



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

“Construcción y estudio funcional de mutantes de la biosíntesis de ergosterol 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 Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Maximiliano Alberto Venegas Ruiz

Director del Seminario de Título:

Dra. Jennifer Cecilia Alcaíno Gorman

Co-Director:

Dr. Víctor Hugo Cifuentes Guzmán

Junio 2018

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

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 Maximiliano Alberto Venegas Ruiz**.

“Construcción y estudio funcional de mutantes de la biosíntesis de ergosterol 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 Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Director Seminario de Título: _____

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión: _____

Evaluador: _____

Santiago de Chile,.....

BIOGRAFÍA



Nací el 8 de junio de 1995 en Hualqui, Chile. Mis padres son Miguel Angel Venegas Jaña y Mirna Helem Ruiz Hormazábal. Además tengo un hermano, Miguel Ignacio Venegas Ruiz quien tiene 29 años y trabaja como guía turístico en Hualqui y Coyhaique bajo la empresa con nombre de Huella Sur. En mi infancia vivía en Hualqui, donde mi mamá me cuidaba durante las mañanas, para a la tarde irme al colegio y mi padre trabajaba de vendedor independiente durante todo el día y llegaba al anochecer.

Estudie en el colegio The Pacific School, de Chiguayante desde primero básico hasta terminar la enseñanza media. Colegio el cual me siento muy orgulloso de haber estudiado, por la calidad de profesores y personas que este tenía. Al ingresar a la enseñanza medio este colegio tuvo que cambiar de lugar físico en el que se encontraba ubicado, producto del terremoto del 2010. El año 2012 me gradué del colegio, y rendí la PSU ese mismo año, con la idea formada de postular a la carrera de ingeniería en Biotecnología Molecular de la Universidad de Chile, en Santiago.

El Año 2013 ingrese la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular. 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. El año 2015 ingrese al laboratorio de Genética como pasante a cargo de la profesora Jennifer Alcaíno, donde conocí a un grupo de trabajo con una gran calidad de personas tanto en el científico como en lo personal.

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. Han sido ya casi 4 años, donde en primera instancia entre como pasante ayudando a Carla Gárate 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 Salvador Barahona, Dionisia Sepúlveda y Rafael Negrete por estar siempre apoyándome en lo práctico y personal. También a los alumnos de pregrado y postgrado.

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).

Agradezco a la Dirección de Asuntos Estudiantiles (DAE) por colaborar en el financiamiento de la asistencia al LX Congreso Chileno de Biología (2017), realizado en la ciudad de Puerto Varas.

Finalmente, Agradezco a mis padres y hermano por el apoyo incondicional para poder terminar esta etapa de mi vida

V. ÍNDICE DE CONTENIDOS

Biografía	iii
Agradecimientos	iv
Índice de Tablas	viii
Índice de figuras	ix
Lista de abreviaturas	xi
Resumen	xii
Abstract	xiv
Introducción	1
Hipótesis	13
Objetivos	13
Objetivo General	13
Objetivos Específicos	13
Materiales y Métodos	13
Materiales	
Bacterias	14
Levaduras	14
Plásmidos, cepas, enzimas y ácidos nucleicos	14
Extracción y análisis de ácidos nucleicos	
Extracción de ADN de E.coli	17
Extracción de ADN de X. dendrorhous	17
Extracción de ARN de X. dendrorhous	17

Purificación de ADN desde geles de agarosa	18
Reacción en cadena de la polimerasa en cadena (PCR), transcripción reversa (RT) y PCR cuantitativo (qPCR).	19
Análisis bioinformático	22
Transformación por electroporación	
Transformación por electroporación de <i>E. coli</i>	23
Transformación por electroporación en <i>X. dendrorhous</i>	23
Extracción de carotenoides y esteroides en <i>X. dendrorhous</i>	
Extracción de carotenoides	24
Extracción de esteroides	25
Análisis de la composición de pigmentos y esteroides.	26
Resultados	
Análisis bioinformático de los genes <i>ERG3</i> y <i>ERG4</i> de <i>X. dendrorhous</i> .	27
Obtención de cepas mutantes CBS-6938Δerg3 y CBS-6938Δerg4 en <i>X. dendrorhous</i>	32
Construcción de los vectores para la obtención de mutantes	33
Transformación de <i>X. dendrorhous</i>	
Caracterización fenotípica de las cepas mutantes CBS-6938 Δ erg3 y CBS-6938 Δ erg4 de <i>X. dendrorhous</i>	40
Caracterización fenotípica de las cepas mutantes CBS-6938Δerg3 y	43

CBS-6938 Δ erg4 de *X. dendrorhous*

Fenotipo de las cepas en estudio	43
Análisis de cantidad y composición de carotenoides y esteroides	45
Análisis del crecimiento en presencia de drogas antifúngicas	50
Análisis de expresión en las cepas mutantes y parental	51
Discusión	53
Conclusiones	60
Bibliografía	61

VIII. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas utilizadas y construidas	15
Tabla 2. Plásmidos construidos y utilizados	16
Tabla 3. Partidores utilizados	21
Tabla 4. Composición (en %) de carotenoides de las cepas mutantes y parental de <i>X. dendrorhous</i> en porcentaje analizadas por RP-HPLC.	47
Tabla 5. Composición (en %) de esteroides de las cepas mutantes y parental de <i>X. dendrorhous</i> en porcentaje analizadas por RP-HPLC.	48

IX. ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Esquema de la vía del mevalonato y biosíntesis de astaxantina y ergosterol	5
Figura 2. Estructuras de los diversos esteroides	6
Figura 3. Últimos tres pasos de la ruta de síntesis del ergosterol	9
Figura 4. Vía SREBP en humano	12
Figura 5. Estructura de los genes <i>ERG3</i> y <i>ERG4</i> de <i>X. dendrorhous</i> y secuencia logo de la secuencia SRE	28
Figura 6. Predicción bioinformática de regiones de transmembrana de las proteínas Erg3 y Erg4 de <i>X. dendrorhous</i>	30
Figura 7. Modelo por homología y análisis de dominios conservados en Erg4 de <i>X. dendrorhous</i>	32
Figura 8. Obtención de la región homóloga río arriba y abajo de los genes <i>ERG3</i> y <i>ERG4</i>	34
Figura 9. Obtención de los vectores pudErg3 y pudErg4	35
Figura 10. Purificación de los módulos de resistencia a antibiótico para <i>X. dendrorhous</i>	37
Figura 11. Obtención de los vectores pΔErg3-Hig y pΔErg3-Zeo	38
Figura 12. Obtención del vector pΔErg4-Zeo	39
Figura 13. Verificación de la mutación del gen <i>ERG3</i> reemplazado por el módulo de resistencia a Higromicina B en <i>X. dendrorhous</i>	41

Figura 14. Verificación de la mutación del gen <i>ERG4</i> reemplazado por el módulo de resistencia a Zeocina en <i>X. dendrorhous</i>	42
Figura 15. Comparación fenotípica entre las cepas de <i>X. dendrorhous</i> parental y mutantes $\Delta erg3$, $\Delta erg4$ y <i>cyp61</i> -.	44
Figura 16. Curvas de crecimiento de las cepas CBS-6938, CBS-6938 $\Delta erg3$, CBS-6938 $\Delta erg4$ y CBS-6938 <i>cyp61</i> -	45
Figura 17. Análisis de carotenoides y esteroles totales producidos por las cepas CBS-6938, CBS-6938 $\Delta erg3$, CBS-6938 $\Delta erg4$ y CBS-6938 <i>cyp61</i> -	47
Figura 18. Cromatogramas de esteroles producidos por las cepas CBS-6938, CBS-6938 $\Delta erg3$, CBS-6938 $\Delta erg4$ y CBS-6938 <i>cyp61</i> -	49
Figura 19. Ensayo de crecimiento en presencia de azoles o de anfotericina B.	50
Figura 20. Análisis de los niveles de transcrito de los genes <i>HMGS</i> , <i>ERG3</i> y <i>ERG4</i> en las cepas mutantes y parentales	52

LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil-CoA Acetil-Coenzima A

Acetoacetil-CoA Acetoacetil-Coenzima A

cADN ADN complementario

CTD Dominio carboxilo terminal

D.O. Densidad óptica

E Exón

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

HMG-CoA 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A

ORF Marco abierto de lectura

pb Pares de bases

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

RP-HPLC Cromatografía líquida en fase reversa

RT Transcripción reversa

SDS Dodecilsulfato sódico

TAE Buffer Tris-acetato-EDTA

TE Buffer Tris-EDTA

UV Luz ultravioleta

Xd *Xanthophyllomyces dendrorhous*

RESUMEN

La levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous* es capaz de sintetizar astaxantina, un carotenoide utilizado en la industria acuícola. 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. El ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol) es un componente de las membranas celulares de los hongos y el producto final de la ruta de esteroides. 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.

Se ha visto que la regulación de las rutas biosintéticas de carotenoides y esteroides está relacionada, ya que la delección del gen *CYP61* que participa en la síntesis de ergosterol (mutante CBS-6938*cyp61*-), resultó en un fenotipo que sobreproduce carotenoides. Estas observaciones podrían ser explicadas por un efecto negativo del ergosterol sobre la regulación de la biosíntesis de carotenoides y esteroides, especialmente a nivel de la transcripción de genes de la ruta del mevalonato como el gen *HMGR*. Es así como en este seminario de título se planteó poner a prueba dicha hipótesis construyendo otros mutantes de la biosíntesis de ergosterol (mutantes de los genes *ERG3* y *ERG4*) para evaluar si estos mantienen el mismo fenotipo que la mutante CBS-6938*cyp61*- (ausencia de ergosterol y sobreproducción de carotenoides).

Mediante análisis bioinformático se identificaron los genes *ERG3* y *ERG4* de *X. dendrorhous* y se construyeron los plásmidos para la delección de ambos genes en la cepa CBS-6938, obteniendo las mutantes CBS-6938 Δ *erg3* y CBS-6938 Δ *erg4*. Se evaluó el fenotipo de las mutantes con respecto a la cepa CBS-6938 mediante análisis

de carotenoides y esteroides totales, observando un aumento en los niveles de esteroides, aunque no se afectó el nivel de carotenoides totales. También se realizó un análisis de expresión mediante RT-qPCR del gen *HMG5*, el cual posiblemente es regulado por vía SREBP en *X. dendrorhous*, donde solo observó un aumento en el nivel de transcrito de este gen en la mutante del gen *ERG4*. Además, las cepas mutantes presentaron una disminución en el crecimiento en presencia de los azoles clotrimazol y ketoconazol y el antifúngico Anfotericina B.

Los resultados indican que la vía SREBP no se encuentra activa en las mutantes CBS-6938 Δ *erg3* y CBS-6938 Δ *erg4*. En conclusión, no es la ausencia de ergosterol lo que estaría activando la vía SREBP, sino más bien la acumulación de esteroides específicos como sería el caso la cepa CBS-6938 $cyp61$ -.

ABSTRACT

The yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* is able to synthesize astaxanthin, a carotenoid used in the aquaculture industry. This pigment is synthesized from metabolites of the mevalonate pathway, which are also necessary for the synthesis of sterols. Ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol) is a component of fungal cell membranes and the final product of the sterol pathway. Both routes have been reported to be regulated by the SREBP pathway, which in mammals regulates cholesterol levels in cells. In fungi the SREBP pathway is conserved, as in the yeast *Schizosaccharomyces pombe* where the transcription factor Sre1N regulates the synthesis of sterols and the response to hypoxia.

It has been found that the regulation of the biosynthetic pathways of carotenoids and sterols is related, since the deletion of the *CYP61* gene involved in the synthesis of ergosterol (mutant CBS-6938cyp61-), resulted in a phenotype that overproduces carotenoids. These observations could be explained by a negative effect of ergosterol on the regulation of the biosynthesis of carotenoids and sterols, especially at the level of the transcription of genes of the mevalonate route such as the *HMGR* gene. Thus, in this work it was proposed to test this hypothesis by the mutation other mutants of ergosterol biosynthesis (mutants of the *ERG3* and *ERG4* genes) to evaluate whether they maintain the same phenotype as the mutant CBS-6938cyp61- (absence of ergosterol and overproduction of carotenoids).

By bioinformatic analysis, the *ERG3* and *ERG4* genes of *X. dendrorhous* were identified and the plasmids were constructed for the deletion of both genes in strain CBS-6938, obtaining the mutants CBS-6938 Δ erg3 and CBS-6938 Δ erg4. The phenotype of the mutants was evaluated with respect to the aforementioned strain CBS-6938 by analysis

of carotenoids production and total sterols, were an increase in sterol levels was observed although no change was observed in total carotenoids. . An expression analysis was also performed by RT-qPCR of the HMG5 gene, which is suggested to be regulated via SREBP in *X. dendrorhous*. In this case, the mutants presented only increase in the transcript level in the mutant of *ERG4*. In addition, a decrease in the growth of the mutant strains was observed in the presence of the azoles clotrimazole and ketoconazole and the antifungal agent Amphotericin B.

The results indicate that the SREBP pathway is not active in the mutants CBS-6938 Δ erg3 and CBS-6938 Δ erg4. In conclusion, it is not the absence of ergosterol that would be activating the SREBP pathway, but rather the accumulation of specific sterols as would be the case with the strain CBS-6938cyp61-.

INTRODUCCIÓN

Xanthophyllomyces dendrorhous

Xanthophyllomyces dendrorhous es una levadura basidiomicete capaz de producir carotenoides, los cuales son pigmentos naturales de 40 átomos de carbono de la familia de los isoprenoides, lipo-solubles, de tonalidades desde el amarillo al rojo, y con propiedades antioxidantes atribuidas a su estructura. Entre los carotenoides, la astaxantina, es un producto de interés biotecnológico que además de su color, destaca por su capacidad antioxidante, por lo que es utilizado en el área de la salud. Este pigmento pertenece al grupo de las xantófilas, carotenoides que poseen uno o más átomos de oxígeno en su estructura, y es producido biológicamente por *X. dendrorhous*, *Haematococcus pluvialis* y *Chlorella zofingiensis*. La astaxantina también posee un importante interés económico dado que se utiliza en la industria salmonera como suplemento alimenticio para otorgar el color característico anaranjado a la carne de estos peces. 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 (Schmidt I. y col., 2011) y se proyecta que para el año 2030, esta industria abastecerá el 62% de los peces utilizados para el consumo humano (Msangi S. y col., 2013). El salmón tiene un alto valor nutritivo, ya que aporta micronutrientes, ácidos grasos como el omega 3, proteína de alta calidad y vitaminas (Higuera-Ciapara y col., 2006).

Como se mencionó, el principal mercado para la astaxantina es como fuente de pigmentación en acuicultura, principalmente para el salmón y la trucha, por lo que se ha realizado una serie de esfuerzos para generar cepas de *X. dendrorhous* capaces de sobreproducir astaxantina que puedan ingresar al mercado competitivo de la síntesis

química. La astaxantina se vende por \$US 2.500 el kg con un mercado anual mundial estimado en \$US 200 millones. Aunque el 95% de este mercado consume el derivado de la síntesis química, la demanda del consumidor por productos naturales hace que los pigmentos sintéticos sean menos deseables y proporciona una oportunidad para la producción de la astaxantina natural (Schmidt I. y col., 2011). Además, durante el proceso de síntesis química se producen 3 estereoisómeros de astaxantina en la proporción 1:2:1 (3S, 3'S), (3R, 3'S) y (3R, 3'R) respectivamente, de los cuales sólo uno (3R, 3'R) 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 esta levadura como un microorganismo con potencial biotecnológico para optimizar la producción de astaxantina.

Isoprenoides y carotenoides

Los isoprenoides o terpenos corresponden a un grupo de compuestos orgánicos presentes en arqueas, bacterias y eucariontes. Éstos son fundamentales en diferentes procesos biológicos ya sea, como componentes de la membrana celular, función fotoprotectora, entre otros. Algunos ejemplos de compuestos isoprenoides son las quinonas, dolicoles, esteroides, pigmentos carotenoides, entre muchos otros (Chang y col., 2013). Las quinonas isoprenoides son uno de los grupos más importantes de compuestos que se producen en las membranas de los organismos vivos. Estos compuestos contienen un grupo de cabeza hidrófilo y una cadena lateral isoprenoide apolar, lo que confiere a las moléculas un carácter liposoluble. Las quinonas isoprenoides funcionan principalmente como portadores de electrones y protones en las cadenas de transporte de electrones fotosintéticas y respiratorias, y además muestran funciones adicionales, como la función antioxidante (Nowicka y Kruk., 2010).

Por otro lado, el dolicol es un lípido polisoprenoide 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). Mientras, los esteroides son componentes estructurales y regulatorios de membranas biológicas que participan en la regulación de procesos biológicos como la estabilidad de la membrana celular y la transducción de señales. Por último, los pigmentos carotenoides son pigmentos naturales de 40 átomos de carbono (colorantes naturales) con tonalidades que van desde el amarillo al rojo. Los carotenoides presentan propiedades antioxidantes (Armstrong, 1994) 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).

El Isopentenil pirofosfato (IPP) en eucariontes es sintetizado en la vía del mevalonato (MVA) (Figura 1); sin embargo, en plantas y bacterias existen vías anexas para la síntesis de este precursor. En específico, en *X. dendrorhous*, el IPP es precursor de la biosíntesis de los carotenoides, y a su vez del ergosterol, el principal esteroide en hongos.

En la vía del MVA, la síntesis del IPP y DMAPP comienza con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA mediante la enzima acetoacetil-CoA tiolasa dando origen al acetoacetil-CoA, el cual se condensa con una molécula de acetil-CoA produciendo 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (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 la fosfomevalonato quinasa (PMK) originando MVA-5-pirofosfato (MVA-PP). Finalmente, el MVA-PP mediante la acción de una pirofosfomevalonato decarboxilasa (MVD) se convierte en IPP (Miziorko 2011). El IPP proveniente de la vía del MVA es utilizado en el inicio de la biosíntesis de los isoprenoides. Mediante la isopentenil fosfato isomerasa, el IPP es convertido en su isómero DMAPP, luego ambos productos se condensan para formar geranil 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 geranilgeranil 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 esteroides. La condensación de dos moléculas de GGPP produce fitoeno, el precursor de los carotenoides (tetraterpenos, terpenos de 40 carbonos) (Alcaíno J. y col., 2014).

En *X. dendrorhous* la biosíntesis de astaxantina (figura 1) se inicia a partir de la condensación de dimetilalil-pirofosfato (DMAPP, C5) e isopentenil-pirofosfato (IPP, C5) produciendo geranil-pirofosfato (GPP, C10). Luego se adiciona una segunda molécula de IPP dando origen a farnesil-pirofosfato (FPP, C15), el cual es sustrato tanto en la vía de síntesis de ergosterol, como en la de astaxantina. Al FPP se le une una tercera molécula de IPP para dar origen a geranilgeranil-pirofosfato (GGPP, C20). La condensación de 2 moléculas de GGPP da origen al fitoeno (el primer carotenoide de la ruta de síntesis), el cual sufre 4 desaturaciones y se transforma en licopeno. La

ciclación de ambos extremos del licopeno produce β -caroteno y finalmente la adición de un grupo ceto y un hidroxilo en ambos anillos terminales del β -caroteno, da origen a la astaxantina (Loto I. y col., 2012).

