia de $CoCl_2$ (donde se

esperaba que las cepas mutantes $\Delta ofd1$ fueran más resistentes), éstos arrojaron el mismo resultado anterior: es decir, no se presentaron diferencias entre las cepas mutantes y sus parentales. Estos resultados sugieren que la delección del gen *OFD1* no otorga ventajas adaptativas frente a condiciones de estrés que afectan los niveles de ergosterol u oxígeno, como se esperaba.

En *S. pombe* la delección del gen *OFD1* en una cepa que expresa solo la forma activa del factor de transcripción, permite la acumulación de Sre1N de forma independiente a los niveles de oxígeno ambientales y si se restablece una copia del gen mediante un vector, se recupera el efecto del oxígeno en la cepa silvestre: Sre1N se degrada rápidamente en presencia de oxígeno (Hughes & Espenshade, 2008). En este sentido, los ensayos de complementación realizados en *S. pombe* con el gen *OFD1* de *X. dendrorhous* analizados mediante Western blot revelaron que los niveles de Sre1N no se ven afectados por la presencia del gen de *X. dendrorhous*. Por lo cual, *Ofd1* de *X. dendrorhous* no complementa en *S. pombe*, ya sea porque *Ofd1* de *X. dendrorhous* no participa de la vía SREBP o porque las interacciones que esta proteína tiene con otras en su sistema original no se puedan ejecutar en este otro organismo.

El conjunto de resultados obtenidos en este seminario de título permiten concluir que *OFD1* no participa en la regulación de la vía SREBP en *X. dendrorhous*. Al respecto, otros mecanismos podrían estar actuando en la regulación de los niveles de Sre1N. En mamíferos, la vía SREBP regula los niveles de esteroides y SREBP1 es regulado en el núcleo por la proteína GSK3 (*glycogen-synthase kinase*) la cual fosforila a SREBP1 de manera insulina-dependiente promoviendo la formación de un sitio de enlace para la ligasa ubiquitina SCF^{Fbw7} permitiendo la poliubiquitinación que lleva a la rápida degradación proteosomal (Bengoechea-Alonso & Ericsson, 2009). Por otra parte,

en mamíferos la regulación de la respuesta a hipoxia depende del factor de transcripción HIF (*hipoxia-inducible factor*), el cual activa los genes de respuesta a la hipoxia. HIF es regulado por una familia de tres proteínas perteneciente a las 2-oxoglutarato Fe (II) dioxigenasa denominadas PHD1-3 que regulan la degradación y actividad de HIF mediante modificaciones post-traduccionales (hidroxilación) dependiente de oxígeno (Semenza, 2001).

La vía SREBP ha sido estudiada en diversos hongos, ya que presenta un particular interés para el desarrollo de terapias antifúngicas, siendo muchos de sus elementos descritos como variables entre las divisiones de hongos: ascomicetes y basidiomicetes (Bien & Espenshade, 2010). Representantes de la división ascomicetes como *S. pombe* y *Aspergillus fumigatus* poseen los factores de transcripción homólogos a SREBP: Sre1 en *S. pombe* que regula la síntesis de esteroides y la respuesta a hipoxia, y SrbA en *A. fumigatus* que también regula esas vías junto con la homeostasis del hierro (Hughes y col., 2005; Dhingra & Cramer, 2017). Sin embargo, el mecanismo de corte necesario para liberar la forma activa de esos factores no se realiza por una enzima tipo S2P como en mamíferos, más bien se requiere de un complejo de proteínas DSC (*defective for SREBP cleavage*) junto con una proteasa romboide (RbdB en *A. fumigatus* y Rbd2 en *S. pombe*) (Willger y col., 2012; Dhingra y col., 2016; Hwang y col., 2016). En general no se ha encontrado la proteasa S2P en ascomicetes, lo que sugiere que esta proteína se ha perdido después de la divergencia entre las divisiones en hongos (Bien & Espenshade, 2010). Ahora bien, en cuanto a la regulación de los niveles de SrbA en *A. fumigatus*, se ha descubierto una posible proteína Ofd1 pero no ha sido caracterizada; sin embargo, no existe un homólogo para su contraparte la proteína Nro1 (Dhingra & Cramer, 2017).

