

**CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA SREBP  
DEPENDIENTE DE LOS NIVELES DE  
ERGOSTEROL Y OXÍGENO EN LA BIOSÍNTESIS  
DE CAROTENOIDES Y ERGOSTEROL EN  
*Xanthophyllomyces dendrorhous*.**

**Tesis**

Entregada a la

Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

**Doctora en Ciencias con mención en Microbiología**

**Facultad de Ciencias**

**Por**

**María Soledad Gutiérrez Gutiérrez**

Enero, 2019

**Directora de Tesis Dra. Jennifer Alcaíno Gorman**

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACION**  
**TESIS DE DOCTORADO**

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

**MARÍA SOLEDAD GUTIÉRREZ GUTIÉRREZ**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctora en Ciencias con mención Microbiología, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día .....

**Directora de Tesis:**

Dra. Jennifer Alcaíno Gorman .....

**Co-Director de Tesis**

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán .....

**Comisión de Evaluación de la Tesis**

Dr. Claudio Martínez .....

Dr. Ricardo Cabrera .....

Dr. Francisco Chávez. ....

Dr. Claudio Vásquez .....

## **DEDICATORIA**

*A mi familia y amigos  
por el apoyo incondicional en todos los  
buenos y no tan buenos momentos.*

## BIOGRAFÍA



Nací un jueves 17 de abril de 1986 en Concepción, integrándome a mi familia como el *conchito*, la cual estaba formada por mi padre Ociel, mi mamá Irma y mis hermanos Alfredo y Ociel. Junto a mis hermanos nos criamos en el pueblo de Monte Aguila e inicié mis estudios en la escuela básica Orlando Vera (ex Liceo A-71). Posteriormente, los estudios de enseñanza media los realicé en la ciudad de Concepción, decisión que mis padres tomaron en busca de una mejor formación académica, por lo cual debí internarme en el Liceo de Niñas de ésta ciudad, momentos de grandes cambios que me otorgaron la capacidad de mirar más allá con el fin de desarrollarme tanto a nivel educacional como personal. Luego, me vine a Santiago para entrar a estudiar Bachillerato en Ciencias en la Universidad de Chile, mi indecisión en la carrera que quería seguir me llevo a la Facultad de Ingeniería, es allí donde me di cuenta que lo que me gustaba era la ciencia y sus laboratorios. Es por esto que ingrese a Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Facultad de Ciencias. Durante el desarrollo de diferentes cursos a lo largo de la carrera mi interés por la ciencia incrementó, esto me motivo a ingresar al Laboratorio de Genética de la facultad, y es aquí donde reafirmó mi vocación científica y decidí entrar al Doctorado en Ciencias mención Microbiología.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco sinceramente al gran equipo de trabajo que forma parte del Laboratorio de Genética, gracias al cual he podido desarrollarme profesionalmente, aprendiendo de cada integrante tanto a nivel científico como personal. Gracias Dony, Salvador, Rafael, Anita, Meli, Luis, Max, Seba y a los que ya pasaron y nuevos integrantes por hacer del laboratorio lo que es y por su compañía, momentos de discutir resultados, momentos de distensión los cuales hacen mas llevadero el día a día. Agradezco a mi tutota, Jennifer, por su apoyo constante y confianza, por motivarme a seguir en este camino, por su gran aporte en el desarrollo de esta tesis. Tambien agradezco al profe Víctor por abrirme las puertas del laboratorio y apoyar esta tesis y a Marcelo por las preguntas y discusiones de experimentos.

Además, agradezco a la comisión evaluadora de mi tesis, al Dr. Claudio Martinez, Dr. Ricardo Cabrera, Dr. Claudio Vasquéz y Dr. Francisco Chavez por apoyar con sus comentarios y criticas constructivas el desarrollo de esta.

Finalmente, y lo más importante agradezco hoy y siempre a mi familia por su infinito apoyo y amor, a Claudio, mi compañero de aventuras, mi madre, siempre tan dedicada a sus hijos, mis hermanos Alfredo y Ociel, a mi sobrina Fran, mi cuñada Zulema y al conchito que llego a iluminar a la familia, mi ahijado Maximiliano.

Agradezco a mis amigos beios, la familia que uno escoge como dicen, por formar parte de mi vida y por bellos momentos vividos y por vivir. Amo!

Agradezco a CONICYT por el financiamiento a travez de la beca doctoral y Proyecto FONDECYT 1160202, además a la Universidad de Chile.

## INDICE DE CONTENIDOS

<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	x
<b>RESUMEN</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> y los carotenoides.....	1
Biosíntesis de terpenos en <i>X. dendrorhous</i> : Carotenoides y Esteroles.....	3
Regulación de la ruta de biosíntesis de Carotenoides y Esteroles en <i>X. dendrorhous</i> .....	8
Vía Sterol Regulatory Element Binding Protein (SREBP).....	11
Vía SREBP en mamíferos.....	11
Vía SREBP en hongos.....	15
<b>Hipótesis</b> .....	18
Objetivo General.....	18
Objetivos Específicos.....	18
<b>MATERIALES YMETODOS</b> .....	19
Cepas y condiciones de cultivo.....	19
Determinación del crecimiento celular y biomasa.....	22
Técnicas de biología molecular.....	22
Transformación por electroporación.....	26
Construcción de plásmidos.....	29
Extracción de carotenoides totales y análisis por RP-HPLC.....	37
Extracción de esteroides totales y análisis por RP-HPLC.....	38
Expresión heteróloga de genes y purificación de proteínas de <i>E. coli</i> .....	39
Ensayos de cambio de la movilidad electroforética (EMSA).....	40
Secuenciación y análisis bioinformático.....	41
<b>RESULTADOS</b> .....	43
Identificación y caracterización bioinformática de los genes ortólogos de la vía SREBP presentes en <i>X. dendrorhous</i> y determinación de la existencia de elementos SRE en la región promotora de genes que participan en la biosíntesis de carotenoides y ergosterol.....	43
Caracterización funcional del gen de SREBP de <i>X. dendrorhous</i> .....	57
Deleción del gen <i>SRE1</i> y expresión del dominio activador de la transcripción de Sre1 (Sre1N) en <i>X. dendrorhous</i> .....	57
Complementación heteróloga del gen <i>SRE1</i> de <i>X. dendrorhous</i> en <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....	77
Determinar la regulación de la vía SREBP mediada por oxígeno en <i>X. dendrorhous</i> .....	81
Rol de Sre1 en la regulación transcripcional en <i>X. dendrorhous</i> .....	91
Evaluación la interacción de SREBP con los elementos SRE identificados.....	97
<b>DISCUSIÓN</b> .....	101
<b>CONCLUSIONES</b> .....	115
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	116
<b>ANEXOS</b> .....	117

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Biosíntesis de terpenoides en <i>X. dendrorhous</i> .....	8
<b>Figura 2.</b> Esquema de la Vía SREBP en hongos.....	14
<b>Figura 3.</b> Estructura intrón-exón de los genes ortólogos de los componentes de la vía SREBP identificados en <i>X. dendrorhous</i> .....	46
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de identidad entre los homólogos de la Vía SREBP de <i>X. dendrorhous</i> y otros organismos.....	47
<b>Figura 5.</b> Análisis de la secuencia aminoacídica codificada por el gen <i>SRE1</i> de <i>X. dendrorhous</i> .....	49
<b>Figura 6.</b> Elementos SRE (Sterol Regulatory Element) identificados en los genes de la vía SREBP, ruta del mevalonato, biosíntesis de carotenoides y esteroides.....	52
<b>Figura 7.</b> Secuencia SRE consenso de <i>X. dendrorhous</i> .....	56
<b>Figura 8.</b> Esquemas de las estrategias experimentales utilizadas para la obtención de los módulos para la transformación de <i>X. dendrorhous</i> .....	60
<b>Figura 9.</b> Análisis de los mutantes del gen <i>SRE1</i> por PCR.....	63
<b>Figura 10.</b> Crecimiento en clotrimazol de las celas mutantes del gen <i>SRE1</i> .....	65
<b>Figura 11.</b> Curva y parámetros de crecimiento de las cepas parentales y mutantes.....	67
<b>Figura 12.</b> Producción y Composición de esteroides de las cepas parentales y mutantes del <i>SRE1</i> de <i>X. dendrorhous</i> .....	70
<b>Figura 13.</b> Producción y Composición de carotenoides de las cepas parentales y mutantes del <i>SRE1</i> de <i>X. dendrorhous</i> .....	73
<b>Figura 14.</b> Niveles de transcritos de los genes <i>HMGR</i> , <i>HMGS</i> , <i>crtR</i> y <i>crtS</i> en las cepas parentales y mutantes del gen <i>SRE1</i> determinados por RT-qPCR.....	75
<b>Figura 15.</b> Cepas parentales y transformantes de <i>S. pombe</i> obtenidas para los ensayos de complementación heteróloga. 78	
<b>Figura 16.</b> Ensayo de complementación heteróloga en <i>S. pombe</i> .....	79
<b>Figura 17</b> Crecimiento en condiciones de hipoxia de los mutantes del gen <i>SRE1</i> de <i>X. dendrorhous</i> .....	82
<b>Figura 18.</b> Crecimiento en cloruro de cobalto de las cepas parentales y mutantes del gen <i>SRE1</i> .....	84
<b>Figura 19.</b> Respuesta transcripcional a la condición de hipoxia (H) y en presencia de cloruro de cobalto (Co) de las cepas CBS 6938 (WT) y mutante CBS. <i>sre1</i> <sup>-</sup> ( <i>sre1</i> <sup>-</sup> ).....	89
<b>Figura 20.</b> Genes diferencialmente expresados en Hipoxia y Cloruro de cobalto.....	90
<b>Figura 21</b> Genes diferencialmente expresados en mutantes <i>sre1</i> <sup>-</sup> en normoxia.....	93
<b>Figura 22.</b> Genes diferencialmente expresados que aumentan en las cepas CBS. <i>cyp61</i> <sup>-</sup> y CBS. <i>gSREIN</i> respecto a la silvestre.....	96
<b>Figura 23.</b> Purificación e identificación de proteínas expresadas heterológamente.....	99
<b>Figura 24.</b> Ensayos de retardo de la movilidad electroforética.....	100

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Cepas bacterianas y de levadura utilizadas y/o construidas en esta Tesis.....	21
<b>Tabla 2:</b> Plásmidos utilizados y/o construidos en esta Tesis.....	33
<b>Tabla 3:</b> Oligonucleótidos diseñados y/o utilizados en esta Tesis.....	35
<b>Tabla 4.</b> Posibles secuencias SRE identificadas con los programas TFBIND y JASPAR para genes de la vía SREBP, biosíntesis de carotenoides y esteroides en <i>X. dendrorhous</i> ...	53



## LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorbancia
ANOVA	Análisis de varianza
bHLH	Basic Helix Loop Helix
BSA	Albumina sérica bovina
Cz	Clotrimazol
CPR	Citocromo P450 reductasa
Co	Cloruro de Cobalto II
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
EDTA	Tetra acetato disódico de etilendiamina
EMM	<i>Edinburgh minimal medium</i> , Medio mínimo para <i>S. pombe</i>
H	Hipoxia
Hyg	Higromicina
kb	Kilobases
kDa	KiloDalton
N	Normoxia (21 % oxígeno)
ORF	Marco abierto de lectura
pb	Pares de bases nucleotídicas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Psi	Libras por pulgada cuadrada
RE	Retículo Endoplasmático
RT-qPCR	PCR cuantitativo de cDNA obtenido por Retrotranscripción
RP-HPLC	Cromatografía líquida en fase reversa
RT	Reacción de transcripción reversa
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UV	Ultravioleta
YES	Medio <i>Yeast Extract</i> con <i>Supplements</i>
YM	Medio completo para levadura
Zeo	Zeocina

## RESUMEN

*Xanthophyllomyces dendrorhous* es una levadura basidiomicete que sintetiza carotenoides, siendo el principal de ellos astaxantina. Esta característica la hace de gran interés comercial y objeto de numerosos estudios; sin embargo, existen muchos aspectos desconocidos relacionados con los mecanismos de regulación transcripcional del proceso de carotenogénesis. Estudios recientes proponen la participación del ergosterol, principal esteroide en levaduras, en la regulación de genes carotenogénicos y otros esenciales en la vía del mevalonato. En este aspecto, se ha demostrado en otros hongos que el mecanismo por el que el ergosterol regula la transcripción génica es mediante la vía SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*). El factor transcripcional Sre1 posee el dominio activador de la transcripción en el amino terminal (Sre1N) y su activación ocurre cuando bajan los niveles de esteroides y/u oxígeno en la célula regulando la transcripción de genes involucrados en la biosíntesis de esteroides y respuesta a hipoxia, entre otros. El objetivo general de este trabajo fue estudiar el mecanismo de regulación de la expresión génica mediada por la vía SREBP dependiente de los niveles de ergosterol y oxígeno en la biosíntesis de carotenoides y esteroides en *X. dendrorhous*, enfocándose en la función del regulador transcripcional Sre1.

En primer lugar, se identificaron y caracterizaron bioinformáticamente posibles genes de la vía SREBP: *SRE1*, *SCP1*, *STP1* y *OFD1* de *X. dendrorhous*. Para estudiar la funcionalidad del gen *SRE1*, se construyeron mutantes por delección de este gen: CBS.*sre1*<sup>-</sup> y CBS.*cyp61*/*sre1*<sup>-</sup> que provienen de las cepas parentales CBS 6938 y CBS.*cyp61*<sup>-</sup> (esta última no produce ergosterol), respectivamente. Además, se construyó la cepa mutante

CBS.g*SREIN*, que expresa sólo el dominio activador de la transcripción (Sre1N). Se evaluó el fenotipo de estas cepas en cuanto a la producción de esteroides y carotenoides, crecimiento en presencia de un inhibidor de la síntesis de esteroides (clotrimazol) y la expresión a nivel de transcritos de algunos genes. Como resultado, se observó que la delección del gen disminuye la producción de ambos tipos de metabolitos y además, *SREI* es esencial para el crecimiento en clotrimazol. Adicionalmente, la cepa CBS.g*SREIN* produce doble cantidad de carotenoides y esteroides, respecto a la cepa silvestre.

Paralelamente, se realizó un ensayo de complementación heteróloga vía expresión del gen *SREI* de *X. dendrorhous* en una cepa mutante *sreI*<sup>-</sup> de *Schizosaccharomyces pombe* y se observó que existe una complementación parcial, dado que la cepa complementada presenta un mejor crecimiento en anaerobiosis y cloruro de cobalto, respecto al control *sreI*<sup>-</sup>.

Por otra parte, se realizaron análisis transcriptómicos de las cepas mutantes en condiciones de normoxia, hipoxia y cloruro de cobalto, dado que este último compuesto se ha descrito como un agente que imita las condiciones de hipoxia. De estos análisis se desprende que Sre1 es necesario para la respuesta a hipoxia y que el cloruro de cobalto imitaría esta respuesta transcripcional en la levadura al menos en algunos genes de la biosíntesis de esteroides.

Finalmente, de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio se concluyó que el gen *SREI* identificado en *X. dendrorhous* es funcional y participa en la regulación de la biosíntesis de esteroides y carotenoides.

## ABSTRACT

*Xanthophyllomyces dendrorhous* is a basidiomycete yeast that synthesizes carotenoids, mainly astaxanthin, this characteristic is of great commercial interest and subject of numerous studies. However, there are many unknown aspects related to transcriptional regulation mechanisms of carotenogenesis. Recent studies propose that ergosterol, the main sterol in yeast, is involved in the regulation of carotenogenic genes expression and on other genes of the mevalonate pathway. In this aspect, in other fungi it has been demonstrated that the mechanism by which ergosterol regulates gene transcription is through the SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein) pathway. The transcriptional factor Sre1 contains a transcriptional activation domain at its amino terminal end (Sre1N) that is activated when cellular sterols and/or oxygen levels decrease and by this way, it regulates the transcription of genes involved in the biosynthesis of sterols and response to hypoxia, among others. The general goal of this work was to study if this mechanism, the SREBP pathway, regulates the biosynthesis of carotenoids and sterols in *X. dendrorhous*, focusing on the function of the transcriptional regulator Sre1.

First, *X. dendrorhous* potential genes of the SREBP pathway, *SRE1*, *SCP1*, *STP1* and *OFD1*, were identified and bioinformatically characterized. To study the functionality of the *SRE1* gene, deletion mutants of this gene were constructed: CBS.*sre1*<sup>-</sup> and CBS.*cyp61*<sup>-</sup> / *sre1*<sup>-</sup> that derived from the parental strains CBS 6938 and CBS.*cyp61*<sup>-</sup> (which does not produce ergosterol), respectively. In addition, the mutant strain CBS.g*SRE1N* was generated, which expresses only the transcription activating domain (Sre1N). The phenotype of these strains was evaluated in relation to sterol and carotenoids

production, growth in the presence of sterol synthesis inhibitor (clotrimazole) and transcript level of some genes. As a result, it was observed that the *SRE1* gene deletion, decreases the production of both types of metabolites and also this gene is essential for growth in the presence of clotrimazole. In addition, the production of carotenoids and sterols in the CBS.g*SRE1N* strain was increased 2-fold compared to the wild-type strain.

In parallel, a heterologous complementation assay was performed by expressing the *X. dendrorhous SRE1* gene in a *Schizosaccharomyces pombe sre1<sup>-</sup>* mutant strain. Partial complementation was observed as the complemented strain displayed better growth in anaerobiosis and in the presence of cobalt chloride (an agent that imitates hypoxia conditions), regarding to the controls strains.

On the other hand, transcriptomic analyses of the mutant strains were carried out in conditions of normoxia, hypoxia and cultures in the presence of cobalt chloride. In general, it was observed that Sre1 is necessary for the response to hypoxia conditions and that cobalt chloride would imitate these conditions in the transcriptional response in the yeast, at least in some genes of the sterol biosynthesis.

In conclusion, the *SRE1* gene identified in *X. dendrorhous* is functional and it is involved in the regulation of the biosynthesis of sterols and carotenoids in this yeast.

## 1. INTRODUCCIÓN

---

### 1.1. *Xanthophyllomyces dendrorhous* y los carotenoides

*Xanthophyllomyces dendrorhous* es una levadura basidiomicete que puede sintetizar **carotenoides**, siendo el principal de ellos astaxantina, característica que la hace de gran interés comercial y objeto de numerosos estudios. *X. dendrorhous* fue aislada originalmente desde exudados de árboles de regiones montañosas de Japón y Alaska en la década de los 60's por Phaff y colaboradores (Phaff y cols., 1972). Posteriormente, se obtuvo aislados procedentes de la Patagonia Argentina asociados a cuerpos fructíferos de *Cyttaria hariatii* en árboles del género *Nothofagus* (Libkind y cols., 2007) y del sur de Chile desde hojas de eucalipto (Weber y cols., 2008). Un estudio reciente, reveló que el genoma de una cepa haploide de esta levadura tiene un tamaño de aproximadamente 20 Mb con sólo un 3,1 % de elementos repetidos y contiene 6.385 posibles genes codificantes de proteínas (Sharma y cols., 2015). Por otro lado, la comparación de genomas de distintos aislados de esta levadura con otros miembros basidiomicetes de la clase *Tremellomycetes*, indican que el genoma de *X. dendrorhous* está enriquecido en mecanismos antioxidantes. Se identificaron, además de los genes de la biosíntesis de carotenoides, genes para la síntesis de micosporinas del tipo glutaminol-glucósido (MGG) (Bellora y cols., 2016), moléculas que exhiben alta actividad antioxidante y de fotoprotección a luz UV (Libkind y cols., 2011). Interesantemente, la cantidad de genes con intrones y el número de intrones por gen en *X. dendrorhous* presentan los valores más altos encontrados en hongos a la

fecha siendo similares a los encontrados en humanos, este rasgo podría compartirse con otros miembros del orden *Cistofilobasidiales* (Bellora y cols., 2016).

Se postula que los carotenoides cumplen un rol antioxidante en *X. dendrorhous*, principalmente dado que su hábitat natural, los exudados de árboles, son altamente oxidantes y contienen sustancias antifúngicas. Por lo tanto, estos pigmentos estarían ejerciendo un rol protector en la levadura especialmente porque en *X. dendrorhous* hay carencia y baja actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la catalasa, respectivamente (Schroeder y cols., 1993). En apoyo de esta hipótesis se ha demostrado que la xantófila astaxantina, principal carotenoide producido por esta levadura, posee una alta actividad antioxidante e incluso mayor a la de otros reconocidos antioxidantes como el  $\beta$ -caroteno y el  $\alpha$ -tocoferol (Miki, 1991). Por este motivo, actualmente la astaxantina es comercializada por la industria nutracéutica. No obstante, el mercado más importante de este carotenoide es la industria acuícola, ya que se usa como colorante de salmónidos cultivados (Higuera-Ciapara y cols., 2006).

Los **carotenoides** son un grupo de pigmentos muy diversos y están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Son **tetraterpenos**, compuestos orgánicos de 40 átomos de carbono ( $C_{40}$ ) derivados del isopreno ( $C_5$ ) por lo que también reciben el nombre de isoprenoides. Poseen una cadena de dobles enlaces conjugados, sistema de polieno, lo que les otorga sus propiedades cromofóricas (Frengova y Beshkova, 2009). Dada la alta hidrofobicidad de estas moléculas, generalmente se encuentran en las membranas lipídicas de las células o asociadas a proteínas permitiendo su acceso a ambientes acuosos (Britton y cols., 2004).

Actualmente se conocen más de setecientas estructuras diferentes de este tipo de pigmentos, los que se clasifican en carotenos y xantófilas. Los carotenos sólo poseen átomos de carbono e hidrógeno en su estructura, siendo el  $\beta$ -caroteno uno de los más conocidos. Las xantófilas son derivados oxigenados y entre ellas se encuentran la zeaxantina, cantaxantina y astaxantina (Britton, 1995). Los carotenoides se encuentran en la mayoría de las formas de vida y son producidos naturalmente por organismos fotosintéticos y algunos procariontes, hongos filamentosos y levaduras (Lu y col, 2008). Por el contrario, los animales no son capaces de sintetizar estos pigmentos *de novo*, por lo tanto, los adquieren desde su dieta (Maoka, 2011). Algunas de las funciones que cumplen los carotenoides son: pigmentos fotosintéticos, precursores de la vitamina A, antioxidantes (protección contra foto-oxidación y radicales libres) y participan en la síntesis de ácido abscísico. También son importantes para la atracción visual de animales polinizadores (Frengova y Beshkova, 2009).

### **1.2. Biosíntesis de terpenos en *X. dendrorhous*: carotenoides y esteroides**

Los terpenos comprenden una amplia y diversa familia de compuestos orgánicos con múltiples funciones. La biosíntesis de todos los terpenos en diversas especies puede organizarse en tres etapas: una etapa temprana donde se sintetiza el precursor fundamental, el isopentenil pirofosfato (IPP); una etapa intermedia donde adiciones sucesivas de IPP generan el esqueleto carbonado de diferentes isoprenoides; y una etapa tardía de adición o remoción de grupos metilos y/o átomos de oxígeno a los diferentes terpenos. En esta última etapa, además de los carotenoides, son sintetizados los esteroides, los cuales ejercen diversas funciones biológicas y también presentan potencial



biotecnológico (Margalith., 1989). Los esteroides, siendo el ergosterol el principal esteroide en levaduras, son componentes estructurales de la membrana plasmática y ejercen un rol muy importante modulando su permeabilidad y fluidez (Zhang y Rao, 2010).

En levaduras y hongos filamentosos, el IPP es sintetizado por la **vía del mevalonato**, la que comienza con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA formando acetoacetil-CoA, reacción catalizada por la enzima acetil-CoA C-acetiltransferasa codificada por el gen *ERG10* en *X. dendrorhous* (Werner y cols., 2016). Una segunda condensación del acetoacetil-CoA con acetil-CoA genera la formación de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA); este paso es catalizado por la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa codificada por el gen *HMGS* (Tarshis y cols., 1996). Luego, el HMG-CoA es reducido para formar mevalonato (MVA), paso catalizado por la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa dependiente de NADPH codificada por el gen *HMGR*. En los pasos siguientes, el mevalonato es fosforilado sucesivamente por las enzimas mevalonato quinasa, codificada por el gen *MVK*, y fosfomevalonato quinasa, codificada por *PMK*, generándose 5-pirofosfomevalonato. Finalmente, la descarboxilación del 5-pirofosfomevalonato por la enzima pirofosfomevalonato descarboxilasa dependiente de ATP y codificada por el gen *MVD*, produce el isopentenil pirofosfato (IPP) (Sandmann y cols., 2001a).