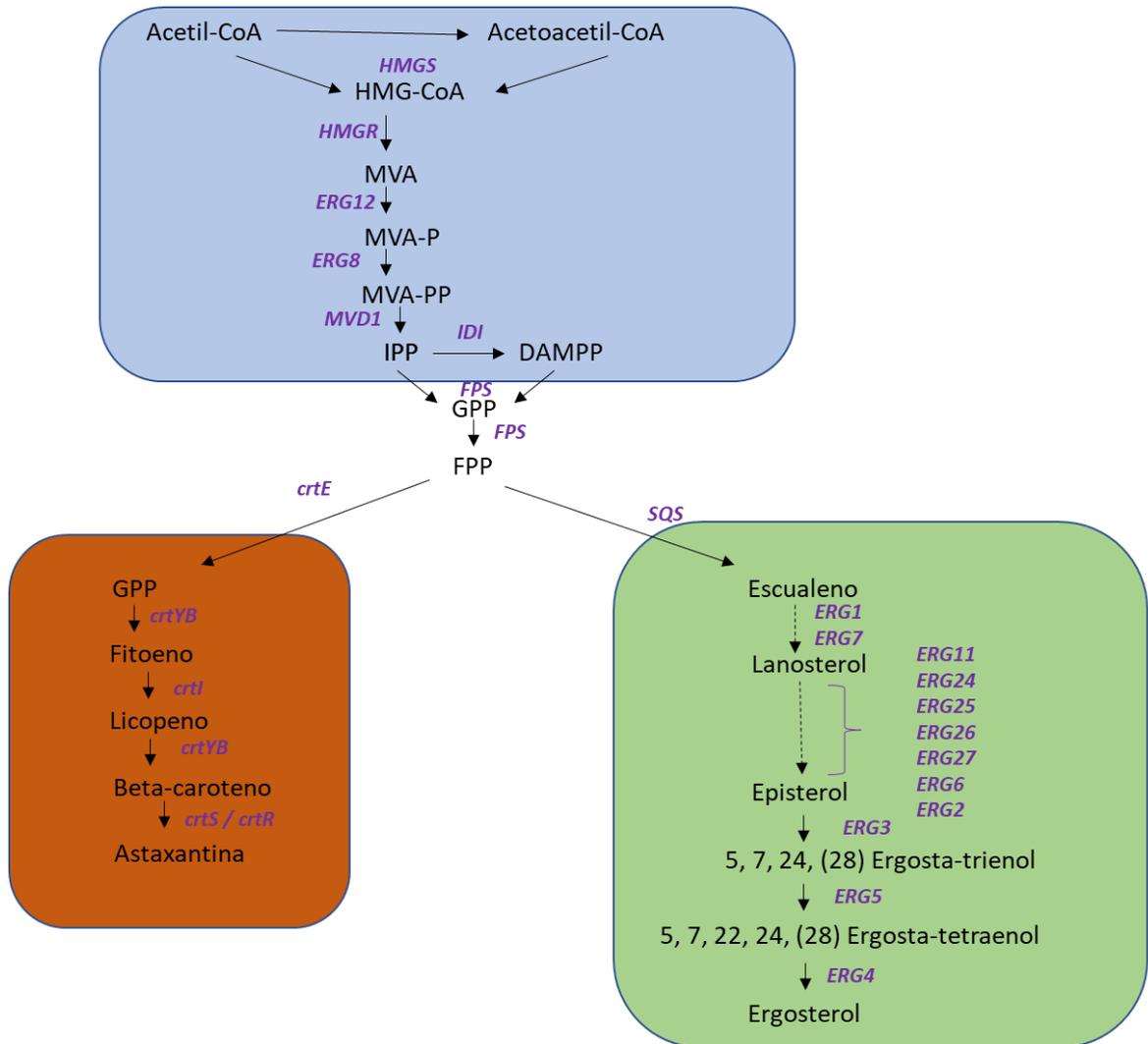


Figura 1. Esquema de la vía del mevalonato y biosíntesis de astaxantina y ergosterol. Los metabolitos se indican en letras negras, donde: HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA), MVA (mevalonato), MVA-P (mevalonato-5-fosfato), MVA-PP (mevalonato-5-pirofosfato), IPP (isopentenil pirofosfato), DMAPP (dimetilalil pirofosfato), GPP (geranil pirofosfato), FPP (farnesil pirofosfato) y GGPP (geranilgeranil pirofosfato). Las flechas representan los pasos catalíticos: Vía del mevalonato (Celeste), biosíntesis de astaxantina (naranja) y biosíntesis de ergosterol (Verde). (Modificado de Loto y col., 2012).

Esteroles

Los esteroides regulan procesos biológicos y mantienen la estructura de las membranas celulares, donde se consideran estabilizadores de membrana. Mientras que el colesterol es el principal esteroide en los mamíferos, el ergosterol juega un papel clave en los hongos. Las plantas generalmente poseen composiciones de esteroides más complejas. Estigmasterol y sistosterol, dos 24-etil esteroides, son los principales constituyentes de los perfiles de esteroides en plantas y están involucrados en el crecimiento embrionario (Schaller, 2003). Hopanoides como bacteriohopanetetrol son sustitutos de esteroides de bacterias primitivas (arqueobacterias, cianobacterias, etc.) que se desarrollan en condiciones muy extremas como aguas termales, a muy alta presión en alta mar, agua altamente salina y lagos cubiertos de hielo (Figura 2).

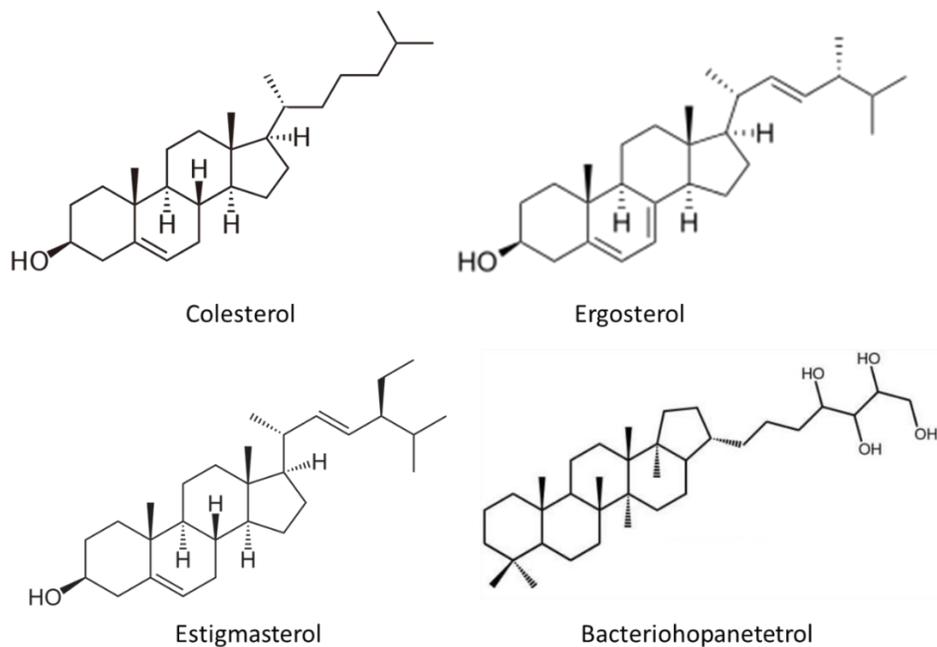


Figura 2. Estructuras de los diversos esteroides. Estructura química de los esteroides pertenecientes a células animales (Colesterol), hongos (Ergosterol), células vegetales (Estigmasterol), bacterias y arqueas (Bacteriohopanetetrol).

El ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol) es un componente de las membranas celulares de los hongos, que cumple la misma función que el colesterol realiza en las células de mamíferos, siendo así capaz de modificar la fluidez y permeabilidad de la membrana o actuando como modulador de algunas proteínas celulares. La presencia de ergosterol en las membranas de las células de los hongos, junto con su ausencia en las membranas de las células de mamíferos, convierte a este compuesto en un objetivo útil para el desarrollo de drogas antifúngicas. El ergosterol también está presente en las membranas celulares de algunos protistas, como los tripanosomas.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se encuentra bien descrita la ruta de síntesis del ergosterol, donde los tres últimos pasos son catalizados por las enzimas Erg3, Erg5 y Erg4 (Figura 3). La enzima Erg5 también es denominada como Cyp61, puesto a que pertenece a la superfamilia de hemoproteínas conocidas como citocromo P450 (P450). Las P450s son monooxigenasas que se encuentran presentes en todos los dominios de la vida, y su función está relacionada con el metabolismo oxidativo (Degtyarenko & Archakov, 1993). Dos 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).

Erg3 y Erg4

El gen *ERG3* codifica la C-5 esteroles desaturasa, la cual cataliza la conversión de episterol a 5,7,24(28) ergostatrienol utilizando como cofactor el NADPH, reacción que consiste en la remoción *cis* de los hidrógenos ubicados en las posiciones α de los carbonos 5 y 6 del episterol, acoplado a la reducción de una molécula de oxígeno (Figura 3). En la literatura se ha descrito que la mutación *erg3-* afecta el crecimiento en *Candida glabrata* resultando en un fenotipo que no es capaz de producir ergosterol, acumulando así otros esteroides intermediarios (Geber y col., 1995). También se ha descrito que el gen *ERG3* es esencial para el crecimiento de *S. cerevisiae* con sustratos como glicerol y etanol, es decir que la mutante *erg3-* no crece en este tipo de medios (Smith & Parks., 1993).

Por otra parte, el gen *ERG4* codifica una C-24(28) esteroles reductasa que participa en la última etapa de la biosíntesis de ergosterol y convierte 5,7,24,28 ergostatetraenol en ergosterol. Esta reacción consiste en la reducción de la molécula de 5,7,24,28 ergostatetraenol mediante el cofactor NADPH para la biosíntesis de ergosterol.

En *S. cerevisiae* se ha obtenido el mutante *erg4-*, que presenta un fenotipo donde no se observa la producción de ergosterol, sino más bien la presencia de intermediarios de esta ruta de biosíntesis, pero no afecta la viabilidad celular, aunque si la resistencia a diferentes condiciones de estrés (Dagmar y col., 2000).

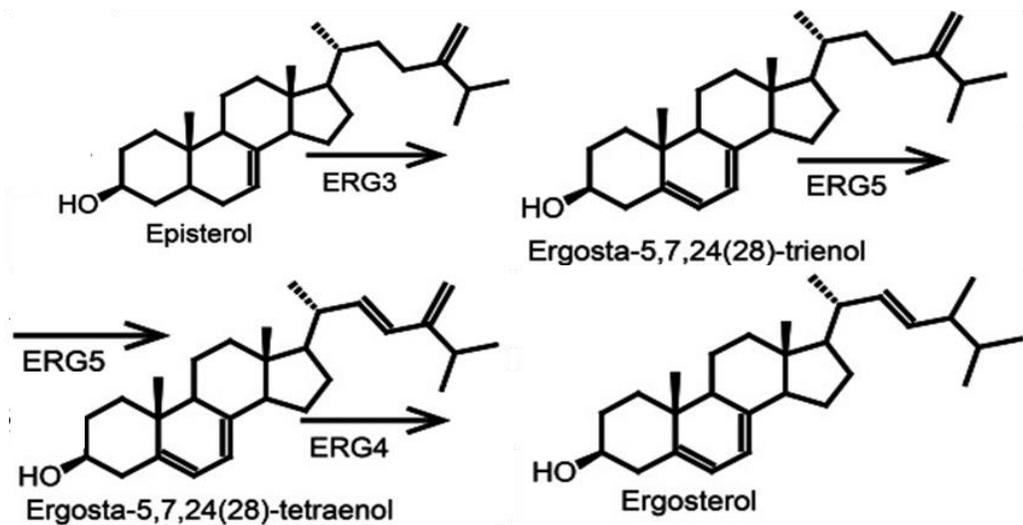


Figura 3. Últimos tres pasos de la ruta de síntesis del ergosterol. La conversión del espisterol a ergosta-5-7-dienol es catalizada por la enzima Erg3. Este compuesto luego es convertido mediante la enzima Erg5 a ergosta 5,7,22,24tetraen-3 β -ol. Finalmente ocurre la conversión a ergosterol mediante la enzima Erg4.

De acuerdo con la literatura, la interrupción de la vía de síntesis del ergosterol mediante la mutación del gen de la C-22 esteroles desaturasa (gen *ERG5* o *CYP61*) en *X. dendrorhous* resulta en un fenotipo que no produce ergosterol y una sobreproducción de carotenoides (Loto I. y col., 2012). Una de las hipótesis que podría explicar la mayor producción de carotenoides en ausencia de ergosterol, es el aumento observado en los niveles de transcritos del gen *HMGR*, que codifica una enzima que participa en la vía del mevalonato cuya expresión podría estar regulada negativamente por ergosterol. Por otro lado, el aumento en la producción de carotenoides también podría estar relacionado con la acumulación de algún esteroles en el mutante *cyp61*- que favorezca la producción de carotenoides.

Vía Sterol Regulatory Element Binding Protein (SREBP)

La vía de regulación de la síntesis de colesterol en mamíferos depende del factor de transcripción SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*). Este factor es un

activador de la transcripción que se ancla a la membrana del retículo endoplasmático a través de dos regiones de transmembrana y donde interactúa con la proteína Scap (*SREBP cleavage activating protein*) a través del dominio carboxilo terminal (Figura 4). A su vez Scap, la cual detecta los niveles de esteroides celulares, interactúa con la proteína INSIG (*Insulin Induced Gene 1*), la cual retendría al complejo SREBP-Scap anclado a la membrana del retículo endoplasmático. De esta manera, SREBP permanece en una forma inactiva cuando los niveles de esteroides son suficientes. Cuando los niveles de esteroides disminuyen, Scap ya no uniría esteroides lo que provocaría un cambio en su conformación afectando su interacción con INSIG, permitiendo que el complejo SREBP-Scap sean transportados hacia el aparato de Golgi donde SREBP sufre dos cortes proteolíticos liberando al dominio amino-terminal (N-SREBP, la forma activa de SREBP) que se transloca al núcleo donde activa la expresión de genes blanco (de síntesis y consumo de lípidos) por medio de un motivo de unión a ADN a los sitios SRE (*Sterol Regulatory Element*) en la región promotora de dichos genes (Espenshade, 2006). En la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* se ha descrito un gen homólogo de SREBP denominado como *SRE1*, cuyo producto génico Sre1, se activa en respuesta a la depleción de esteroles como consecuencia de los bajos niveles de oxígeno (Hughes y col., 2005). En esta levadura, Sre1 es necesario para el crecimiento anaeróbico ya que también activa la expresión de genes involucrados en la respuesta de adaptación a bajos niveles de oxígeno. Cuando los niveles de esteroides disminuyen, el complejo Sre1-Scp1 (homólogos de SREBP y Scap, respectivamente) es translocado al aparato de Golgi para la activación de Sre1 (Figura 4).

La señal de la activación de Sre1 mediada por los niveles de esteroides en *S. pombe* fue descrita por el grupo de trabajo del Dr. Espenshade, donde se vio que la activación de Sre1 está regulada más bien por los niveles de los metil esteroides 24-metileno lanosterol y 4,4-dimetil fecosterol bajo condiciones de bajo oxígeno y estrés celular. Tanto los aumentos como las disminuciones en el nivel de estos intermedios de la ruta del ergosterol inducen la proteólisis de Sre1 de una manera dependiente de Scp1. El ortólogo de SREBP en el hongo patógeno *Cryptococcus neoformans* también se activa con altos niveles de metil esteroides, lo que sugiere que esta señal para la activación de SREBP se conserva en eucariotas unicelulares (Hughes y col., 2007).

La vía SREBP no ha sido descrita en *X. dendrorhous*; sin embargo, estudios previos del laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile han permitido la identificación del gen *SRE1* en el genoma de la levadura. La delección de este gen en el mutante CBS-6938*cyp61* (mutante que no produce ergosterol y sobreproduce carotenoides (Loto I. y col., 2012)), reveló una disminución en la producción de carotenoides respecto a la cepa parental, recuperando los niveles alcanzados por la cepa silvestre (Gutiérrez, 2016).

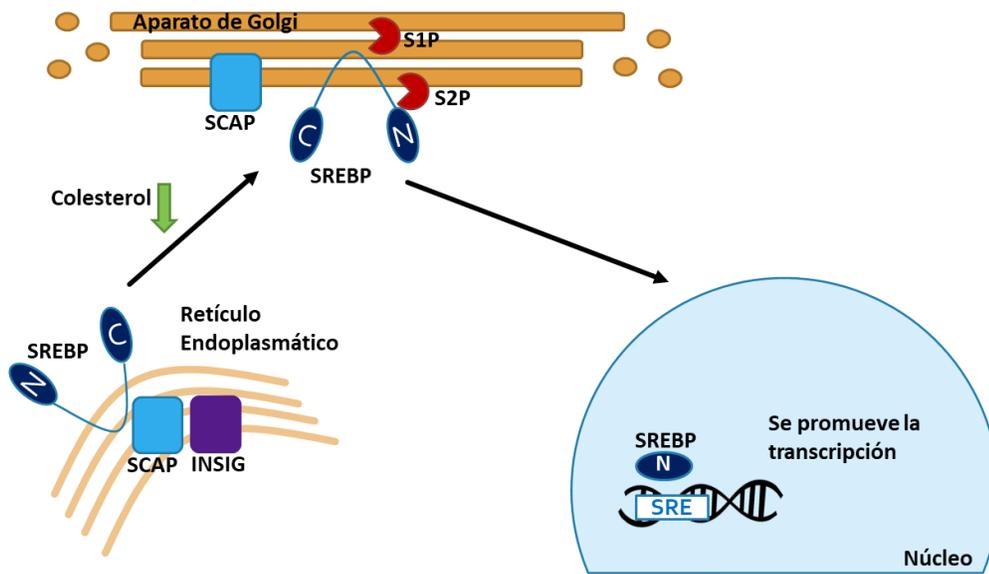


Figura 4. Vía SREBP en humano. Representación de la vía SREBP en humano. Cuando los niveles de colesterol son suficientes, el complejo SREBP-Scap es retenido en el retículo endoplasmático interactuando con la proteína INSIG, pero cuando los niveles de colesterol disminuyen, el complejo SREBP-Scap es translocado al aparato de Golgi. En el Golgi este factor sufre dos cortes proteolíticos los cuales son llevados a cabo por 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.

De acuerdo con los antecedentes presentados y con el objetivo de estudiar el efecto de la ausencia de ergosterol en la levadura es que en este seminario de título se construyeron dos mutantes de la biosíntesis de ergosterol en la levadura *X. dendrorhous*, los cuales corresponden a: i) mutante del gen que controla un paso río arriba al del gen *CYP61* en la biosíntesis de ergosterol: gen *ERG3* que codifica la C-5 esterol desaturasa que cataliza la conversión de episterol a 5,7,24(28) ergostatrienol en *S. cerevisiae* y ii) mutante del gen que controla el paso río abajo al del gen *CYP61* en la biosíntesis de ergosterol: gen *ERG4* que codifica la C-24(28) esterol reductasa que participa en la última etapa de la biosíntesis de ergosterol y convierte 5,7,24,28 ergostatetraenol en ergosterol en *S. cerevisiae*. Mutantes de ambos genes han sido descritas en *S. cerevisiae* (Smith y col., 1993; Dagmar y col., 2000), las cuales no

producen ergosterol, y acumulan otros esteroides intermediarios de la biosíntesis de ergosterol.

Hipótesis: La mutación de los genes *ERG3* y *ERG4*, generará una disminución de ergosterol y aumento en los niveles de carotenoides a través de la modulación del gen *HMGR* en *Xanthophyllomyces dendrorhous*

Objetivo General: Estudiar el efecto en la producción de carotenoides al bloquear la biosíntesis de ergosterol mediante la mutación de los genes *ERG3* y *ERG4* de la biosíntesis de ergosterol en *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

Objetivos específicos:

1. Identificar y caracterizar bioinformáticamente los genes *ERG3* y *ERG4* de *X. dendrorhous*.
2. Construir dos vectores que mediante recombinación homóloga permita construir las cepas mutantes de los genes *ERG3* y *ERG4* en *X. dendrorhous*.
3. Obtener y caracterizar mutantes de los genes *ERG3* y *ERG4* respecto a sus parentales en cuanto al contenido y composición de carotenoides y esteroides.
4. Evaluar los niveles de transcrito de los genes *HMGS*, *ERG3* y *ERG4* en las mutantes en los genes *ERG3* y *ERG4*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Bacterias

Para la mantención de plásmidos se utilizó la cepa DH5 α de *E. coli* (Sambrook & Russell, 2001), la cual se cultivó en medio LB (*Lysogeny broth*; triptona 1 %, extracto de levadura 0,5 %, NaCl 0,5 %) con agitación constante a 37°C. Para la selección de

colonias transformantes, se utilizó medio LB semi-sólido (agar 1,5 %) suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y Xgal (120 µg/ml) para la selección de recombinantes.