En la levadura ascomicete *Candida albicans*, la biosíntesis de ergosterol está regulada por la proteína Upc2 (Lu y col., 2013) la cual no se relaciona con la vía SREBP. Sin embargo en esta levadura, si existe una proteína similar al factor de transcripción SREBP, la proteína Cph2, pero ésta no es necesaria para la biosíntesis de ergosterol, su función está relacionada con la colonización gastrointestinal murina, regulando el flujo glicolítico, y no depende de los niveles de ergosterol u oxígeno, por lo cual Ofd1 no regula su estabilidad. En tanto la proteína Ofd1 que posee *C. albicans* regula al activador transcripcional de genes específicos de elongación de la hifa, Ume6, de manera oxígeno dependiente (Lu y col., 2013; Lane y col., 2015).

En *Saccharomyces cerevisiae* no existe una ruta SREBP conservada, pero posee un homólogo a Ofd1, la proteína Tpa 1p, la cual está involucrada en el término de la traducción. Tpa 1p actúa como un sensor de oxígeno y tiene influencia sobre diversas rutas regulatorias (Henri y col., 2010), sugiriendo que los ortólogos de Ofd1 forman parte de rutas diferentes en los diferentes organismos.

Finalmente, *C. neoformans* es un hongo patógeno representante de la división basidiomicete en el que se ha caracterizado la vía SREBP, encargada de regular la síntesis de esteroides y la homeostasis de hierro y cobre (Chang y col., 2007). Presenta conservación en los elementos Sre1 y Scp1 de la vía, pero a diferencia de los ascomicetes, el corte proteolítico que activa Sre1 liberando a Sre1N lo realiza una proteasa tipo S2P, llamada Stp1 (Bien y col., 2009). Un homólogo de Ofd1 fue estudiado en *C. neoformans*; sin embargo, se determinó que no participa en la regulación de Sre1. Análisis de Western blot demostraron que mutaciones en los genes *DAM1* y *GSK3* de este organismo afectan la estabilidad de los niveles del factor transcripcional Sre1N. *GSK3* es la proteína que en mamíferos regula los niveles de

SREBP1 de manera insulina dependiente. En tanto *DAM1* (CNF02850) no había sido descrito en la regulación de la vía SREBP y aún no es claro cómo operaría regulando la tasa de recambio de Sre1N. Dam1 (XP_571593.1) posee un dominio BCAS2 (*breast carcinoma amplified sequence 2*) que pertenece a una familia de muchas secuencias eucariontes sin función conocida; en este sentido se ha descrito que la proteína Dam1 de *H. sapiens* es una posible proteína asociada al espliceosoma (Chang y col., 2009).

Estudios en el laboratorio de Genética han demostrado que el corte proteolítico que activa el factor de transcripción Sre1 en *X. dendrorhous*, es realizado por una proteína tipo S2P que ha sido denominada como Stp1, al igual que en *C. neoformans* (Gómez, 2016). Los componentes de la vía SREBP en *X. dendrorhous* (basidiomicete) son similares a la ruta SREBP de mamíferos y a la de *C. neoformans* (basidiomicete). En aquellas vías SREBP no existe un elemento Ofd1 que regule los niveles de Sre1N en el núcleo, por lo que los resultados obtenidos en este seminario de título son concordantes considerando la similitud de las vías. En mamíferos y en el hongo *C. neoformans*, la proteína GSK3 está involucrada en la tasa de recambio de Sre1N en el núcleo, por lo que sería interesante evaluar si la proteína “kinase-domain-containing-protein” identificada en la base de datos de *X. dendrorhous*, la cual comparte un 79% de identidad de secuencia con 99% de cobertura con GSK3 de *C. neoformans* cumple la misma función. Así mismo, sería interesante estudiar la proteína homóloga al gen *DAM1* (caracterizado en la vía SREBP en *C. neoformans*) hallada en la base de datos de *X. dendrorhous*. Ésta ha sido depositada con el nombre de “Spliceosome-associated coiled-coil protein” (CED85123.1) y presenta un 33% de identidad de secuencia con 90% de cobertura con Dam1 de *C. neoformans*. Finalmente, la ruta SREBP en *X. dendrorhous* aún tiene elementos desconocidos y su mapa de regulación