En la etapa intermedia común para la síntesis de carotenoides y esteroides, el IPP es susceptible de ser convertido en su isómero activo dimetilalil pirofosfato (DMAPP) por la enzima isopentenil pirofosfato isomerasa, codificada por el gen *idi* descrito en *X. dendrorhous* (Kajiwara y cols., 1997) (Figura 1). Luego, se lleva a cabo la condensación

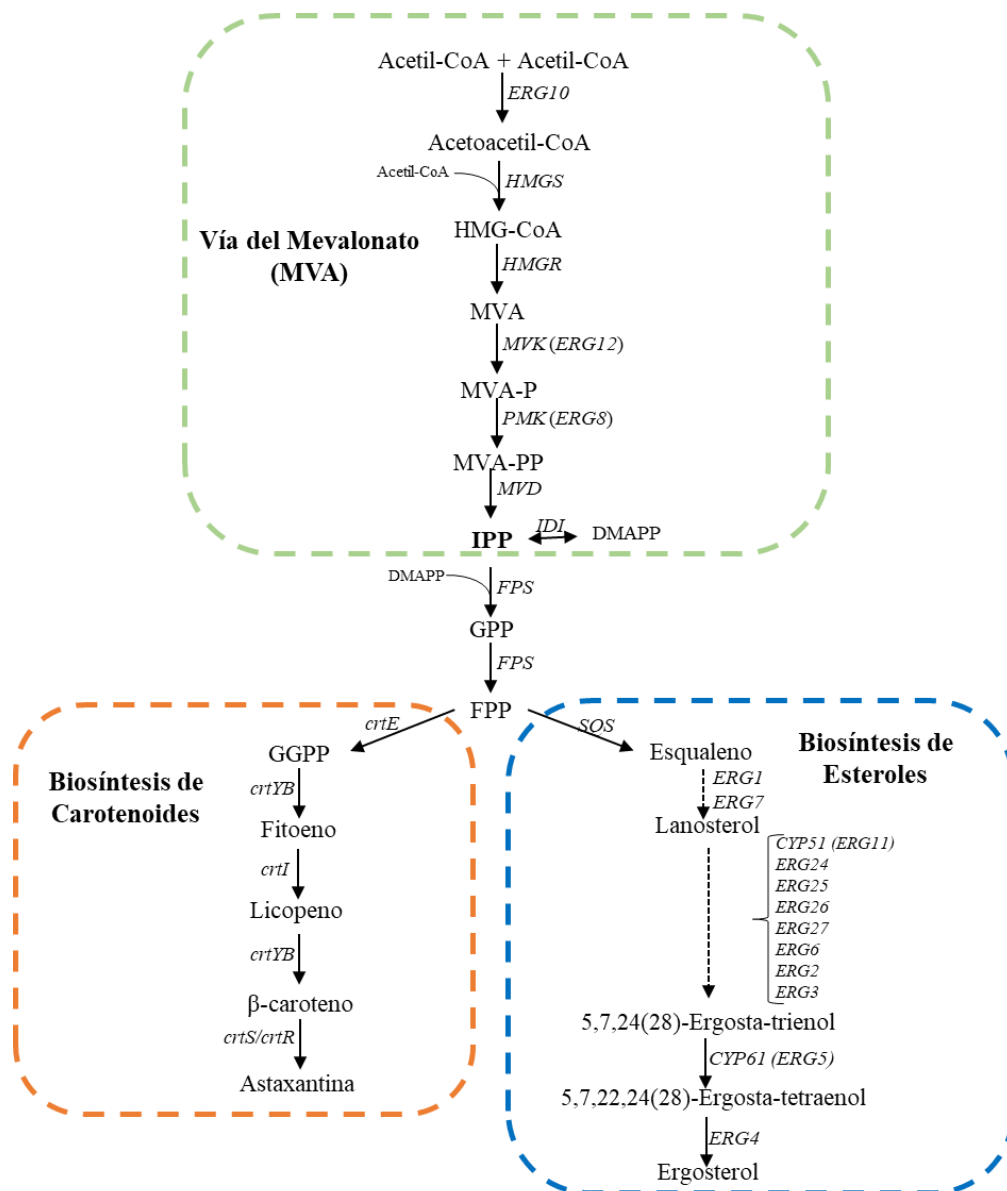
de una molécula de IPP con otra de DMAPP formando geranyl pirofosfato (GPP, C<sub>10</sub>), al que se le adiciona una segunda molécula de IPP formando farnesil pirofosfato (FPP, C<sub>15</sub>). Ambas reacciones son catalizadas por la enzima FPP-sintasa, codificada por el gen *FPS* (Alcaíno y cols., 2014).

En la síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous*, al FPP se agrega una tercera molécula de IPP generando geranylgeranyl pirofosfato (GGPP, C<sub>20</sub>), paso catalizado por la enzima geranylgeranyl pirofosfato sintasa (codificada por el gen *crtE*) (Alcaíno y cols., 2014). Posteriormente, la condensación de dos moléculas de GGPP, etapa catalizada por la enzima bifuncional fitoeno- $\beta$ -caroteno sintasa (PBS) codificada por el gen *crtYB*, produce fitoeno (C<sub>40</sub>) que es el primer carotenoide de la vía (Verdoes y cols., 1999a). A continuación, el fitoeno sufre cuatro desaturaciones por la enzima fitoeno desaturasa (PDS, producto del gen *crtI*) generando licopeno (Verdoes y cols, 1999b). Los extremos del licopeno son ciclados por la actividad licopeno ciclasa de la enzima PBS formando el  $\beta$ -caroteno (Verdoes y cols, 1999a). Finalmente, el  $\beta$ -caroteno es oxidado por acción de la enzima astaxantina sintasa (CrtS, codificada por el gen *crtS*), que es una enzima citocromo P450 monooxigenasa (Ojima y cols., 2006). De esta manera, CrtS adiciona un grupo ceto en los carbonos 4 y 4', y un grupo hidroxilo en los carbonos 3 y 3' de los anillos del  $\beta$ -caroteno, generando astaxantina (de la Fuente y cols, 2010). Se ha demostrado que en la síntesis de astaxantina desde  $\beta$ -caroteno en *X. dendrorhous* también es esencial la enzima CrtR que es una citocromo P450 reductasa codificada por el gen *crtR* (Alcaíno y cols., 2008) que dona los electrones necesarios para la catálisis de las enzimas P450s. A la fecha, *X. dendrorhous* es el único organismo conocido que sintetiza astaxantina a través

de un sistema citocromo P450. Es interesante el hecho que la interrupción del gen *crtR* bloquea la producción de astaxantina; sin embargo, el mutante es viable (Alcaíno y cols., 2008) y produce ergosterol en cuya vía de síntesis también participan enzimas P450. De este modo, el mecanismo dador de electrones alternativo CYB5-CBR presente en esta levadura (Gutiérrez y cols., 2015) podría sustentar otros procesos dependientes de citocromo P450 monoxigenasas como la síntesis de ergosterol, pero no la carotenogénesis. En este sentido, en el genoma de *X. dendrorhous* se han identificado 13 genes que probablemente codifican enzimas P450, todos los cuales son transcritos (Córdova y cols., 2017).

En la biosíntesis de esteroides descrita en otras levaduras, dos moléculas de FPP serían condensadas por la enzima escualeno sintasa formando escualeno, el primer precursor específico de los esteroides (Merkulov y cols., 2000). La biosíntesis de esteroides es objeto de estudio en *X. dendrorhous*, donde a la fecha se han caracterizado funcionalmente cuatro genes que participarían en esta ruta: el gen *CYP51/ERG11*, que codifica la enzima esterol C14-demetilasa que cataliza la desmetilación de lanosterol (Leiva y cols., 2015), el gen *ERG3*, que codificaría la enzima C-5 esterol desaturasa la cual catalizaría la conversión de episterol a 5,7,24(28) ergostatrienol (Venegas., 2018); el gen *CYP61/ERG5* que codifica la enzima C22-desaturasa que actuaría en el penúltimo paso de la síntesis de ergosterol (Loto y cols., 2012) y finalmente, el gen *ERG4* que codifica una C-24(28) esterol reductasa que participaría en la última etapa de la biosíntesis de ergosterol y convertiría 5,7,24,28 ergostatetraenol en ergosterol (Venegas., 2018). Tanto, C14-demetilasa (CYP51) como la C22-desaturasa (CYP61), pertenecen a la

superfamilia de las citocromo P450 y por lo tanto, requerirían de CrtR y/o CYB5-CBR como dadores de electrones para su actividad (Gutiérrez y cols., 2015).



**Figura 2. Biosíntesis de terpenoides en *X. dendrorhous*.** Se esquematiza la vía del mevalonato (cuadro verde), la biosíntesis de carotenoides (cuadro naranja) y la biosíntesis de esteroides (cuadro azul) de *X. dendrorhous*. En letras cursivas se indica los genes participantes en cada ruta y a continuación su número de acceso a la base de datos GenBank en paréntesis: *ERG10* [KX267759], *HMGS* [AB919150.1], *HMGR* [AJ884949.1], *MVK*, *PMK*, *MVD*, *idi* [DQ235686], *FPS* [DI032788.1, patente US 6872556 B2], *crtE* [DQ012943], *crtYB* [DQ016503], *crtI* [Y15007], *crtS* [EU713462], *crtR* [EU884133] y *CYP61* [JX183236]. Abreviaciones: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), ácido mevalónico (MVA), mevalonato-5-fosfato (MVA-P), mevalonato-5-pirofosfato (MVA-PP), isopentenil pirofosfato (IPP), dimetilalil pirofosfato (DMAPP), farnesil pirofosfato (FPP), geranylgeranil pirofosfato (GGPP) (Modificado de Loto, 2012).

### **1.3. Regulación de la ruta de biosíntesis de carotenoides y esteroides en *Xanthophyllomyces dendrorhous***

Pocos estudios se han centrado en describir los mecanismos moleculares de regulación de la biosíntesis de terpenos (carotenoides y esteroides) en *X. dendrorhous*, y principalmente se han centrado en comprender la regulación de la carotenogénesis. En diversos trabajos se han identificado múltiples factores que influyen sobre la cantidad y composición de carotenoides producidos por la levadura, los que han propuesto principalmente mecanismos regulatorios dependientes de la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Liu y Wu 2007), la fuente de carbono en el medio (Gu y cols., 1997; Vázquez y cols., 1997; Flores y cols., 2001; Johnson., 2003) y la inhibición por producto (Schroeder y Johnson.,1995). Estas evidencias sugieren que la regulación es compleja y podría darse a distintos niveles.

La producción de carotenoides se ha visto inducida por el tratamiento de un cultivo de *X. dendrorhous* con peróxido de hidrogeno y O<sub>2</sub> singlete (<sup>1</sup>O)<sub>2</sub> (Liu y Wu., 2007; Schroeder y Johnson., 1995). Aunque no está claro a qué nivel estas especies actuarían para inducir la carotenogénesis, se propone que podría ser mediante mecanismos de regulación transcripcional (Schroeder y Johnson 1995).

Un posible mecanismo de regulación estaría dado por el procesamiento alternativo de algunos transcritos primarios de genes carotenogénicos, como *crtYB* y *crtI*, cuyo *splicing* alternativo genera transcritos con codones de término temprano, lo cual resulta en una proteína más corta que no tendría función. En el estudio de Lodato y cols. (Lodato y cols., 2003), se determinó que la relación entre transcritos maduros y transcritos

alternativos de estos genes varia durante las etapas de crecimiento y que se relaciona con la producción de carotenoides.

Diversas investigaciones han permitido deducir que la fuente de carbono utilizada en el medio influye tanto en la cantidad total de carotenoides producidos como en la composición de éstos (Johnson y Lewis., 1979; Vázquez y cols., 1997; Visser y cols. 2003). Estudios más recientes, han confirmado la existencia del mecanismo de represión catabólica mediado por glucosa, a través del represor Mig1 que reconoce elementos *cis* en el DNA (cajas Mig1) en las zonas promotoras de varios genes reprimidos por glucosa. En ausencia de glucosa, Mig1 es fosforilado y localizado en el citoplasma. Sin embargo, en presencia de glucosa, una cascada de señalización intracelular resulta en la desfosforilación de Mig1 y en este estado, la proteína Mig1 se transporta al núcleo uniéndose a las regiones promotoras de sus genes blanco y reclutando al co-represor Tup1 y Cyc8 que ejecutan la represión de los genes blanco (Trumbly., 1992; Smith y Johnson., 2000; Córdova y cols., 2016).

En cuanto a la producción de esteroides en *X. dendrorhous*, los estudios se han centrado en comprender la ruta de síntesis de éstos. Se ha determinado que al bloquear la producción de ergosterol por la deleción del gen *CYP61*, los niveles de transcritos de genes de la vía del mevalonato aumentan. Interesantemente, la cepa mutante *CBS-cyp61* presenta un fenotipo de color más intenso que su cepa parental debido a una mayor producción de carotenoides. Además, la producción de esteroides totales también aumenta al igual que los niveles de transcritos del gen *HMGR* (un aumento de alrededor de 14 veces) (Loto y cols., 2012). En este mismo sentido, la deleción del gen *CYP51* reduce la producción de esteroides, esto acompañado de un aumento en los niveles de transcritos de

los genes *HMGR* y *crtR* (Leiva y cols., 2015). Para comprender que mecanismo podría estar involucrado en esta respuesta transcripcional que se manifiesta a la baja o ausencia de ergosterol en la levadura, se evaluaron las regiones promotoras de varios genes tanto de la ruta de carotenogénesis, ergosterol y otros, buscando elementos cis **SREs** (*Sterol Regulatory Response Elements*), que son secuencias específicas de unión del factor de transcripción **SREBP** (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*). En estos estudios se identificaron elementos SRE en la zona promotora del gen *ERG10* (Werner y cols., 2016) y en la mayoría de los genes de citocromo P450 monoxigenasas identificados en la levadura (Córdova y cols., 2017). Cabe destacar que dentro de estas enzimas se encuentran CYP51 y CYP61 involucradas en la biosíntesis de esteroides.

La identificación de estos elementos regulatorios SRE en diversos genes de *X. dendrorhous* hace sospechar la presencia y funcionalidad de esta vía de regulación transcripcional SREBP en esta levadura.



#### **1.4. Vía *Sterol Regulatory Element Binding Protein* (SREBP).**

La vía SREBP fue inicialmente estudiada en mamíferos, siendo el principal mecanismo de regulación de la homeostasis de lípidos. Dicha vía está compuesta por el factor transcripcional SREBP el cual se ha descrito como el principal regulador de la biosíntesis de colesterol en organismos superiores. SREBP es sintetizado como una proteína inactiva anclada a membrana que requiere de cortes proteolíticos para su liberación de la membrana y activación. Interesantemente, SREBP está bajo un mecanismo regulador único en el cual los esteroides regulan directamente la actividad de SREBP inhibiendo la proteólisis cuando los niveles de esteroles celulares son suficientes (Shimamoto y cols., 2001; Goldstein y cols., 2006). En el año 2005, esta vía se describió por primera vez en hongos donde el principal mecanismo de regulación es dependiente de ergosterol, un análogo al colesterol en mamíferos.

##### **1.4.1. Vía SREBP en mamíferos.**

La biosíntesis de colesterol y ácidos grasos en mamíferos es regulada por SREBPs, que son una familia de factores transcripcionales unidos a la membrana del retículo endoplasmático (Figura 2). Estas proteínas presentan tres regiones: a) un dominio amino-terminal (N-terminal) que contiene el motivo de unión a DNA *basic hélix-loop-helix-leucine zipper* (bHLH-Zip); b) dos segmentos hidrofóbicos de transmembrana dispuestos hacia el citoplasma separados por un *loop* hidrofílico que se encuentra hacia el lumen del RE; y c) un dominio carboxilo-terminal (C-terminal), que es esencial para la activación de este regulador transcripcional. En el RE, el dominio C-terminal de SREBP interactúa con la proteína SCAP (*SREBP Cleavage Activating Protein*); SCAP también reside en la membrana de RE y es capaz de detectar los niveles de colesterol en la célula a través de

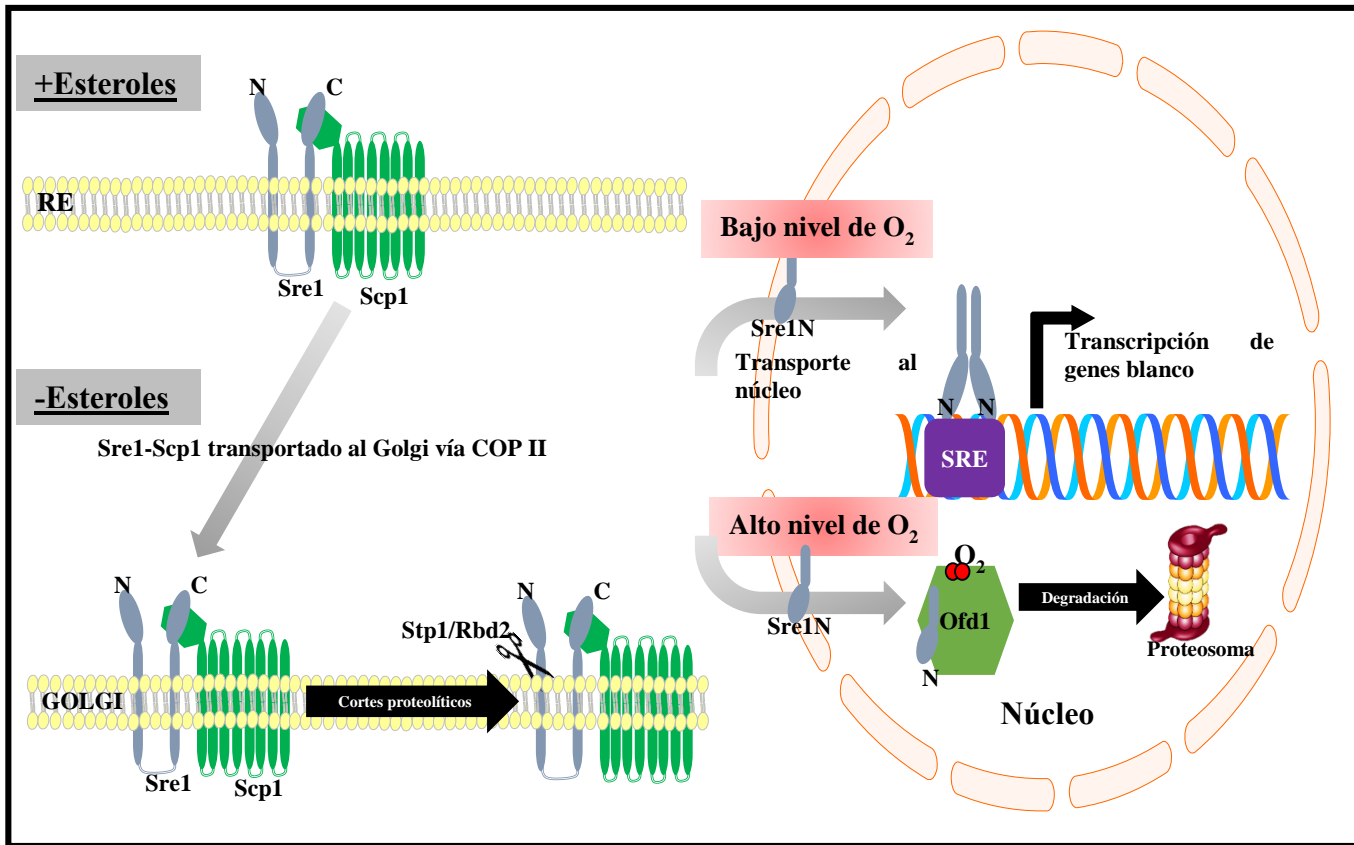
un dominio SSD (*Sterol Sensing Domain*). El SSD se encuentra entre los segmentos transmembrana 2 al 6, el dominio C-terminal de SCAP posee una serie de 40 repetidos de residuos de triptófano-aspártico (*WD-repeat*), los cuales participan en la interacción proteína-proteína (Sakai y cols., 1997). Cuando los niveles de colesterol son suficientes, el complejo SCAP-SREBP se mantiene retenido en la membrana del RE por la interacción de SCAP con la proteína INSIG (*Insulin-Induced Gene*) (Hua y cols., 1996; Nohturfft y cols., 1998). Cuando los niveles de esteroides disminuyen, SCAP sufre un cambio conformacional al dejar de unir esteroides lo que interrumpe su interacción con INSIG y así, el complejo SREBP-SCAP es transportado al aparato de Golgi vía vesículas COPII (Yabe y cols., 2002). En el aparato de Golgi, SREBP es activado por dos cortes sucesivos de las proteasas S1P y S2P (*Site-1 Protease* y *Site-2 Protease*, respectivamente).

S1P es una serina-proteasa anclada en el aparato de Golgi por un segmento transmembrana, cuyo dominio catalítico se encuentra hacia el lumen del Golgi siendo la responsable de realizar el primer corte en el *loop* hidrofílico de SREBP (Rawson., 2003). S2P es una zinc-metaloproteasa la cual se distingue del resto de proteasas de esta familia por su alta hidrofobicidad, particularmente los aminoácidos que flaquean el motivo HEXXH. La hidrofobicidad de su sitio catalítico hace que sus sustratos sean particularmente hélices hidrofóbicas insertas en membranas como ocurre con SREBP, generándose así la liberación al citoplasma del dominio activador de la transcripción de SREBP (SREBPN) que es translocado al núcleo (Rawson y cols., 2003). En el núcleo, SREBPN reconoce y se une a los elementos regulatorios SRE promoviendo la transcripción de sus genes blanco, los cuales están principalmente involucrados en la

biosíntesis de colesterol a partir de Acetil-CoA y su incorporación desde el medio extracelular mediante el receptor LDLH (Horton y cols., 2002).

Los primeros estudios que describieron la vía SREBP fueron particularmente en humanos, cuyo genoma posee dos genes que codifican tres isoformas de SREBP: SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2; las primeras dos provienen de un mismo gen cuyo mRNA sufre un *splicing* alternativo. Las tres isoformas pueden activar la mayoría de los genes SREBP-dependientes diferenciándose en la eficiencia de activación. SREBP-1a es el activador más potente, ya que posee un segmento de transactivación más largo (Horton y cols., 2002). Por otro lado, los roles de SREBP-1c y SREBP-2 son más restrictivos que el de SREBP-1a. SREBP-1c preferencialmente aumenta la transcripción de genes requeridos para la síntesis de ácidos grasos, pero no los de la síntesis de colesterol, en cambio SREBP-2 activa preferentemente genes de la biosíntesis de colesterol y del receptor LDL (Horton y cols., 1998).

La regulación de la biosíntesis de lípidos por SREBP requiere de su interacción con los elementos regulatorios SRE. Esta unión a los elementos SRE viene dada por una particularidad de SREBP en su motivo bHLH-Zip, ya que a diferencia de otros factores de transcripción de la familia bHLH-Zip, SREBP posee un residuo de tirosina conservado en lugar de un residuo de arginina en la región básica de este dominio. Esta diferencia le otorga la posibilidad de unirse no solo a los repetidos invertidos “*E-box*” (5'-CANNTG-3') sino también a las secuencias repetidas directas, SRE (secuencia consenso: 5'-TCACNCCAC -3') (Rawson., 2003).



**Figura 2. Esquema de la Vía SREBP en hongos.** El activador transcripcional Sre1 es sintetizado como un precursor inactivo que está unido a la membrana del retículo endoplásmico (RE) a través de dos hélices transmembrana.

### 1.4.2. Vía SREBP en hongos.

La búsqueda de genes ortólogos de la vía SREBP en otros organismos se ha visto facilitada por el creciente aumento en la información de genomas disponibles a la fecha lográndose identificar posibles componentes de la vía SREBP en diversas levaduras y hongos filamentosos. Los modelos más ampliamente caracterizados en este aspecto han sido la levadura ascomicete *Schizosaccharomyces pombe* y los patógenos humanos *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus* (Bien y cols., 2010). *C. neoformans* pertenece al *phylum* Basidiomycota que esta remotamente relacionado con el *phylum* Ascomycota, al cual pertenecen *S. pombe* y *A. fumigatus*. La presencia de SREBP en estos dos *phylum* de hongos divergentes sugiere una conservación generalizada de la vía SREBP en el reino de los hongos. Los estudios que caracterizan estos diferentes sistemas en hongos han llevado a hallazgos interesantes sobre la evolución en los mecanismos de regulación de la vía SREBP.