1.2. Levaduras

Como objeto de estudio se utilizó a la cepa de levadura *X. dendrorhous* CBS 6938. la cual se cultivó en medio YM (extracto de levadura 0,3 %, extracto de malta 0,3 %, bactopectona 0,5 %) suplementado con glucosa 1 %, en agitación constante a 22°C. Para la selección de colonias transformantes, se utilizó medio YM semi-sólido suplementado con higromicina B (35 µg/ml) o Zeocina (50 µg/ml). Las curvas de crecimiento de las cepas de *X. dendrorhous* estudiadas se realizaron por triplicado en medio YM líquido con agitación constante. El crecimiento se evaluó determinando la densidad óptica del cultivo a 600 nm en un espectrofotómetro V-630 UV-VIS (Jasco) a diferentes tiempos de cultivo. Para el análisis de los transformantes, las levaduras se crecieron en placas con medio YM suplementado con ketoconazol (0,1 µg/ml), Clotrimazol (0,1 µg/ml) o con el antimicótico Anfotericina B (0,25 µg/ml).

1.3. Plásmidos, cepas, enzimas y ácidos nucleicos

Las cepas y plásmidos utilizados o generados en este trabajo se describen en la Tabla 1 y Tabla 2, respectivamente. Para los experimentos de clonado en *E. coli* DH5α 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. Las reacciones de ligación entre los diferentes vectores y fragmentos de ADN se realizaron con la enzima ADN ligasa T4 (Promega) en un volumen final de 20 µl con una relación inserto: vector de 5: 1. Los ácidos nucleicos utilizados incluyen los marcadores de peso

molecular Lambda ADN/*Hind*III Marker y GeneRuler 1kb Plus ADN Ladder de Thermo Scientific.

Tabla 1. Cepas utilizadas y construidas.

Cepa	Descripción	Referencia
DH5α	Cepa de <i>E. coli</i> utilizada con mayor frecuencia para clonación. Las mutaciones <i>recA1</i> y <i>endA1</i> en DH5a aumentan la estabilidad del inserto y mejoran la calidad del ADN plasmídico preparado a partir de Miniprep.	Sambrook & Russell, 2001
CBS-6938	Cepa de <i>X. dendrorhous</i> silvestre	ATCC 96594
CBS-6938Δ<i>erg3</i>	Transformante que deriva de CBS-6938 en el que se reemplazó el gen <i>ERG3</i> por un módulo de resistencia a Higromicina.	Este trabajo
CBS-6938Δ<i>erg4</i>	Transformante que deriva de CBS-6938 en el que se reemplazó el gen <i>ERG4</i> por un módulo de resistencia a zeocina.	Este trabajo
CBS-6938<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.	Loto y col., 2012

Tabla 2. Plásmidos contruidos y utilizados.

Plásmido	Descripción	Referencia
pBluescript II SK (pBS)	Vector de clonado en <i>E. coli</i> .	Agilent Technologies
pudErg3	Vector pBS que contiene la región río arriba (585 pb) y abajo (496 pb) del ORF de <i>ERG3</i> .	Este trabajo
pudErg4	Vector pBS que contiene la región río arriba (668 pb) y abajo (610 pb) del ORF de <i>ERG4</i> .	Este trabajo
pΔErg3_Hig	Vector pudErg3 que contiene un módulo de resistencia a Higromicina B, entre la región río arriba y río abajo del gen <i>ERG3</i> .	Este trabajo
pΔErg4_Zeo	Vector pudErg4 que contiene un módulo de resistencia a Zeocina, entre la región río arriba y río abajo del gen <i>ERG4</i> .	Este trabajo
pBS_EcoRV_Zeo	Vector pBS que contiene un módulo de resistencia a Zeocina clonado en el sitio <i>EcoRV</i>	Laboratorio Génetica
pBs_EcoRV_Hig	Vector pBS que contiene un módulo de resistencia a Higromicina B clonado en el sitio <i>EcoRV</i>	Laboratorio Génetica

2. Extracción y análisis de ácidos nucleicos

2.1. Extracción de ADN de *E. coli*

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

2.2. Extracción de ADN de *X. dendrorhous*

La extracción de ADN 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 líquido. 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 el ADN se precipitó 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 temperatura ambiente durante 10 min. Por último, el ADN se suspendió en 100 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM; pH 8) más ARNasa (34 µg/ml). El ADN genómico obtenido se almacenó a -20°C para su posterior utilización.

2.3. Extracción de ARN de *X. dendrorhous*

La extracción de ARN se realizó a partir de un pellet celular obtenido desde 5 ml de cultivo líquido, crecido durante 120 horas en medio YM. El pellet celular 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 llevó al molidor de células Mini-Beadbeater-16 (BioSpec) durante 3 min y se adicionó 800 µl de la solución TriReagent (Life Technologies). Luego, 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. 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. Luego, se colectó la fase acuosa y se le agregó 250 µl de agua, 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 10 µl de agua libre de nucleasas. El ARN obtenido se almacenó a -80°C hasta su utilización.

2.4. Purificación de ADN desde geles de agarosa

Los productos de reacción de PCR o de digestión enzimática se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 40 mM, EDTA 1mM, pH 8), teñidos con SafeView Nucleic Acid Stain (NBS 20 Biologicals) a una concentración final de 1X y las bandas de ADN se visualizaron con un transiluminador UV. En el caso de purificación de las bandas, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio, las bandas se cortaron con un bisturí y se transfirieron a

un tubo Eppendorf. Luego, se adicionó 1.000 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 la solución 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 ADN purificado de esta manera se almacenó a -20°C hasta su utilización.

2.4. Reacción en cadena de la polimerasa en cadena (PCR), transcripción reversa (RT) y PCR cuantitativo (qPCR).

Las reacciones de PCR se realizaron con la enzima *Pfu* ADN polimerasa (Agilent Technologies) para amplificar los fragmentos río arriba y río debajo de los genes *ERG3* y *ERG4*; para verificar la correcta inserción de los fragmentos en el vector, la resistencia y los clones, se utilizó la enzima *Taq* ADN polimerasa (purificada en el Laboratorio de Genética).

Las reacciones de PCR se realizaron 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 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 ADN molde. Se utilizó un termociclador Applied Biosystem 2720 con el siguiente programa para PCR estándar: denaturación inicial a 95°C por 3 min (en el caso de PCR de colonia fue durante 5 min, al igual que con la enzima *Pfu* ADN polimerasa), 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, luego una elongación a 72°C por 10 min y finalmente la reacción se mantuvo a 4°C.

El PCR de elongación (OE-PCR, *Overlap Extension PCR*) utilizado para unir los fragmentos río arriba y río debajo de ambos genes, se realizó en un volumen final de 25 μ l con 1U de *Pfu* ADN polimerasa (Agilent Technologies), buffer *Pfu* 1X, cada dNTP a 200 μ M y 100 ng de cada fragmento de ADN. 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, luego una elongación a 72°C por 10 min y finalmente la reacción se mantuvo a 4°C. A continuación, la mezcla de reacción obtenida se amplificó en una reacción de PCR estándar con *Pfu* ADN polimerasa (Agilent Technologies).

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

El qPCR en tiempo real se realizó en el equipo Mx 3000P (Stratagene). Para ello se utilizó 10 μ l del Fast Evagreen qPCR Master Mix (Quantance), 8 μ l de agua, 1 μ l de una mezcla de partidores directo y reverso (10 μ M) y 1 μ l de cADN. Se utilizaron partidores con eficiencia mayor a un 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 ADN Technologies y se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Partidores utilizados

N°	Nombre	Secuencia (5'-3')	Sentido
1	Fw_UP1 ERG3	CGCCGGCCTTGTGGATTC	D
2	Fw_UP3 ERG3	CCAACAGCACAGCATCGTG	D
3	Rv_Down1 ERG3	CCCTTTGTCTCGCCATCTC	R
4	Rv_Down3 ERG3	CGCCATCTCATTCCCTTAGAC	R
5	Fw_Down ERG3	CTGGCTTTACGTAAACCTTCCTCCTCTGGTGCTCC	D
6	Rv_UP ERG3	GAGGAGGAAGGTAAACGTAAAGCCAGGGCTGTGTCCG	R
7	Fw_UP2 ERG3	CGCGTGATTGATTCGTAC	D
8	RV_Down2 ERG3	GTC TCCCTAAGCGTGTGGT	R
9	Fw_UP1 ERG3	CGCCGGCCTTGTGGATTC	D
10	FW_ERG3C	CCGACTTCTCCCTGGGTGTCC	D
11	RV_ERG3C	CAACCGGGTGGAAACGCGTG	R
12	Fw_UpM ERG3	GCTTCTCTTCTCCGCCA	D
13	Rv_DownM ERG3	GAGCAGCAGACAAGGACCG	R
14	Fw_UP1 ERG4	CCCGTCACCGGTCTAGCCAAC	D
15	Rv_UP ERG4	TCGGTGAACGGTAAACGTTTGCCTGCTTGCGCTGCC	R
16	Fw_Down ERG4	GCAGGCAAACGTAAACCGTTCACCGATGCGGTGCGAGAC	D
17	Rv_Down1 ERG4	GTACAGCCTTGCGGCGTTTCGAC	R
18	Fw_UP2 ERG4	GCGCCAACGAACCTTCTCGAC	D
19	Rv_Down2 ERG4	CCTTCACGGTGGCCCCAAC	R
20	Fw_UP3 ERG4	CCCCAATGCCTGGGTCAGACC	D
21	Rv_Down3 ERG4	CGGTCACGAGCTTGAAACTGCC	R
22	Rv_Down4 ERG4	CACTTCTGCCGTCCTACTGGC	R
23	FW_ERG4C	CCGCCGGGATAGTCCACTAC	D
24	RV_ERG4C	CGTAGTGGGGATCATCTCCTC	R
25	PEFForEV	GATATCGGCTCATCAGCCGACAGTT	D
26	pEFrev0	TTTGAAGCTGTTTCGAGATAG	R
27	gpdTF	ACGGTTCTCTCCAAACCCTC	D

N°	Nombre	Secuencia (5´-3´)	Sentido
28	P.TEFR	GGTGAAGCTGTTTCGAGATAGA	R
29	H-out.F	CTCGATGAGCTGATGCTTTG	D
30	H-out.R	CACTGGCAAACGTGTGATGGA	R
31	Zeo.R	GTGACCCTGTTTCATCAGCG	R
32	Zeo.F	GACTTCGTGGAGGACGACTT	D
33	M13 Rv	GGAAACAGCTATGACCATG	R
34	M13 Fw	TGTAACGACGGCCAGT	D
35	mactR-RT	TCACCAACGTAGGAGTCCTT	R
36	mactF-RT	CCGCCCTCGTGATTGATAAC	D
37	FW 1 ERG3Q	CTCCATTGCGCTCCCACG	D
38	FW 2 ERG3Q	CGGTTGACGGGTATCTCCAA	D
39	RV 1 ERG3Q	GGCCGGTCCGTTAATGATCT	R
40	FW 1 ERG4Q	GCTTCTTACTTCCGGCTGGT	D
41	FW 2 ERG4Q	GACTTGGGGTCTCTCTACCG	D
42	RV 1 ERG4Q	CCTTCCGTAAGTGGCTGCAC	R

2.5. Análisis bioinformático

La identificación de los genes se realizó a partir de la base de datos del Laboratorio de Genética, identificando las secuencias exón-intrón de los genes *ERG3* y *ERG4*, mediante el programa Alignx perteneciente a Vector NTI v11.5. Mediante la misma herramienta se dedujo las posibles secuencias aminoacídicas de ambas proteínas. También se caracterizaron bioinformáticamente ambas secuencias proteicas a través de TMHMM Server v. 2.0. Para el caso de la predicción de la localización subcelular se utilizó la plataforma PROSITE con el método *k*-Nearest Neighbors Classifier (*k*-NN), el cual otorga un porcentaje que corresponde a la probabilidad que se predice al comparar la secuencia aminoacídica con las que se encuentran en la base de datos de esta plataforma. Y por último se construyó un modelo por homología (con ModWEB) a PDB 4quvA como molde (35% Identidad de secuencia) solo para el producto génico del gen *ERG4*. Por otra parte, para el análisis de las regiones promotores de los genes *ERG3* y *ERG4* se realizó mediante la plataforma JASPAR utilizando la base de datos

TRANSFAC (Mathelier A. y col., 2013). Se utilizó como secuencia consenso el factor transcripcional SREBPF2.

3. Transformación por electroporación

3.1. Transformación por electroporación de *E. coli*

Las células electrocompetentes se prepararon a partir de un inóculo de *E. coli* DH5 α crecido en medio LB con ácido nalidíxico (15 $\mu\text{g/ml}$) a 37°C hasta una D.O. a 600 nm de 0,4 (Sambrook & Russell, 2001). Las células se cosecharon por centrifugación refrigerada durante 5 min a 10.000 rpm. Luego, se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con 250 ml de agua estéril. El pellet celular 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 μl en tubos Eppendorf estériles y se congelaron a -80°C hasta su uso. Para la electroporación, 40 μl de células electrocompetentes se mezcló con 3,8 μl del ADN plasmídico y se transfirieron a una cubeta de electroporación de 2 mm. Se aplicó un pulso de 2.500 V, 25 μF y 200 Ω , y luego se agregó 1 ml de medio LB. Se incubó durante 1 h a 37°C y posteriormente, las células se sembraron en LB semi-sólido con Ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$)

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 (1995). Se utilizó un cultivo de 100 ml en medio YM con la cepa de *X. dendrorhous* a electroporar crecida a 22°C hasta una D.O. a 600 nm 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 separó en fracciones de 60 µl en tubos Eppendorf estériles, las que fueron utilizadas en el mismo día. Para electroporar, una fracción se mezcló con 6 µl de ADN transformante (10 µg). Se utilizó una cubeta de 2 mm y las condiciones de electroporación fueron: 450 V, 125 µF y 600 Ω. Luego del pulso 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.

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

4.1. Extracción de carotenoides

La extracción de carotenoides se realizó según el método descrito en la literatura (An & col., 1989). Se utilizó 20 ml de cultivo y se centrifugó durante 5 min a 4.000 rpm. Las células cosechadas se lavaron con 20 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

de cultivo por triplicado. La determinación de pigmentos obtenidos se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\mu g \text{ de Pigmentos}}{g \text{ de peso seco}} = \frac{Vol. \acute{e}ter * Abs * 100}{21 * Peso \text{ seco} * C}$$

Dónde: vol. éter = volumen de éter de petróleo recuperado (ml); Abs = 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:

$$\frac{\mu g \text{ de Esteroides}}{g \text{ de peso seco}} = \frac{Vol. \acute{e}ter * Abs * 10000}{11900 * Peso \text{ seco}}$$

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.

4.3 Análisis de la composición de pigmentos y esteroides.

La determinación de la composición de pigmentos se realizó mediante cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC) en un equipo de HPLC con un detector de arreglo de diodos Shimadzu SPD-M10A y una columna Lichrospher RP18 125-4 (Merck). Para ello, se dejó evaporar el éter de petróleo del extracto, se suspendió con 200 μ l de acetona y se inyectó 20 μ l en el equipo. Como fase móvil se utilizó acetonitrilo: metanol: isopropanol en una proporción 85: 10: 5 (v/v), con un flujo de 1 ml/min en condiciones isocráticas. Los carotenoides fueron reconocidos de acuerdo con sus tiempos de retención y espectro de absorción de acuerdo a los estándares.

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

RESULTADOS

1. Análisis bioinformático de los genes *ERG3* y *ERG4* de *X. dendrorhous*.

Los genes *ERG3* y *ERG4* de *X. dendrorhous* se identificaron mediante análisis de la base de datos genómica y transcriptómica de esta levadura disponible en el Laboratorio de Genética, particularmente de la cepa silvestre UCD 67-385. Las secuencias identificadas fueron traducidas *in silico* a proteínas y comparadas con las respectivas proteínas de *S. cerevisiae*; la proteína Erg3 presenta un 41% de identidad de secuencia con la proteína Erg3 de *S. cerevisiae* (SGD:S000004046) con un 100% de cobertura y Erg4 presenta un 44% de identidad de secuencia con la proteína Erg4 de *S. cerevisiae* (SGD:S000002980) con un 100% de cobertura.

También fueron comparadas mediante alineamientos con los datos genómicos de la cepa CBS-6938 que se encuentran en la base de datos del NCBI. Para el caso de *ERG3* (XDEN_03446) se obtuvo un 99,9% de similitud de secuencia, con un 100% de cobertura. De igual forma, para *ERG4* se obtuvo un 99,9% de similitud de secuencia con un 100% de cobertura (XDEN_03446). El análisis de las secuencias de ambos genes permitió identificar su estructura exón-intrón. El gen *ERG3* contiene 6 exones de 554, 68, 102, 44, 105, 114 pb; por otro lado, el gen *ERG4* presenta 15 exones de 202, 107, 97, 276, 134, 133, 4, 93, 35, 151, 16, 17, 55, 103, 35 pb los cuales se encuentran representados en la figura 5.

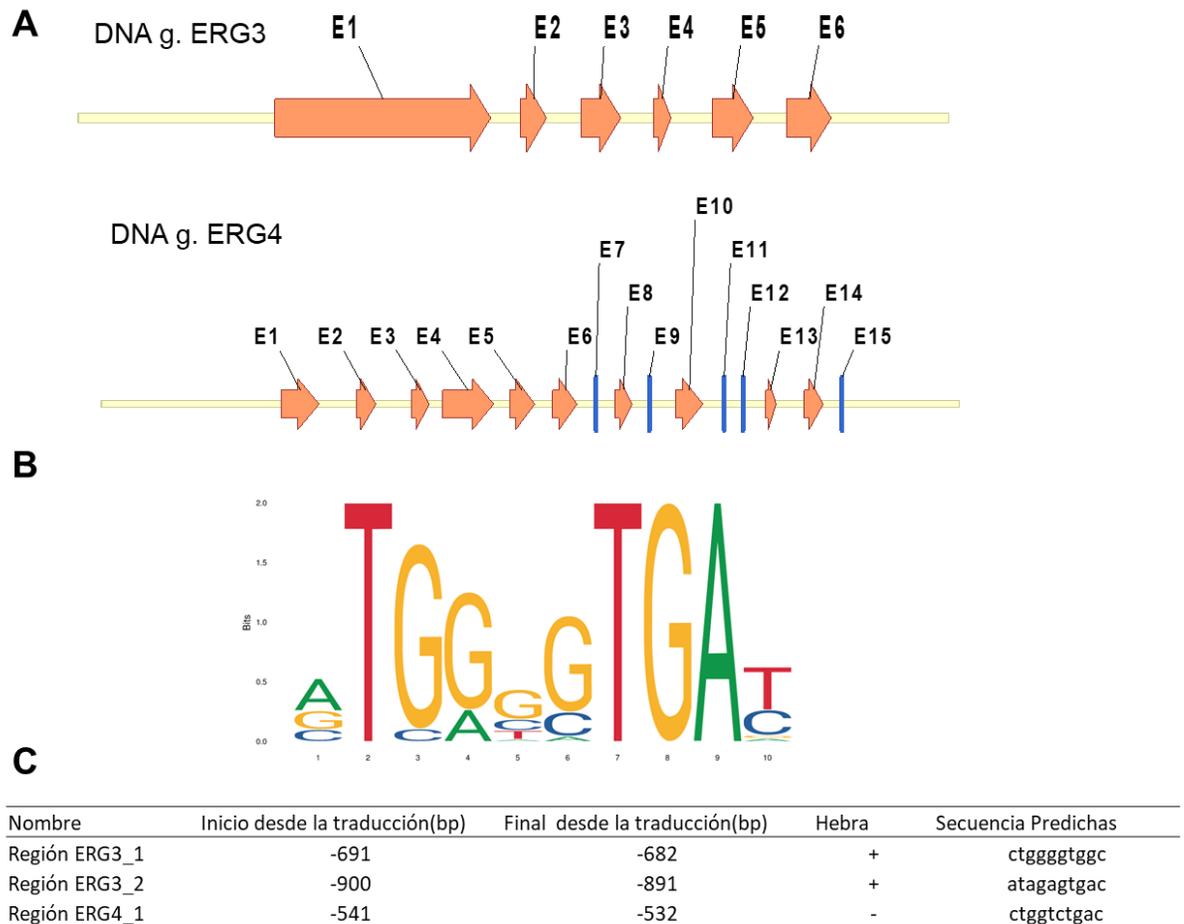


Figura 5. Estructura de los genes *ERG3* y *ERG4* de *X. dendrorhous* y secuencia logo de la secuencia SRE. (A) Representación de la organización estructural de los genes *ERG3* compuesto por 6 exones y *ERG4* compuesto por 15 exones. Los exones se representan con las flechas de color naranja, mientras que los de menor tamaño se representan en azul. (B) Secuencia logo de la base de datos TRANSFAC del factor de transcripción SREBF2 (Gene ID: 6721) de humanos, el cual está encargado de la regulación del colesterol. (C) Tabla con las posibles secuencias SRE predichas en las regiones promotoras de los genes *ERG3* y *ERG4*.