se encuentra en proceso de construcción, por lo que los esfuerzos en completar este conocimiento permitirán evaluar desde otras perspectivas los desafíos biotecnológicos que plantea este microorganismo.

CONCLUSIONES

- El gen *OFD1* identificado en *X. dendrorhous* codificaría una proteína perteneciente a la familia de las 2-oxoglutarato oxigenasas, conformada por dos dominios unidos mediante un linker: el dominio amino terminal (NTD) donde se localiza el sitio activo conformado por el motivo HXD/E...H, y el dominio carboxilo terminal (CTD).
- La delección del gen *OFD1* en tres cepas de *X. dendrorhous*: CBS-6938 (silvestre), CBS-*cyp61*⁻ (mutante que no produce ergosterol y sobre produce carotenoides) y CBS-*SRE1N* (mutante que expresa solo la forma activa del factor de transcripción Sre1) no aumentó la producción de esteroides y carotenoides, como se había propuesto. Tampoco otorgó mayor resistencia a las drogas antifúngicas clotrimazol y ketoconazol. Asimismo no favoreció el crecimiento o promovió la pigmentación en presencia de cloruro de cobalto (agente que imita las condiciones de hipoxia) ni en condiciones de anaerobiosis en el sistema de anaerobiosis en jarra.
- El gen *OFD1* de *X. dendrorhous* aparentemente no complementaría la mutación del gen *OFD1* en *S. pombe*.
- Proponemos que la proteína codificada por el gen *OFD1* de *X. dendrorhous*, no participaría en la vía SREBP regulando los niveles del factor transcripcional Sre1N en el núcleo. Lo que sugiere que en esta levadura debe existir otro mecanismo de regulación.

BIBLIOGRAFÍA

- Adrio, J.L. y Veiga, M. 1995. Transformation of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnology Techniques* **9**: 509-512.
- 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.
- Ambati, R. R., Phang, S. M., Ravi, S., y Aswathanarayana, R. G. 2014. Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications. A review. *Marine Drugs* **12**: 128-152.
- 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.
- Aravind, L., y Koonin, E. V. 2001. The DNA-repair protein AlkB, EGL-9, and Ipreca define new families of 2-oxoglutarate- and iron-dependent dioxygenases. *Genome Biology* **2**: 1.
- Armstrong, G. A. 1994. Eubacteria show their true colors: genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *Journal of Bacteriology* **176**: 4795-4802.
- Arthington-Skaggs, B. A., Crowell, D. N., Yang, H., Sturley, S. L., y Bard, M. 1996. Positive and negative regulation of a sterol biosynthetic gene (ERG3) in the post squalene portion of the yeast ergosterol pathway. *FEBS letters* **392**: 161-165.
- Bengoechea-Alonso, M. T., y Ericsson, J. 2009. A phosphorylation cascade controls the degradation of active SREBP1. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 5885-5895.
- Chang, Y. C., Bien, C. M., Lee, H., Espenshade, J. P., y Kwon-Chung, K. J. 2007. *Cryptococcus neoformans* sterol regulatory element binding protein (Sre1p), a virulence factor that functions in oxygen sensing and sterol homeostasis. *Molecular Microbiology* **64**: 614-629.
- Bien, C. M., Chang, Y. C., Nes, W. D., Kwon-Chung, K. J., y Espenshade, P. J. 2009. *Cryptococcus neoformans* Site-2 protease is required for virulence and survival in the presence of azole drugs. *Molecular Microbiology* **74**: 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**: 352-359.
- Cantagrel, V., y Lefeber, D. J. 2011. From glycosylation disorders to dolichol biosynthesis defects: a new class of metabolic diseases. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **34**: 859-867.