En *S. pombe* fueron los primeros estudios donde se identificaron ortólogos de los componentes esta vía, como SREBP, SCAP, INSIG, llamados en este organismo como Sre1, Scp1 y Ins1, respectivamente. Se han identificado muchas similitudes de la vía SREBP al sistema en mamíferos. Primero, Sre1 es sintetizado como un precursor inactivo unido a membrana y su liberación depende de los niveles de esteroides, lo cual ha sido demostrado mediante el uso de inhibidores de la síntesis de ergosterol como azoles y compactina (Hughes y cols., 2005). En segundo lugar, Sre1 y Scp1 interaccionan, y Sre1 requiere de Scp1 para su activación (Hughes y cols., 2005). Tercero, experimentos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que Sre1 se une específicamente a secuencias SRE en

promotores de genes blanco (Todd y cols., 2006). Finalmente, Sre1 activa genes necesarios para la biosíntesis de ergosterol y los mutantes del gen *SRE1* (*sre1<sup>-</sup>*) sintetizan menos esteroides (Hughes y cols., 2005). Además de estas similitudes entre las vías SREBP de *S. pombe* y mamíferos existen importantes diferencias, una de ellas está dada por el mecanismo de activación de Sre1, ya que en *S. pombe* no se han identificado las proteasas S1P ni S2P. Para la activación de Sre1 en *S. pombe*, Sre1 en el aparato de Golgi es ubiquitinado por la ligasa DscE3 y luego reclutado por la AAA-ATPasa Cdc48, posteriormente es escindido por la proteasa Rbd2 (Hwang y cols., 2016). Por otro lado, Sre1 presenta mayor actividad cuando los niveles de oxígeno celular disminuyen, siendo el principal regulador de respuesta a hipoxia en *S. pombe* (Todd y cols., 2006). Esto se explica por la interacción de la región N-terminal de Sre1 (Sre1N) con la proteína nuclear Ofd1 (2-Oxoglutarato Fe (II) Dioxigenasa); en presencia de oxígeno, Ofd1 impide la interacción de Sre1N con los elementos SRE y además acelera su degradación vía proteosoma. En ausencia de oxígeno, la proteína Nro1 (Negative Regulator de Ofd1) se une a la región C-terminal de Ofd1 impidiendo su interacción con Sre1N, resultando de este modo en la acumulación de Sre1N en el núcleo y la activación de sus genes blanco (Lee y cols., 2009). Por lo tanto, Sre1, regula la respuesta transcripcional dada ambas condiciones: bajos niveles de esteroides y de oxígeno.

La vía SREBP en *C. neoformans* es importante para la homeostasis de esteroides, detectar los niveles de oxígeno y además para su virulencia (Chang y cols., 2007; Chun y cols., 2007). Interesantemente, *C. neoformans* a diferencia de *S. pombe*, conserva la proteasa S2P, llamada Stp1 en este organismo, que es necesaria para el procesamiento y actividad de Sre1. La cepa mutante del gen *STP1* no acumula a Sre1N, sugiriendo que

Stp1 es la única proteasa para Sre1 en esta levadura (Bien y cols., 2009). La regulación transcripcional mediada por Sre1 en *C. neoformans* es similar tanto al sistema en mamíferos como el de *S. pombe*. Sre1 es necesario para la regulación de la mayoría de los genes de la biosíntesis de esteroides tanto bajo condiciones de normoxia como hipoxia. Por el contrario, en *S. pombe* Sre1 regula principalmente los genes de la biosíntesis de esteroides oxígeno-dependientes.

Tanto en *S. pombe* como en *C. neoformans*, Sre1 regula otras vías de respuesta a la condición de hipoxia como la biosíntesis de esfingolípidos y de grupo hemo, y captación y transporte de hierro y cobre. Además, se demostró en ambas levaduras que Sre1 es esencial para el crecimiento en condiciones de hipoxia.

De acuerdo a las evidencias presentadas, en cuanto al aumento de los niveles de transcritos de genes de la vía del mevalonato y carotenogénicos en mutantes de *X. dendrorhous* deficientes en la producción de ergosterol, así como, la identificación de posibles elementos regulatorios SRE en los promotores de diversos genes de esta levadura y dado los recientes hallazgos del mecanismo de regulación transcripcional dependiente de los niveles de esteroides SREBP en hongos, es interesante estudiar la presencia y funcionalidad de la vía SREBP y su participación en la carotenogénesis como en otros procesos de la levadura.

Acorde a lo anterior se plantea la siguiente hipótesis de trabajo

### **1.5. Hipótesis**

La expresión de genes que participan en las rutas de síntesis de carotenoides y ergosterol en *X. dendrorhous* está regulada por la vía SREBP, cuyo mecanismo de activación estaría mediado por los niveles de ergosterol y oxígeno celular.

### **1.6. Objetivo General**

Estudiar el mecanismo de regulación de la expresión génica mediada por la vía SREBP dependiente de los niveles de ergosterol y oxígeno en la biosíntesis de carotenoides y esteroides en *X. dendrorhous*.

### **1.7. Objetivos Específicos**

1. Identificar y caracterizar bioinformáticamente los genes ortólogos de la vía SREBP presentes en *X. dendrorhous* y determinar la existencia de los elementos SRE en la región promotora de genes que participan en biosíntesis de carotenoides y ergosterol.
2. Caracterizar funcionalmente el gen *SRE1* en *X. dendrorhous*.
3. Determinar la regulación de la vía SREBP mediada por oxígeno en *X. dendrorhous*.
4. Evaluar la interacción de Sre1 con los elementos SRE identificados.



## 2. MATERIALES Y METODOS

---

### 2.1. Cepas y condiciones de cultivo

En la tabla 1 se describen las cepas de microorganismos que fueron utilizados y construidos en esta tesis.

Para la propagación de plásmidos y expresión de proteínas se utilizaron cepas de *Escherichia coli* (Tabla 1). Las condiciones de cultivo fueron las siguientes, a menos que se especifique lo contrario. Las células fueron cultivadas a 37 °C en medio *Lysogeny Broth* (LB, triptona 1 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 5 g/L) durante 12 a 15 h con agitación constante a 150 rpm. Para seleccionar transformantes y recombinantes se utilizaron placas con medio LB agar al 1,5 % y según cada experimento se suplementaron con ampicilina (100 µg/mL), X-GAL (32 µg/mL) y/o kanamicina (50 µg/mL). Para la producción de proteínas recombinantes se utilizó la cepa BL21(DE3)pLysS cultivada en medio LB con kanamicina (50 µg/mL) a 22 °C a 150 rpm por 15 h aproximadamente y la expresión génica se indujo con IPTG a 100 mM.

Las especies de levaduras utilizadas fueron *X. dendrorhous*, *S. pombe* y *Saccharomyces cerevisiae* (Tabla 1). Las cepas de *X. dendrorhous* se cultivaron a 22 °C en medio completo YM (extracto de levadura 3 g/L, extracto de malta 3 g/L, glucosa 10 g/L y peptona 5 g/L) con agitación constante a 150 rpm. Para los cultivos en placas, al medio YM se le adicionó agar al 1,5 % y para la selección de transformantes se adicionó el antibiótico correspondiente: higromicina B (35 µg/mL) y/o zeocina (50 µg/mL). Las

cepas de *S. pombe* fueron cultivadas en medio completo YES (*Yeast Extract with Supplements*) (extracto de levadura 5 g/L, glucosa 30 g/L y adenina, histidina, leucina, uracilo y lisina a 225 mg/L de cada uno) y medio mínimo *Edinburgh Minimal Medium* (EMM, hidrogenofalato de potasio 3 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2,2 g/L,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5 g/L, glucosa 20 g/L, stock de sal 50X 20 mL/L, 1000 X 1 mL/L y stock de minerales 10000 X 0,1 mL/L; Composición de las soluciones stock: stock de sal 50 X:  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  52,5 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,735 g/L,  $\text{KCl}$  50 g/L y  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  2 g/L, stock de vitaminas 1000X: ácido pantoténico 1 g/L, ácido nicotínico 10 g/L, inositol 10 g/L, biotina 10 mg/L, stock de minerales 10000 X: ácido bórico 5 g/L,  $\text{MnSO}_4$  4 g/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4 g/L,  $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  2 g/L, ácido molíbdico 0,4 g/L,  $\text{KI}$  1 g/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,4 g/L, ácido cítrico 10 g/L) e incubadas a 30 °C con agitación a 150 rpm. Para los análisis de fenotipo, selección de transformantes y recombinantes a los medios YES y EMM se les adicionó 1,5 % de agar y fueron suplementados con adenina, histidina, leucina, uracilo y lisina a 225 mg/L cada uno y G418 (100 mg/L) según correspondió. La cepa de *S. cerevisiae* se cultivó en medio YEPD (peptona 20 g/L, extracto de levadura 10 g/L y glucosa 20 g/L) a 30 °C con agitación constante a 150 rpm y para la selección de transformantes en placa se adicionó 1,5 % de agar y G418 (200 mg/L).

**Tabla 1: Cepas bacterianas y de levadura utilizadas y/o construidas en esta tesis.**

<b>Características y Genotipo</b>		<b>Fuente y/o Referencia</b>
<b>Cepas</b>		
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	Cepa utilizada para experimentos de transformación y replicación de plásmidos. Sensible a ampicilina F- $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 $\lambda$ - thi-1 gyrA96 relA1.	(Sambrook and Russell, 2001)
BL21(DE3)pLysS	Cepa utilizada para experimentos de expresión de proteínas heterólogas. Sensible a kanamicina. F <sup>-</sup> , <i>dcm ompT hsdS</i> (rb <sup>-</sup> mb <sup>-</sup> ) <i>gal</i> $\lambda$ (DE3) [pLysS Cam <sup>r</sup> ].	
<b><i>S. cerevisiae</i></b>		
S288c	Cepa tipo utilizada para la construcción de módulos mediante <i>DNA assembler</i> . MAT $\alpha$ , SUC2, gal2, mal, mel, flo1, flo8-1, hap1, ho, bio1, bio6 (ATCC 204508).	ATCC
<b><i>S. pombe</i></b>		
KGY425	Cepa silvestre ( <i>h<sup>-</sup> his3-D1 leu1-32 ura4-D18 ade6-M210</i> ) Utilizada para los ensayos de complementación. ATCC 96115. Auxótrofa para uracilo.	ATCC
Sp. <i>sreI</i> <sup>-</sup>	Cepa mutante <i>sreI</i> <sup>-</sup> derivada de KGY425 ( <i>h<sup>-</sup>, his3-D1 leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 <math>\Delta</math>sreI::kanMX6</i> ). Utilizada para los ensayos de complementación. Resistente a G418 y auxótrofa para uracilo.	(Hudges y cols., 2005)
Sp. <i>sreI</i> <sup>-</sup> + EV	Cepa mutante <i>sreI</i> <sup>-</sup> . Contiene el plásmido pSLF102 (EV, <i>empty vector</i> ), utilizada para los ensayos de complementación. Resistente a G418.	Esta tesis
Sp. <i>sreI</i> <sup>-</sup> + <i>SREIN</i> <sub>Sp</sub>	Cepa mutante <i>sreI</i> <sup>-</sup> . Contiene el plásmido pEP145, utilizada para los ensayos de complementación. Resistente a G418.	Esta tesis
Sp. <i>sreI</i> <sup>-</sup> + <i>SREIN</i> <sub>Xd</sub>	Cepa mutante <i>sreI</i> <sup>-</sup> . Contiene el plásmido pSP102_Xd <i>SREIN</i> , utilizada para los ensayos de complementación. Resistente a G418.	Esta tesis
<b><i>X. dendrorhous</i></b>		
CBS 6938	Cepa silvestre haploide. Sensible a higromicina B y zeocina ATCC 96594.	ATCC
CBS <i>sreI</i> <sup>-</sup>	Cepa mutante <i>sreI</i> <sup>-</sup> derivada de CBS 6938. Resistente a zeocina.	Esta tesis
CBS <i>cyp6I</i> <sup>-</sup>	Cepa mutante <i>cyp6I</i> <sup>-</sup> derivada de CBS 6938. No produce ergosterol y sobreproduce carotenoides y esteroides totales. Resistente a higromicina B.	(Loto y cols., 2012)
CBS <i>cyp6I</i> <sup>-</sup> / <i>sreI</i> <sup>-</sup>	Cepa mutante <i>sreI</i> <sup>-</sup> derivada de CBS <i>cyp6I</i> <sup>-</sup> . Resistente a higromicina B y zeocina.	Esta tesis
CBS <i>gSREIN</i>	Cepa mutante <i>SREIN</i> derivada de CBS 6938 que contiene la versión genómica de los primeros 1.869 nucleótidos desde el codon de inicio del gen <i>SREI</i> (codifican la región N-terminal de Sre1) integrados en el <i>locus</i> de <i>SREI</i> . Resistente a zeocina.	Esta tesis

## 2.2. Determinación del crecimiento celular y biomasa

El crecimiento celular se determinó midiendo la densidad óptica del cultivo a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) con el espectrofotómetro UV-630 de JASCO cada 10 - 12 h durante al menos cinco días. Las curvas de crecimiento se realizaron por triplicado. Para ello, se inocularon matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 100 mL de medio YM con un cultivo de 48 h de crecimiento para alcanzar una  $DO_{600nm}$  inicial entre 0,1 - 0,2 UA. Los cultivos se incubaron a 22 °C con agitación constante a 150 rpm y luego de 120 h, se colectaron muestras de 50 mL para: i) determinar el peso seco de levadura en el cultivo (2 muestras de 2,5 mL), ii) extraer RNA (4 muestras de 5 mL), iii) extraer carotenoides (1 muestra de 20 mL), iv) extraer esteroides (1 muestra de 5 mL). Los precipitados de células se lavaron con agua destilada y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior procesamiento. La biomasa se determinó como el promedio del peso seco de levadura, para lo cual el precipitado celular de dos muestras de 2,5 mL de cultivo se secó a 80 °C por toda una noche (16 h aproximadamente) y luego se cuantificó la biomasa en una balanza analítica (Shimadzu).

Los parámetros de crecimiento como la tasa de crecimiento máxima y el tiempo generacional fueron estimados utilizando un mínimo de cinco datos a lo largo de la curva de crecimiento para cada cepa.

### **2.3. Técnicas de biología molecular**

Las técnicas de biología molecular como extracción de ácidos nucleicos, reacciones de PCR, digestiones de DNA con enzimas de restricción, reacciones de ligado de DNA entre otras, se realizaron de acuerdo a protocolos estándares (Sambrook y Russell., 2001), indicaciones de los proveedores o modificaciones estandarizadas en nuestro laboratorio, según se indique.

Los plásmidos utilizados y construidos en esta tesis se describen en la Tabla 2. Los oligonucleótidos diseñados en esta tesis fueron sintetizados por *Integrated DNA Technologies* (IDT) y se describen en la Tabla 3.

#### **2.3.1. Extracción de ácidos nucleicos**

##### **2.3.1.1. Extracción de DNA genómico de *X. dendrorhous***

Para la extracción de DNA genómico de la levadura se colectó un precipiado de células desde placas con cultivo fresco y se depositó en un tubo de 2 mL de tapa rosca que contenía 600  $\mu$ L de *buffer* TE (Tris HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8,0) y aproximadamente 200  $\mu$ L de perlas de vidrio de 0,5 mm (BioSpec). Luego se agregaron 600  $\mu$ L de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1) y se agitó en un homogenizador Mini- Beadmeater 16 (BioSpec) por 2 min. Posteriormente, se centrifugó por 5 min a 18.000 x g. La fase acuosa se transfirió a un tubo Eppendorf limpio de 1,5 mL, se agregó un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24: 1), se homogenizó en vórtex por 30 s y se centrifugó por 1 min a 18.000 x g. Nuevamente, el DNA presente en la fase acuosa fue traspasado a un tubo Eppendorf limpio de 1,5 mL y se agregó 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se mezcló y se dejó a -20 °C al menos por 2 h para la precipitación del DNA. Luego, se centrifugó a 18.000 x g por 10 min y se eliminó todo

etanol. El DNA precipitado se lavó con etanol al 70 % y se dejó secar a 37 °C por 5 min. Finalmente, el DNA se suspendió en 100 µL de *buffer* TE-RNasa A (Tris 10 mM; EDTA 1 mM, RNasa A 40 µg/ml, pH 8,0).

### **2.3.1.2. Extracción de DNA genómico de *S. cerevisiae* y *S. pombe***

Para la extracción de DNA de *S. cerevisiae* y *S. pombe* se centrifugaron 10 mL de cultivo a 5.000 x g por 5 min. El precipitado celular se lavó dos veces con agua destilada, se suspendió en 500 µL de *buffer* TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 20 mM) y se agregaron 200 µL de perlas de vidrio de 0,5 mm (BioSpec). Para la ruptura celular, la mezcla se agitó en vórtex durante 1 min y luego se incubó en hielo por 1 min, este paso se repitió dos veces. A continuación, a la mezcla se adicionaron 400 µL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1), se agitó en vórtex por 30 s y se centrifugó a 18.000 x g por 30 s. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se adicionaron 400 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24: 1), esta mezcla se homogenizó en vórtex por 30 s. Luego, se centrifugó a 18.000 x g durante 30 s y la fase acuosa se traspasó a un tubo limpio. Para precipitar el DNA se adicionó 1 mL de etanol al 100 % a la fase acuosa y se incubó a -20 °C por 2 h. Finalmente, se centrifugó por 10 min a 18.000 x g, se descartó completamente el etanol y el DNA precipitado se suspendió en 100 µL agua MilliQ grado biología molecular.

### **2.3.1.3. Extracción de RNA total, obtención de cDNA y análisis mediante RT-qPCR**

La extracción de RNA de *X. dendrorhous* se realizó de acuerdo con Chomczynski y Sacchi (1987). Brevemente, se tomó una muestra de 5 mL de un cultivo de la levadura

y se centrifugó a 4.000 x g por 5 min descartando el sobrenadante. El precipitado celular se suspendió en 200  $\mu$ L de solución de lisis (Acetato de Sodio 0,02 M a pH 5,5, SDS 0,5 % y EDTA 1 mM), se adicionó 100  $\mu$ L de perlas de vidrio de 0,5 mm (BioSpec) y se agitó por 1 min en un homogeneizador Mini-Beadbeater-16 (BioSpec). Luego se agregó 800  $\mu$ L de TRI Reagent (Ambion) y nuevamente se agitó en homogeneizador por 1 min e incubó en hielo por 10 min. Posteriormente, se adicionó 200  $\mu$ L de cloroformo, se agitó manualmente por 15 s y se incubó por 6 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 18.000 x g por 10 min a temperatura ambiente y se recuperó la fase acuosa a la que se le adicionó un volumen de isopropanol frío,  $\frac{1}{2}$  volumen de solución de precipitación (NaCl 1,2 M, citrato de sodio 0,8 M). La mezcla se incubó por 1 h a -20 °C y posteriormente se centrifugó por 10 min a 18.000 x g descartando el sobrenadante. El precipitado se lavó con 1 mL de etanol 70 % y se centrifugó por 5 min a 18.000 x g. Nuevamente se descartó el sobrenadante con una micro-pipeta para eliminar todo el etanol (cuando fue necesario, el precipitado se calentó a 37 °C hasta evaporar el etanol). El precipitado se suspendió en 30 - 60  $\mu$ L de agua MilliQ libre de nucleasas y la muestra de RNA obtenida se almacenó a -80 °C hasta su análisis. Para determinar la calidad del RNA extraído, se determinó la razón de absorbancias  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  de una alícuota (Sambrook y Russell, 2001). La concentración se determinó espectrofotométricamente en el equipo Epoch 2 con la microplaca Take 3 mediante el *software* Gene5 (BioTek Instruments).

La síntesis de cDNA, se realizó con 5  $\mu$ g de RNA total, 1,25  $\mu$ M de partidor oligo-dT, 0,5  $\mu$ M de dNTPs y 200 U de transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) en un volumen final de 20  $\mu$ L, según las indicaciones del fabricante de la enzima. La

determinación de los niveles de transcritos se realizó mediante qPCR de acuerdo con Livak, 2001 (Livak y Schmittgen., 2001) utilizando el kit SsoFast EvaGreen Supermix (Quantance) según las indicaciones del proveedor en un equipo Mx 3000P (Stratagene). La reacción se realizó en un volumen final de 20  $\mu$ L con 1  $\mu$ L de cDNA molde y 0,25  $\mu$ M de cada par de primers específico para cada gen (Tabla 3). A las parejas de primers utilizados se les determinó la eficiencia mediante una curva estándar con diluciones seriadas de cDNA. Los valores de Ct obtenidos se normalizaron con el valor respectivo del gen de actina [GenBank: X89898.1] (Wery y cols., 1996) y posteriormente expresados en función a la condición control.

#### **2.3.1.4. Extracción de DNA plasmidial de *E. coli***

La purificación de DNA plasmidial se realizó desde un cultivo *overnight* de *E. coli* con el kit comercial GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific Inc) de acuerdo con las indicaciones del proveedor.

#### **2.3.1.5. Purificación de DNA desde geles de agarosa**

Para la purificación de DNA desde geles de agarosa se utilizó el kit comercial GenCatch™ Gel Extraction (Epoch Life Science) siguiendo las indicaciones del fabricante.

### **2.4. Transformación mediante electroporación.**

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

La obtención de células electrocompetentes de *E. coli* se realizó mediante el protocolo descrito (Sambrook y Russell., 2001). Brevemente, se inocularon 500 mL de medio LB suplementado con ácido nalidíxico (15  $\mu$ g/mL) con 5 mL de cultivo *overnight*



de *E. coli* DH5 $\alpha$  y se incubó a 37 °C con agitación constante a 150 rpm hasta alcanzar un DO<sub>600nm</sub> entre 0,4 y 0,6 (2 h aproximadamente). Luego, las células se colectaron por centrifugación a 4.000 x g durante 10 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El precipitado de células se lavó dos veces con 200 mL de agua destilada estéril y fría, y luego con 20 mL de glicerol al 10 % estéril enfriado. Finalmente, las células se suspendieron en 2 mL de glicerol al 10 % y se almacenaron a -80 °C en alícuotas de 40  $\mu$ L hasta su utilización.

Para la transformación, se descongelaron lentamente las alícuotas de células y se agregó al tubo de células de 2 a 4  $\mu$ L de la reacción de ligado, previamente dializada por 10 min, o 1 ng de vector purificado, según correspondía. La mezcla de células y DNA se transfirió a una cubeta de electroporación de 2 mm de espesor mantenida en hielo y el pulso se realizó en el equipo Gene Pulser X Cell (BioRad) programado con las siguientes condiciones: 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$  y 2,5 kV. Posteriormente, a la cubeta se adicionó 1 mL de medio LB y la mezcla se traspasó a un tubo Eppendorf estéril y luego incubada por 1 h a 37 °C. Finalmente, se sembraron alícuotas en placas de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Las placas se incubaron a 37 °C hasta la aparición de colonias.

#### **2.4.2. Transformación de *X. dendrorhous***

Para la obtención de células electrocompetentes de *X. dendrorhous* se inocularon 100 mL de medio YM con 1 mL de un cultivo de 48 h de la levadura. El cultivo se incubó a 22 °C con agitación a 150 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> de 2 - 4 y las células se colectaron por centrifugación a 4.000 x g durante 5 min. El precipitado de células se

suspendió en 26 mL de *buffer* fosfato de potasio (50 mM, pH 7) con DTT (25 mM) y se incubó a 22 °C por 15 min. Luego las células se lavaron dos veces con 25 mL de *buffer* STM enfriado (270 mM sacarosa, 10 mM Tris-HCl pH 7,5 y 1 mM de MgCl<sub>2</sub>). Finalmente, las células se suspendieron en 500 µL de *buffer* STM y dividieron en fracciones de 60 µL para ser utilizadas inmediatamente.