Con el fin de dilucidar si los genes *ERG3* y *ERG4* son posibles blancos de regulación de la vía SREBP, se analizó bioinformáticamente si la región promotora (1000pb) de cada gen contiene probables secuencias consenso de unión de este factor de transcripción. Para esto se utilizó la secuencia consenso de unión (secuencia SRE) del factor transcripcional de humanos SREBF2 (Figura 5B). Las secuencias promotoras se

analizaron mediante la base de datos TRANSFAC (Mathelier A. y col., 2013). Los resultados arrojaron 1 posible secuencia SRE en la región promotora del gen *ERG4* ubicada en la hebra negativa del gen, mientras que para el gen *ERG3*, el análisis arrojó 2 posibles secuencias SRE ubicadas en la hebra positiva las cuales se detallan en la figura 5C.

A partir de las secuencias codificantes de ambos genes, se dedujo que la proteína Erg3 es de 328 aminoácidos con un peso molecular estimado de 38,1 kDa y punto isoeléctrico (PI) de 7,88. Además, presenta 26 residuos cargados positivamente y 25 cargados negativamente. Por otro lado, la proteína Erg4 es de 485 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 55,1 kDa y un PI de 9,14. Presenta 31 residuos cargados negativamente y 43 cargados positivamente.

También se predijo la localización subcelular de cada proteína mediante la herramienta TMHMM Server v. 2.0, donde se observó que ambas se encontrarían asociadas al retículo endoplásmico con un 34,8% para Erg3 en la prueba *K-*nn**, mientras que un 55,6% para Erg4. También se predijo la cantidad de segmentos de transmembrana en cada una de ellas donde se observó que Erg3 posee 3 segmentos, mientras que Erg4 presenta 9 segmentos de transmembrana (Figura 6 B y C).

A partir de ambas proteínas deducidas desde los genes identificados, y mediante la plataforma Prosite se predijo *in silico* la presencia de dominios conservados para ambas proteínas. Para el caso de Erg3, no se observaron dominios conservados en la secuencia a partir de esta base de datos, mientras que para Erg4, se observaron dos dominios conservados pertenecientes a la familia de proteínas esteroles reductasa (Figura 7A).

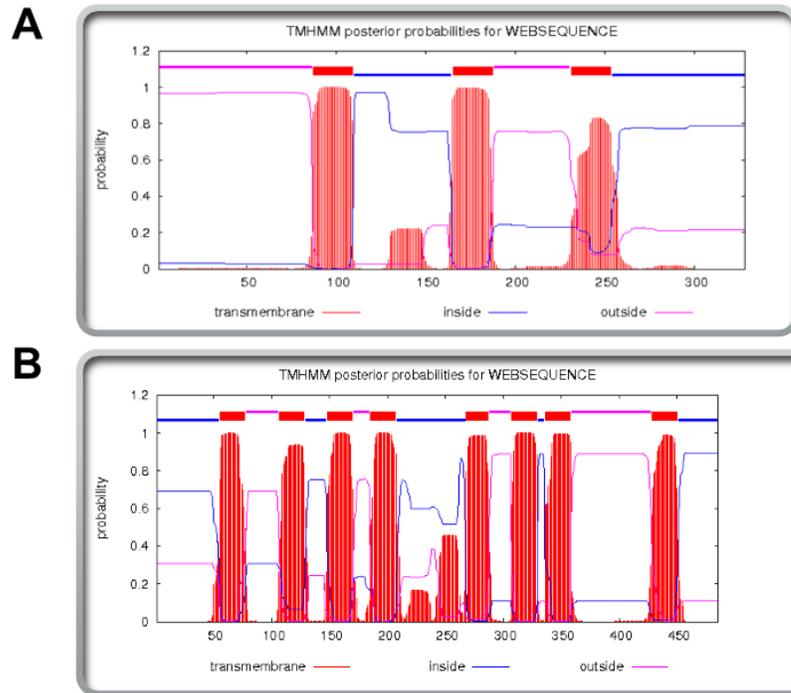


Figura 6. Predicción bioinformática de regiones de transmembrana de las proteínas Erg3 y Erg4 de *X. dendrorhous*. Análisis bioinformáticos mediante TMHMM Server v. 2.0, donde se observa que la proteína Erg3 (A) presenta 3 segmentos de transmembrana y Erg4 (B) presenta 9 segmentos de transmembrana.

Por otro lado, con el fin de caracterizar las proteínas, se construyó un modelo de Erg4 por homología (ModWeb) usando a PDB 4quvA como molde, la cual corresponde a la proteína esteroil reductasa de membrana de *Methylomicrobium alcaliphilum* (35% de identidad de secuencia). Sólo se construyó un modelo para Erg4, ya que no se encontró una estructura cristalográfica de Erg3 que sirviera como molde en las bases de datos (que tuviese >30% de identidad de secuencia). Para la construcción del modelo, se utilizó como región blanca desde el residuo 55 hasta el residuo 485 de Erg4 y los residuos 24 al 427 de la proteína esteroil reductasa (PDB 4quvA). Considerando las recomendaciones descritas por plataforma Mod Web; para que un modelo sea confiable, es necesario que los valores de los siguientes parámetros sean: i) MPQS >

1.1, ii) TSVmod NO35 > 40%, iii) GA341 > 0.7 y iv) z-DOPE < 0. El Puntaje de calidad ModPipe (MPQS) es una puntuación compuesta que comprende la identidad de la secuencia, la cobertura y los tres puntajes individuales de *e-value*, z-Dope y GA341. TSVmod NO35 corresponde a un puntaje que representa la superposición nativa a 3.5° de la proteína molde respecto al modelo. GA341 corresponde a un puntaje para la confiabilidad de un modelo derivado de potenciales estadísticos (Melo y cols., 2002) y basado en que un plegamiento es correcto cuando al menos el 30% de sus átomos Ca se superponen dentro de 3.5 Å de sus posiciones correctas. Por otro lado, el valor de z-DOPE es derivado de una probabilidad estadística, optimizando la energía para el plegamiento. Por último el valor RSMD (*root-mean-square deviation of atomic positions*) es la medida de la distancia promedio entre los átomos (átomos de la cadena principal) de las proteínas superpuestas. En base a los valores entregados por el servidor ModWeb (Figura 7B), es posible considerar al modelo construido como confiable. En el modelo se observan 9 estructuras de alfa hélice, representadas en color rojo, que podría corresponder a la porción de transmembrana, y en amarillo los dominios de sabana beta, los cuales podrían estar relacionados con la actividad de la proteína.

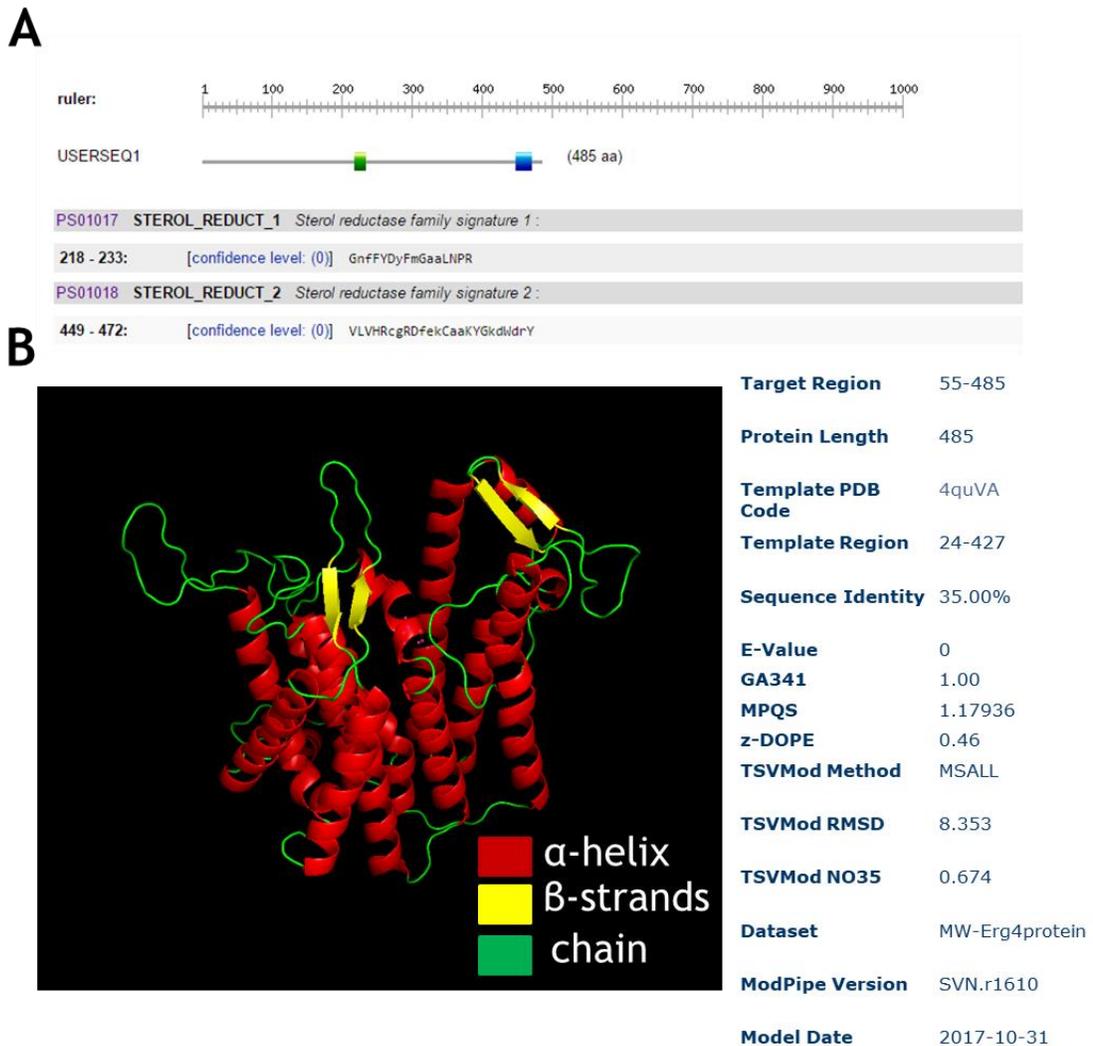


Figura 7. Modelo por homología y análisis de dominios conservados en Erg4 de *X. dendrorhous*. El modelo fue construido mediante el método MSALL, el cual considera una estructura secundaria similar y se utilizan las características de la proteína molde. Se observan en el modelo las 9 hélices de transmembrana predichas anteriormente. A la derecha de la figura se muestran los valores estadísticos que se encuentran entre los parámetros que considera a un modelo confiable.

2. Obtención de cepas mutantes CBS-6938 Δ erg3 y CBS-6938 Δ erg4 en *X. dendrorhous*

Con el fin de evaluar la funcionalidad de los genes identificados, se construyeron cepas mutantes de delección. Una vez obtenidas, se evaluó el fenotipo de éstas respecto a la cepa parental en cuanto al contenido y composición de carotenoides y de esteroides, y

crecimiento en presencia de azoles. Debido a que los genes *ERG3* y *ERG4* controlan la síntesis de ergosterol, se esperaba que las mutantes construidas no produzcan ergosterol, lo que podría afectar la producción de carotenoides y su crecimiento en presencia de azoles.

2.1. Construcción de los vectores para la obtención de mutantes

Para la delección de los genes *ERG3* y *ERG4* en *X. dendrorhous*, lo primero fue la construcción de los módulos de recombinación. Para el caso de *ERG3*, éste contenía 585 pb río arriba y 538 pb río abajo del gen. Por otro lado, para el caso de *ERG4*, éste contenía 610 pb río y 579 pb río abajo del gen (Figura 8A). Para la construcción, las regiones río arriba y río abajo de ambos genes se amplificaron mediante PCR a partir de ADN genómico de *X. dendrorhous* (Figura 8B y C), las que luego fueron unidas, respectivamente, mediante OE-PCR. Para realizar el OE-PCR, en los partidores reversos de la región “up” y directo de la región “down”, se añadieron 10 bases de complementaridad como se muestra en la Tabla 3 (partidores 5, 6, 15 y 16) y la unión de ambos fragmentos para el caso del gen *ERG3* poseía un tamaño de 1.123 pb (585pb+538pb), mientras que para el gen *ERG4*, el fragmento era de un tamaño de 1.179 pb (610pb+579pb) (Figura 8). El diseño de los partidores también permitió incluir un sitio de restricción para la enzima *HpaI* entre ambos fragmentos unidos.

Los productos obtenidos por OE-PCR tanto para el gen *ERG3* como para *ERG4*, fueron ligados al vector pBluescript II SK- (pBS) digerido con *EcoRV* y replicado en *E. coli* DH5 α , obteniéndose los vectores pudErg3 y pudErg4 (Figura 9).

Se seleccionaron las colonias de *E. coli* resistentes a ampicilina blancas en presencia de Xgal y mediante PCR de colonia se determinaron cuáles contenían las regiones amplificadas mediante OE-PCR como inserto, utilizando los partidores que amplifican dicha región (Tabla 3). Luego, se purificó el ADN plasmídico de estas colonias y se

analizó por PCR, escogiendo aquella que cumplió con el patrón de bandas esperado (Figura 9). Para el caso del plásmido pudErg4, éste fue secuenciado, debido a que se presentaron mayores problemas técnicos para la obtención de este vector, y la secuenciación permitió corroborar el correcto ensamble de las zonas río arriba y río abajo del gen con los partidores universales M13 (partidores 33 y 34, Tabla 3). Cabe destacar que la inserción del fragmento podía ocurrir en ambos sentidos en el vector, siendo directo en el caso de *ERG4*, mientras que para *ERG3* fue reverso por lo cual, cambio el sentido de los partidores.

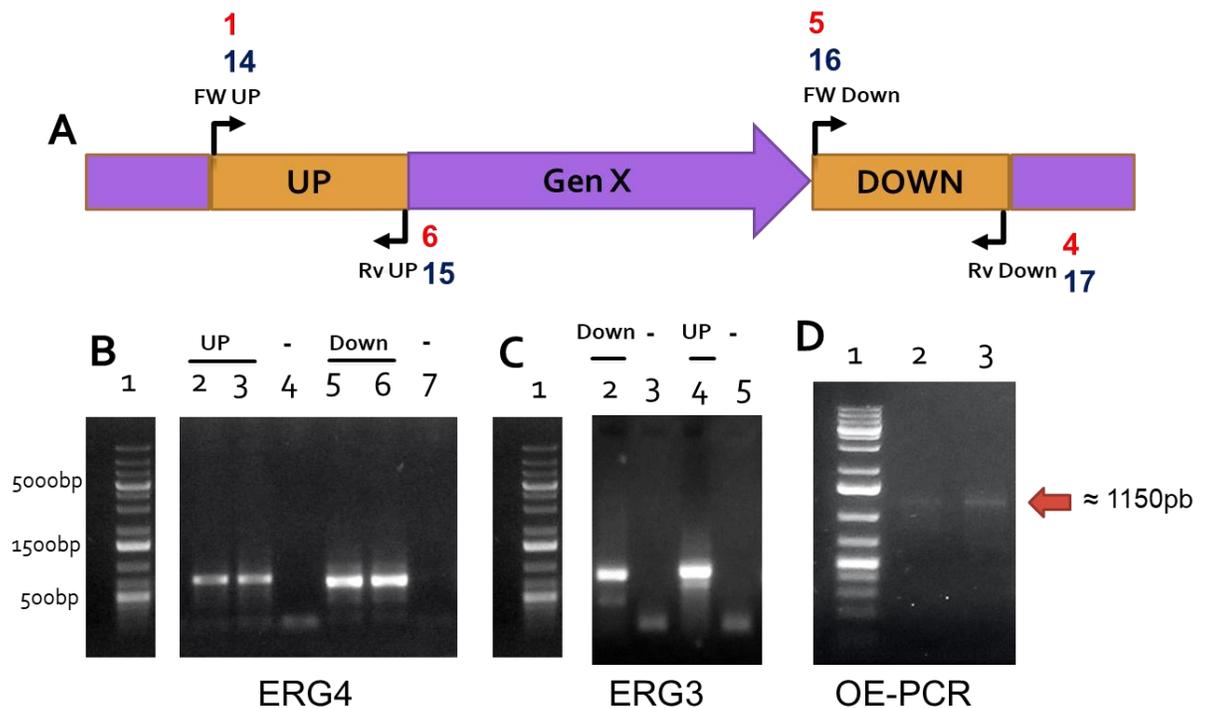


Figura 8. Obtención de la región homóloga río arriba y abajo de los genes *ERG3* y *ERG4*. (A) Representación esquemática de los genes ya sea *ERG3* o *ERG4* (Gen X) en el genoma de *X. dendrorhous*. El gen está representado en flecha morada, y las regiones río arriba (UP) y río abajo (Down), en amarillo. El sentido de los partidores utilizados se indica con flechas negras: el número de los partidores utilizados para el gen *ERG3* están en color rojo, mientras que para *ERG4* en color azul (los números corresponden a los anotados en la Tabla 3). (B) Amplificación por PCR de la región UP (carril 2 y 3), Down (carril 5 y 6) del gen *ERG4* con los respectivos controles negativos (Carril 4 y 7). (C) Amplificación por PCR de las regiones Down (Carril 2) y Up (Carril 4) del gen *ERG3* con sus respectivos controles negativos (Carril 3 y 5). (D) Productos del OE-PCR para las regiones río arriba y río abajo del gen *ERG3* (Carril 2) y *ERG4* (Carril 3). El carril 1 de las figuras B, C y D corresponde al marcador de peso molecular 1Kb Plus, donde se indican los tamaños de las principales bandas.