- Chang, Y. C., Ingavale, S. S., Bien, C., Espenshade, P., y Kwon-Chung, K. J. 2009. Conservation of the sterol regulatory element-binding protein pathway and its pathobiological importance in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* **8**: 1770-1779.
- Chang, W. C., Song, H., Liu, H. W., y Liu, P. 2013. Current development in isoprenoid precursor biosynthesis and regulation. *Current opinion in Chemical Biology* **17**: 571-579.
- Clifton, I. J., McDonough, M. A., Ehrismann, D., Kershaw, N. J., Granatino, N., y Schofield, C. J. 2006. Structural studies on 2-oxoglutarate oxygenases and related double-stranded β -helix fold proteins. *Journal of Inorganic Biochemistry* **100**: 644-669.
- Costanzo, P. R., y Knoblovits, P. 2016. Vitamin D and male reproductive system. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* **28**: 151-159.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., y Lewis, N. G. 2000. Natural products (secondary metabolites). *In* Buchanan B, Gruissem W, Jones R., eds, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD 1250–131.
- Degtyarenko, K. N., y Archakov, A. I. 1993. Molecular evolution of P450 superfamily and P450-containing monooxygenase systems. *FEBS letters* **332**: 1-8.
- Dhingra, S., Kowlaski, C. H., Thammahong, A., Beattie, S. R., Bultman, K. M., y Cramer, R. A. 2016. RbdB, a Rhomboid Protease Critical for SREBP Activation and Virulence in *Aspergillus fumigatus*. *mSphere* **1**: e00035-16.
- 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.
- Eisenberg, D., Lothy, R. y Bowie, J. U. 1997. VERIFY3D: Assessment of Protein Models with Three-Dimensional Profiles. *Methods in Enzymology* **277**: 396–404.
- Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D., y Rohdich, F. 2004. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**: 1401-1426.
- Espenshade, P. J. 2006. SREBPs: sterol-regulated transcription factors. *Journal of Cell Science* **119**: 973-976.
- Eswar, N., Eramian, D., Webb, B., Shen, M-Y. y Sali, A. 2008. Protein structure modeling with MODELLER. *Methods in Molecular Biology* **426**:145–159.
- Falnes, P. Ø., Klungland, A., y Alseth, I. 2007. Repair of methyl lesions in DNA and RNA by oxidative demethylation. *Neuroscience* **145**: 1222-1232.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S. E., Wilkins, M. R., Appel, R. D., y Bairoch, A. 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. (In) John M. Walker (eds.), *The Proteomics Protocols Handbook*. pp. 571-607. Humana Press.

Goldberg, T., Hamp, T., y Rost, B. 2012. LocTree2 predicts localization for all domains of life. *Bioinformatics* **28**: 458-465.

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 en ejecución para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

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.

Goodwin, T. W. 1984. The Biochemistry of Carotenoids. (eds. II), Animals. Chapman and Hall, London.

Goujon, M., McWilliam, H., Li, W., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J. y Lopez, R. 2010. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research* **38**: 695–699.

Gutiérrez, M. 2016. Caracterización de la vía SREBP dependiente de los niveles de ergosterol y oxígeno en la biosíntesis de carotenoides y ergosterol en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis en ejecución para optar al grado de Doctora en Ciencias mención Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L., y Goycoolea, F. M. 2006. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **46**:185-196.