A cada alícuota de células electrocompetentes se adicionó 10 µg de DNA transformante en un volumen de 6 µL. La mezcla de DNA y células se electroporó en cubetas de 2 mm mantenida en hielo y el pulso se realizó en el equipo Gene Pulser X Cell (BioRad) programado con las siguientes condiciones: 125 µF, 600 Ω y 450 V. Luego del pulso de electroporación a la cubeta se adicionó 1 mL de medio YM, la suspensión se traspasó a un tubo Eppendorf estéril y se incubó por 4 h a 22 °C. Finalmente, se sembraron alícuotas de 100 µL en placas con medio YM suplementado con el antibiótico respectivo para la selección de transformantes e incubadas a 22 °C hasta el desarrollo de colonias.

#### **2.4.3. Transformación de *S. cerevisiae* y *S. pombe***

La preparación de células electrocompetentes de *S. cerevisiae* y *S. pombe* se realizó de manera similar diferenciando las condiciones de cultivo y parámetros de electroporación para cada levadura. Se inoculó un matraz que contenía 50 mL de medio YEPD o YES con *S. cerevisiae* o *S. pombe*, respectivamente para cada medio. El matraz se incubó a 30 °C con agitación constante durante la noche. A continuación, al mismo cultivo se agregó 50 mL del respectivo medio de cultivo fresco y se incubó durante 4 h bajo las mismas condiciones. Transcurrido ese tiempo, las células fueron colectadas por centrifugación a 5000 x g por 5 min y se realizaron 3 lavados: dos veces con 50 mL de

agua destilada estéril y fría y uno con 25 mL de sorbitol 1 M. Finalmente, las células se suspendieron en 400  $\mu$ L de sorbitol 1 M y mantenidas a 4 °C en alícuotas de 40  $\mu$ L hasta su utilización durante el día.

La transformación se realizó mezclando una alícuota de células electrocompetentes de la respectiva levadura con un máximo de 10  $\mu$ L de DNA. Tanto para la transformación con DNA plasmidial como con fragmentos de DNA, la concentración final fue aproximadamente de 100 ng totales de cada uno. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 2 mm y el pulso eléctrico se realizó con el electroporador Gene Pulser X Cell (BioRad). Para *S. cerevisiae* los parámetros fueron: 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$  y 1,5 kV y para *S. pombe*: 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$  y 2,3 kV. Una vez dado el pulso, las células se suspendieron en 1 mL de medio YEPD o YES, respectivamente para cada levadura, y se incubaron a 30 °C por 1 h. Posteriormente, las células se lavaron una vez con sorbitol 1 M y se suspendieron en 1 mL de sorbitol 1 M luego se sembraron alícuotas de 100  $\mu$ L en placas con medio selectivo para cada transformación, de acuerdo con la sección 2.1.

## **2.5. Construcción de plásmidos**

Para la generación de las cepas mutantes de delección y de expresión de la porción del gen *SRE1* de *X. dendrorhous* que codifica el dominio activador de la transcripción

(Sre1N), fue necesario la construcción de los plásmidos pXd-*sreI*::zeo y pXd-g*SRE1N*-zeo, respectivamente (Tabla 2).

### **2.5.1. Construcción de plásmido para delección génica por reemplazo**

Para la delección del gen *SRE1* se construyó el plásmido pXd-*sreI*::zeo. Primero, se amplificaron independientemente 1.100 pb río arriba (UP) y 338 pb río abajo (DOWN) del gen utilizando como molde DNA genómico de la cepa silvestre CBS 6938 y los siguientes partidores: Sre\_Del1\_Out.F + 8\_Int3+HpaI.R y Sre1\_Down+HpaI.F + Sre\_Del2.R (Tabla 3). Luego, la región río arriba y río abajo del gen fueron unidas mediante *Overlap Extension* PCR (OE-PCR) (Horton y cols., 1989) incorporando entre ambas regiones un sitio de restricción para la enzima *HpaI* dado al diseño de los partidores. El producto del OE-PCR (UP-DOWN) se insertó en el sitio de corte de la enzima *EcoRV* del plásmido pBlueScrip (pBS). El plásmido resultante: pBS+UP-DOWN, fue digerido con la enzima *HpaI* y se ligó el módulo de resistencia a zeocina para *X. dendrorhous* (Loto y cols., 2012) obteniéndose el plásmido pXd-*sreI*::zeo. Para la transformación de *X. dendrorhous*, el plásmido pXd-*sreI*::zeo se digirió con las enzimas *XbaI* y *KpnI* para liberar el DNA transformante.

### **2.5.2. Construcción de módulo de expresión de Sre1N mediante DNA assembler**

Para reemplazar el gen *SRE1* de *X. dendrorhous* por la versión que solo codifica el dominio N-terminal (Sre1N) de la proteína, se construyó el plásmido pXd-g*SRE1N*-zeo

mediante la técnica de *DNA assembler* en *S. cerevisiae* (Kuijpers y cols., 2013). Primero, se amplificaron nueve fragmentos por PCR utilizando parejas de oligonucleótidos diseñados de manera tal que permitiera el ensamblaje *in vivo* mediante recombinación homóloga en *S. cerevisiae*. Los fragmentos amplificados por PCR fueron los siguientes, indicándose entre paréntesis las parejas de oligonucleótidos y DNA molde utilizados (Tablas 2 y 3): i) Origen de replicación 2 $\mu$  de *S. cerevisiae* (B.Fw + B.Rv, amplificado desde el plásmido pYES2), ii) Origen de replicación ColE1 y módulo de resistencia a ampicilina para *E. coli* (A.Fw + A.Rv, amplificado desde el plásmido pBS), iii) Módulo de resistencia kanMX6 (H.Fw + H.Rv, amplificado utilizando el plásmido pFA6a), iv) 829 pb río arriba del gen *SRE1* de *X. dendrorhous* (C.Fw + C.Rv, amplificado desde DNA genómico de la cepa CBS 6938), v) 1.869 pb desde el codón de inicio del gen *SRE1* de *X. dendrorhous* (SRE1\_ATG.Fw + SRE1N(stop)+term.Rv, amplificado desde DNA genómico de la cepa CBS 6938), vi) Epítoto 3xFLAG (D\_2.Fw + D\_2.Rv, amplificado utilizando el plásmido pFlagTEM1), vii) 338 pb del terminador del gen *SRE1* de *X. dendrorhous* (E\_Nt(stop).Fw + E.Rv, amplificado desde DNA genómico de la cepa CBS 6938), viii) Módulo de resistencia a zeocina para *X. dendrorhous* (F.Fw + F.Rv, amplificado desde el plasmido pIR-*zeo*) y ix) 500 pb de la región río abajo del gen *SRE1* de *X. dendrorhous* (G.Fw + G.Rv, amplificado desde DNA genómico de la cepa CBS 6938). La amplificación de cada uno de estos fragmentos fue evaluada mediante gel de agarosa al 1%. Posteriormente, se transformó la cepa S288c de *S. cerevisiae* con 100 ng de cada fragmento purificado desde el gel y los transformantes se seleccionaron mediante su crecimiento en presencia de G418 (200  $\mu$ g/mL). La recuperación de los plásmidos ensamblados se realizó mediante la extracción de DNA total de los transformantes y

posteriormente la transformación de *E. coli* con estos DNAs. Los plásmidos se purificaron desde *E. coli* y se evaluaron mediante PCR, análisis de restricción y secuenciación. Para liberar el DNA transformante para la transformación de *X. dendrorhous*, el plásmido pXd-*gSREIN-zeo* se digirió con las enzimas *HpaI*.

**Tabla 2: Plásmidos utilizados y/o construidos en esta tesis.**

Plásmidos	Características principales	Fuente y/o Referencia
pBlueScript SK <sup>-</sup> (pBS)	Plásmido para clonamiento (pUC Ori; Amp <sup>R</sup> con LacZ para la selección por color blanco o azul). Confiere resistencia a ampicilina.	Stratagene
pMN- <i>hph</i>	Plásmido derivado de pBS con módulo de resistencia a higromicina B ( <i>hyg<sup>R</sup></i> ) para <i>X. dendrorhous</i> .	(Niklitschek y cols., 2008)
pIR- <i>zeo</i>	Plásmido derivado de pBS con módulo de resistencia a zeocina ( <i>zeo<sup>R</sup></i> ) para <i>X. dendrorhous</i> .	(Loto y cols., 2012)
pBS+UP-DOWN	Plásmido derivado de pBS que contiene en el sitio <i>EcoRV</i> 1.100 pb río arriba (UP) y 338 pb río abajo (DOWN) del gen <i>SRE1</i> , y entre ellos posee un sitio de corte para <i>HpaI</i> .	Esta tesis
pXd- <i>sre1<sup>-</sup>::zeo</i>	Plásmido derivado de pBS+UP-DOWN que contiene en el sitio de <i>HpaI</i> el módulo de resistencia a zeocina entre las 1.100 pb río arriba y 338 pb río abajo del gen <i>SRE1</i> .	Esta tesis
pXd- <i>sre1<sup>-</sup>::hyg</i>	Plásmido derivado de pBS+UP-DOWN que contiene en el sitio de <i>HpaI</i> el módulo de resistencia a higromicina B entre las 1.100 pb río arriba y 338 pb río abajo del gen <i>SRE1</i> .	Esta tesis
pXd-g <i>SRE1N</i> - <i>zeo</i>	Plásmido construido por <i>DNA assembler</i> que contiene la versión genómica de los primeros 1.869 nucleótidos desde el codón de inicio del gen <i>SRE1</i> de <i>X. dendrorhous</i> (codifican el dominio activador de la transcripción de <i>Sre1</i> ) para la integración en el <i>locus</i> de <i>SRE1</i> . Confiere resistencia a zeocina.	Esta tesis
pYES2	Plásmido de expresión para <i>S. cerevisiae</i> . La expresión es regulada por el promotor <i>GALI</i> . Contiene el gen <i>URA3</i> para la selección de transformantes y el origen de replicación 2 $\mu$ .	Invitrogen

pFA6a	Plásmido que contiene los marcadores de selección <i>URA3</i> y <i>kanMX6</i> utilizados para la construcción de módulos mediante <i>DNA assembler</i> en <i>S. cerevisiae</i> .	(Onishi M et al., 2013 )
pFlagTEM1	Plásmido que contiene el <i>tag FLAG3X</i> utilizado para la construcción de módulos mediante <i>DNA assembler</i> en <i>S. cerevisiae</i> .	(Raffatellu et al., 2005)
pSFL102	Plásmido de expresión para <i>S. pombe</i> . Expresión regulada por el promotor CaMV y el operador <i>tet</i> . Marcador de selección de transformantes <i>URA4</i> .	(Forsburg y cols., 1993)
pEP145	Plásmido derivado de pSLF102 que contiene 1.300 pb que codifican el dominio N-terminal de Sre1 de <i>S. pombe</i> (440 aa).	Esta tesis
pSP102_ <i>XdSRE1N</i>	Plásmido derivado de pSLF102 que contiene 1.869 pb que codifican el dominio N-terminal de Sre1 de <i>X. dendrorhous</i> (520 aa).	Esta tesis
pET-TEV	Plásmido de expresión para <i>E. coli</i> derivado de pET-28a(+), adiciona un sitio de corte para la proteasa TEV (Tobacco Etch Virus). Genera una proteína de fusión con una cola de 6X-His y la proteína de interés. Posee el marcador de selección <i>kanMX6</i> .	Esta tesis
pET-TEV + <i>XdSRE1N</i>	Plásmido derivado de pET-TEV que contiene 1.869 pb que codifican el dominio N-terminal de Sre1 de <i>X. dendrorhous</i> (520 aa).	Esta tesis
pET-TEV + <i>XdSRE1_bHLH</i>	Plásmido derivado de pET-TEV que contiene 387 pb que codifican el motivo de unión a DNA bHLH de Sre1 de <i>X. dendrorhous</i> (129 aa).	Esta tesis
pET-TEV+ <i>Sp_SRE1_bHLH</i>	Plásmido derivado de pET-TEV que contiene 330 pb que codifican el motivo de unión a DNA bHLH de Sre1 de <i>S. pombe</i> (110 aa).	Esta tesis

---



**Tabla 3: Oligonucleótidos diseñados y/o utilizados en esta tesis.**

Nombre	Secuencia 5' a 3'	Secuencia blanco
<b>Delección del gen <i>SRE1</i></b>		
Sre_Del1_Out.F	CCAAGACGAGAGAGGGACAAAAC	promotor <i>SRE1</i>
8_Int3+HpaI.R	CTAGATCAGAGTTAACCGCACATCAATTCGAACAGC	promotor <i>SRE1</i>
Up2.Fw	GGGGAAGACTCGGAAGAGAA	promotor <i>SRE1</i>
Sre1_Down+HpaI.F	TTGATGTGCGGTTAACTCTGATCTAGTTTCCTTTTA	terminador <i>SRE1</i>
Sre_Del2.R	TCCAAGCGCTGATCGAAAGGTT	terminador <i>SRE1</i>
Sre_Del2_Out.R	TGTGACAGACGAGACCAAGAACAG	terminador <i>SRE1</i>
TEF.F	CGGCTCATCAGCCGACAGTTCA	promotor <i>EF-1<math>\alpha</math></i>
Pef.R	TGAAGCTGTTTCGAGA	promotor <i>EF-1<math>\alpha</math></i>
gpdT.F	ACGGTTCTCTCCAAA	terminador <i>gpd</i>
GPD.R	ATGAGAGATGACGGAGATGAT	terminador <i>gpd</i>
<b>Complementación en <i>S. pombe</i></b>		
Sre1.F+HpaI	TTTTTTGTAAACATGGAAGACCTGTTCGAAG	gen <i>SRE1</i> <i>Xd</i>
Sre1.R+SphI	TTTTTTGCATCGTCAGCGTTTTGATGGGCC	gen <i>SRE1</i> <i>Xd</i>
Sre1_Nc+SpHl.R	TTTTTTGCATCGTCAGGGGTGGTGGCGGTGGAGGGGG	gen <i>SRE1</i> <i>Xd</i>
SP231	GCGGATCCATGCAAAGCTCAATTCCG	gen <i>SRE1</i> <i>Sp</i>
SP232	GATCGTCGACTTATGGAGACATAAGAAAAGG	gen <i>SRE1</i> <i>Sp</i>
<b>DNA assembler</b>		
A.Fw	TATCATGCGTCAATCGTATGTGAATGCTGGTCGCTATACTGG CATTAAAGCGCGGCGGGTG	pBS
A.Rv	AGTCCGTGGAATTAATTCTCATCTTTGACAGCTTATCATCGAT AAGTGCGCGGAACCCCT	pBS
B.Fw	GAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACT TATCGATGATAAGCTGTC	pYES2
B.Rv	ACGTCCTTCGTAGTTTTGTCCCTCTCTCGTCTTGGGTAAACCA TTGCGAATACCGCTTCC	pYES2
C.Fw	TACTTTTGAGCAATGTTTGTGGAAGCGGTATTTCGCAATGGTT AACCCAAGACGAGAGAGG	promotor <i>SRE1</i>
C_2.Rv	ATATCATGATCTTTATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTCCA TTGTGTGTGTGTGGG	promotor <i>SRE1</i>
D_2.Fw	CCATAGATAAGCACACCCACACCCACACACACACAATGG ACTACAAAGACCATGACGG	pFlagTEM1

D_2.Rv	TCGAACCGGAATGGATCTTTTTCTTCGAACAGGTCTTCCATTT TATCGTCGTCATCTTTG	pFlagTEM1
E_Nt (stop).Fw	AGTGACGGCCACCGTCACCACCCTACCGCTGCCACCTGATC TGATCTAGTTTCCTTTTA	terminador <i>SRE1</i>
E.Rv	CAAAGAGCTTGTGTCCGATGAACTGTCCGGCTGATGAGCCGAT TGGGCAGACGGAAGCATG	terminador <i>SRE1</i>
F.Fw	TACTGTCTCGATCTGCTTTCATCTTTTCATGCTTCCGTCTGCCC AATCGGCTCATCAGCC	pIR- <i>zeo</i>
F.Rv	AAAGACAAAAGGAAGAGAAAAATAAAAGGAAACTAGATC AGAATCATGAGAGATGACGG	pIR- <i>zeo</i>
G.Fw	TCACATCTGTTGACCATCACCATCATCTCCGTCTCTCTCATG ATTCTGATCTAGTTTCC	terminador <i>SRE1</i>
G.Rv	GTCAAGACTGTCAAGGAGGGTATTCTGGGCCTCCATGTCGTT AACTCCAAGCGCTGATCG	terminador <i>SRE1</i>
H.Fw	TCAATCTATCATATGTAACCTTTCGATCAGCGCTTGGAGTTA ACGACATGGAGGCCAG	pFA6a
H.Rv	GCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAAT GCCAGTATAGCGACCAG	pFA6a
SRE1_ATG. Fw	ATAAAGATCATGATATCGACTACAAAGATGACGACGATAAA ATGGAAGACCTGTTTCAAG	gen <i>SRE1</i>
SRE1- N(stop)+term .Rv	AAAAAGGAAGAGAAAAATAAAAGGAAACTAGATCAGATCA GGTGGCAGCGGTAGTGGTGG	gen <i>SRE1</i>

#### Análisis de RT-qPCR

mactF-RT	CCGCCCTCGTGATTGATAAC	gen <i>ACT</i>
mactR-RT	TCACCAACGTAGGAGTCCTT	gen <i>ACT</i>
crtR_RT.F	TGTGTTTGGCCTGGGAAACAAGAC	gen <i>crtR</i>
crtR_RT.R	TGTCGTAACCGAGGTTTCTTAACCA	gen <i>crtR</i>
crtS_RT.F	TATCTCTGGACCCAGAGCTTGC	gen <i>crtS</i>
crtS_RT.R	ACCTGCAAACGCATCTGGTAC	gen <i>crtS</i>
HMGR_Real _2_F	GGCCGATCGCTATACATCCGTTT	gen <i>HMGR</i>
HMGR_Real _2_R	ATGCAGTTGATGGCAGAAGGCT	gen <i>HMGR</i>
hmgS_RT2.F	AAGCAGGTTGAGCCTGGAATGA	gen <i>HMGS</i>
hmgS_RT2.R	AAAGCGGTTGAGCTCTTGACCT	gen <i>HMGS</i>
RT3_SRE1.F w	GAGAAAATCACGAATGGATCAGC	gen <i>SRE1</i>
RT3_SRE1.R v	GGGTAAGGGCATGAGGTTG	gen <i>SRE1</i>

---

## 2.6. Extracción de carotenoides totales y análisis mediante RP-HPLC.

La extracción de carotenoides totales se realizó con acetona según el método descrito por An y colaboradores (An y cols, 1989). Para ello, se colectó el precipitado celular de 15 mL de cultivo mediante centrifugación a 5.000 x g por 5 min, las células se lavaron con 5 mL de agua destilada y se traspasaron a un tubo de 7 mL con tapa rosca. El precipitado de células se suspendió en 1 mL de agua destilada con 500  $\mu$ L de perlas de vidrio de 0,5 mm (BioSpec). La muestra se agitó durante 3 min en un homogeneizador Mini-Beadbeater-16 (BioSpec), se agregó 1 mL de acetona y nuevamente se llevó al homogeneizador durante otros 3 min. El homogeneizado se centrifugó a 5.000 x g por 5 min y se recolectó el sobrenadante en un tubo tipo Falcon de 15 mL limpio. Al tubo con los restos celulares se le agregaron 2 mL de acetona, se agitó por 3 min, se centrifugó a 5.000 x g por 5 min y se recuperó el sobrenadante en el mismo tubo anterior. Las extracciones con 2 mL de acetona se repitieron hasta que el extracto celular fuese incoloro juntando todos los sobrenadantes en un mismo tubo. Posteriormente, se agregó 1/5 del volumen final de sobrenadante recuperado de éter de petróleo, se mezcló y se centrifugó por 5 min a 5.000 x g. La fase superior (éter de petróleo donde se encontraban disueltos los carotenoides) se transfirió a un tubo de vidrio y se determinó su absorbancia a 465 nm. La cantidad de carotenoides se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Total de carotenoides}(\mu\text{g/g peso seco}) = \frac{(v \text{ éter})(A)(100)}{(\varepsilon)(\text{peso seco levadura})}$$

Donde: A= Absorbancia a 465 nm,  $v \text{ éter}$ = volumen de éter de petróleo recuperado (mL) y  $\varepsilon$ = coeficiente extinción 100 % = 21 (An y cols, 1989).

A continuación, se dejó evaporar totalmente el éter de petróleo del extracto de carotenoides a temperatura ambiente, cubriendo los tubos con papel aluminio, y una vez que el tubo estaba seco, los carotenoides se disolvieron en acetona (100 - 200  $\mu\text{L}$ ). La composición de pigmentos se determinó mediante cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC, Shimatzu SPD-M10VP) en un equipo con detector con arreglo de diodos, usando una columna Lichrospher RP18 125-4 (Merck) y como fase móvil, una mezcla de acetonitrilo: metanol: isopropanol (85: 10: 5) con un flujo de 1 mL/min. Cada pigmento se identificó de acuerdo con su tiempo de retención y su espectro de absorción, en comparación a estándares (Britton y cols., 2004).

### **2.7. Extracción de esteroides totales y análisis mediante RP-HPLC.**

La extracción de esteroides se realizó según el protocolo descrito previamente por Shang y colaboradores (Shang y cols., 2006 y Cheng y cols., 2010). Brevemente, se colectó el precipitado celular de 5 mL de cultivo y se agregó 4 g de KOH y 16 mL de etanol 60 %, se mezcló y se incubó a 80 °C a baño María por 2 h (saponificación). Luego, los esteroides no saponificables fueron extraídos con 10 mL de éter de petróleo y se cuantificaron espectrofotométricamente a 282 nm. Para la cuantificación de los esteroides, se utilizó el coeficiente de extinción molar 11.900  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  (Shang y cols., 2006). Posteriormente, se dejó evaporar completamente el éter de petróleo del extracto de esteroides, los cuales se disolvieron en 100  $\mu\text{L}$  de acetona. La composición se determinó mediante cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC, Shimatzu SPD-M10VP), usando una columna Lichrospher RP18 125-4 (Merck) utilizando como estándar

ergosterol comercial (Sigma-Aldrich, CAS No. 57-87-4). Como fase móvil se utilizó una mezcla de metanol: agua (97: 3) con un flujo de 1 mL/min.

## **2.8. Expresión heteróloga de genes y purificación de proteínas en *E. coli***

Para la producción heteróloga de distintas versiones de la proteína Sre1 de *X. dendrorhous* y de *S. pombe*, se utilizó la cepa de *E. coli* BL21(DE3)*pLys*. Se obtuvieron las cepas recombinantes mediante transformación por electroporación con los siguientes plásmidos: pET-TEV+ *XdSRE1N*, pET-TEV+ *XdSRE1\_bHLH* y pET-TEV+ *Sp\_SRE1\_bHLH* (Tabla 2), corroborándose la presencia de dichos plásmidos por PCR. Para obtener las proteínas se sembró una colonia de cada cepa en 7 mL de medio LB con kanamicina (50 µg/mL), y se incubó a 37 °C durante la noche con agitación constante. Posteriormente, se inoculó utilizando 1 mL del cultivo anterior (pre-inoculo) en 100 mL de medio LB con kanamicina (50 µg/mL) y se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> de 0,6 (alrededor de 3 h). Luego, el cultivo se dividió en dos matraces: a uno se le agregó IPTG (100 mM) y al otro se dejó sin inducir como control. Estos cultivos se incubaron durante la noche a 22 °C con agitación constante. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 5.000 x g por 10 min y las células se lavaron dos veces con agua destilada. El precipitado celular se suspendió en *buffer* de lisis (Tris 20 mM, NaCl 50 mM, Imidazol 20 mM a pH 8). La lisis celular se realizó mediante sonicación a frecuencia máxima durante 5 ciclos de 10 s manteniendo la muestra en hielo. A continuación, el homogenizado se centrifugó a 14.000 x g por 10 min a 4 °C rescatándose la fracción soluble (sobrenadante) e insoluble y se evaluó la extracción de proteínas mediante SDS-PAGE. La purificación se realizó desde la fracción insoluble mediante columna de Ni<sup>+2</sup>:

primero la proteína fue cargada en la columna, luego denaturada con cloruro de guanidina 6 M, en seguida se replegó pasando por la columna un gradiente de urea de 8 a 0 M en *buffer* salino.

Cada fracción recuperada fue cuantificada mediante el método BSA de acuerdo con las indicaciones del proveedor. La integridad y pureza de la proteína obtenida se evaluó mediante SDS-PAGE bipartito con una región concentradora al 5 % (Tris-HCl, pH 6,8) y una separadora al 10 % (Tris-HCl, pH 8,8) en un *buffer* Tris-Glicina. Finalmente, el gel se tiñó con azul de Coomassie.