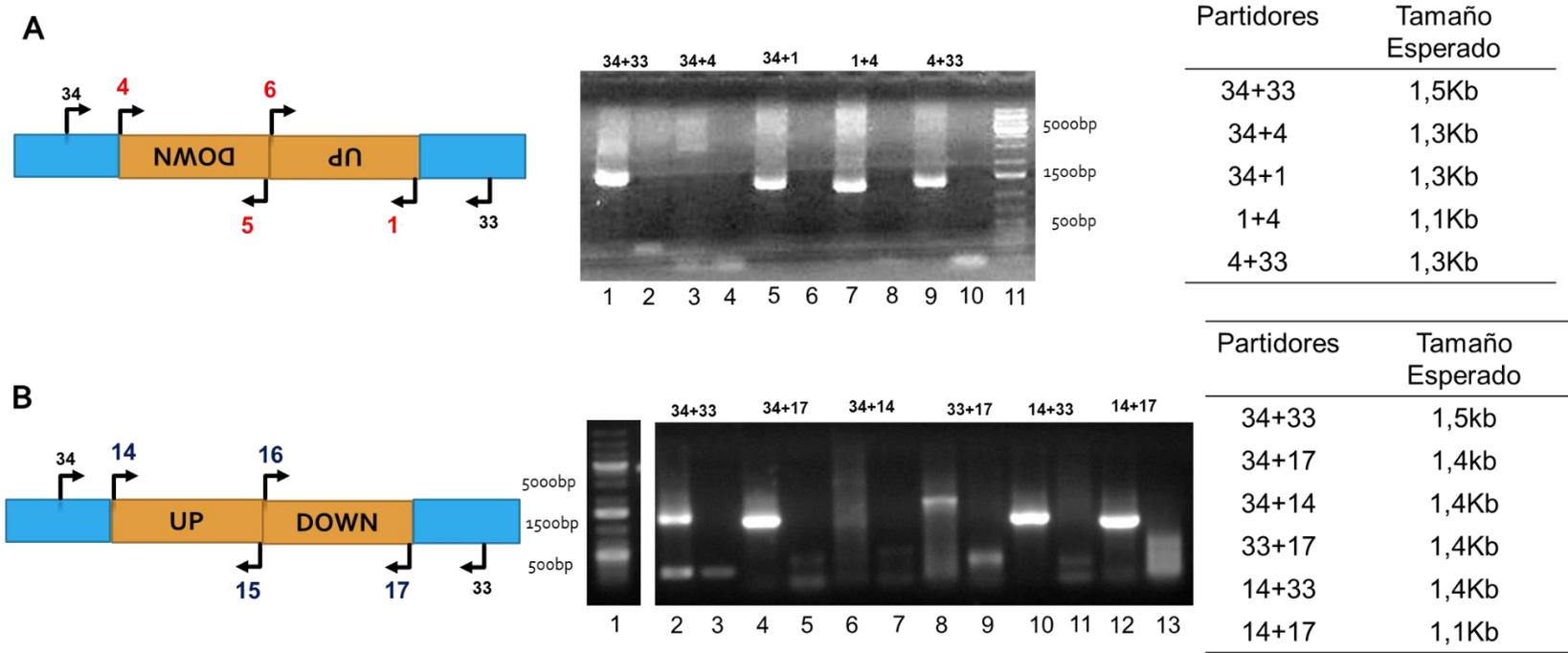


Figura 9. Obtención de los vectores pudErg3 y pudErg4. A la izquierda de la figura se observa la representación de la fracción con el inserto incorporado del vector pudErg3 (A) y del vector pudErg4 (B). Las regiones Up y Down se representan en color amarillo y corresponden a las regiones río arriba y río abajo del gen, mientras que el vector pBluescript II SK- (pBS) se representa en color celeste. Las flechas negras representan los partidores utilizados en el análisis junto con su numeración de acuerdo con la tabla 3. En el centro se puede observar el gel con el análisis de la orientación del inserto mediante PCR. En (A) el carril 1 corresponde al amplificado del inserto con los partidores universales M13, los amplificados en los carriles 5 y 7 corroboran la inserción del fragmento en el plásmido y el sentido en este. Los carriles 2, 4, 6, 8 y 10 corresponden a controles negativos de cada reacción de PCR. En (B) el carril 2 corresponde al amplificado los partidores universales M13, los carriles 4 y 10 corroboran la orientación y el inserto del fragmento. Los carriles 3, 5, 7, 9, 11 y 13 corresponden a los controles negativos de cada una de las reacciones de PCR. A la derecha de la imagen en ambos casos se encuentra la tabla con los tamaños esperados para cada una de las reacciones de PCR. Los carriles 11(A) y 1(B) corresponden al marcador de peso molecular 1Kb Plus.

En ambos casos, en pudErg3 y pudErg4, se incorporó un sitio de restricción para la enzima *HpaI* (Corte en romo) entre las regiones “up” y río abajo de los genes en el cual se insertó un módulo que confiere a *X. dendrorhous* resistencia a los antibióticos Zeocina o a Higromicina B. Estos módulos de resistencia, tanto para Zeocina como para Higromicina B, se encuentran bajo un promotor constitutivo EF-1 α (promotor del factor de elongación 1 α) y el terminador de la transcripción GPD (terminador del gen del gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), ambos de *X. dendrorhous* (Niklitschek y col., 2008).

Los módulos que confieren resistencia a Zeocina e Higromicina B se purificaron desde geles de agarosa a partir de la digestión de los plásmidos pBS_*EcoRV*_Zeo y pBS_*EcoRV*_Higro (Tabla 2) con *EcoRV* (Figura 10). Luego se realizó un ligado con los vectores pudErg3 y pudErg4 digeridos con *HpaI* con cada uno de los módulos de resistencia purificados para obtener los vectores p Δ Erg3 y p Δ Erg4 (Figura 11 y 12, respectivamente) al transformar *E. coli* DH5 α con los productos de la reacción de ligado y seleccionando colonias que fueran resistentes a ampicilina. Todas las colonias obtenidas eran blancas, ya que el gen de la β -galactosidasa de pBS ya se había interrumpido, por lo cual fue necesario analizar por PCR de colonia alrededor de 100 colonias en cada caso con los partidores que amplifican los módulos de resistencia a antibiótico (partidores 27 y 28, Tabla 3), hasta determinar alguna colonia que tuviera como inserto los módulos de resistencia a antibiótico. Se extrajo ADN plasmídico de las colonias escogidas que dieron positivo en el análisis por PCR de colonia, y se realizó una serie de reacciones de PCR, para verificar la correcta inserción de los fragmentos. Para el caso de p Δ Erg3 se obtuvo tanto p Δ Erg3-Zeo y p Δ Erg3-Hig, pero para el caso de p Δ Erg4 solo se obtuvo p Δ Erg4-Zeo con el módulo de resistencia a Zeocina.

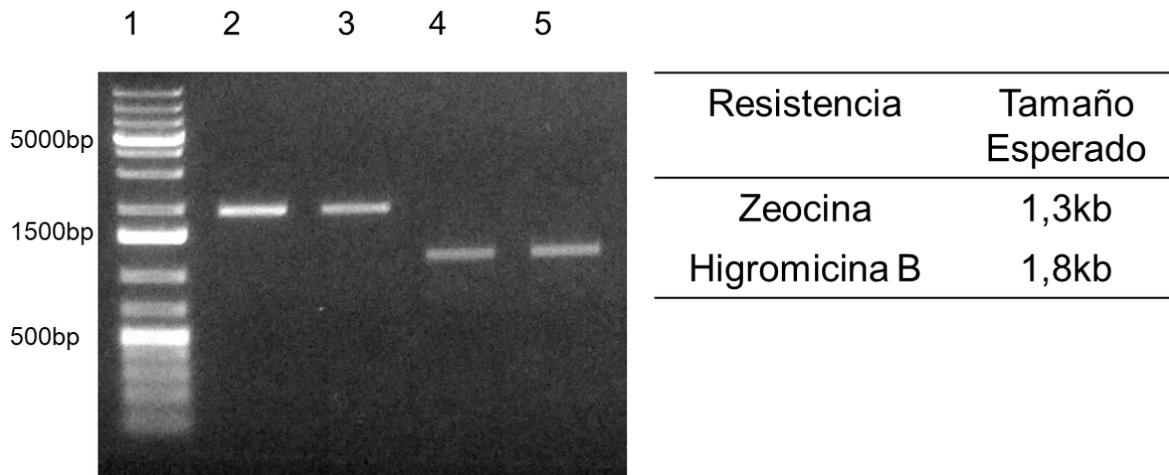


Figura 10. Purificación de los módulos de resistencia a antibiótico para *X. dendrorhous*. Los módulos de resistencia se purificaron desde geles de agarosa para insertarlos posteriormente en el sitio *HpaI* de los plásmidos pudErg3 y pudERG4. Estos módulos tienen un promotor constitutivo EF-1 α (promotor del factor de elongación 1 α) y el terminador de la transcripción GPD (terminador del gen del gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), ambos de *X. dendrorhous* y el gen de resistencia ya sea a Higromicina B (módulo= 1,8 kb, carriles 2 y 3) o Zeocina (módulo= 1,3 kb, carriles 4 y 5). Carril 1: corresponde al marcador de peso molecular 1Kb Plus.

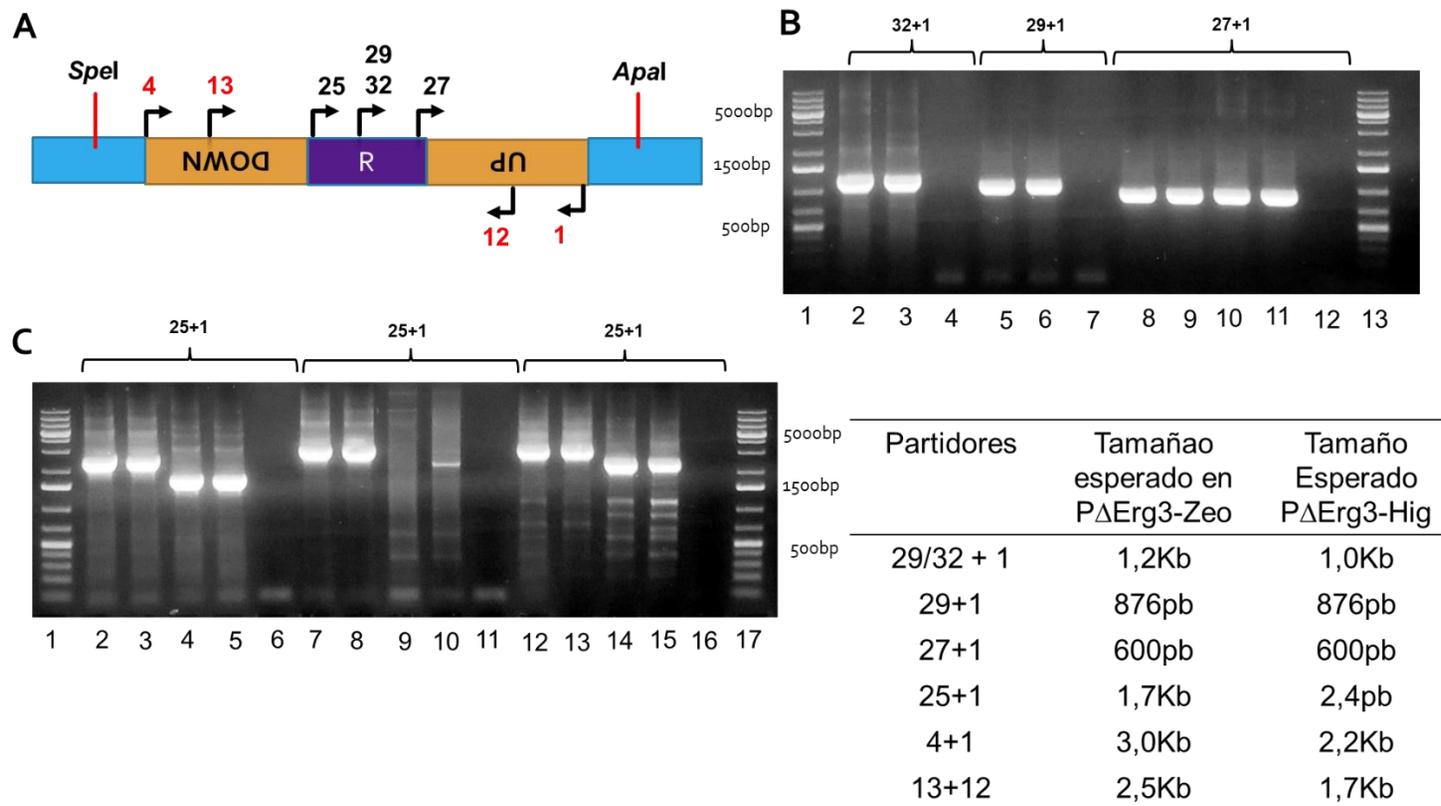


Figura 11. Obtención de los vectores pΔErg3-Hig y pΔErg3-Zeo. (A) Representación de la fracción del vector pΔErg3 con el inserto incorporado. Las regiones río arriba (Up) y río abajo (Down) del gen *ERG3* se representan en color amarillo, el vector pBluescript II SK- (pBS) en celeste y el módulo de resistencia (R), ya sea para zeocina o higromicina B, en morado. Las flechas negras representan los partidores utilizados para analizar el vector junto con su numeración de acuerdo con la tabla 3; el partidor 29 se utilizó para el análisis de la resistencia a higromicina B, mientras que el 32 para Zeocina. En color rojo se indican los sitios de restricción para la posterior liberación del ADN transformante del vector con las enzimas *SpeI* y *ApaI*. (B) Análisis por PCR de la inserción de las resistencias. En la parte superior del gel se describen los partidores utilizados, los carriles 1 y 13 corresponden al marcador de peso molecular 1Kb Plus, los carriles 2, 10 corresponden a la colonia 1 desde donde se obtuvo el vector pΔErg3-Zeo. Los carriles 3 y 11 a la colonia 2 también del que contienen el vector pΔErg3-Zeo, mientras que los carriles 5 y 8 a la colonia 1 desde donde se obtuvo pΔErg3-Hig, y el carril 6 y 9 a la colonia 2. Los carriles 4, 7 y 12 corresponden a los controles negativos de cada una de las reacciones de PCR. (C) Continuación del análisis por PCR de inserción de resistencia. Los carriles 2, 7 y 12 corresponde a colonia 1 y los carriles 3, 8 y 13 a la colonia 2 desde donde se obtuvo el pΔErg3-Hig. Los carriles 4, 9 y 14 a la colonia 1 de pΔErg3-Zeo, mientras que carriles 5, 10 y 15 a la colonia 2. Los carriles 6, 11 y 16 corresponden a los controles negativos de cada una de las reacciones de PCR. A la derecha se encuentra la tabla con los tamaños esperados para cada una de las reacciones de ambos plásmidos.

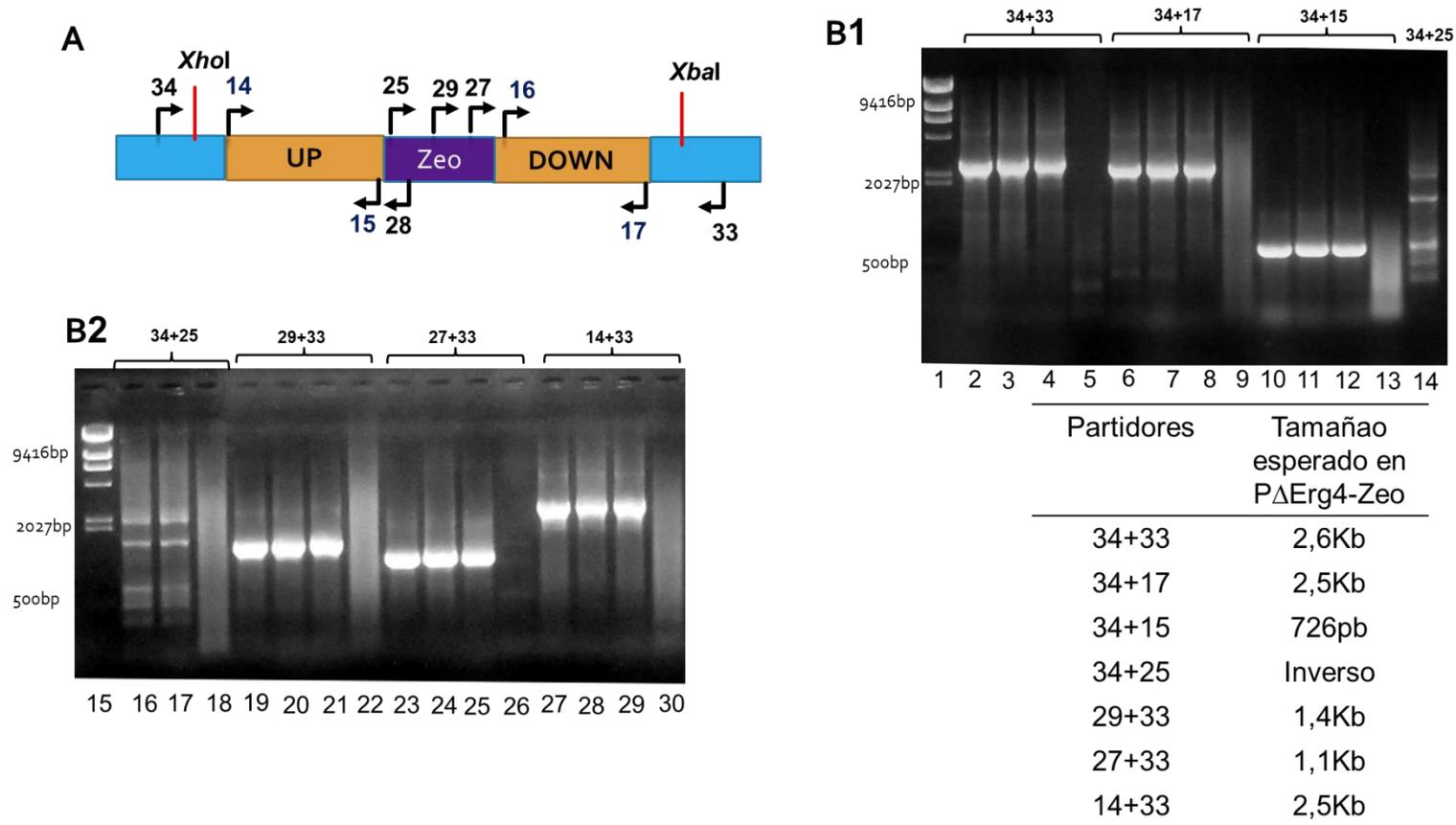


Figura 12. Obtención del vector pΔErg4-Zeo. Representación de la fracción del vector pΔErg4 con el inserto incorporado. (A) Representación del vector pΔErg4-Zeo. Las regiones río arriba (Up) y río abajo (Down) del gen *ERG4* se representan en color amarillo, el vector pBluescript II SK- (pBS) en celeste y el módulo de resistencia para zeocina (Zeo) en morado. Las flechas negras representan los partidores utilizados para analizar el vector junto con su numeración de acuerdo con la tabla 3. En color rojo se indican los sitios de restricción para la posterior liberación del ADN transformante del vector con las enzimas *XhoI* y *XbaI* (B) Análisis de la inserción de las resistencias. En la parte superior del gel, se indican los partidores utilizados, el carril 1 corresponde al marcador de peso molecular Lambda ADN/*HindIII*, los carriles 2, 6, 10, 14, 19, 23 y 27 corresponden a la colonia 1, los carriles 3, 7, 11, 15, 20, 24 y 28 a la colonia 2 y los carriles 4, 8, 12, 16, 21, 25 y 29 a la colonia 3 desde donde se obtuvo el vector pΔErg4-Zeo. Los carriles 5, 9, 13, 17, 22, 26 y 30, corresponden a los controles negativos de cada una de las reacciones de PCR. A la derecha de la figura, se incluye una tabla con los tamaños esperados para cada una de las reacciones de PCR.

2.2 Transformación de *X. dendrorhous*

Una vez obtenidos los plásmidos con las regiones “up” y río abajo de ambos genes más los módulos de resistencia para la transformación de *X. dendrorhous*, se procedió con la transformación la cepa CBS-6938 (silvestre) para reemplazar el respectivo gen por el módulo de resistencia a antibiótico mediante la recombinación homóloga a través de las zonas río arriba y río abajo de cada gen. Para el caso de los transformantes mutantes del gen *ERG3*, no se logró obtener cepas resistentes para Zeocina, pero si para Higromicina B (3 colonias transformantes) (Figura 13). Para el gen *ERG4*, se obtuvo 4 colonias resistentes a Zeocina (Figura 14). Las mutantes obtenidas fueron denominadas CBS-6938 Δ *erg3* y CBS-6938 Δ *erg4*. El detalle del análisis de las cepas obtenidas y de sus parentales se muestra en la Figura 13 y 14, donde se observa que las cepas CBS-6938 Δ *erg3* y CBS-6938 Δ *erg4* obtenidas desde CBS-6938 no presentan los genes correspondientes, los que fueron reemplazados por el módulo de resistencia, ya sea Higromicina B para el gen *ERG3* o Zeocina para el gen *ERG4*.