Hirst, J., y Roessler, M. M. 2016. Energy conversion, redox catalysis and generation of reactive oxygen species by respiratory complex I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1857**: 872-883.

Horita, S., Scotti, J. S., Thinnes, C., Mottaghi-Taromsari, Y. S., Thalhammer, A., Ge, W., y McDonough, M. A. 2015. Structure of the Ribosomal Oxygenase OGFOD1 Provides Insights into the Regio-and Stereoselectivity of Prolyl Hydroxylases. *Structure* **23**: 639-652.

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

Hughes, B. T., y Espenshade, P. J. 2008. Oxygen regulated degradation of fission yeast SREBP by Ofd1, a prolyl hydroxylase family member. *The EMBO Journal* **27**: 1491-1501.

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.

- Iwaki, T., Lefuji, H., Hiraga, Y., Hosomi, A., Morita, T., Giga-Hama, Y., y Takegawa, K. 2008. Multiple functions of ergosterol in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology* **154**: 830-841.
- Johansson, C., Tumber, A., Che, K., Cain, P., Nowak, R., Gileadi, C., y Oppermann, U. 2014. The roles of Jumonji-type oxygenases in human disease. *Epigenomics* **6**: 89–120.
- Kaelin, W. G., y Ratcliffe, P. J. 2008. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular Cell* **30**: 393-402.
- Katz, M. J., Acevedo, J. M., Loenarz, C., Galagovsky, D., Liu-Yi, P., Pérez-Pepe, M., Thalhammer, A., Sekirnik, R., Ge, W., Melani, M., Thomas, M. G., Simonetta, S., Boccaccio, G. L., Schofield, C. J., Cockman, M. E., Ratcliffe, P. J., y Wappner, P. 2014. Sudestada1, a *Drosophila* ribosomal prolyl-hydroxylase required for mRNA translation, cell homeostasis, and organ growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: 4025-4030.
- Kim, H. S., Kim, H. L., Kim, K. H., Lee, S. J., Yoon, J. Y., Yoon, H. J., y Suh, S. W. 2010. Crystal structure of Tpa1 from *Saccharomyces cerevisiae*, a component of the messenger ribonucleoprotein complex. *Nucleic Acids Research* **38**: 2099-2110.
- Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**: 1870-1874.
- Landau, M., Mayrose, I., Rosenberg, Y., Glaser, F., Martz, E., Pupko, T. y Ben-Tai, N. 2005. ConSurf 2005: the projection of evolutionary conservation scores of residues on protein structures. *Nucleic Acids Research*. **33**: 299–302.
- Lane, S., Di Lena, P., Tormanen, K., Baldi, P., y Liu, H. 2015. Function and Regulation of Cph2 in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* **14**: 1114-1126.
- Larkin, M., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. y Higgins, D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947–2948.
- Lee, H., Bien, C. M., Hughes, A. L., Espenshade, P. J., Kwon-Chung, K. J., y Chang, Y. C. 2007. Cobalt chloride, a hypoxia-mimicking agent, targets sterol synthesis in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology* **65**: 1018-1033.
- Lee, C. Y. S., Stewart, E. V., Hughes, B. T., y Espenshade, P. J. 2009. Oxygen-dependent binding of Nro1 to the prolyl hydroxylase Ofd1 regulates SREBP degradation in yeast. *The EMBO Journal* **28**: 135-143.
- Lee, C. Y. S., Yeh, T. L., Hughes, B. T., y Espenshade, P. J. 2011. Regulation of the Sre1 hypoxic transcription factor by oxygen-dependent control of DNA binding. *Molecular Cell* **44**: 225-234.

Lepesheva, G. I., y Waterman, M. R. 2007. Sterol 14 α -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1770**: 467-477.

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*. *BMC Microbiology* **12**:235.

Lu, Y., Su, C., Solis, N. V., Filler, S. G., y Liu, H. 2013. Synergistic regulation of hyphal elongation by hypoxia, CO₂, and nutrient conditions controls the virulence of *Candida albicans*. *Cell Host & Microbe* **14**: 499-509.