### **2.9. Ensayos de Cambio de la Movilidad Electroforética (EMSA)**

Los ensayos EMSA permiten detectar cambios en la migración electroforética de fragmentos de DNA por su interacción con una proteína. Para estos ensayos, se utilizaron tres tipos de sondas marcadas con Biotina en ambos extremos diseñadas a partir del análisis *in silico* de la zona promotora del gen *HMGS* de *X. dendrorhous*. Las mezclas de reacción y revelado se realizaron de acuerdo con las indicaciones del proveedor del kit LightShift Chemiluminescent EMSA Kit (ThermoFisher Scientific).

## 2.10. Secuenciación y análisis bioinformático.

La secuenciación de plásmidos y fragmentos de DNA se realizó a través del servicio externo Macrogen Korea. El análisis de estas secuencias se realizó mediante las herramientas Geneious v10 (Kearse y cols., 2012), CLC Genomic Workbench v10 (CLC Bio, Aarhus, Denmark) y los programas disponibles en línea como BLAST y ORF Finder del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Para la identificación de los posibles genes de los componentes de la vía SREBP en *X. dendrorhous*, se analizó la base de datos del genoma y transcriptoma de la cepa UCD 67-385 disponibles en nuestro laboratorio (Baeza y cols., 2015).

La búsqueda de elementos SRE se realizó sobre regiones promotoras de genes de la vía del mevalonato, biosíntesis de carotenoides y esteroides, previamente identificados en nuestro laboratorio. Para ello, se analizaron 1.000 pb río arriba del codón de inicio de la traducción de estos genes con los programas TFBIND y JASPAR *scan* utilizando las bases de datos TRANSFAC y JASPAR, respectivamente, para cada herramienta. Se utilizó como umbral de puntuación mayor o igual a 80 % para cada matriz de peso posicional (*Positional Weight matrices*, PWM) favoreciendo la sensibilidad y especificidad del análisis. Además, se descartaron aquellas secuencias identificadas en la hebra anti-sentido, dado que en *S. pombe* se demostró que las posibles secuencias SRE identificadas en la hebra anti-sentido de varios genes presentan una muy baja o nula unión al factor de transcripción *in vitro* (Todd y cols., 2006).

Los análisis de RNAseq se realizaron a las cepas CBS 6938, CBS.*sreI*<sup>-</sup>, CBS.*cyp6I*<sup>-</sup>, CBS.*cyp6I*<sup>-</sup>/*sreI*<sup>-</sup> y CBS.*gSREIN* cultivadas por triplicado a 22 °C en medio completo YM por 40 h bajo normoxia (21 % O<sub>2</sub>). Paralelamente, luego de 36 h de crecimiento bajo las condiciones antes mencionadas, cultivos de las cepas CBS 6938 y CBS.*sreI*<sup>-</sup> fueron sometidos a las siguientes condiciones: i) hipoxia (2 – 3 % O<sub>2</sub> en *Anaerobic Chamber* Coy Lab Products) o ii) suplementadas con CoCl<sub>2</sub> (400 μM), ambas durante 4 h. La extracción de RNA se realizó según el método descrito en la sección 2.3.1.3 y la integridad de las muestras de RNA se evaluó mediante el equipo BioAnalyzer 2100 (Agilent). La construcción de las librerías y secuenciación masiva fue realizada por el Centro Nacional para el Análisis Genómico de Barcelona, España. Brevemente, para la construcción de las librerías se utilizó el kit TruSeq Stranded mRNA (Illumina) con un tamaño de fragmento de 75 pb y la secuenciación se llevó a cabo mediante lecturas *paired-end* en la plataforma HiSeq 2000 System (Illumina). Para el conteo de *reads* de los doce transcriptomas obtenidos, se utilizó el alineador de la herramienta RNAseq *analysis* del software CLC Genomics Workbench v10 para mapear los *reads* sobre los 6.385 posibles secuencias codificantes (CDS) de la cepa CBS 6938 de *X. dendrorhous* determinadas previamente (Sharma y cols., 2015). Para la determinación de los genes diferencialmente expresados (DEGs), el conteo total de *reads* alineados por cada CDS fue analizado mediante la herramienta DESeq2 de R Bioconductor teniendo en consideración una tasa de descubrimiento de eventos falsos menor a 1% (FDR < 0,01) (Love y cols., 2014).



### 3. RESULTADOS

---

#### **3.1. Identificación y caracterización bioinformática de los genes ortólogos de la vía SREBP presentes en *X. dendrorhous* y determinación de la existencia de elementos SRE en la región promotora de genes que participan en la biosíntesis de carotenoides y ergosterol.**

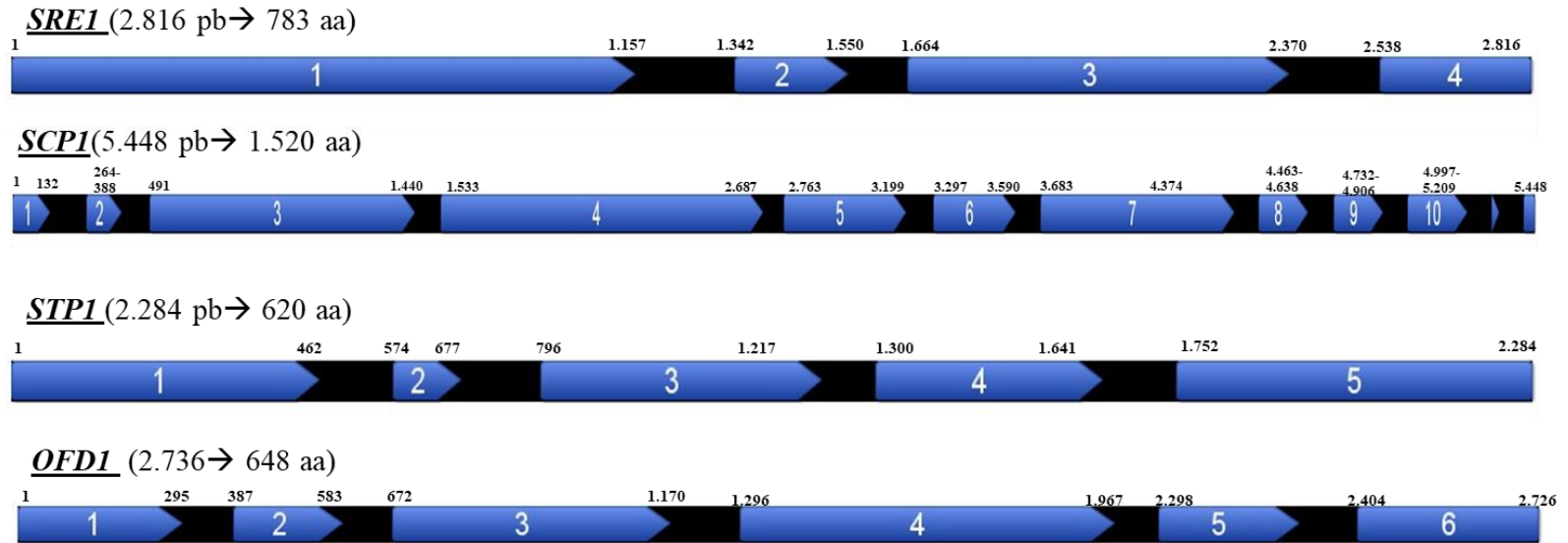
Este objetivo se desarrolló completamente *in silico* de manera de tener la primera aproximación de una posible funcionalidad de la vía SREBP en *X. dendrorhous*. Para abordar los resultados obtenidos se dividieron en dos partes:

##### **3.1.1. Parte I: Identificación y caracterización bioinformática de los genes ortólogos de la vía SREBP presentes en *X. dendrorhous*.**

En primer lugar, se realizó una búsqueda en el genoma y transcriptoma de la levadura disponibles en nuestro laboratorio que corresponden a la cepa UCD 67- 385 (Baeza y cols., 2015) de los posibles genes que codificarían componentes de la vía SREBP en *X. dendrorhous* mediante la herramienta BLAST. Para ello, se utilizó las secuencias nucleotídicas de los genes *SRE1*, *SCPI*, *INS1*, *SIP*, *STPI(S2P)* y *OFD1* disponibles en GeneBank de diversos organismos como: *S. pombe* [NP\_595694, NP\_596673, NP\_587813, NP\_596087], *C. neoformans* [XP\_567526, XP\_569410, XP\_571333,

XP\_566748], *A. fumigatus* [XP\_749262, XP\_752057, XP\_755813] y *Candida albicans* [XP\_712449, XP\_711450] (Chang y cols., 2007; Willger y cols., 2008; Bien y Espenshade., 2010). Luego, la comparación entre la versión genómica y transcriptómica de cada secuencia permitió determinar la estructura génica de las secuencias identificadas y establecer los dominios conservados de los productos proteicos que codificarían. A pesar del bajo porcentaje de identidad a nivel nucleotídico y aminoacídico deducido que existe entre las secuencias, se logró identificar posibles genes que codificarían homólogos a Sre1 (*SRE1*), Scp1 (*SCPI*), Stp1 (*STPI*) y Ofd1 (*OFDI*). En la Figura 3 se presenta la estructura génica y tamaño de cada uno de ellos. No fue posible identificar un gen ortólogo para Ins1, lo que coincide con lo descrito en otras levaduras basidiomicetes. De los genes identificados, *SRE1* tiene un tamaño de 2.816 pb formado por 4 exones y 3 intrones; el análisis de su secuencia de cDNA reveló la presencia de un ORF de 2.352 pb cuyo producto proteico sería de 783 aa. El posible gen *SCPI* tiene un tamaño de 5.448 pb cuyo ORF es de 4.443 pb y codificaría una proteína de 1.417 aa. El gen *STPI* presenta un tamaño de 2.284 pb con un ORF de 1.863 y la proteína que codificaría sería de 620 aa. Finalmente, el gen *OFDI* tiene un tamaño de 2.532 pb, un ORF de 1.947 pb y la proteína codificada sería de 648 aa. Se determinaron los porcentajes de identidad entre las secuencias aminoacídicas que codificaría cada gen dado que la divergencia de secuencias nucleotídicas por mutaciones o recombinaciones es mucho más rápida. Los resultados obtenidos de los alineamientos de las probables proteínas de *X. dendrorhous* con los ortólogos más cercanos en otras especies muestran en general un bajo porcentaje de identidad entre ellos. Sin embargo, los mayores porcentajes de identidad de las proteínas se dieron con los ortólogos de la levadura *C. neoformans* que pertenece al mismo *phylum*

de *X. dendrorhous* (Figura 4). Con esta información se diseñaron oligonucleótidos para amplificar la versión genómica y de cDNA del gen *SREI* de la cepa CBS 6938, que luego se insertaron en el plásmido pBS, resultando los plásmidos pBS-*cSREI* y pBS-*gSREI*. El análisis de las secuencias nucleotídicas de los plásmidos obtenidos reveló una diferencia en dos posiciones con respecto a la cepa UCD 67-385, el gen *SREI* de la cepa CBS 6938 presenta una A en lugar de una G en la posición 1.378 de y una T en lugar de una G en la posición 1.656. Finalmente, estas diferencias nucleotídicas de las secuencias del gen *SREI* entre ambas cepas se traducirían en la diferencia de un residuo aminoacídico en la posición 460 donde la cepa CBS 6938 posee un residuo de alanina y la cepa UCD 67-385 uno de treonina.



**Figura 3. Estructura intron-exon de los genes ortólogos de los componentes de la vía SREBP identificados en *X. dendrorhous*.**

**SRE1**

	<i>X. dendrorhous</i>	<i>S. pombe</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. albicans</i>
<i>X. dendrorhous</i>		12,8%	15,8%	10,8%	9,7%
<i>S. pombe</i>	12,8%		13,2%	18,5%	16,1%
<i>C. neoformans</i>	15,8%	13,2%		11,7%	10,7%
<i>A. fumigatus</i>	10,8%	18,5%	11,7%		14,8%
<i>C. albicans</i>	9,7%	16,1%	10,7%	14,8%	

**SCPI**

	<i>X. dendrorhous</i>	<i>S. pombe</i>	<i>C. neoformans</i>
<i>X. dendrorhous</i>		9,3%	15,5%
<i>S. pombe</i>	9,3%		13,2%
<i>C. neoformans</i>	15,5%	13,2%	

**OFDI**

	<i>X. dendrorhous</i>	<i>S. pombe</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>A. fumigatus</i>
<i>X. dendrorhous</i>		28,5%	43,1%	34,1%
<i>S. pombe</i>	28,5%		25,6%	31,1%
<i>C. neoformans</i>	43,1%	25,6%		41,1%
<i>A. fumigatus</i>	34,1%	31,1%	41,1%	

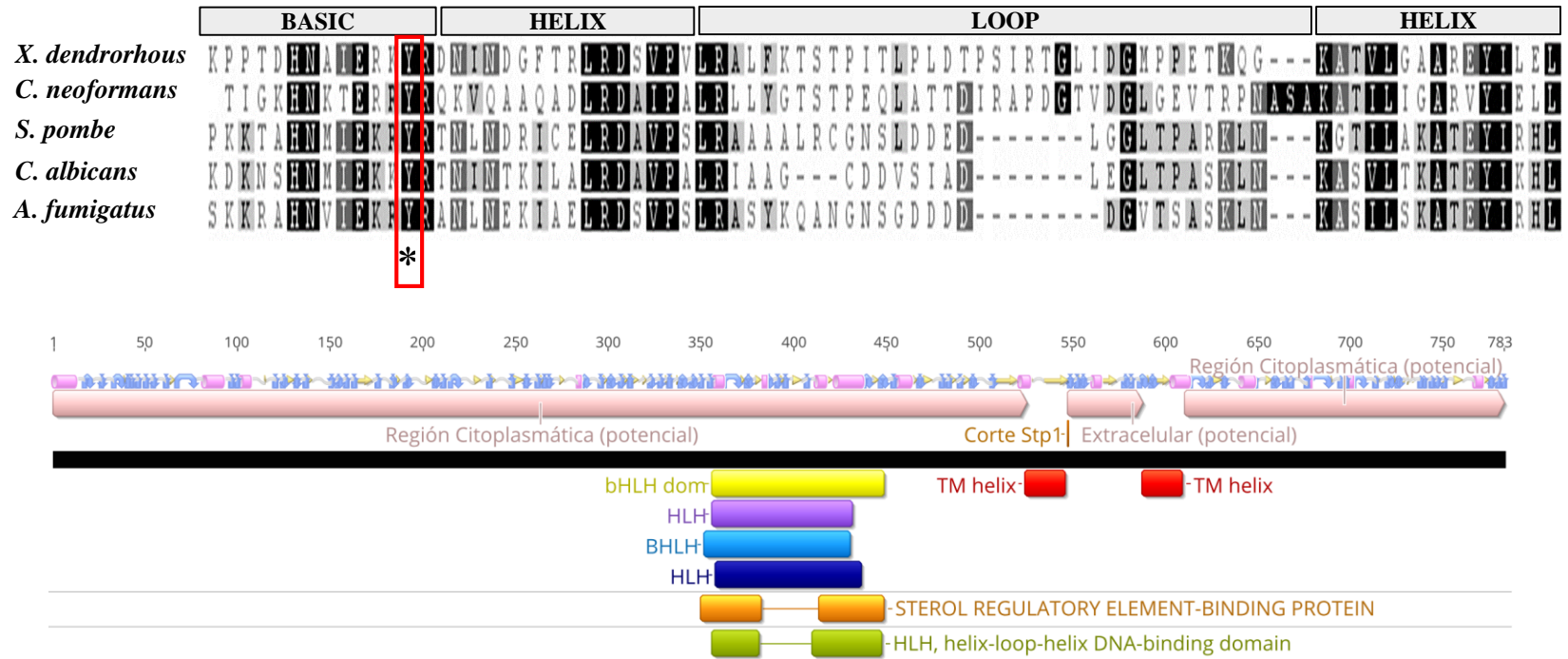
**STPI**

	<i>X. dendrorhous</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>C. neoformans</i>
<i>X. dendrorhous</i>		19,7%	23,9%
<i>H. sapiens</i>	19,7%		15,8%
<i>C. neoformans</i>	23,9%	15,8%	

**Figura 4. Porcentaje de identidad entre los homólogos de la Vía SREBP de *X. dendrorhous* y otros organismos.** Los porcentajes de identidad se obtuvieron del alineamiento de las secuencias aminoácidas deducidas de los homólogos identificados con la de otros organismos mediante la matriz de sustitución BLOSUM62.

La identificación de los posibles genes que codificarían los componentes de la vía SREBP en *X. dendrorhous* hacen suponer la funcionalidad de esta vía en la levadura. Particularmente, esta tesis se centró en caracterizar funcionalmente al regulador transcripcional Sre1, dado que corresponde al componente central para el funcionamiento de la vía al ser la proteína que ejerce la función de interactuar directamente con el DNA. Cabe mencionar que el estudio del resto de los componentes identificados fue abordado en otros trabajos de nuestro laboratorio.

La búsqueda de dominios conservados de la proteína Sre1 de *X. dendrorhous* se realizó mediante la herramienta Geneious 10.1.3v junto con las bases de datos Pfam, Gen3D, Prosite y Panther. Sre1 presenta los elementos característicos de la familia de factores de transcripción del tipo SREBP y dentro de ellos, se identificó el motivo de unión al DNA del tipo bHLH que se une al elemento *cis* SRE en el dominio activador de la transcripción (dominio N-terminal, Sre1N). Particularmente, en el motivo bHLH de Sre1 se identificó el residuo aminoacídico de tirosina conservado y característico que distingue a los factores de transcripción SREBP de otros del tipo bHLH (Figura 5 A). Además, en el dominio N-terminal de Sre1 se identificó la región rica en serina y prolina que antecede al motivo bHLH que comprende un 35 % del total de aminoácidos del dominio N-terminal. El análisis de la estructura secundaria y el perfil de hidrofobicidad mediante TMHMM de Sre1, reveló dos posibles regiones transmembrana entre los aminoácidos 525-547 (TM1) y 588-613 (TM2) (Figura 5 B), tal como se ha descrito en otros organismos.



**Figura 5. Análisis de la secuencia aminoacídica codificada por el gen *SRE1* de *X. dendrorhous*.** A) Alineamiento de los dominios de unión a DNA (bHLH) de Sre1 de diferentes hongos. \*: residuo de tirosina conservado B) Representación de los dominios conservados mediante las bases de datos: Gene 3D (amarillo), Pfam (lila), Prosite (Celeste), SART (verde), Panther (naranja), TMHMM (rojo).

### 3.1.2. Parte II: Determinación de la existencia de elementos SRE en la región promotora de genes que participan en la biosíntesis de carotenoides y ergosterol en *X. dendrorhous*.

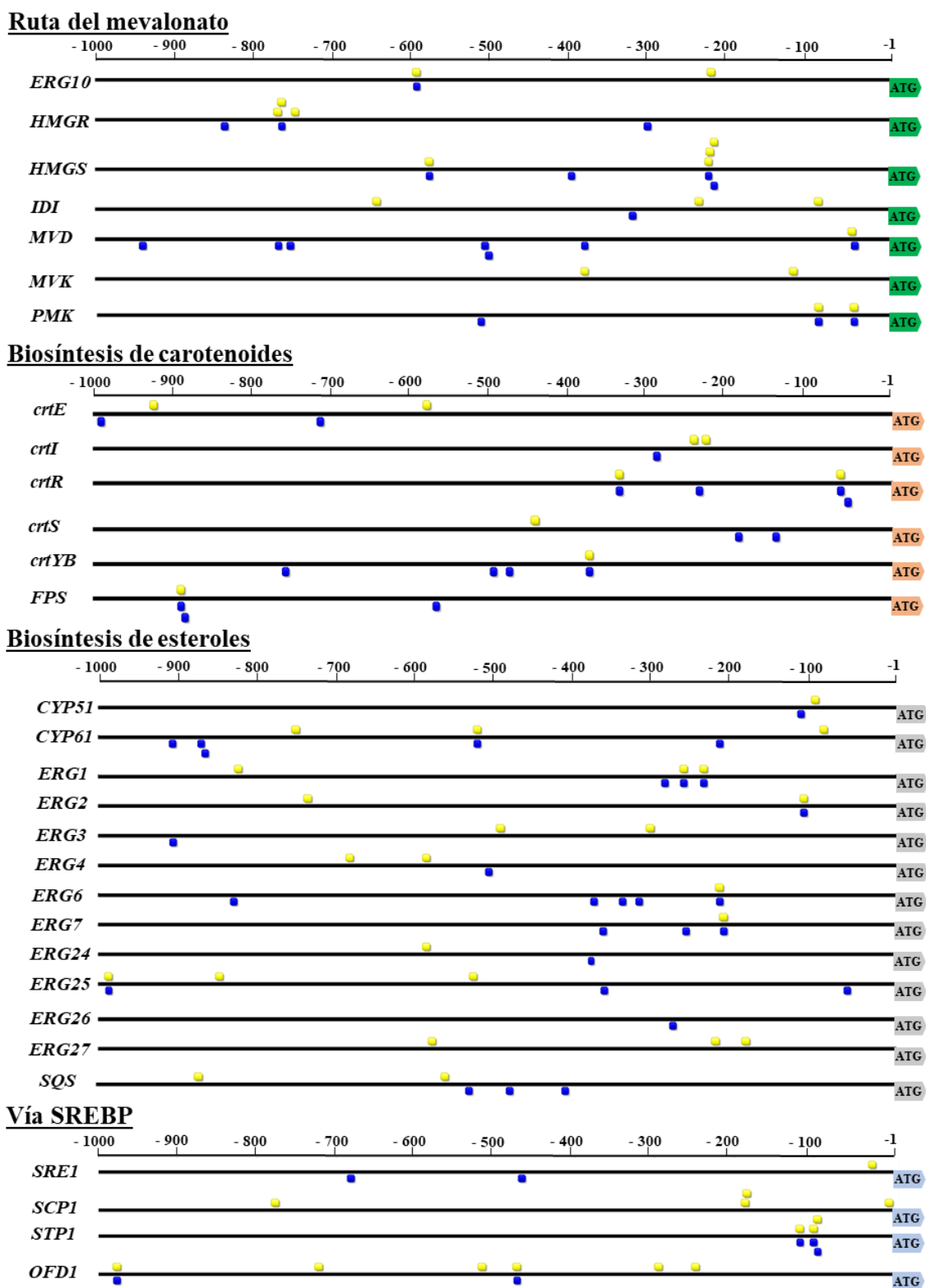
Con el objetivo de caracterizar *in silico* la participación de la vía SREBP en la regulación de la expresión génica de la síntesis de carotenoides y ergosterol en *X. dendrorhous*, se analizaron aproximadamente 1.000 pb río arriba del codón de inicio de la traducción de genes involucrados en ambas vías buscando en sus zonas promotoras la presencia de elementos regulatorios SRE.

Se evaluaron las zonas promotoras de los siguientes genes de la vía del mevalonato: *ERG10*, *HMGS*, *HMGR*, *MVK*, *PMK*, *MVD* e *idi*; de la biosíntesis de carotenoides: *FPS*, *crtE*, *crtI*, *crtYB*, *crtR* y *crtS*; y síntesis de esteroides: *SQS*, *ERG1*, *ERG7*, *CYP51*, *ERG24*, *ERG25*, *ERG26*, *ERG27*, *ERG6*, *ERG2*, *ERG3*, *CYP61* y *ERG4*; además, para evaluar una posible regulación de *feedback* positivo del factor de transcripción Sre1, se analizaron las zonas promotoras de los genes que codificarían posibles componentes de la vía SREBP en *X. dendrorhous*: *SRE1*, *SCPI*, *STP1* y *OFD1* (Figura 6).