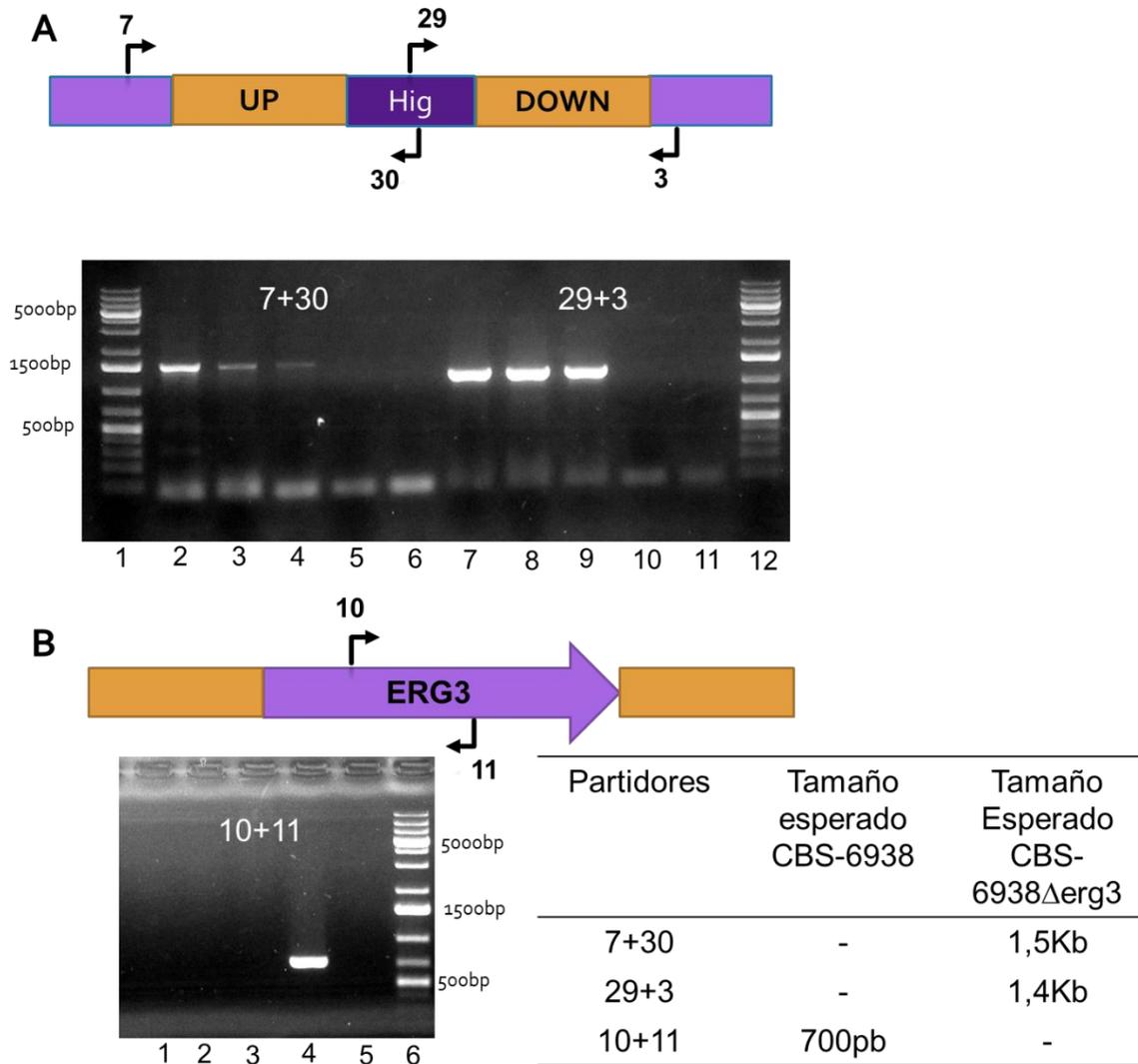


Figura 13. Verificación de la mutación del gen *ERG3* reemplazado por el módulo de resistencia a Higromicina B en *X. dendrorhous*. (A) Esquema que representa un fragmento del genoma de *X. dendrorhous* donde se reemplazó el gen *ERG3* por el módulo de resistencia a Higromicina B. En la parte superior con flechas negras se indican los partidores utilizados para la revisión de las posibles cepas mutantes. En la figura inferior se esquematiza al locus *ERG3* para verificar su presencia en las 3 colonias obtenidas posibles mutantes CBS-6938Δerg3. Los carriles 1 y 12 corresponden al marcador de peso molecular 1Kb Plus. Los carriles 2, 3, 4, 7, 8 y 9 corresponden al análisis de las 3 cepas obtenidas, los carriles 5 y 10 corresponden a la cepa parental CBS-6938, mientras que los carriles 6 y 11, a los controles negativos de cada una de las reacciones de PCR. La pareja de partidores 7+30 se utilizó en el análisis mostrado en los carriles 2 a 6, mientras que la pareja 29+3 en el análisis mostrado en los carriles 7 a 11. (B) El esquema representa el mismo fragmento del genoma en A, pero incluye al gen *ERG3* sin ser reemplazado por el módulo de resistencia, las flechas negras representan los partidores utilizados para la evaluación. El carril 6 de la figura inferior corresponde al marcador de peso molecular 1Kb Plus, los carriles 1, 2 y 3 corresponden a las 3 cepas CBS-6938Δerg3, mientras que el carril 4 a la cepa parental y finalmente, el carril 5 al control negativo de la reacción de PCR. Los tamaños esperados de los productos de PCR en ambos geles, se encuentran en la Tabla.

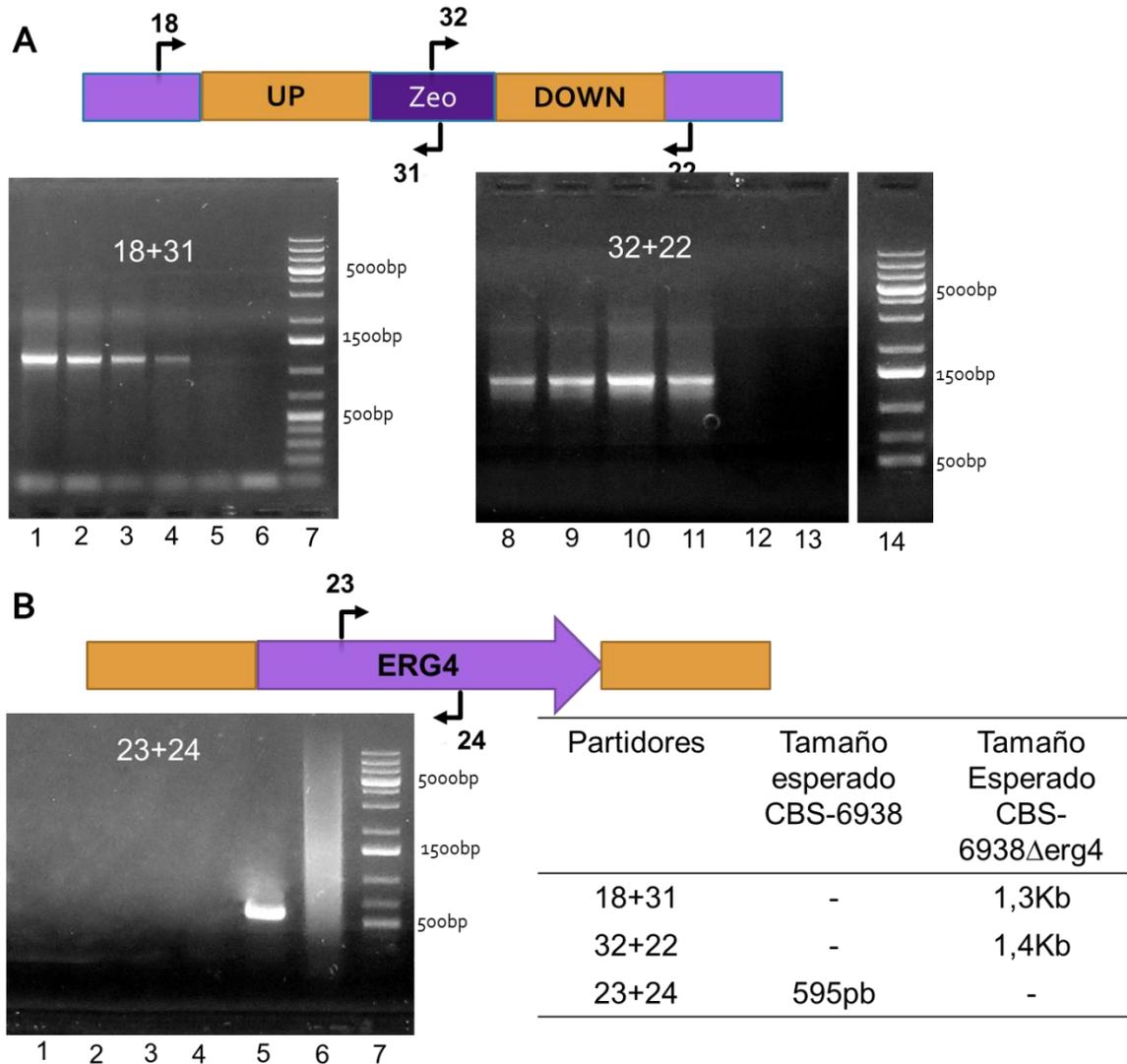


Figura 14 Verificación de la mutación del gen *ERG4* reemplazado por el módulo de resistencia a Zeocina en *X. dendrorhous*. (A) Esquema que representa un fragmento del genoma de *X. dendrorhous* donde se reemplazó el gen *ERG4* por el módulo de resistencia a Zeocina. En la parte superior con flechas negras se indican los partidores utilizados para la revisión de las posibles cepas mutantes. En la figura inferior se esquematiza el locus de *ERG4* para verificar su presencia en las 4 colonias obtenidas posibles mutantes CBS-6938Δ*erg4*. Los carriles 7 y 14 corresponden al marcador de peso molecular 1Kb Plus. Los carriles 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10 y 11 corresponden a las distintas cepas obtenidas, los carriles 5 y 12 corresponden a la cepa parental CBS-6938, mientras que los carriles 6 y 13 a los controles negativos de cada una de las reacciones de PCR. La pareja de partidores 18+31 se utilizó en el análisis mostrado en los carriles 1 a 6, mientras que la pareja 32+33 en el análisis mostrado en los carriles 7 a 13. (B) El esquema representa el mismo fragmento del genoma en A, pero incluye al gen *ERG4* sin ser reemplazado por el módulo de resistencia, las flechas en negras representan los partidores utilizados para la revisión. El carril 7 de la figura inferior corresponde al marcador de peso molecular 1Kb Plus, los carriles 1, 2, 3 y 4 corresponden a las cepas CBS-6938Δ*erg3*, mientras que el carril 5 a la cepa parental y finalmente, el carril 6 al control negativo de la reacción de PCR. Los tamaños esperados de los productos de PCR en ambos gels se encuentran en la Tabla.

3. Caracterización fenotípica de las cepas mutantes CBS-6938 Δ erg3 y CBS-6938 Δ erg4 de *X. dendrorhous*

Una vez obtenidos ambos mutantes, se evaluó el efecto de la delección de cada uno de los genes respecto a la cepa parental y a la cepa CBS-6938*cyp61*-. Para ello, se realizaron diferentes ensayos. En primera instancia, se evaluó la pigmentación de las colonias cultivadas en medio YM semi-sólido; también se realizaron curvas de crecimiento desde las cuales se tomó una muestra para determinar la cantidad y composición de carotenoides y esteroides producidos por cada una de las cepas. Finalmente, se evaluó el crecimiento de la cepa parental y las cepas mutantes obtenidas en este trabajo, además de la cepa CBS-6938*cyp61*- en presencia de azoles.

3.1. Fenotipo de las cepas en estudio

Una vez obtenidas las cepas mutantes, se evaluó si la delección de los genes *ERG3* y *ERG4* producían un cambio aparente en la pigmentación de estas cepas, para ello se sembraron las cepas de estudio CBS-6938, CBS-6938*cyp61*-, CBS-6938 Δ erg3, CBS-6938 Δ erg4 en medio YM semi-sólido (Figura 15). En la cepa mutante CBS-6938 Δ erg4, se observó una pigmentación levemente más clara y aspecto más brillante que la cepa parental, mientras que en la cepa CBS-6938 Δ erg3, sólo se observó un aspecto más brillante que la parental. Sin embargo, ninguna de las cepas mutantes obtenidas en este trabajo presentó un fenotipo similar a la cepa CBS-6938*cyp61*-, que sobreproduce carotenoides y no produce ergosterol, como era esperado.

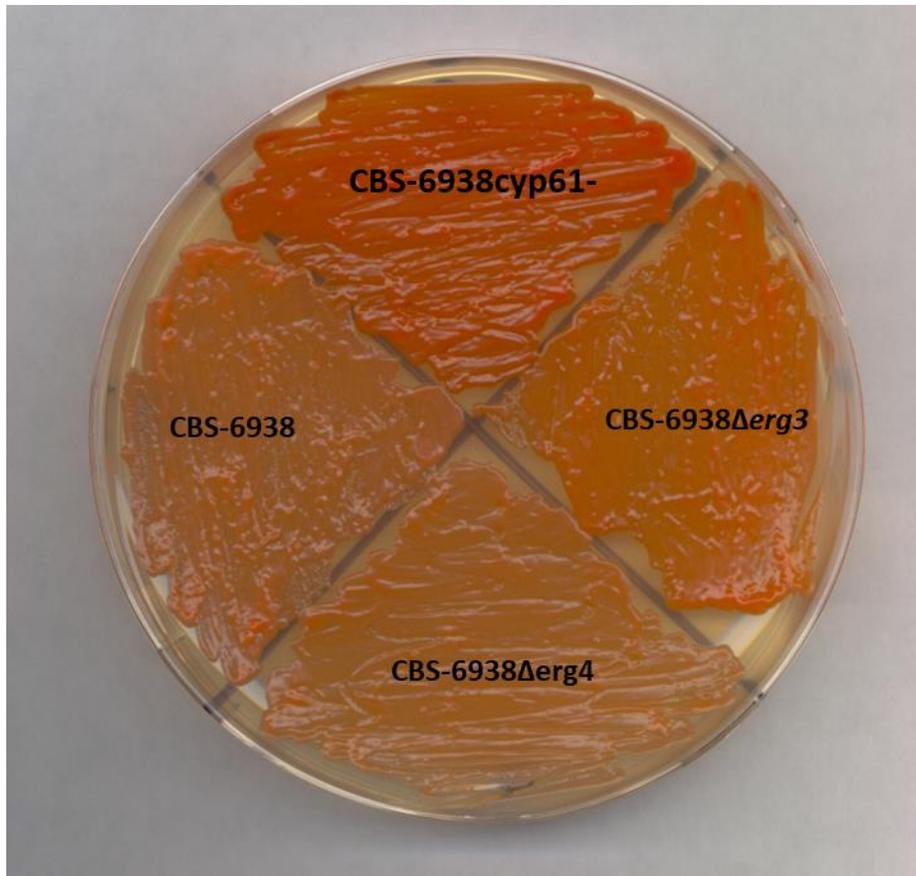


Figura 15. Comparación fenotípica entre las cepas de *X. dendrorhous* parental y mutantes $\Delta erg3$, $\Delta erg4$ y *cyp61*-. Cepas CBS-6938 (parental), CBS-6938 $\Delta erg3$, CBS-6938 $\Delta erg4$ y CBS-6938*cyp61*- sembradas en placa con medio YM semi-sólido incubadas a 22°C por 4 días.

Luego, para evaluar si la delección de los genes *ERG3* y *ERG4* afecta el crecimiento de la levadura, se realizaron curvas de crecimiento incluyendo a las cepas: CBS-6938, CBS-6938*cyp61*-, CBS-6938 $\Delta erg3$ y CBS-6938 $\Delta erg4$, cultivadas simultáneamente y en triplicados (Figura 16). A partir de los valores de la D.O a 600 nm en la fase exponencial de cada una de las cepas se calcularon las tasas de crecimiento y tiempo generacional de éstas para que pudiesen ser comparadas, cálculos que corresponden a una aproximación puesto que para el análisis se sugiere el dato de al menos 10 puntos en fase exponencial (Zwietering y col., 1990). Sólo se observó diferencias estadísticamente significativas en las curvas de crecimiento de la cepa CBS-6938 $\Delta erg4$ con respecto a su parental desde las 48 horas (p -valor $<0,05$) en cuanto a la tasa de crecimiento y el tiempo generacional.

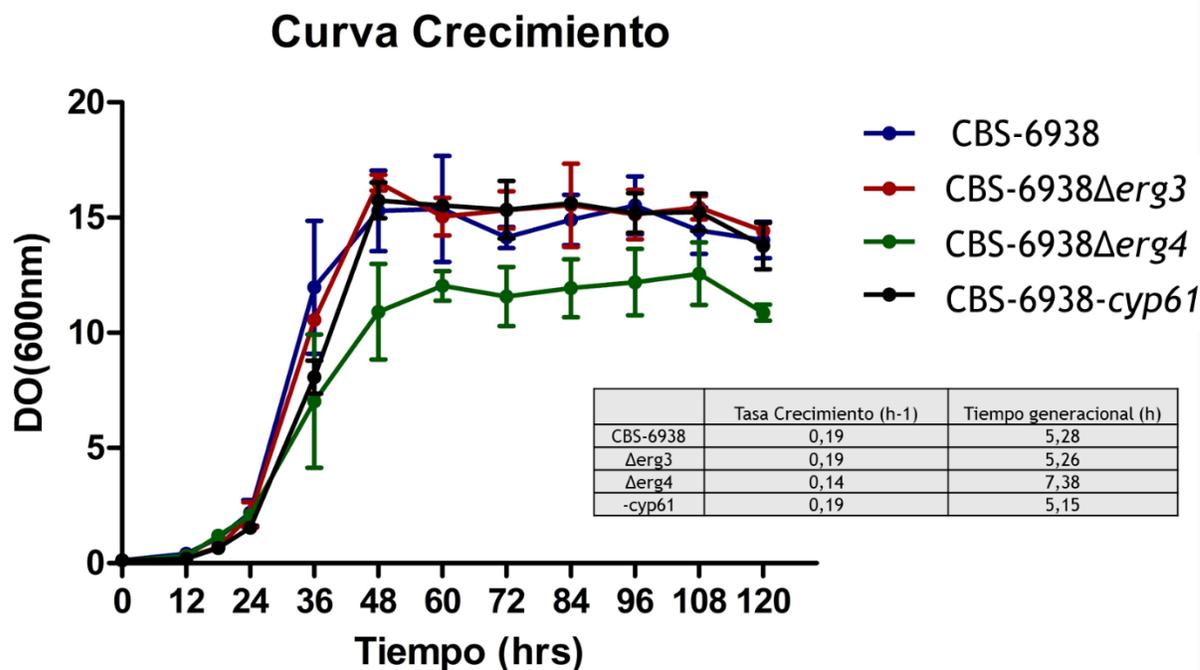


Figura 16. Curvas de crecimiento de las cepas CBS-6938, CBS-6938Δerg3, CBS-6938Δerg4 y CBS-6938cyp61-. Todas las cepas se cultivaron a 22°C en medio YM con agitación constante por triplicado a 22°C, midiendo la D.O. del cultivo a 600 nm a ciertos tiempos para la confección de la curva. Se tomó una muestra a las 120 h de cultivo, en la fase estacionaria, para análisis posterior de carotenoides, esteroides y niveles de transcritos. La tasa de crecimiento y tiempo generacional se calcularon a partir de la DO, con los gráficos auxiliares del trabajo de Zwietering (Zwietering y col., 1990).