Marine Harvest. 2016. Salmon farming industry handbook (PDF). <http://www.marineharvest.com/investor/industry-handbook/> [Consulta: 19 de julio de 2016].

Matsuyama, A., Arai, R., Yashiroda, Y., Shirai, A., Kamata, A., Sekido, S., Kobayashi, Y., Hashimoto, A., Hamamoto, M., Hiraoka, Y., y Horinouchi, S. 2006. ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature Biotechnology* **24**: 841-847.

McDonough, M. A., Loenarz, C., Chowdhury, R., Clifton, I. J., y Schofield, C. J. 2010. Structural studies on human 2-oxoglutarate dependent oxygenases. *Current opinion in Structural Biology* **20**: 659-672.

McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N., Cowley, A. P. y Lopez, R. 2013. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research* **41**: 597-600.

Miller, W. L. 2017. Disorders in the initial steps of steroid hormone synthesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **165**: 18:37.

Miziorko, H. M. 2011. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **505**: 131-143.

Msangi, S., Kobayashi, M., Batka, M., Vannuccini, S., Dey, M. M., y Anderson, J. L. 2013. Fish to 2030: prospects for fisheries and aquaculture. *World Bank Report* **1**: 83177.

Nakai, K., y Horton, P. 1999. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends in Biochemical Sciences* **24**: 34-35.

Parker, J. E., Warrilow, A. G., Price, C. L., Mullins, J. G., Kelly, D. E., y Kelly, S. L. 2014. Resistance to antifungals that target CYP51. *Journal of Chemical Biology* **7**: 143-161.

Porter, J. R., Lee, C. Y. S., Espenshade, P. J., y Iglesias, P. A. 2012. Regulation of SREBP during hypoxia requires Ofd1-mediated control of both DNA binding and degradation. *Molecular Biology of the Cell* **23**: 3764-3774.

- Rodríguez-Sáiz, M., de la Fuente, J. L., y Barredo, J. L. 2010. *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. *Applied Microbiology and Biotechnology* **88**: 645-658.
- Sabatinos, S., y Forsburg, S. 2010. Molecular genetics of *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in Enzymology* **470**: 759-795.
- Saitou, N., y Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425.
- Sambrook, J. y Russell, D. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Semenza, G. L. 2001. HIF-1, O-2, and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* **107**:1-3.
- 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**: 2817-2831.
- Tu, T., Giblin, D., y Gross, M. L. 2011. Structural determinant of chemical reactivity and potential health effects of quinones from natural products. *Chemical Research in Toxicology* **24**: 1527-1539.
- Wang, W., Shinto, L., Connor, W. E., y Quinn, J. F. 2008. Nutritional biomarkers in Alzheimer's disease: the association between carotenoids, n-3 fatty acids, and dementia severity. *Journal of Alzheimer's Disease* **13**: 31-38.
- Wang, C., Kim, J. H., y Kim, S. W. 2014. Synthetic biology and metabolic engineering for marine carotenoids: new opportunities and future prospects. *Marine Drugs* **12**: 4810-4832.
- Willger, S. D., Cornish, E. J., Chung, D., Fleming, B. A., Lehmann, M. M., Puttikamonkul, S., y Cramer, R. A. 2012. Dsc orthologs are required for hypoxia adaptation, triazole drug responses, and fungal virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell* **11**: 1557-1567.
- Yeh, T. L., Lee, C. Y. S., Amzel, L. M., Espenshade, P. J., y Bianchet, M. A. 2011. The hypoxic regulator of sterol synthesis Nro1 is a nuclear import adaptor. *Structure* **19**: 503-514.
- Zhang, Y., y Rao, R. 2010. Beyond ergosterol: linking pH to antifungal mechanisms. *Virulence* **1**: 551-554.