Con la base de datos JASPAR se identificaron posibles secuencias SRE en la mayoría de los genes estudiados excepto en *ERG27* y *SCPI*. De modo similar, al utilizar el programa TFBIND se identificaron posibles elementos SRE en casi todos los genes estudiados, excepto en *ERG26* (Tabla 4). Posteriormente, dado el gran número de posibles secuencias SRE identificadas, se seleccionaron aquellas secuencias que fueron identificadas con ambos programas y que se encontraran en la misma posición de la zona



promotora (Tabla 4, nombre de genes y secuencias subrayadas). De las 40 zonas promotoras analizadas solo fue posible identificar, bajo los criterios antes mencionados, posibles elementos SRE en los genes: *STP1*, *OFD1*, *ERG10*, *HMGR*, *HMGS*, *PMK*, *crtR*, *crtYB*, *FPS*, *CYP61*, *ERG1*, *ERG2*, *ERG6*, *ERG7* y *ERG25*. Con estas secuencias se realizó un alineamiento múltiple para obtener la secuencia consenso SRE representada mediante una secuencia logo (Figura 7). Las posiciones más conservadas corresponden a la tercera con un 80 % de conservación de timina (T), la cuarta posición con un 96 % conservación de citosina (C), la quinta posición con un 92 % de conservación de citosina (C) y la décima posición con un 86 % de conservación de una adenina (A).



**Figura 6. Elementos SRE (*Sterol Regulatory Element*) identificados en los genes de la vía SREBP, ruta del Mevalonato, Biosíntesis de carotenoides y esteroides. En azul se indican los posibles elementos SRE identificados utilizando la base de datos JASPAR y en amarillo los identificados mediante TRANSFAC.**

**Tabla 4.** Posibles secuencias SRE identificadas con los programas TFBIND y JASPAR en genes de la vía SREBP, biosíntesis de carotenoides y esteroides en *X. dendrorhous*.

Gen	Programa	Secuencia (5' - 3')	Posición	5' - 3'	Largo (pb)
<b>Vía SREBP</b>					
<i>SRE1</i>	TFBIND	GATAAGCACAC	-22	-32	11
	JASPAR	GTGGCGTGTC	-463	-472	10
	JASPAR	GTGGAGAGAT	-678	-687	10
<i>SCP1</i>	TFBIND	GATTCCCAAC	-783	-773	11
	TFBIND	GATTCCCTC	-192	-182	11
	TFBIND	TTTCCCTCAC	-190	-180	11
	TFBIND	GCTCACTTGCC	-11	-1	11
<i>STP1</i>	TFBIND	<u>GATCACGTGAT</u>	-123	-113	11
	TFBIND	<u>TATCATCTCAC</u>	-106	-96	11
	TFBIND	<u>TCTCACGTGTT</u>	-101	-91	11
	JASPAR	<u>ATCACGTGAT</u>	-122	-113	10
	JASPAR	<u>CTCACGTGTT</u>	-100	-91	10
	JASPAR	<u>ATCATCTCAC</u>	-105	-96	10
	JASPAR	<u>ATCACGTCAG</u>	-981	-972	10
<i>OFD1</i>	JASPAR	<u>ATCAGCCGAG</u>	-478	-469	10
	TFBIND	<u>GATCACGTCAG</u>	-982	-972	11
	TFBIND	GATAACGGGAT	-728	-718	11
	TFBIND	TATCTCCCTG	-523	-513	11
	TFBIND	<u>TATCAGCCGAG</u>	-479	-469	11
	TFBIND	GATCAGTCAA	-301	-291	11
	TFBIND	GTTGAACCCAC	-254	-244	11
<b>Ruta del mevalonoato</b>					
<i>ERG10</i>	JASPAR	<u>ATCAGGCGAC</u>	-590	-599	10
	TFBIND	GTGCACGTGAT	-219	-229	11
	TFBIND	<u>GATCAGGCGAC</u>	-590	-600	11
<i>HMGR</i>	TFBIND	TGTGACCTCAC	-765	-775	11
	TFBIND	<u>CCTCACGTGAC</u>	-760	-770	11
	TFBIND	CGACACGTGTG	-743	-753	11
	JASPAR	<u>CTCACGTGAC</u>	-760	-769	10
	JASPAR	AACACGTGAT	-832	-841	10
	JASPAR	GTGTGGTGAT	-299	-308	10
	<i>HMGs</i>	TFBIND	CGTCTCCTGAC	-586	-596
TFBIND		<u>TGTAACACCAC</u>	-234	-244	11
TFBIND		TAACACCACAC	-232	-242	11
TFBIND		CCACACGTGAC	-227	-237	11
JASPAR		GTCTCCTGAC	-586	-595	10
JASPAR		CACACGTGAC	-227	-236	10
JASPAR		<u>GTAACACCAC</u>	-234	-243	10
JASPAR		ATGAGCGGAT	-407	-416	10
<i>idi</i>	JASPAR	CATACGTGAC	-318	-327	10
	TFBIND	GAGCACAACAC	-640	-650	11
	TFBIND	GATCGTCCCAT	-234	-244	11
	TFBIND	TCATACCCAC	-84	-94	11

<i>MVD</i>	TFBIND	GTTCAACACAC	-41	-	-51	11
	JASPAR	AACACACCAC	-38	-	-47	10
	JASPAR	CCCACGCCAT	-499	-	-508	10
	JASPAR	GTCGGCCCAC	-504	-	-513	10
	JASPAR	CTCACTCGAT	-749	-	-758	10
	JASPAR	GTCAGATCAT	-764	-	-773	10
	JASPAR	CTGGGCTGAT	-378	-	-387	10
	JASPAR	GTAACGCGAT	-935	-	-944	10
<i>MVK</i>	TFBIND	GCTCACGTCAA	-378	-	-388	11
	TFBIND	GGTCACTTGCG	-115	-	-125	11
<i>PMK</i>	TFBIND	<u>GATCACCTCTT</u>	-41	-	-51	11
	TFBIND	GTTCACGTGAT	-86	-	-96	11
	JASPAR	<u>ATCACCTCTT</u>	-41	-	-50	10
	JASPAR	TTCACGTGAT	-86	-	-95	10
	JASPAR	GTCTGCCCAT	-511	-	-520	10

#### **Biosíntesis de Carotenoides**

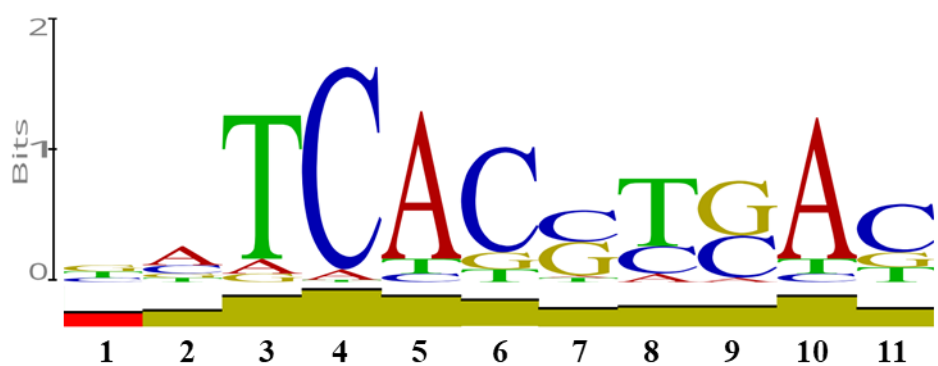
<i>crtE</i>	TFBIND	GATCACTTCCC	-577	-	-587	11
	TFBIND	CATCTCCTGTT	-919	-	-929	11
	JASPAR	CCGGGCTGAT	-710	-	-719	10
	JASPAR	ATGAGTTGAT	-985	-	-994	10
<i>crtI</i>	TFBIND	CAGCACGTGAC	-227	-	-237	11
	TFBIND	AGACACGTGAG	-242	-	-252	11
	JASPAR	ATCACATCAA	-289	-	-298	10
<i>crtR</i>	TFBIND	<u>TATCTCCTCAC</u>	-58	-	-68	11
	TFBIND	<u>GCTCACGTGAC</u>	-335	-	-345	11
	JASPAR	CTCAGGTCAG	-49	-	-58	10
	JASPAR	<u>ATCTCCTCAC</u>	-58	-	-67	10
	JASPAR	TTCACGCAAC	-235	-	-244	10
	JASPAR	<u>CTCACGTGAC</u>	-335	-	-344	10
<i>crtS</i>	TFBIND	CAGCAGGTGAT	-441	-	-451	11
	JASPAR	GACACACCAT	-139	-	-148	10
	JASPAR	ATCAGGGCAC	-186	-	-195	10
<i>crtYB</i>	TFBIND	<u>GATCACGTGAG</u>	-373	-	-383	11
	JASPAR	<u>ATCACGTGAG</u>	-373	-	-382	10
	JASPAR	CTCAACTCAG	-473	-	-482	10
	JASPAR	ATCACCCGCT	-493	-	-502	10
	JASPAR	TTCAGTCAT	-754	-	-763	10
<i>FPS</i>	TFBIND	<u>GATCATCTCAC</u>	-885	-	-895	11
	JASPAR	GTCAGGCGAG	-565	-	-574	10
	JASPAR	CTCACACCTC	-880	-	-889	10
	JASPAR	<u>ATCATCTCAC</u>	-885	-	-894	10

#### **Biosíntesis de esteroides**

<i>CYP51</i>	TFBIND	GATCACCTCTC	-95	-	-105	11
	JASPAR	TGGATCTTTT	-113	-	-122	10
	TFBIND	AATCAGCTGCG	-747	-	-757	11
<i>CYP61</i>	TFBIND	<u>CATCACCAGAG</u>	-519	-	-529	11
	TFBIND	TTTCATCTGAC	-84	-	-94	11
	JASPAR	ATCAGCCAAG	-902	-	-911	10

	JASPAR	CTCAGATCAG	-866	-	-875	10
	JASPAR	ATCAGATCAC	-861	-	-870	10
	JASPAR	<u>ATCACCAGAG</u>	-519	-	-528	10
	JASPAR	CTCACACCTT	-215	-	-224	10
<i>ERG1</i>	TFBIND	TGTCACGTGGT	-819	-	-829	11
	TFBIND	<u>TTTCACCCAAC</u>	-260	-	-270	11
	TFBIND	<u>GAACACTCCAC</u>	-235	-	-245	11
	JASPAR	ATCAACCAAT	-284	-	-293	10
	JASPAR	<u>TTCACCCAAC</u>	-260	-	-269	10
	JASPAR	<u>AACACTCCAC</u>	-235	-	-244	10
<i>ERG2</i>	JASPAR	<u>CTCACGTGAC</u>	-109	-	-118	10
	TFBIND	CATCACGTTTT	-732	-	-742	11
	TFBIND	<u>TCTCACGTGAC</u>	-109	-	-119	11
<i>ERG3</i>	JASPAR	CTGGGGTGGC	-901	-	-910	10
	TFBIND	GCTCTCGTGCT	-490	-	-500	11
	TFBIND	CGTCACCACTC	-302	-	-312	11
<i>ERG4</i>	JASPAR	GTCAGACCAG	-505	-	-514	10
	TFBIND	AATCAAGTGAC	-679	-	-689	11
	TFBIND	GGTCACTCCTC	-583	-	-593	11
<i>ERG6</i>	JASPAR	<u>GGCACGTGCC</u>	-215	-	-224	10
	TFBIND	<u>AGGCACGTGCC</u>	-215	-	-225	11
	JASPAR	GTGGGGTCAA	-316	-	-325	10
	JASPAR	TTGGGGTGAT	-337	-	-346	10
	JASPAR	GTGTCGTGAT	-373	-	-382	10
	JASPAR	CTGCCGTGAT	-825	-	-834	10
<i>ERG7</i>	TFBIND	<u>GATCACACAG</u>	-210	-	-220	11
	JASPAR	GTCAACCGAC	-361	-	-370	10
	JASPAR	ATCATTCAT	-257	-	-266	10
	JASPAR	<u>ATCACACAG</u>	-210	-	-219	10
<i>ERG24</i>	TFBIND	GATCAACTGAG	-583	-	-593	11
	JASPAR	GTCATCCCA	-377	-	-385	9
<i>ERG25</i>	TFBIND	<u>CATCAGCCCAC</u>	-982	-	-992	11
	TFBIND	CATGATGTGAG	-843	-	-853	11
	TFBIND	GATCTCGTGTG	-524	-	-534	11
	JASPAR	<u>ATCAGCCCAC</u>	-982	-	-991	10
	JASPAR	CTCACGCTAG	-360	-	-369	10
	JASPAR	CTCACGCCCCG	-55	-	-64	10
	<i>ERG26</i>	JASPAR	ACGAGCTGAT	-274	-	-283
<i>ERG27</i>	TFBIND	CCTCAGATGAT	-576	-	-586	11
	TFBIND	TTTTATCCCAC	-220	-	-230	11
	TFBIND	GTTTCATGTGTG	-182	-	-192	11
<i>SQS</i>	TFBIND	GATCACTTGGG	-867	-	-877	11
	TFBIND	GATCATCTGCT	-558	-	-568	11
	JASPAR	GTCACCTCAA	-528	-	-537	10
	JASPAR	AGCACCCAT	-477	-	-486	10
	JASPAR	ATCAGGCCTT	-407	-	-416	10

Nota: Se subrayaron aquellas secuencias SRE que fueron identificadas con ambos programas predictivos.



**Figura 7. Secuencia SRE consenso de *X. dendrorhous*.** La secuencia se obtuvo alineando las secuencias SRE que fueron identificadas con ambos programas (Tabla 4). Un mayor tamaño de un nucleótido indica una mayor conservación del nucleótido en dicha posición (señalada en la parte inferior). La secuencia fue generada utilizando el programa Geneious 10.1.3v.

### **3.2. Caracterización funcional del gen de SREBP de *X. dendrorhous*.**

Para caracterizar funcionalmente al gen *SRE1* de *X. dendrorhous* se abordaron tres estrategias: i) delección del gen *SRE1* en *X. dendrorhous*, ii) expresión del dominio activador de la transcripción de Sre1 en *X. dendrorhous* y iii) complementación heteróloga del gen *SRE1* de *X. dendrorhous* en *S. pombe*. Se evaluó el fenotipo de cada una de las cepas resultantes frente a diferentes condiciones. A continuación, se detallan en primera instancia la aproximación experimental utilizada y luego los resultados obtenidos.

#### **3.2.1. Delección del gen *SRE1* y expresión del dominio activador de la transcripción de Sre1 (Sre1N) en *X. dendrorhous***

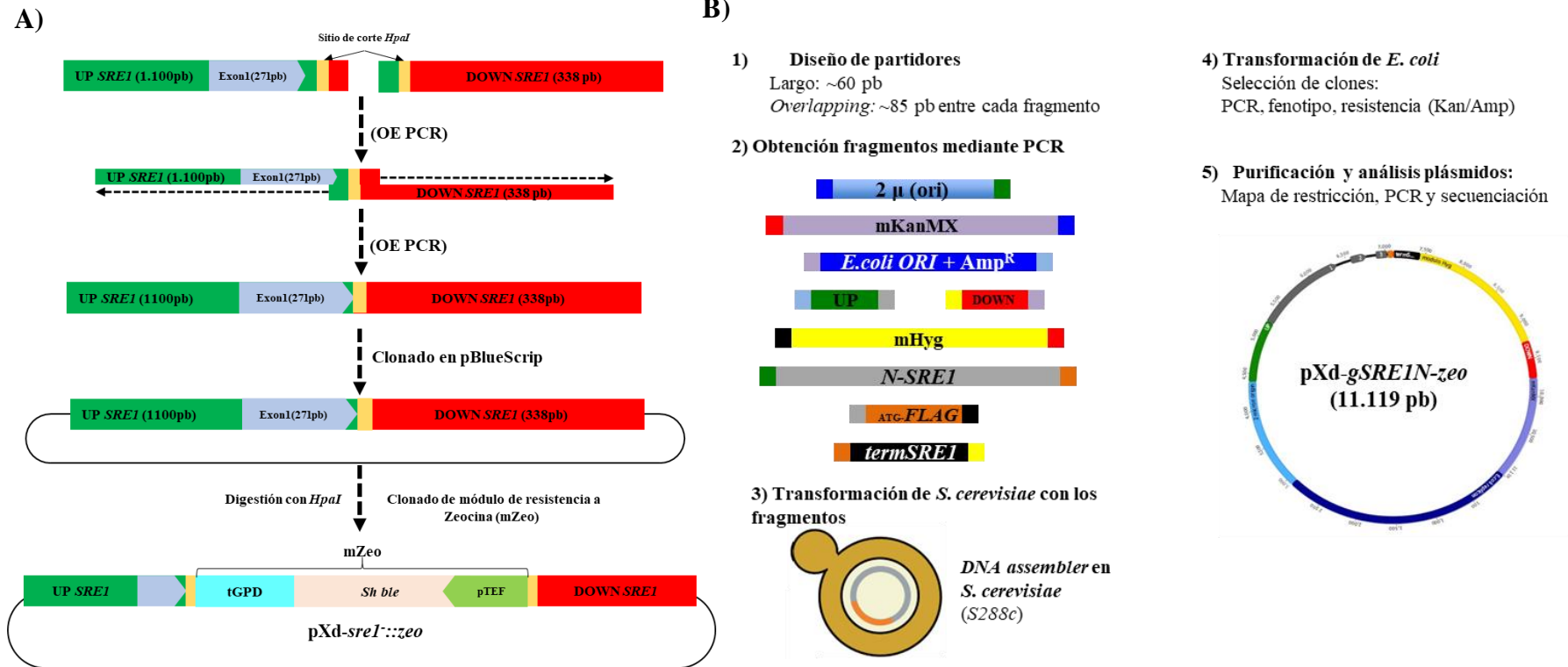
Para la delección del gen *SRE1* de *X. dendrorhous* se construyó un módulo de delección que se integró en el genoma de la levadura mediante recombinación homóloga, reemplazando al *locus SRE1*. Primero, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar las regiones río arriba (*UP*) y río abajo (*DOWN*) del gen *SRE1* (Figura 8A). Cabe mencionar, que no fue posible amplificar eficientemente una región *UP* de integración inmediatamente río arriba del codón de inicio del gen *SRE1* para luego lograr la delección completa del gen. Se probaron distintas parejas de oligonucleótidos para obtener el fragmento de interés, resultando un fragmento *UP* de 1.371 pb que incluye 271 pb río abajo del codón de inicio que son parte del primer exón del gen *SRE1* y 1.100 pb río arriba del codón de inicio, según la Figura 8A. Estas 271 pb codificarían un péptido de 135 aminoácidos los cuales, según el análisis *in silico*, no contienen ningún motivo conservado del factor de transcripción Sre1 y efectivamente, no incluyen al motivo *bHLH*. Posteriormente, ambas regiones *UP* y *DOWN* se unieron mediante OE-PCR y se

insertaron en el sitio *EcoRV* del plásmido pBS; luego, entre las regiones *UP* y *DOWN* se insertó un módulo que confiere resistencia a zeocina a *X. dendrorhous* como marcador de selección (sección 2.5.1) (Figura 8 A). El plásmido resultante se denominó pXd-*sre1*<sup>-</sup>::*zeo*, éste fue digerido para liberar el módulo de delección y se transformó mediante electroporación la cepa silvestre CBS 6938 y la mutante CBS.*cyp61*<sup>-</sup> de la levadura. Cabe destacar que esta última cepa no produce ergosterol, por lo que representa un excelente modelo para estudiar la directa relación del ergosterol en la regulación de la transcripción mediada por el factor de transcripción Sre1.

Para estudiar la función y los mecanismos de activación la vía SREBP se hace necesario la construcción de módulos de expresión complejos, es por esto que se utilizó e implementó en nuestro laboratorio la metodología de DNA *assembler in vivo* descrita en *S. cerevisiae* que permite unir fragmentos de DNA de manera rápida y eficiente mediante recombinación homóloga (Kuijpers y cols., 2013). Particularmente, para la expresión del dominio activador de la transcripción de Sre1 (Sre1N) de forma constitutiva, se construyó un módulo de expresión que reemplazó al gen *SRE1* por la versión que sólo codifica el dominio N-terminal; además, se fusionó el epítipo 3X FLAG en el extremo N-terminal (sección 2.5.1) (Figura 8 B). Brevemente, se diseñaron oligonucleótidos de 60 pb que generaran una región de *overlapping* de aproximadamente 85 pb entre dos fragmentos. Los fragmentos amplificados fueron: el origen de replicación 2 $\mu$  de *S. cerevisiae*, el origen de replicación ColE1 y el módulo de resistencia a ampicilina para *E. coli*, el módulo kanMX6 que confiere resistencia a kanamicina y G418, la región *UP* del gen *SRE1*, el epítipo 3XFLAG, la región del gen *SRE1* que codifica el N-terminal, una región



terminadora de la transcripción del gen *SRE1*, el módulo de resistencia a zeocina para selección de los transformantes de *X. dendrorhous* y una región *DOWN* del gen *SRE1* para la recombinación. Los fragmentos amplificados mediante PCR se purificaron desde geles de agarosa y luego se transformó *S. cerevisiae* para seleccionar a los transformantes resistentes a G418. De las colonias transformantes se extrajo DNA total y para recuperar los plásmidos ensamblados en cada transformante de *S. cerevisiae*, se transformó a *E. coli* con el DNA total. Luego, se extrajo DNA plasmidial de las colonias de *E. coli* resistentes a kanamicina se analizaron mediante PCR, y los plásmidos obtenidos desde ellas, se evaluaron mediante PCR, análisis de restricción y secuenciación de DNA. Una vez seleccionado el plásmido que contenía el módulo de expresión de *SRE1N* ensamblado correctamente, éste fue liberado por digestión con la endonucleasa *HpaI*. Con esta digestión se transformó la cepa silvestre CBS 6938 de *X. dendrorhous*. Cabe mencionar que gracias a la implementación de esta técnica se logró construir módulos para generar proteínas de fusión con diversos epítomos para posteriores experimentos y análisis.



**Figura 8. Esquemas de las estrategias experimentales utilizadas para la obtención de los módulos para la transformación de *X. dendrorhous*. A) Construcción del módulo de delección del gen *SREI*. B) Construcción del módulo de expresión del dominio activador de Sre1 mediante DNA Assembler *in vivo* en *S. cerevisiae*.**

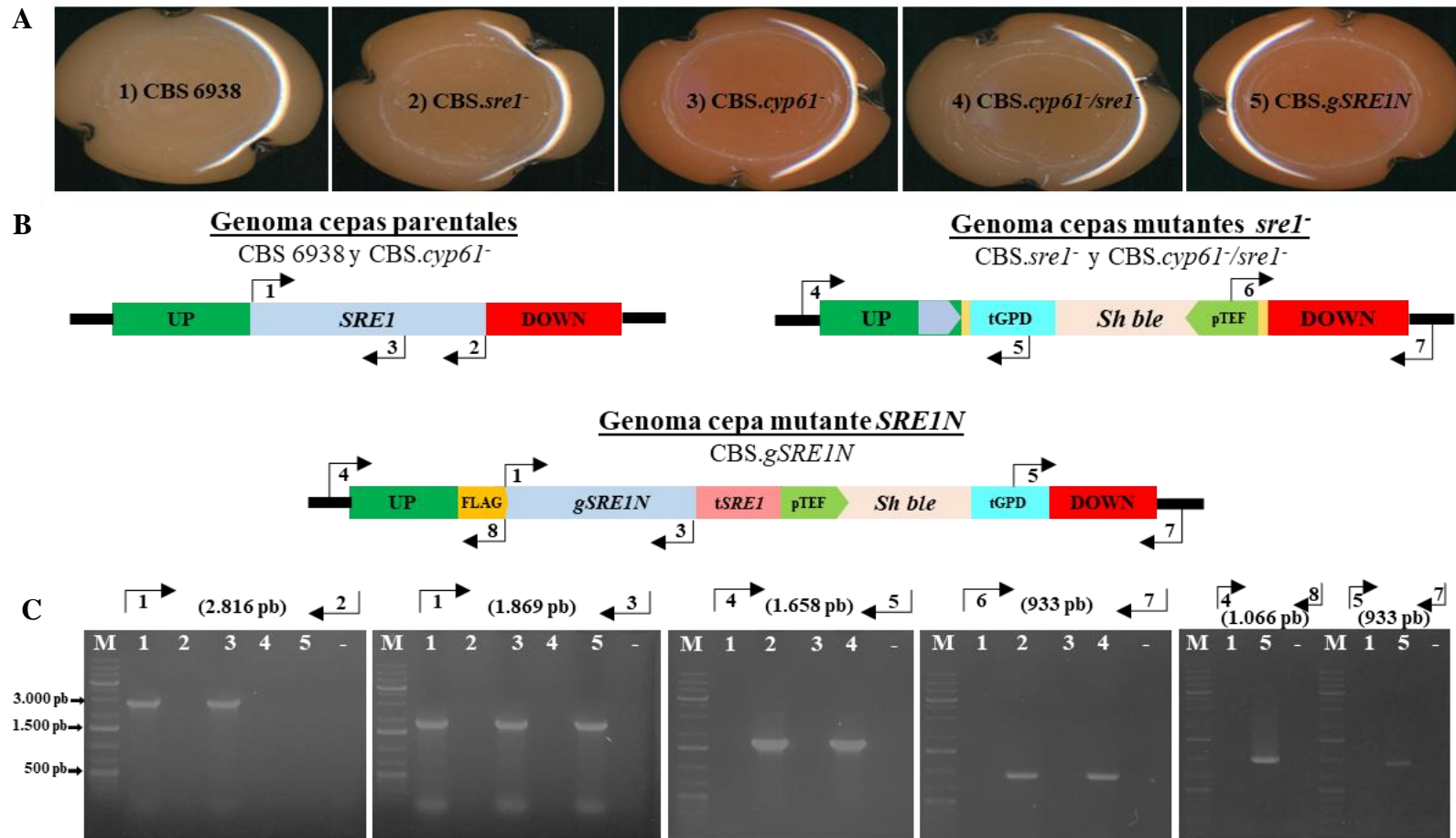
De las respectivas transformaciones se obtuvieron las cepas mutantes de delección del gen *SREI*: CBS.*sreI*<sup>-</sup> y CBS.*cyp6I*<sup>-</sup>/*sreI*<sup>-</sup> que provienen de las cepas parentales CBS 6938 y CBS.*cyp6I*<sup>-</sup> de *X. dendrorhous*, respectivamente. Además, desde la cepa *wild-type* CBS 6938 se obtuvo la cepa mutante CBS.*gSREIN*, que expresa sólo las primeras 1.869 pb de la versión genómica de *SREI* que codifican al dominio activador de la transcripción (Sre1N). Al observar el cultivo en medio líquido de estas cinco cepas (Figura 9A), se observa a simple vista que la mutante CBS.*sreI*<sup>-</sup> presenta una pigmentación similar a la cepa silvestre CBS 6938; en contraste, la cepa doble mutante CBS.*cyp6I*<sup>-</sup>/*sreI*<sup>-</sup> muestra una pigmentación menos intensa en comparación a su cepa parental CBS.*cyp6I*<sup>-</sup>, siendo ésta similar a la de la cepa silvestre. Interesantemente, se observó que la cepa CBS *gSREIN* presenta mayor pigmentación respecto a la cepa silvestre y muy similar al de la cepa CBS.*cyp6I*<sup>-</sup>.