3.2. Análisis de cantidad y composición de carotenoides y esteroides

Para continuar con la caracterización de las cepas, luego de 120 h de cultivo (en fase estacionaria de crecimiento estandarizado), se tomaron muestras para extraer carotenoides y esteroides de cada triplicado de las 4 cepas en estudio desde las curvas de crecimiento realizadas previamente. Se determinó la cantidad total producida tanto de carotenoides como de esteroides (Figura 17) y al comparar las mutantes con la cepa parental, se observó una diferencia estadísticamente significativa en la cantidad total de esteroides producidos por las cepas mutantes CBS-6938Δerg3 y CBS-6938Δerg4 con respecto su parental CBS-6938 y una mayor diferencia entre la cepa CBS-6938cyp61- con respecto a su parental CBS-6938 (Figura 17A). Por otra parte, en la cantidad de carotenoides totales, sólo se observó diferencias en la cepa CBS-6938cyp61- respecto a

las demás cepas (Figura 17B). También, se determinó la composición de carotenoides (Tabla 4) y esteroides (Tabla 5) por RP-HPLC. En cuanto a la composición de carotenoides no se observaron diferencias significativas en la producción de astaxantina para las cepas que presentan una delección en el gen *ERG3* y *ERG4* pero sí para la cepa mutante del gen *CYP61* usada como control. También se observó una disminución significativa en la acumulación de beta caroteno, y un aumento significativo en otros carotenoides para el caso de la cepa CBS-6938 Δ *erg4* y toruleno para el caso de la cepa CBS-6938 Δ *erg3* (Tabla 4). Por otro lado, en la composición de esteroides ni la cepa CBS-6938 Δ *erg3*, ni CBS-6938 Δ *erg4* acumularon ergosterol, sino que más bien se acumularon otros esteroides (Tabla 5). Los esteroides se clasificaron como esteroides en base al tiempo de retención y se representan como picos en el cromatograma (Figura 18). Se definieron como esteroides no identificados porque presentan diferentes tiempos de retención y espectros con respecto al ergosterol (Figura 18, Tabla 5).

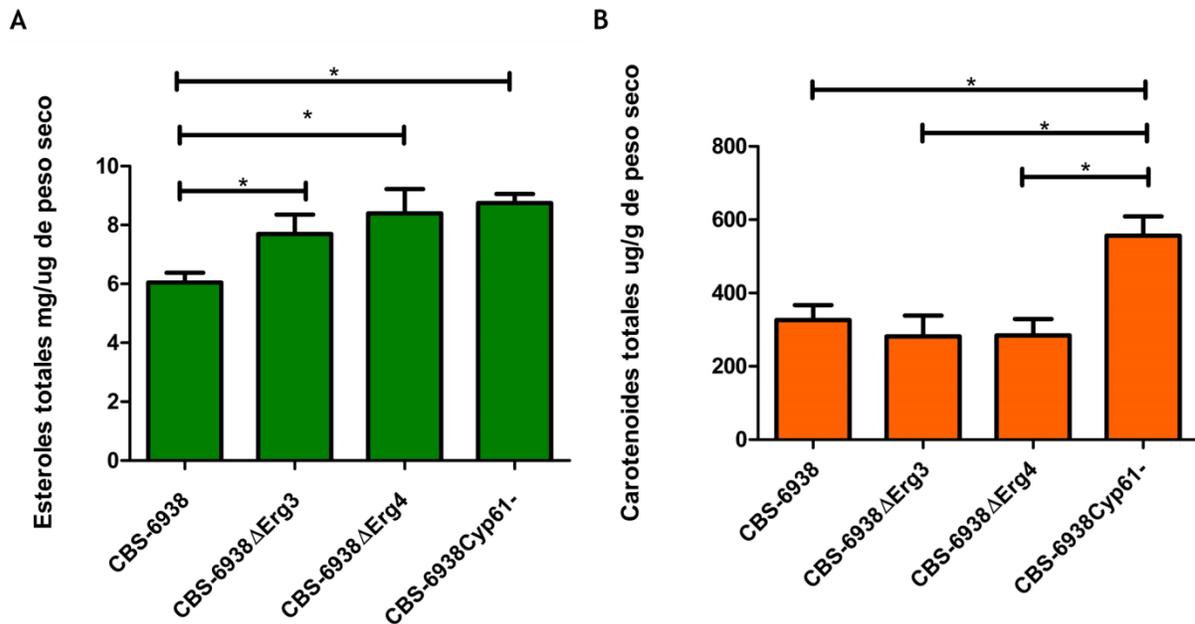


Figura 17. Análisis de carotenoides y esteroides totales producidos por las cepas CBS-6938, CBS-6938ΔErg3, CBS-6938ΔErg4 y CBS-6938cyp61-. Las extracciones de ambos tipos de metabolitos se realizaron a partir de cultivos en fase estacionaria (120 h de cultivo). Se determinó la cantidad de (A) carotenoides (medidos a 474 nm) y de (B) esteroides (medidos a 282 nm). Los gráficos se construyeron considerando el valor promedio de 3 réplicas biológicas, excepto para la cepa CBS-6938ΔErg3 que posee 2 réplicas biológicas y las barras de error corresponden a la desviación estándar. Los datos se normalizaron respecto al peso seco de levadura. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba t-Student (p -valor < 0.05) comprando cada cepa respecto a la parental.

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

	CBS-6938	CBS-6938ΔErg3	CBS-6938ΔErg4	CBS-6938cyp61-
Astaxantina	70,0 ± 2,0	71,6 ± 0,7	69,7 ± 2,1	76,0 ± 2,4*
Fenicoxantina	10,1 ± 1,9	8,6 ± 0,3	13,1 ± 0,6*	13,3 ± 0,6*
Beta-Caroteno	7,8 ± 1,4	3,9 ± 0,7*	3,9 ± 0,5*	3,3 ± 0,2*
OH-equinenona	8,8 ± 1,1	6,8 ± 0,8	3,1 ± 0,1**	2,4 ± 0,4**
OH-k-toruleno	3,2 ± 0,2	4,6 ± 0,4*	3,3 ± 0,4	5,1 ± 0,7*
Cantaxantina	4,5 ± 1,0	2,4 ± 0,5*	1,7 ± 0,4*	1,3 ± 0,4*
Equinona	1,4 ± 0,4	1,1 ± 0,1	1,4 ± 0,1	2,0 ± 0,8
Fitoneo	ND	ND	ND	ND
Otros carotenoides	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,1	5,6 ± 0,5**	1,3 ± 0,2
Porcentaje total	100	100	100	100

Se presenta el promedio ($n=3$, exceptuando la cepa CBS-6938ΔErg3 que fue $n=2$) del porcentaje ± desviación estándar de los cultivos. ND: no detectado. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba t-Student comparando cada mutante con la cepa parental (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$). En la tabla se indican las diferencias significativas de las cepas mutantes respecto a la parental.

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

	CBS-6938	CBS-6938Δerg3	CBS-6938Δerg4	CBS-6938cyp61-
Ergosterol _{14min}	100 \pm 0,0	ND	ND	ND
Pico _{9min}	ND	100 \pm 0,0	ND	ND
Pico _{8min}	ND	ND	100 \pm 0,0	ND
Pico _{12min}	ND	ND	ND	25 \pm 1
Pico _{16min}	ND	ND	ND	75 \pm 4
Total	100	100	100	100

Se presenta el promedio (n=3, exceptuando la cepa CBS-6938 Δ erg3 que fue n=2) \pm desviación estándar de los cultivos. ND: no detectado y Pico_{9min}, Pico_{8min}, Pico_{12min}, Pico_{16min}, corresponden a esteroides no identificados.

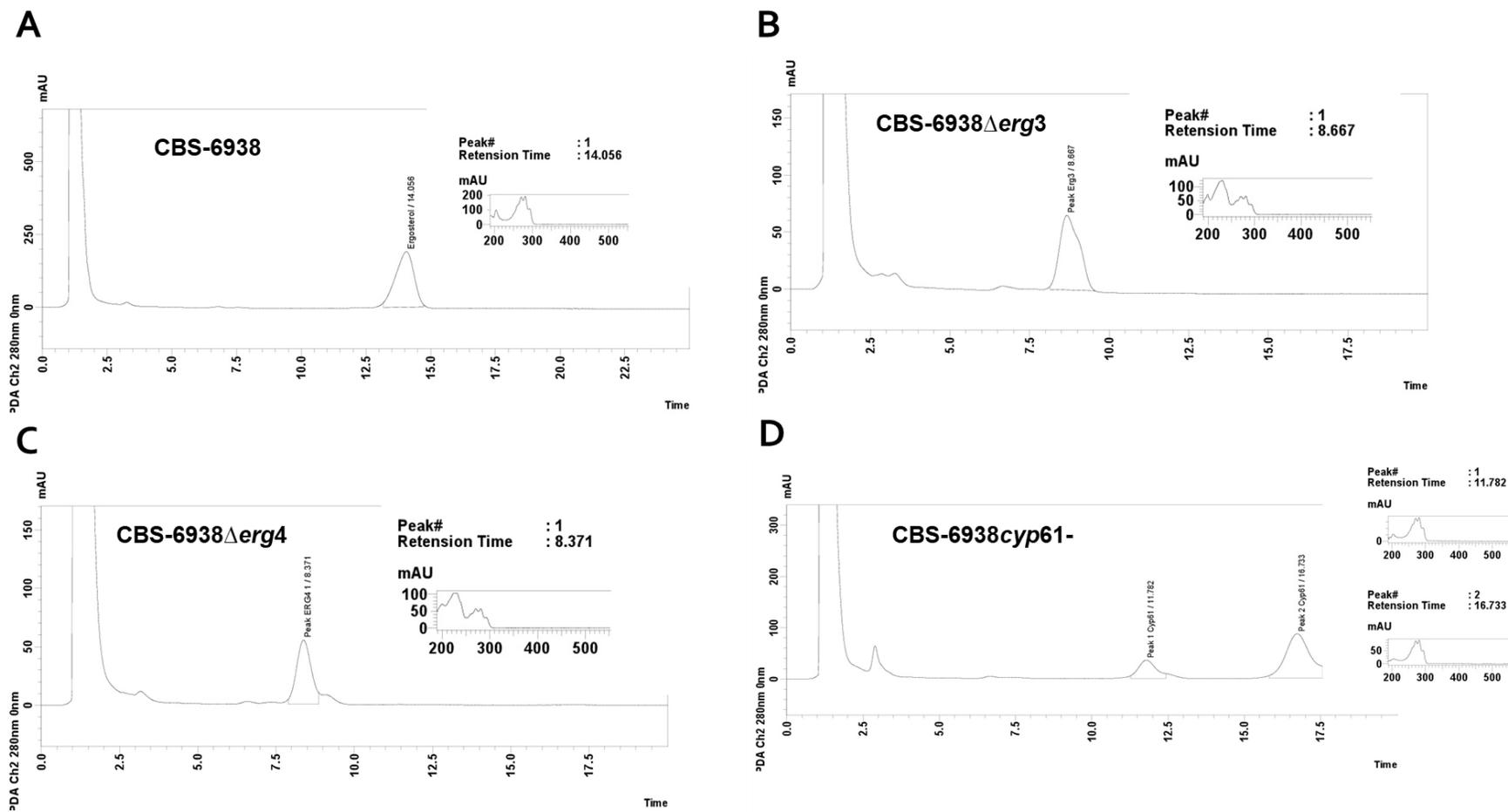


Figura 18. Cromatogramas de esteroides producidos por las cepas CBS-6938, CBS-6938 Δ erg3, CBS-6938 Δ erg4 y CBS-6938cyp61-. Luego de la extracción de esteroides estos fueron suspendidos en 200 μ l acetona y filtrados. Luego, las muestras fueron analizadas mediante RP-HPLC con Fase Móvil 97:3 Metanol Agua (1ml/min) y una columna C18 Fase reversa LiChroCART125 RP-18 (5 μ m). En cada una de las figuras se observan los cromatogramas y la derecha los espectros de los picos. En (A) se observa la cepa CBS-6938 (silvestre), en (B) CBS-6938 Δ erg3, en (C) CBS-6938 Δ erg4 y en (D) CBS-6938cyp61-.

3.3. Análisis del crecimiento en presencia de drogas antifúngicas.

Con el fin de caracterizar las cepas mutantes y observar si hay un efecto en la vía de síntesis de esteroides, se evaluó el crecimiento en presencia de azoles, drogas que inhiben la síntesis de ergosterol al unirse a la proteína Cyp51, entre los cuales se encuentran el itraconazol, fluconazol, ketoconazol y clotrimazol, entre otros (Parker y col., 2014) y anfotericina B droga que se une al ergosterol en la membrana favoreciendo la formación de poros afectando la viabilidad celular (Gray y col., 2012). Para evaluar si existe una diferencia en el crecimiento de las cepas en estudio en presencia de estas drogas antifúngicas con respecto a su cepa parental y la cepa CBS-6938*cyp61*⁻, se realizaron diluciones seriadas (1/10) de cultivos de las 4 cepas con la misma D.O. a 600 nm que fueron sembradas mediante microgotas de 5 µl en presencia de compuestos azólicos (ketoconazol: 0,1 µg/ml o Clotrimazol: 0,1 µg/ml) o anfotericina B (Figura 19). Se observó que tanto la cepa CBS-6938Δ*erg3* y CBS-6938Δ*erg4* eran más sensibles a azoles (Ketoconazol y Crotrimazol), al igual que el caso de la cepa CBS-6938*cyp61*⁻. Sin embargo no eran más resistentes a la anfotericina B.

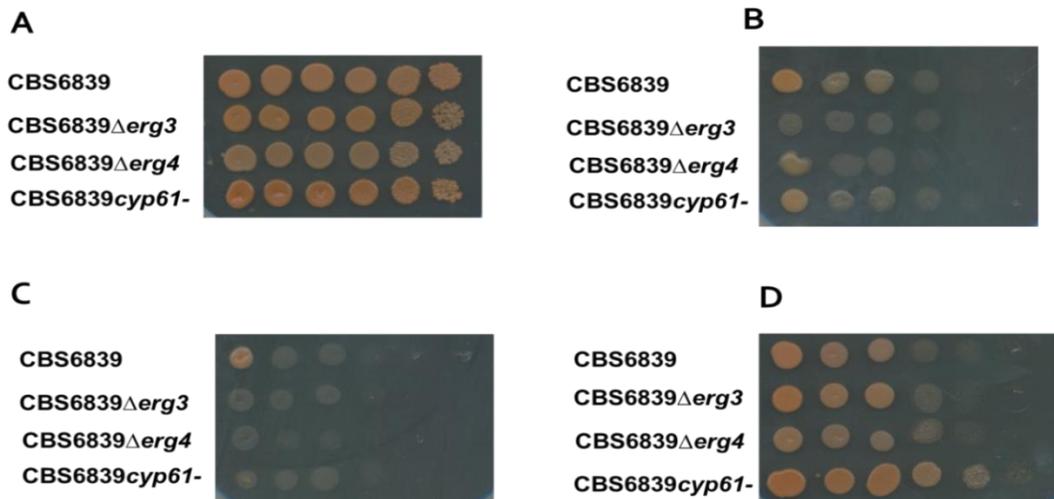


Figura 19. Ensayo de crecimiento en presencia de azoles o de anfotericina B. Diluciones seriadas de cultivos de las cepas indicadas en la figura fueron sembradas mediante la técnica de microgota en placas con medio (A) YM semi-sólido y el mismo medio suplementado con (B) clotrimazol (0,1 µg/ml), (C) ketoconazol (0,1 µg/ml), (D) Anfotericina B.

4.1 Análisis de expresión en las cepas mutantes y parentales

Para estudiar si la delección de los genes *ERG3* y *ERG4* afectó la expresión génica de genes de la vía de síntesis de carotenoides y/o de esteroides para evaluar si se encuentra o no activada la vía SREBP en los mutantes construidos en este trabajo, se estudió la expresión del gen *HMGS* (Figura 20 A), el cual codifica a la HMG-CoA sintasa que participa en la vía del mevalonato convirtiendo el Acetoacetyl Coa en HMG-CoA y se ha visto que la expresión a nivel de transcrito de este gen aumenta con la activación de la vía SREBP (González., 2016). También, se evaluó los niveles de transcritos de los genes *ERG3* y *ERG4* en la cepa CBS-6938*cyp61*- para evaluar si éstos pudieran estar regulados por la vía SREBP (Figura 20 B y C) y confirmar que no existen transcritos en las cepas mutantes para estos mismos genes. Los datos fueron normalizados respecto a los niveles de transcrito del gen de actina. Para su representación, los niveles encontrados fueron comparados en cada una de las cepas mutantes con respecto a la parental.

Se observó cambios significativos en los niveles de transcritos del gen *HMGS* para la cepa CBS-6938 Δ *erg4* considerando un p-valor < 0,05, mientras que para la cepa CBS-6938*cyp61*- este cambio fue estadísticamente significativo con un p-valor < 0,01. En la cepa mutante para el gen *ERG3* no se observaron cambios significativos para el transcrito del gen *HMGS*. Por otro lado, en la cepa CBS-6938*cyp61*- se observaron cambios significativos en los niveles de transcritos tanto del gen *ERG4* como del gen *ERG3*. Finalmente, efectivamente no se observaron niveles de transcrito de los genes mutados en sus respectivas cepas CBS-6938 Δ *erg3* y CBS-6938 Δ *erg4*.

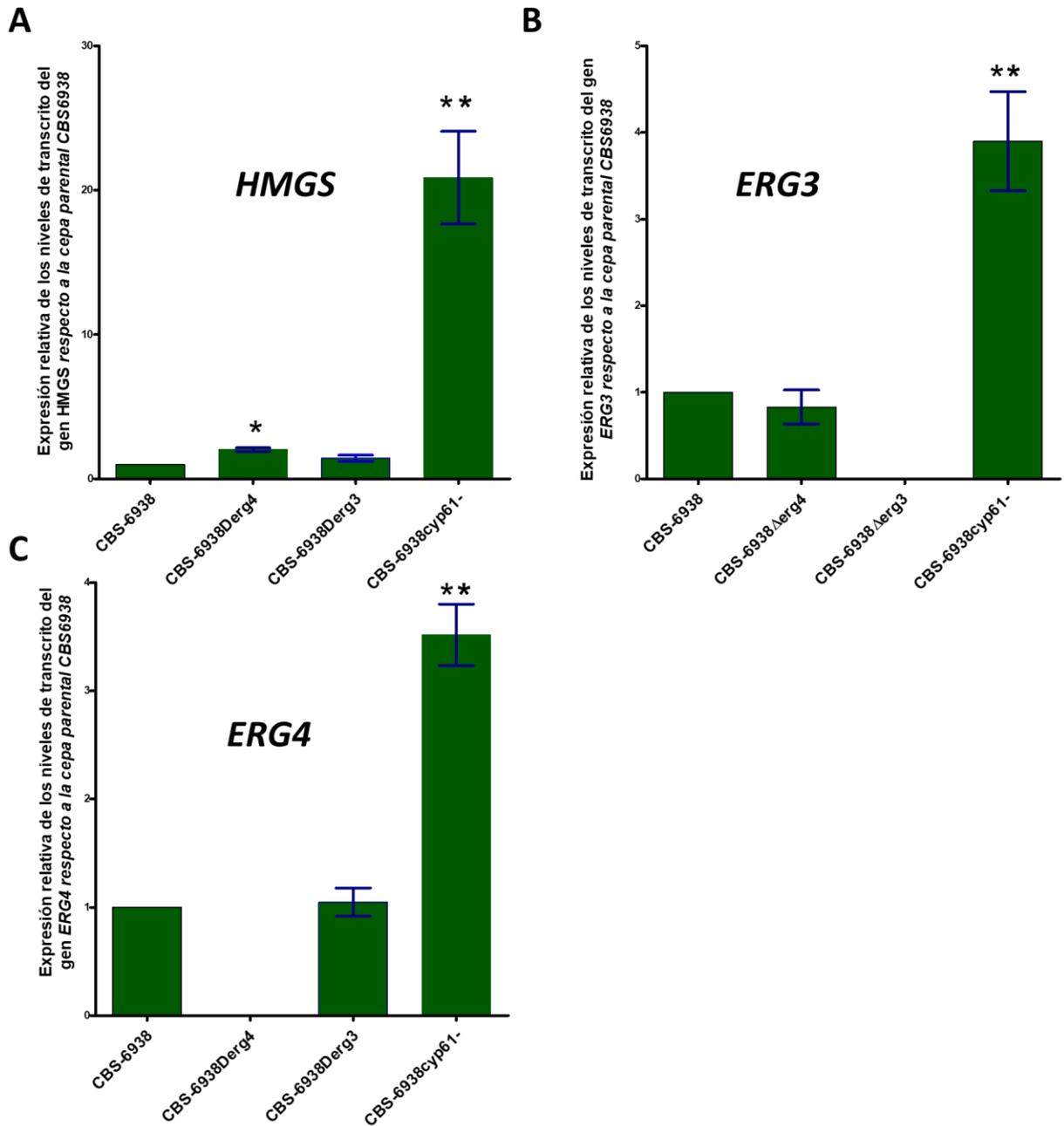


Figura 20. Análisis de los niveles de transcrito de los genes *HMGS*, *ERG3* y *ERG4* en las cepas mutantes y parentales. Se determinaron los niveles de transcrito de los genes *HMGS* (A), *ERG3* (B) y *ERG4*(C) mediante RT-qPCR luego de 120 h de cultivo y fueron normalizados por el gen *ACT*. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba t-Student (**: $p < 0.01$, *: $p < 0,05$).