A todas las cepas mutantes se les extrajo DNA genómico y se evaluó mediante PCR las regiones del genoma donde se insertaron los respectivos módulos, como control se incluyeron las cepas parentales (Figura 9). Para determinar la ausencia del gen *SREI* en las cepas *sreI*<sup>-</sup>, se realizó la reacción de PCR con los oligonucleótidos Sre1.F (1) + Sre1.R (2) que amplifican desde el codón de inicio al codón de término del gen *SREI* cuyo tamaño esperado del amplificado era de 2.816 pb; se observa que solo desde las cepas parentales se obtiene un amplificado cercano a las 3.000 pb. De igual forma, se evaluó si la cepa CBS *gSREIN* posee sólo el segmento del gen que codificaría el N-terminal de Sre1 con los partidores Sre1.F (1) + Sre1\_Nta.R (3), cuyo tamaño esperado del amplificado era de

1.869 pb. Para este caso, sólo se observa un amplificado cercano a los 2.000 pb para las cepas parentales y la cepa mutante CBS *gSREIN*.

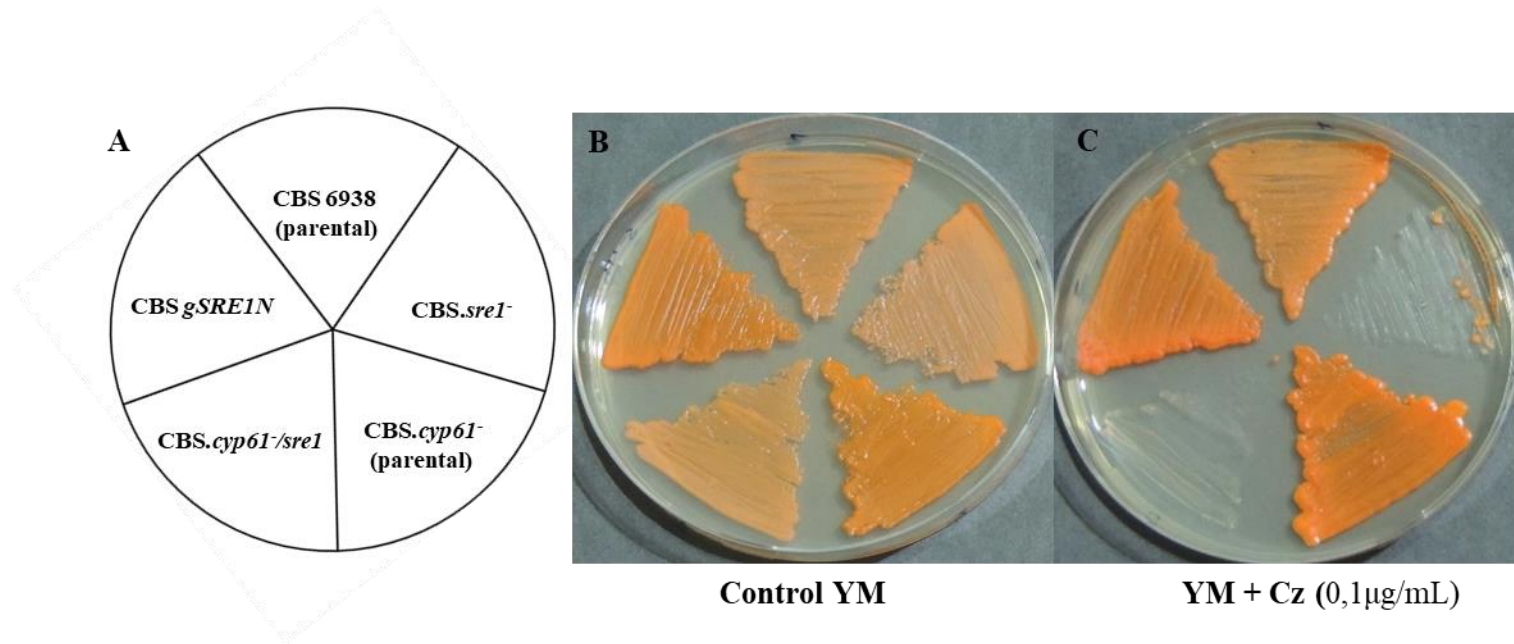
Para confirmar la inserción de los módulos en la posición correcta en el genoma de los transformantes, se amplificó por PCR utilizando un oligonucleótido externo a la zona de inserción junto con uno interno del módulo. En los casos de los mutantes *sreI*, se utilizaron los oligonucleótidos Up2.F (4) + gpdT.F (5) y Pef.R (6) + Del2.out.R (7), para evaluar la región río arriba y río abajo de la inserción, respectivamente. Se observa que solo los carriles 2 y 4 presentan el amplificado de los tamaños esperados. Particularmente, la adecuada inserción río arriba y abajo del módulo en el mutante CBS *gSREIN* se evaluó con los oligonucleótidos Up2.F (4) + D\_2.Rv (8) y gpdT.F (5) + Del2.out.R (7), respectivamente, observando las correspondientes bandas en el mutante CBS *gSREIN*.

Con dichos análisis fue posible corroborar la correcta obtención de las cepas mutantes del gen *SRE1* de *X. dendrorhous*. A cada cepa se les realizó un análisis fenotípico en cuanto a su crecimiento en clotrimazol, producción de carotenoides y esteroides.



**Figura 9. Análisis de los mutantes del gen *SRE1* mediante PCR.** A) Fenotipo de pigmentación de las cepas mutantes del gen *SRE1* y parentales luego de 5 días de cultivo en medio YM con agitación a 22 °C. B) Representación de la inserción de los módulos en el genoma de *X. dendrorhous* y localización de los oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR. C) Cada gel muestra los productos de la reacción de PCR obtenidos con las respectivas parejas de oligonucleótidos y tamaños indicados. En cada carril se indica con número el DNA genómico de cada cepa utilizado como molde, 1: CBS 6938, 2: CBS.*sreI*<sup>-</sup>, 3: CBS.*sreI*<sup>-</sup>/*cyp61*<sup>-</sup>, 4: CBS.*sreI*<sup>-</sup>/*cyp61*<sup>-</sup> y 5: CBS.*gSREIN* y el control negativo sin DNA (-), el marcador del peso molecular (M) utilizado fue 1Kb plus ThermoFisher (20, 10, 7, 5, 4, 3, 2, 1,5, 1, 0,7, and 0,5 Kpb).

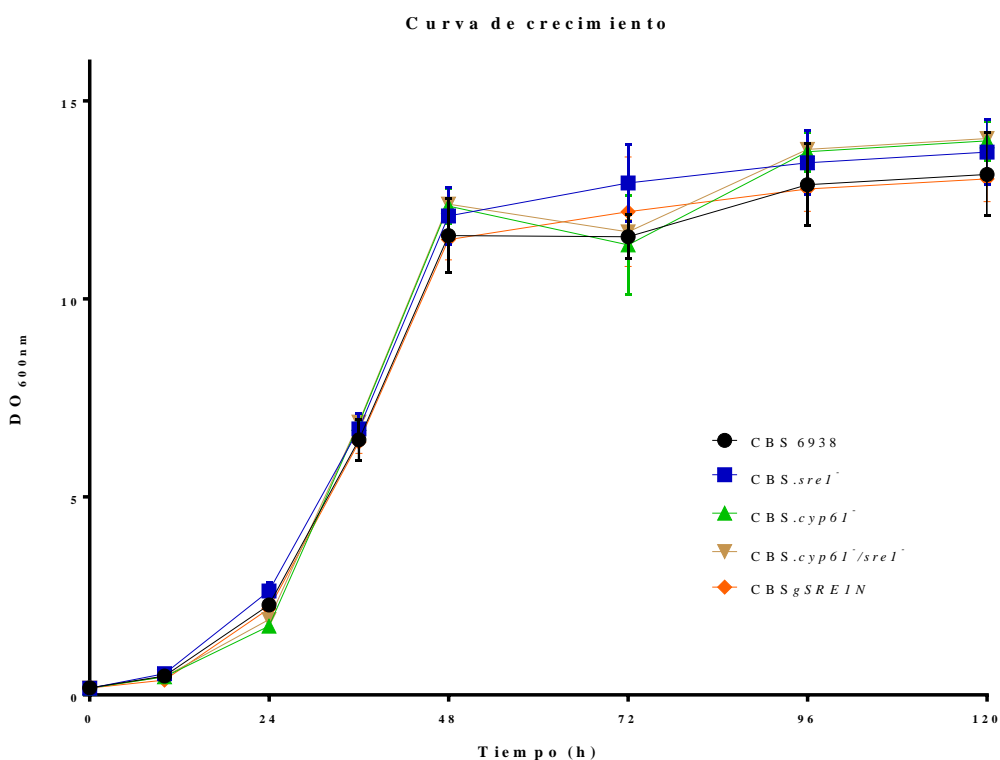
Estudios previos en *C. neoformans* demostraron que Sre1 y Stp1 son necesarios para la viabilidad celular en presencia de azoles tales como clotrimazol e itraconazol (Chang y cols., 2007). Para evaluar si en *X. dendrorhous* el gen *SRE1* es esencial para crecer en presencia de clotrimazol (Cz), las cepas CBS 6938, CBS.*sre1*<sup>-</sup>, CBS.*cyp61*<sup>-</sup>, CBS.*cyp61*<sup>-</sup>/*sre1*<sup>-</sup> y CBS.*gSRE1N* se cultivaron en placas en medio completo (YM) suplementado con 0,1 µg/mL de Cz por 72 h a 22 °C y luego se fotografiaron. Como se puede observar en la Figura 10 C, las cepas mutantes *sre1*<sup>-</sup> son incapaces de crecer bajo estas condiciones; además, se observa que la cepa CBS.*gSRE1N* crece de igual forma que la cepa silvestre por lo cual se puede inferir que la expresión de la región N-terminal de Sre1 es funcional y ésta no afectó el crecimiento en presencia de Cz. Como controles, las cepas se cultivaron en medio YM sin el antifúngico (Figura 10 B) y en medio YM con DMSO, que es el diluyente del Cz (datos no mostrados); en ninguno de estos controles se observó un efecto en el crecimiento en las mutantes. Cabe mencionar que en otro trabajo de nuestro laboratorio (González., 2016), se evaluó el efecto de otros compuestos azólicos como itraconazol y ketoconazol en las cepas mutantes *sre1*<sup>-</sup> observándose el mismo efecto inhibitorio del Cz en este trabajo.



**Figura 10. Crecimiento en clotrimazol de las mutantes del gen *SRE1*.** Cada cepa fue cultivada durante cinco días a 22 °C. **A)** Esquema de la inoculación de cada cepa en las placas de cultivo. **B)** Medio de cultivo YM control. **C)** Medio de cultivo YM con clotrimazol (Cz, 0,1 µg / ml).

Para evaluar los parámetros cinéticos de crecimiento de cada cepa se realizaron curvas de crecimiento por triplicado en medio YM con agitación constante a 22 °C. Se registró la densidad óptica a 600 nm cada 10 – 12 h, aproximadamente, y a las 120 h de cultivo se colectaron las células y almacenaron a -80 °C para los análisis de esteroides, carotenoides y niveles de transcritos. Al observar la gráfica de los valores de densidad óptica en función del tiempo, no se observan diferencias en el crecimiento entre las cinco cepas (Figura 11 A). Posteriormente, estos datos fueron analizados mediante la herramienta *GrowthCurver* de R Bioconductor la cual ajusta los valores a una función logística de crecimiento (Sprouffske y Wagner, 2016) y se obtuvo cada curva ajustada. Los parámetros cinéticos se indican en la Figura 11 B. La  $DO_{600nm}$  máxima ( $k$ ) lograda por cada cepa no presentó diferencias significativas entre ellas alcanzando en promedio  $12,8 \pm 0,3$  UA a las 120 h de cultivo. En cuanto a la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo generacional ( $T_g$ ), ambas cepas *CBS.cyp61<sup>-</sup>* y su mutante *CBS.cyp61<sup>-</sup>/sre1<sup>-</sup>* presentaron un aumento significativo en  $\mu$  y disminución en el  $T_g$  respecto a la cepa silvestre. Es probable que la no producción de ergosterol en estas cepas provoca cambios en el metabolismo que las hagan crecer más rápido. Finalmente, al comparar el parámetro del Área Bajo la Curva (ABC), el cual integra la información de los parámetros logísticos de la función para cada cepa ( $k$ ,  $\mu$  y DO inicial) (Sprouffske y Wagner, 2016), no se encontraron diferencias significativas de las cepas mutantes respecto a la cepa silvestre.





Cepas	DO máx (k, UA)	Tasa de crecimiento ( $\mu, h^{-1}$ )	T <sub>g</sub> (h)	ABC (h*UA)
CBS 6938	12,5 ± 0,9	0,16 ± 0	4,4 ± 0,1	1045 ± 75
CBS <i>sre1</i> <sup>-</sup>	13,3 ± 0,8	0,15 ± 0	4,7 ± 0,2	1117 ± 71
CBS <i>cyp61</i> <sup>-</sup>	12,9 ± 0,7	0,19 ± 0,01 ***	3,7 ± 0,1 ***	1083 ± 60
CBS <i>cyp61</i> <sup>-</sup> / <i>sre1</i> <sup>-</sup>	13,1 ± 0,3	0,18 ± 0,01 **	3,9 ± 0,2 **	1096 ± 28
CBS <i>gSREIN</i>	12,6 ± 0,8	0,16 ± 0	4,4 ± 0,0	1052 ± 66

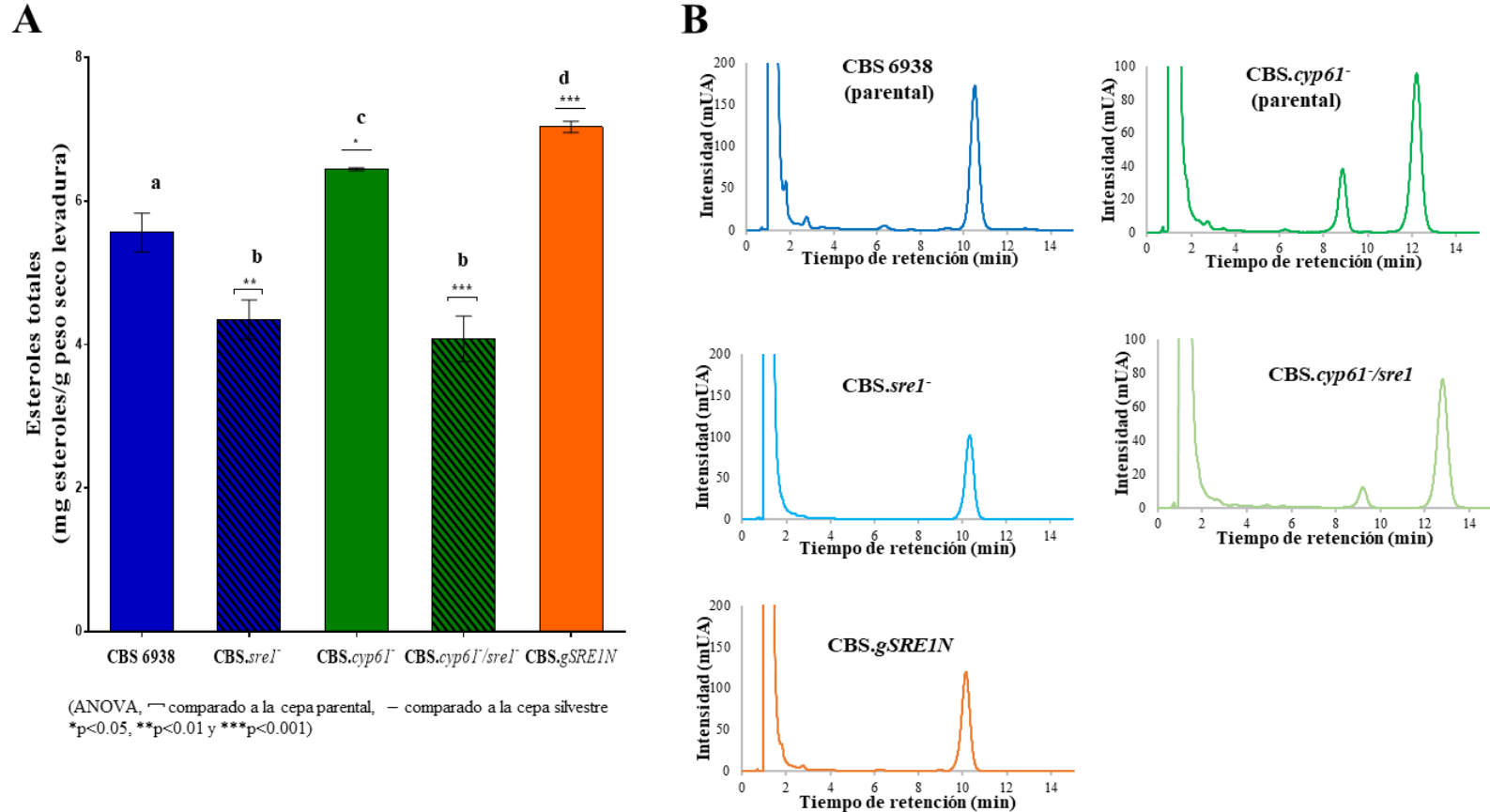
**Figura 11. Curva y parámetros de crecimiento de las cepas parentales y mutantes. A) Curva de crecimiento.** Las cinco cepas se cultivaron en triplicados a 22°C en medio YM con agitación constante, se midió la densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) cada 10-12 h aproximadamente. **B) Parámetros de crecimiento.** Se determinaron mediante la aplicación *GrowthCurver* de R Bioconductor, la cual se basa en ajustar las mediciones a una ecuación logística. ABC: Área bajo la curva. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

### **Producción de esteroides de las cepas mutantes del gen *SRE1***

Dado que Sre1, ha sido caracterizado como uno de los principales reguladores de la expresión de varios genes de enzimas que participan en la producción de esteroides en otras levaduras, se evaluó si los mutantes de este factor de transcripción en *X. dendrorhous* presentan un cambio en los niveles y composición de estos metabolitos. Se extrajeron esteroides totales no-saponificables de las cinco cepas a las 120 h de cultivo. En la Figura 12 A se puede apreciar que la delección del gen *SRE1* afecta significativamente la producción de esteroides, la cepa CBS.*sre1*<sup>-</sup> exhibe una disminución de aproximadamente un 20 % respecto a la cepa silvestre. De igual forma, los niveles de esteroides caen en más de un 30 % en la cepa CBS.*cyp61*<sup>-</sup>/*sre1*<sup>-</sup> al comparar con su parental CBS.*cyp61*<sup>-</sup> [cepa que a pesar de no producir ergosterol, presenta un aumento en la producción de esteroides totales respecto a la cepa silvestre (Loto y cols., 2012)]. El aumento en casi un 20 % de la producción de esteroides en la cepa CBS.*cyp61*<sup>-</sup> respecto a la silvestre se podría deber a un mecanismo de regulación por *feedback* por Sre1, dado que al no haber ergosterol, se activaría la vía SREBP lo que gatillaría un aumento de la expresión de genes de las enzimas de la biosíntesis de esteroides. Por lo tanto, lo anterior provocaría un aumento de esteroides totales, fenotipo que se anula en la cepa doble mutante CBS.*cyp61*<sup>-</sup>/*sre1*<sup>-</sup> al no encontrarse el factor de transcripción. Interesantemente, dado que la delección del gen *SRE1* afecta significativamente a la cepa silvestre en condiciones donde la vía no estaría activada (niveles normales de ergosterol y oxígeno), hace presumir que la vía SREBP en *X. dendrorhous* se encontraría basalmente activa sin requerir un cambio en los niveles de esteroides ni de oxígeno. Por otro lado, en la cepa CBS *gSRE1N* que posee activado

constitutivamente al factor de transcripción Sre1N, se observa un aumento en la producción de esteroides en aproximadamente un 25 % respecto a la cepa silvestre.

En cuanto a la composición de esteroides, evaluada mediante RP-HPLC, no se observaron diferencias entre los mutantes *sre1<sup>-</sup>* y sus cepas parentales. Como se puede observar en los cromatogramas representativos de cada cepa (Figura 12 B), las cepas CBS.*sre1<sup>-</sup>*, CBS *gSRE1N* y silvestre producen principalmente un esteroide (aproximadamente un 98%) representado por un *peak* alrededor de los 10,5 min. Cada muestra se co-inyectó con un estándar comercial de ergosterol corroborándose que efectivamente este *peak* corresponde a ergosterol. Como era de esperar, la cepa CBS.*cyp61<sup>-</sup>* no produce ergosterol y la mutante derivada de dicha cepa, CBS.*cyp61<sup>-</sup>/sre1<sup>-</sup>*, tampoco lo produce, pero ambas acumulan otros dos esteroides con tiempos de retención de 9 y 13 min, aproximadamente.