DISCUSIÓN

En este seminario de título se estudiaron y caracterizaron los genes *ERG3* y *ERG4* de *X. dendrorhous*, como parte del estudio de la vía de regulación SREBP en esta levadura. La vía SREBP no ha sido descrita 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 probablemente sería activada por los niveles de ergosterol y oxígeno (Gutiérrez, 2016).

En primera instancia, los análisis bioinformáticos realizados en este trabajo permitieron analizar a nivel *in silico* ambos genes y las respectivas proteínas deducidas a partir de estas secuencias, tanto la proteína Erg3 como Erg4. Se observó que las secuencias promotoras, definidas como 1000 pb río arriba del inicio de la traducción de cada gen, presentarían sitios de regulación por la vía SREBP lo que podría explicar el aumento de los niveles de transcrito tanto de los genes *ERG3* y *ERG4* en la mutante CBS-6938*cyp61*-, donde la evidencia sugiere que la vía de regulación SREBP se encuentra activa. Con el fin de caracterizar las proteínas predichas a partir de la secuencia genómica de *ERG3* y *ERG4*, se construyó un modelo por homología, el cual solo fue posible para la proteína Erg4 debido a que solo en este caso se encontró una estructura cristalográfica en la base de datos PDB que cumpla los requisitos para el modelamiento de esta. El modelamiento tenía por objetivo establecer el sitio activo de la proteína y la interacción de la proteína Erg4 con su sustrato, lo cual no fue posible por falta de parámetros que permitan restringir esta interacción, como una cristalografía resuelta de una proteína Erg4 de algún otro organismo, y no como fue el caso de una esterol reductasa proveniente de bacteria. El modelo permitió identificar los dominios

alfa hélices de la proteína que van de la mano con la predicción de regiones de transmembrana, sugiriendo que estas regiones son responsables del anclaje de esta proteína en la membrana del retículo endoplasmático, según la predicción bioinformática y lo que se ha visto en *S. cerevisiae* (Dagmar y col., 2000). Por otro lado, para la proteína Erg3, si bien no fue posible la construcción del modelo, se obtuvieron resultados similares con las predicciones bioinformáticas tanto para su localización subcelular en el retículo, como la presencia de regiones de transmembrana sugiriendo de esta manera que en *X. dendrorhous* la biosíntesis de ergosterol finaliza en el retículo endoplasmático como se ha descrito en el mismo trabajo de caracterización de *ERG4* en *S. cerevisiae*. La caracterización de la biosíntesis de ergosterol, si bien presenta las ya conocidas aplicaciones para el desarrollo de antifúngicos que actúan sobre las enzimas de la biosíntesis de este metabolito, también presenta aplicaciones a nivel de microbiología industrial; por ejemplo, en el tráfico y producción de proteínas. En relación con esto, se observó que al someter a la levadura *Pichia pastoris* a condiciones de hipoxia o a tratamientos con compuestos azólicos, el tráfico de una proteína extracelular aumentó, sugiriendo que cuando la biosíntesis de ergosterol se ve afectada, se produce un aumento del tráfico vesicular dentro de la levadura (Baumann y Col., 2011).

La vía SREBP ha sido descrita recientemente en hongos como *S. pombe*, *C. neoformans* y *A. fumigatus*. Al igual que en mamíferos, SREBP es un activador transcripcional requerido para la homeostasis de esteroides en la célula. De esta manera, mutantes de delección del gen de SREBP o de genes de proteínas implicadas en el transporte y corte de ésta, son más sensibles a drogas que inhiben la síntesis de ergosterol (Carrillo-Muñoz y col., 2006). Estudios previos realizados en el laboratorio de

Genética, mostraron que la delección del gen *SRE1* en las cepas CBS-6938 y CBS-6938*cyp61*- produjo una disminución en los niveles de esteroides, y que en el caso de la cepa mutante CBS-6938*cyp61*- , la mutación de *SRE1* restauró el fenotipo de color de la cepa silvestre, apoyando así la hipótesis que en esta cepa el aumento en la producción de carotenoides y esteroides totales de esta cepa se debe a la activación de la vía de regulación SREBP (Gutiérrez, 2016).

Para evaluar la funcionalidad de los genes *ERG3* y *ERG4* de *X. dendrorhous*, se realizó la delección del gen en la cepa CBS-6938 (silvestre). Con el fin de evaluar si en estas cepas se encontraba activa la vía SREBP debido a la ausencia de ergosterol, se utilizó en cada experimento también a la cepa CBS-6938*cyp61*- (mutante que no produce ergosterol y sobre produce carotenoides), en la cual probablemente la vía de regulación de esteroides se encuentra activa.

Considerando que *Sre1* en *X. dendrorhous* podría regular la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de carotenoides y ergosterol, y además que esta ruta se encuentra activa en un momento que no es capaz de producir ergosterol, es que se planteó como hipótesis de esta tesis que Si el ergosterol regula negativamente los niveles de transcrito del gen *HMGR* de la vía del mevalonato, entonces los niveles de transcrito de dicho gen debiesen aumentar y favorecer la síntesis de carotenoides en diferentes mutantes que no producen ergosterol como sería el caso de las mutantes de los genes *ERG4* y *ERG3*.

Contrario a lo que se esperaba, la delección de los genes *ERG3* y *ERG4* produjo pequeños cambios fenotípicos no detectables a simple vista, en primer caso para la mutante del gen *ERG3* se observó un leve aumento en la pigmentación y el brillo de

esta cepa. Por otro lado, para la cepa mutante del gen *ERG4* no se observaron cambios a simple vista en la pigmentación, pero si en el brillo al ser comparadas con la cepa silvestre, lo cual pudiese estar relacionado con la producción de lípidos de la levadura, pero ninguna de las dos mutantes presentó el fenotipo esperado de la cepa CBS-6938*cyp61*-. En primera instancia, si bien no existía un cambio en la pigmentación similar al de la cepa mutante del gen *CYP61*, existía este leve cambio en el brillo de la célula lo que pudiese ser debido a un aumento en la producción de ácidos grasos de la levadura cuya síntesis también es regulada por la vía SREBP en mamíferos (Ye & DeBose-Boyd., 2011). Los principales ácidos grasos de *X. dendrorhous* corresponden al ácido palmítico, ácido linoleico y ácido oleico los cuales al igual que los carotenoides, poseen una amplia gama de aplicaciones, como la industria de detergentes, pinturas y alimenticia, por lo cual a futuro sería importante una mayor caracterización de la ruta de síntesis de estos ácidos grasos y como están siendo regulados.

Los primeros análisis de crecimiento en las cepas mutantes CBS-6938*cyp61*-, CBS-6938 Δ *erg3* y CBS-6938 Δ *erg4*, no mostraron cambios en el crecimiento, exceptuando la cepa CBS-6938 Δ *erg4* en la cual se observó una diferencia significativa en el crecimiento luego de 48 horas de cultivo, pero no es biológicamente significativo.

Luego, se realizaron análisis más detallados en los que se evaluó la cantidad de carotenoides totales, en los cuales tampoco evidenciaron cambios en las cepas mutantes CBS-6938 Δ *erg3* y CBS-6938 Δ *erg4* respecto a la cepa parental. Si bien se observó una diferencia estadísticamente significativa en la composición de esteroides entre las cepas mutantes y la parental, pudiendo ser una respuesta de “feedback” por la ausencia de ergosterol. La composición de esteroides también fue afectada en las

cepas mutantes, donde se evidenció la acumulación de dos esteroides no identificados los cuales poseen un tiempo de retención de aproximadamente de 9 min para la cepa CBS-6938 Δ erg3 y 8 min para la cepa CBS-6938 Δ erg4. Estos esteroides fueron co-inyectados tanto con ergosterol comercial o con la muestra de esteroides extraídos de la cepa CBS-6938cyp61-; en ninguno de los casos correspondían a los mismos esteroides (Cromatogramas no mostrados). Para el caso de la cepa que presenta la delección del gen *ERG3*, se espera que se acumule el intermediario episterol dado que es el sustrato de la enzima codificada por este gen en la levadura *S. cerevisiae* (Dagmar y col., 2000). De la misma forma, se espera que en la cepa que presenta la delección del gen *ERG4* se acumule el intermediario 5,7,24,28 ergostatetraenol; sin embargo, también es posible que el esteroide acumulado en ambos casos, sea un esteroide modificado a partir de los esteroides mencionados anteriormente, como se observó en el caso de la mutante cyp61- donde no necesariamente se acumuló el sustrato de Erg5, si no que los esteroides acumulados fueron identificados como ergosta-5,8-dien-3-ol y ergosta-5,8,22-trien-3-ol (Loto I. y col., 2012). Estos esteroides se acumulan en otros hongos siendo el primer intermediario observado en la mutante de *erg6* en *C. neoformans* (Nes y col., 2009) y el segundo intermediario en cepas que no producen ergosterol y son resistentes a fungicidas polienos (Kanafani & Perfect., 2008) también de *C. neoformans*. Por otra parte, en la cepa CBS-6938cyp61- se observó un aumento significativo en la cantidad total de carotenoides y ergosterol, y un aumento en la composición de la astaxantina que va de la mano con una disminución del beta-caroteno (Gutiérrez, 2016).

Con el fin de observar si es que había un efecto en la ruta de síntesis de ergosterol en los mutantes construidos en este trabajo, se evaluó el crecimiento de ellos en

presencia de agentes antifúngicos como azoles los cuales se unen a la proteína Cyp51 inhibiendo la síntesis de ergosterol afectando a la membrana celular (Parker y col., 2014). En este caso, se evaluó el crecimiento de las cepas CBS-6938, CBS-6938*cyp61*-, CBS-6938 Δ *erg3* y CBS-6938 Δ *erg4* en presencia de los azoles ketoconazol o clotrimazol; el crecimiento también se evaluó en presencia de anfotericina B (antifúngico poliénico que se une al ergosterol). Tanto las cepas CBS-6938 Δ *erg3* y CBS-6938 Δ *erg4*, mostraron una mayor sensibilidad a clotrimazol y a ketoconazol, pero no mostraron diferencias respecto a la sensibilidad a anfotericina B a diferencia de la cepa CBS-6938*cyp61*-. Lo anterior puede explicarse si el intermediario acumulado por ambas mutantes también pudiese tener afinidad por la anfotericina B como el ergosterol, como fue el caso de la mutante *erg4* en *S. cerevisiae* (Dagmar y col., 2000).

Análisis finales en los cuales se evaluaron mediante RT-qPCR los niveles de transcrito de los genes *HMGS* (blanco regulado por Sre1 en *X. dendrorhous*), *ERG3* y *ERG4*, revelaron en primera instancia que no existían transcritos tanto del gen *ERG3* en la cepa CBS-6938 Δ *erg3*, como del gen *ERG4* en la cepa CBS-6938 Δ *erg4* corroborando la correcta obtención de las cepas mutantes. Por otro lado, si bien los niveles de transcrito del gen *HMGS* mostraron un aumento estadísticamente significativo en la cepa que presenta delección el gen *ERG4* y no presentó en la cepa que presenta delección del gen *ERG3*, a diferencia de lo observado en la cepa CBS-6938*cyp61*- con un aumento de 20 veces. Por otra parte, los niveles de transcritos de los genes *ERG3* y *ERG4*, también aumentaron significativamente en la cepa CBS6938-*cyp61*-, lo que confirma estudios anteriores (González, 2016), sugiriendo que ambos genes serían regulados por la vía SREBP. Estos resultados sugieren que la vía SREBP no estaría

activada en los mutantes CBS-6938 Δ *erg3* y CBS-6938 Δ *erg4*, a diferencia del mutante CBS6938-*cyp61*-.

El conjunto de resultados obtenidos en este seminario de título permite concluir que: como se esperaba las cepas CBS-6938 Δ *erg3* y CBS-6938 Δ *erg4* no producen ergosterol y presentan un aumento en la acumulación de esteroides totales que podrían corresponder a intermediarios o modificaciones de estos. Por lo tanto, contrario a la hipótesis planteada en este seminario de título, los resultados obtenidos sugieren que la activación de la vía SREBP no estaría ocurriendo por la ausencia de ergosterol, sino más bien por la acumulación de algún o algunos intermediarios de la biosíntesis de ergosterol. En este sentido, en la levadura *S. pombe*, modelo fúngico donde existen más antecedentes respecto a la vía SREBP, la activación de Sre1 estaría regulada por los niveles de los metil esteroides 24-metileno lanosterol y 4,4-dimetil fecosterol bajo condiciones de bajo oxígeno y de estrés celular. Tanto los aumentos como las disminuciones en el nivel de estos intermedios de la ruta del ergosterol, es decir, cambios en su proporción, inducen la proteólisis de Sre1 de una manera dependiente de Scp1. El ortólogo de SREBP en el hongo patógeno *C. neoformans* también se activa con cambios en los niveles de metil esteroides, lo que sugiere que los niveles en metil esteroides son la señal para la activación de SREBP se conserva en eucariotas unicelulares (Hughes y col, 2007). Por lo que es esencial a continuación de este seminario de título identificar los intermediarios acumulados en las mutantes CBS-6938 Δ *erg3* y CBS-6938 Δ *erg4* y estos que sean comparados con los de la cepa CBS6938-*cyp61*-.

CONCLUSIONES

- La delección del gen *ERG4* de *X. dendrorhous* no provoca cambios significativos en los niveles de carotenoides, pero si en los esteroides totales y nivel de transcrito del gen *HMG5* (un gen blanco de la vía SREBP). Mientras que la delección del gen *ERG3* solo provoca cambios significativos en los niveles de esteroides.
- Si bien las herramientas bioinformáticas son predicciones, éstas resultaron ser útiles en la predicción de elementos SRE, ya que se confirmó cambios en los niveles de transcritos de los genes *ERG4* y *ERG4* en la cepa CBS-6938*cyp61*- donde la vía SREBP estaría activada.
- Con los resultados obtenidos es posible sugerir que la activación de vía de regulación de esteroides SREBP en *X. dendrorhous* no se produce por la ausencia de ergosterol, si no que pudiese estar siendo activada por la acumulación de algún o algunos intermediarios en particular de la ruta de síntesis de ergosterol.

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.G.
- An, G.H., Schuman, D.B. y Johnson, E. A. 1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* with increased astaxanthin content. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 116-124.
- Armstrong, G. A. 1994. Eubacteria show their true colors: genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants. *Journal of Bacteriology* **176**: 4795-4802.
- Baumann, K., Dato, L., Graf, A. B., Frascotti, G., Dragosits, M., Porro, D. & Branduardi, P. 2011. The impact of oxygen on the transcriptome of recombinant *S. cerevisiae* and *P. pastoris*-a comparative analysis. *BMC genomics*, **12**: 218.
- 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.
- Carrillo-Munoz, A. J., Giusiano, G., Ezkurra, P. A., & Quindós, G. 2006. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioter*, **19**: 130-9.
- Chang, W. C., Song, H., Liu, H. W., & Liu, P. 2013. Current development in isoprenoid precursor biosynthesis and regulation. *Current opinion in chemical biology*, **17**: 571-579.

Dagmar, Z., Claudia, H., Sepp, D.K. & Günther, D. 2000. Biochemical characterization and subcellular localization of the sterol C-24(28) reductase, Erg4p, from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Letters, **470**: 83-87.

Degtyarenko, K. N., y Archakov, A. I. 1993. Molecular evolution of P450 superfamily and P450-containing monooxygenase systems. FEBS letters **332**: 1-8.

Espenshade, P. J. 2006. SREBPs: sterol-regulated transcription factors. Journal of Cell Science **119**: 973-976.

Geber, A., Hitchcock, C. A., Swartz, J. E., Pullen, F. S., Marsden, K. E., Kwon-Chung, K. J., & Bennett, J. E. 1995. Deletion of the *Candida glabrata* ERG3 and ERG11 genes: effect on cell viability, cell growth, sterol composition, and antifungal susceptibility. Antimicrobial agents and chemotherapy, **39**: 2708-2717.

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.

Gray, K. C., Palacios, D. S., Dailey, I., Endo, M. M., Uno, B. E., Wilcock, B. C., & Burke, M. D. 2012. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. Proceedings of the National Academy of Sciences, **109**: 2234-2239.

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.

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, A. L., Lee, C. Y. S., Bien, C. M., & Espenshade, P. J. 2007. 4-Methyl sterols regulate fission yeast SREBP-Scap under low oxygen and cell stress. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 24388-24396.
- Kanafani, Z. A., & Perfect, J. R. 2008. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clinical Infectious Diseases*, **46**: 120-128.
- 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.
- Mata-Gómez, L. C., Montañez, J. C., Méndez-Zavala, A., & Aguilar, C. N. 2014. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial cell factories*, **13**: 12.
- Mathelier, A., Zhao, X., Zhang, A. W., Parcy, F., Worsley-Hunt, R., Arenillas, D. J. & Lim, J. 2013. JASPAR 2014: an extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic acids research*, **42**: D142-D147
- 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.
- Nes, W. D., Zhou, W., Ganapathy, K., Liu, J., Vatsyayan, R., Chamala, S. & Miranda, M. 2009. Sterol 24-C-methyltransferase: an enzymatic target for the disruption of ergosterol biosynthesis and homeostasis in *Cryptococcus neoformans*. *Archives of biochemistry and biophysics*, **481**: 210-218.
- Niklitschek, M., Alcaíno, J., Barahona, S., Sepulveda, D., Lozano, C., Carmona, M. & Cifuentes, V. 2008. Genomic organization of the structural genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biological Research*, 41: 93-108.

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.

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.

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

Schmidt, I., Schewe, H., Gassel, S., Jin, C., Buckingham, J., Hümbelin, M., Sandmann, G., & Schrader, J. 2011. Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **89**: 555-571.

Smith, S. J., & Parks, L. W. 1993. The *ERG3* gene in *Saccharomyces cerevisiae* is required for the utilization of respiratory substrates and in heme-deficient cells. *Yeast*, **9**: 1177-1187.

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.

Ye, J., & DeBose-Boyd, R. A. 2011. Regulation of cholesterol and fatty acid synthesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **3**: a004754.

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & Van't Riet, K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and environmental microbiology*, **56**: 1875-1881.