**Figura 12. Producción y Composición de esteroides de las cepas parentales y mutantes del *SRE1* de *X. dendrorhous*. La extracción de esteroides fue realizada luego de 120 h de cultivo para cada cepa por triplicado. **A)** Cuantificación de esteroides totales. **B)** Cromatogramas obtenidos mediante RP-HPLC a 280 nm representativos de cada cepa.**

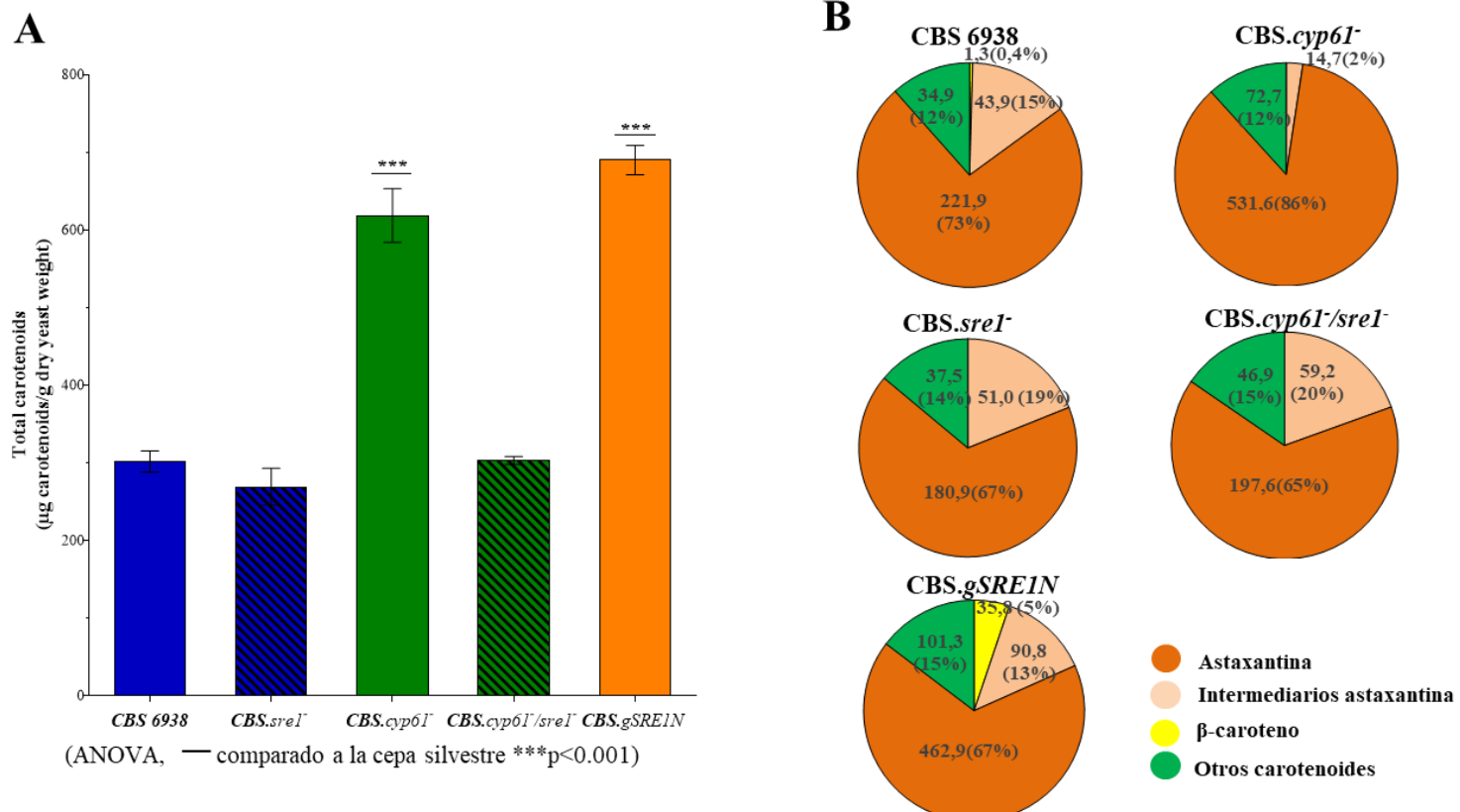
### **Producción de carotenoides de las cepas mutantes del gen *SRE1***

Es interesante conocer si *Sre1* regularía el proceso de carotenogénesis en *X. dendrorhous*, ya que a la fecha no se conoce ningún organismo donde la vía SREBP este regulando la producción de este tipo de metabolitos. Para esto, se extrajeron los pigmentos totales de las cinco cepas en estudio luego de 120 h de cultivo, se cuantificaron y se determinó su composición mediante RP-HPLC. Si bien las diferencias en la producción de carotenoides entre las cepas silvestre y CBS.*sre1*<sup>-</sup> no son estadísticamente significativas, se observa una menor producción por parte de la cepa mutante *sre1*<sup>-</sup> (Figura 13 A). La cepa CBS.*cyp61*<sup>-</sup> presenta a simple vista una mayor pigmentación que la cepa silvestre y efectivamente produce casi un 100 % más de carotenoides que la cepa silvestre. Por el contrario, la producción de carotenoides en la doble mutante CBS.*cyp61*<sup>-</sup>/*sre1*<sup>-</sup>, cae en un 100 % respecto a su parental CBS.*cyp61*<sup>-</sup>, alcanzando una producción similar a la de la cepa silvestre. Un aumento significativo de los carotenoides presentó la cepa CBS.*gSRE1N* alcanzando una producción de casi un 120 % mayor que la de la cepa silvestre y similar a la de la cepa CBS.*cyp61*<sup>-</sup>.

Al comparar la composición de carotenoides entre las cepas silvestre y CBS.*sre1*<sup>-</sup>, se observa que ésta no se vio afectada significativamente (Figura 13 B). Por el contrario, la cepa CBS.*cyp61*<sup>-</sup> presentó una mayor proporción de astaxantina respecto a la cepa silvestre (86 % versus 73 %, respectivamente) y en contraste, la fracción de carotenoides intermediarios a la síntesis de astaxantina desde el  $\beta$ -caroteno como equinenona, hidroxiequinenona y fenicoxantina, disminuye drásticamente en la cepa CBS.*cyp61*<sup>-</sup>. Al igual que en la producción de carotenoides totales, la composición de los carotenoides en

la cepa CBS.*cyp61<sup>-</sup>/sre1<sup>-</sup>* difiere a la de su cepa parental siendo similar a lo observado en la cepa silvestre. Interesantemente, la cepa CBS.*gSREIN* presenta una leve disminución en la proporción de astaxantina producida y aumenta significativamente la proporción de  $\beta$ -caroteno respecto a la cepa parental.

Por lo tanto, estos resultados sugieren fuertemente que el fenotipo sobreproductor de carotenoides de la cepa CBS.*cyp61<sup>-</sup>* que no produce ergosterol, se podría deber a la activación de la vía SREBP y con ello un aumento en los niveles de transcritos de genes que codifiquen productos que actúen ya sea directamente en la ruta de síntesis de carotenoides u otros, que favorezcan la producción de estos metabolitos mediada por Sre1.

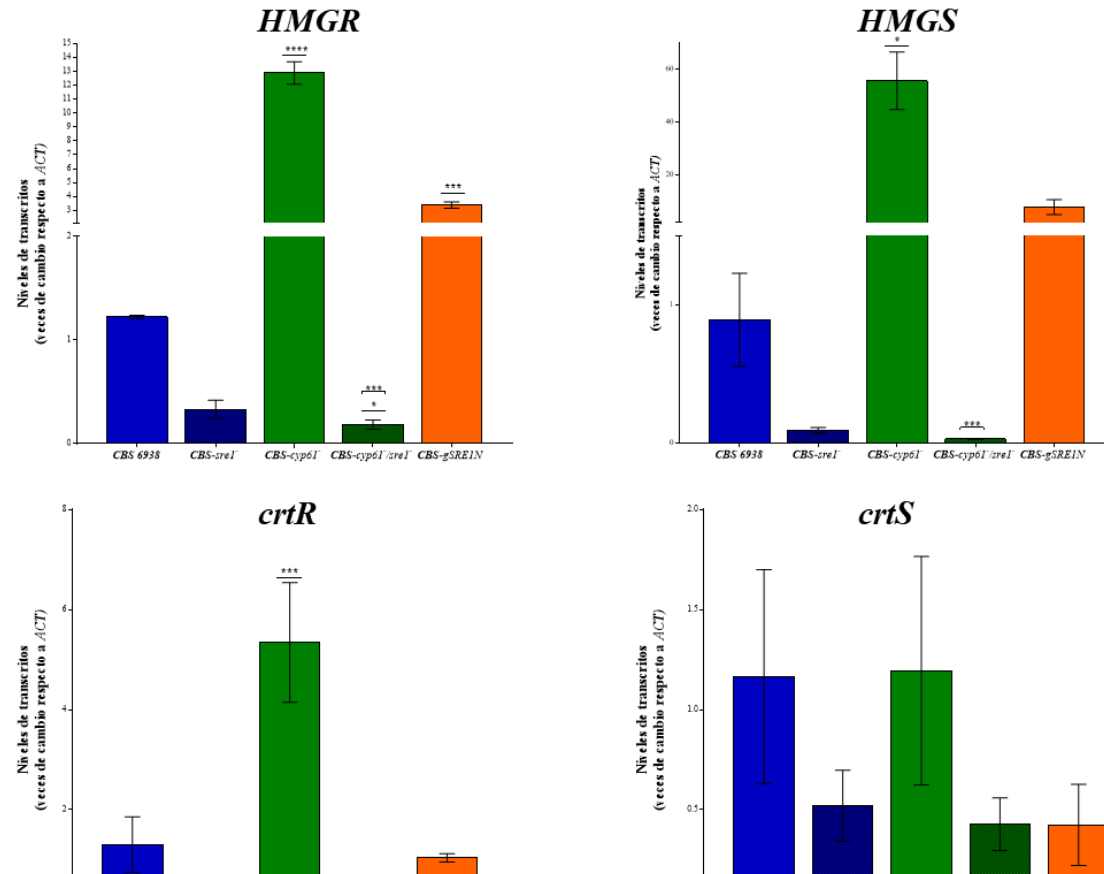


**Figura 13. Producción y Composición de carotenoides de las cepas parentales y mutantes del *SRE1* de *X. dendrorhous*.** La extracción de carotenoides fue realizada luego de 120 h de cultivo para cada cepa por triplicado. **A)** Cuantificación de carotenoides. **B)** Composición de carotenoides, considerando los más abundantes como: Astaxantina, intermediarios de astaxantina desde β-caroteno, β-caroteno y el resto se agrupó como otros carotenoides.

### **Niveles de transcritos de los genes *HMGR*, *HMGS*, *crtR* y *crtS* de las cepas mutantes del gen *SRE1***

Para evaluar el fenotipo de los mutantes en cuanto a los niveles de transcrito, se seleccionaron los genes *HMGS* y *HMGR* de la ruta del mevalonato, dado que estos genes han sido reportados como blancos de regulación de la vía SREBP en otros organismos. Además, se evaluaron los genes *crtR* y *crtS* que participan en la última etapa de la biosíntesis de carotenoides, ya que esta etapa está afectada de acuerdo con los análisis previamente presentados de composición de carotenoides en los mutantes en estudio; además, *crtR* también está involucrado en la biosíntesis de ergosterol. Como se observa en la Figura 17, solo existen diferencias estadísticamente significativas en los niveles de transcritos de los genes *HMGS*, *HMGR* y *crtR* al comparar la cepa parental CBS.*cyp61*<sup>-</sup> y CBS.*cyp61*<sup>-</sup>/*sre1*<sup>-</sup>; sin embargo, se observa una disminución en los transcritos de estos mismos genes entre la cepa silvestre y la mutante CBS.*sre1*<sup>-</sup>. Previamente, en un trabajo de nuestro laboratorio se evaluó un número mayor de genes en mutantes *sre1*<sup>-</sup> y sus parentales determinándose de igual forma el efecto negativo de la delección del gen *SRE1* sobre los niveles de transcrito de los genes *HMGS*, *HMGR*, *crtR*, *CYP61* y *crtS* (González., 2016). Por otro lado, un efecto contrario se observa en la cepa CBS.*gSRE1N* respecto a la cepa silvestre donde los niveles de transcritos de los genes *HMGR* y *HMGS* aumentan significativamente (Figura 17). Cabe mencionar, que para este estudio se escogió un número reducido de genes para evaluar sus niveles de transcritos mediante qPCR dado que, como se presentará más adelante, se realizaron análisis transcriptómicos mediante RNAseq de todas las cepas de estudio.



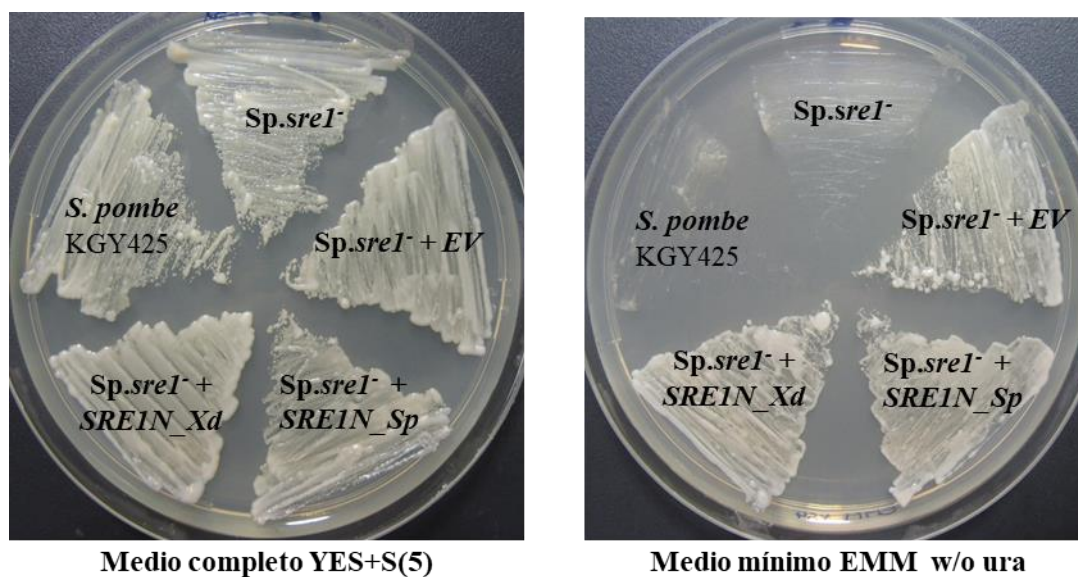


**Figura 14.** Niveles de transcritos de los genes *HMGR*, *HMGS*, *crtR* y *crtS* en las cepas parentales y mutantes del gen *SRE1* determinados mediante RT-qPCR. Los niveles de expresión se normalizaron con respecto al gen de actina (*ACT*) como referencia. Los resultados corresponden al promedio de tres muestras. (Análisis estadístico mediante ANOVA 2 vías y test Tukey: \*P<0,05, \*\*P<0,01 y \*\*\*P<0,001).

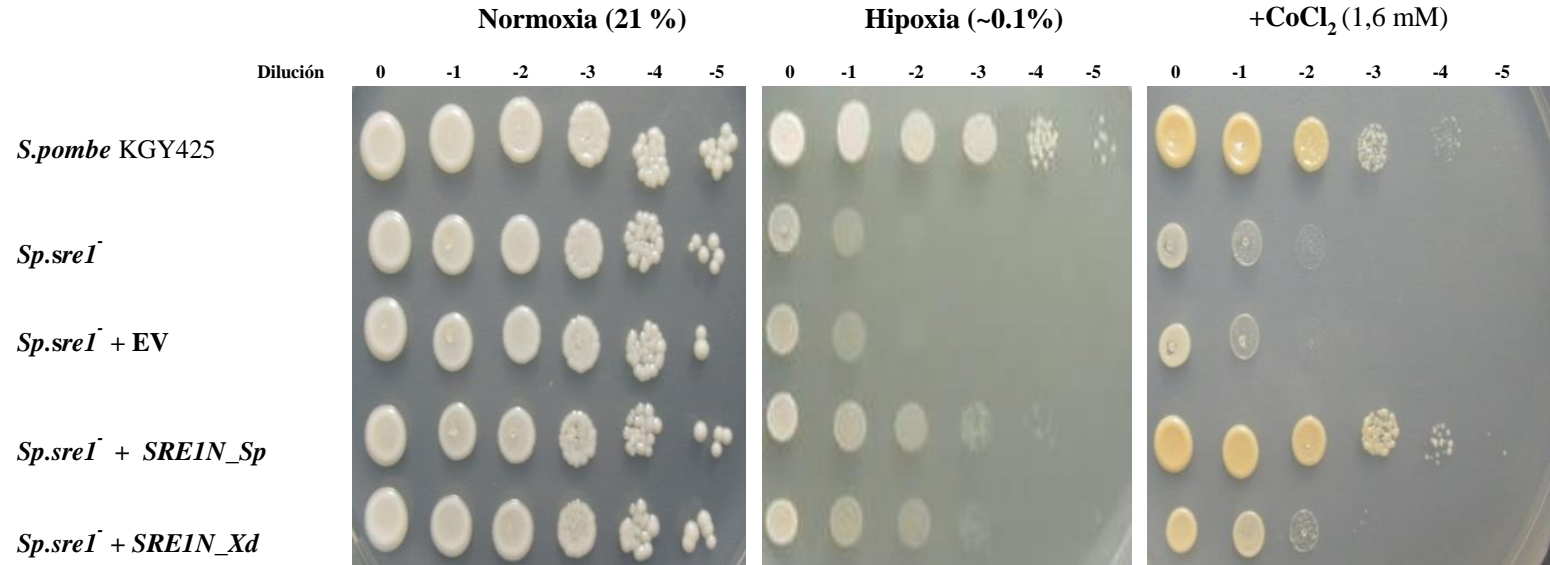
### 3.2.2. Complementación heteróloga del gen *SRE1* de *X. dendrorhous* en *S. pombe*

Otra estrategia abordada para evaluar la funcionalidad del gen *SRE1* de *X. dendrorhous* fue mediante complementación heteróloga en *S. pombe*. Se evaluó si el gen de *X. dendrorhous* es capaz de complementar la delección de *SRE1* en *S. pombe* (cepa *Sp.sre1<sup>-</sup>*). Previamente, se demostró que la cepa *Sp.sre1<sup>-</sup>* crece deficientemente en condiciones de hipoxia y en presencia de cloruro de cobalto, agente que imita las condiciones de hipoxia; sin embargo, esta cepa al ser complementada homológamente con *Sre1N* se restaura el fenotipo silvestre en cuanto a su crecimiento en condiciones mencionadas (Hughes, et al 2005). De esta manera, se transformó la cepa de *S. pombe Sp.sre1<sup>-</sup>* (PEY522) con plásmido pSP102\_*XdSRE1N* que contiene el ORF de *Sre1N* de *X. dendrorhous* y como controles se transformó la misma cepa con el plásmido pEP145 que posee el ORF de *Sre1N* de *S. pombe* y con el plásmido pSLF102 (plásmido vacío, EV). En la Figura 15 se puede observar que las cepas resultantes de la transformación son capaces de crecer en medio mínimo sin uracilo, no así las cepas parentales dado que dicha auxotrofia es complementada por el plásmido transformante. Las cinco cepas fueron cultivadas en medio completo YES con suplementos por 2 días a 30 °C, luego cada cultivo se llevó a una misma densidad óptica medida a 600 nm y cantidad de células/mL, se realizaron diluciones seriadas en base 10 y se sembraron micro-gotas de 10 µL por triplicado en placas con medio YES. Las placas se cultivaron bajo condiciones de normoxia (21 % de O<sub>2</sub>), hipoxia (0,1 % de O<sub>2</sub>) y medio con cloruro de cobalto a 1,6 mM bajo condiciones de normoxia.

Como se puede observar en la Figura 16, en condiciones de normoxia las cinco cepas crecen bien sin presentar mayores diferencias entre ellas y se confirmó que el título inicial de los cultivos utilizados en este experimento era similar para todas las cepas, (aproximadamente  $5 \times 10^7$  UFC/mL). En cambio, tanto en condición de hipoxia como con  $\text{CoCl}_2$  se puede apreciar que las cepas *Sp.sreI<sup>-</sup>* y *S. pombe sreI<sup>-</sup>*+ EV crecen deficientemente evidenciando crecimiento solo hasta la dilución -1; en contraste, la cepa *Sp.sreI<sup>-</sup>* + *SREIN\_Sp* (complementada homológamente) crece de manera similar a la cepa KGY425 silvestre para el gen *SREI*. Interesantemente, la cepa *S. Sp.sreI<sup>-</sup>* + *SREIN\_Xd* mostró crecimiento hasta la dilución -3 en condición de hipoxia y hasta la dilución -2 en presencia de  $\text{CoCl}_2$ , siendo mayor a lo observado en la cepa control con el vector vacío. Es por esto que, aparentemente *Sre1N* de *X. dendrorhous* complementaría parcialmente la mutación *sreI<sup>-</sup>* en *S. pombe*.



**Figura 15. Cepas parentales y transformantes de *S. pombe* obtenidas para los ensayos de complementación heteróloga.** Cada transformante fue cultivado a 30 °C durante 4 días en los medios YES suplementado con adenina, histidina, leucina, uracilo y lisina, y en medio mínimo Edinburgh (EMM) suplementado con adenina, histidina, leucina y lisina.



**Figura 16. Ensayo de complementación heteróloga en *S. pombe*.** Las cepas *S.pombe* KGY425, *Sp.sreI*<sup>-</sup>, *Sp.sreI*<sup>-</sup> + EV, *Sp.sreI*<sup>-</sup> + *SREIN\_Sp* y *Sp.sreI*<sup>-</sup> + *SREIN\_Xd* fueron cultivadas en medio completo (YES) sembrando diluciones seriadas en base 10 en microgotas y se sometieron a las siguientes condiciones: Normoxia a 21% de oxígeno por 3 días, Hipoxia en sistema de anaerobiosis AnaeroGen de Oxoid® por 10 días y cloruro de cobalto a 1,6 mM por 3 días. El medio de cultivo para las 3 condiciones fue medio completo YES(S5) y las cepas fueron cultivadas a 30 °C.

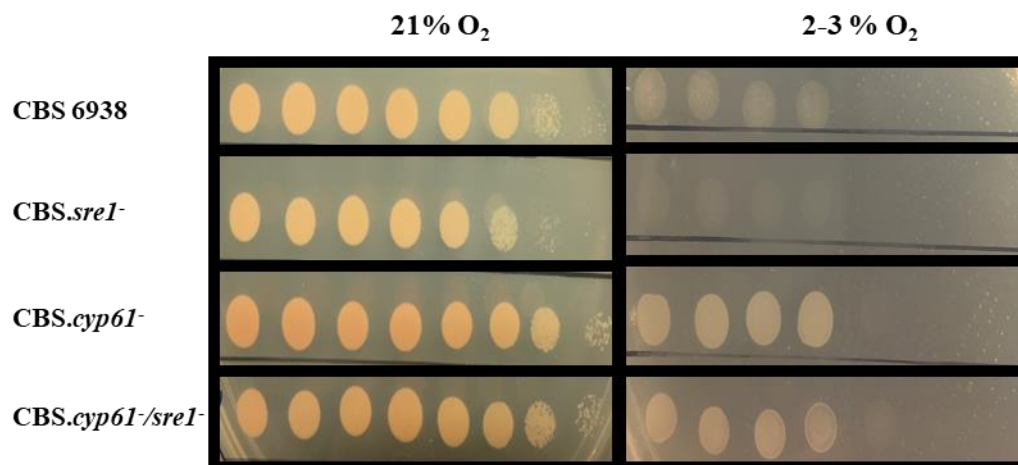
### **3.3. Determinar la regulación de la vía SREBP mediada por oxígeno en *X. dendrorhous*.**

Para evaluar si el mecanismo de activación de la vía SREBP en *X. dendrorhous* estaría mediado por los niveles de oxígeno celular y/o de ergosterol, se planteó evaluar el fenotipo de crecimiento de las cepas parentales y mutantes *sreI*<sup>-</sup> en condiciones de hipoxia y en presencia de cloruro de cobalto y, además estudiar a nivel global la respuesta transcripcional de la levadura frente a las condiciones de crecimiento en normoxia, hipoxia, o en presencia de cloruro de cobalto.

#### **3.3.1. Crecimiento en condiciones de hipoxia o en presencia de cloruro de cobalto.**

Primero se cultivaron las cepas mutantes *sreI*<sup>-</sup> y sus parentales en placas incubadas en jarra de anaerobiosis con AnaeroGen de Oxoid (~ 0,2 % O<sub>2</sub>) y se observó que ninguna de las cepas fue capaz de crecer bajo estas condiciones. Por el contrario, al cultivar las cepas mutantes *sreI*<sup>-</sup> y sus parentales en condiciones de microaerofilia (aproximadamente un 8 % de O<sub>2</sub>) en jarra de anaerobiosis con el generador de atmosfera Anaerocult C de Merck, se observó que todas las cepas crecieron deficientemente y alcanzaron una menor pigmentación, no siendo posible observar diferencias en el crecimiento entre las cepas mutantes *sreI*<sup>-</sup> y sus respectivos parentales. Dado lo anterior, fue necesario analizar concentraciones de oxígeno menores a las evaluadas anteriormente para determinar un posible efecto de la delección del gen *SREI* en el crecimiento de *X. dendrorhous* en hipoxia.

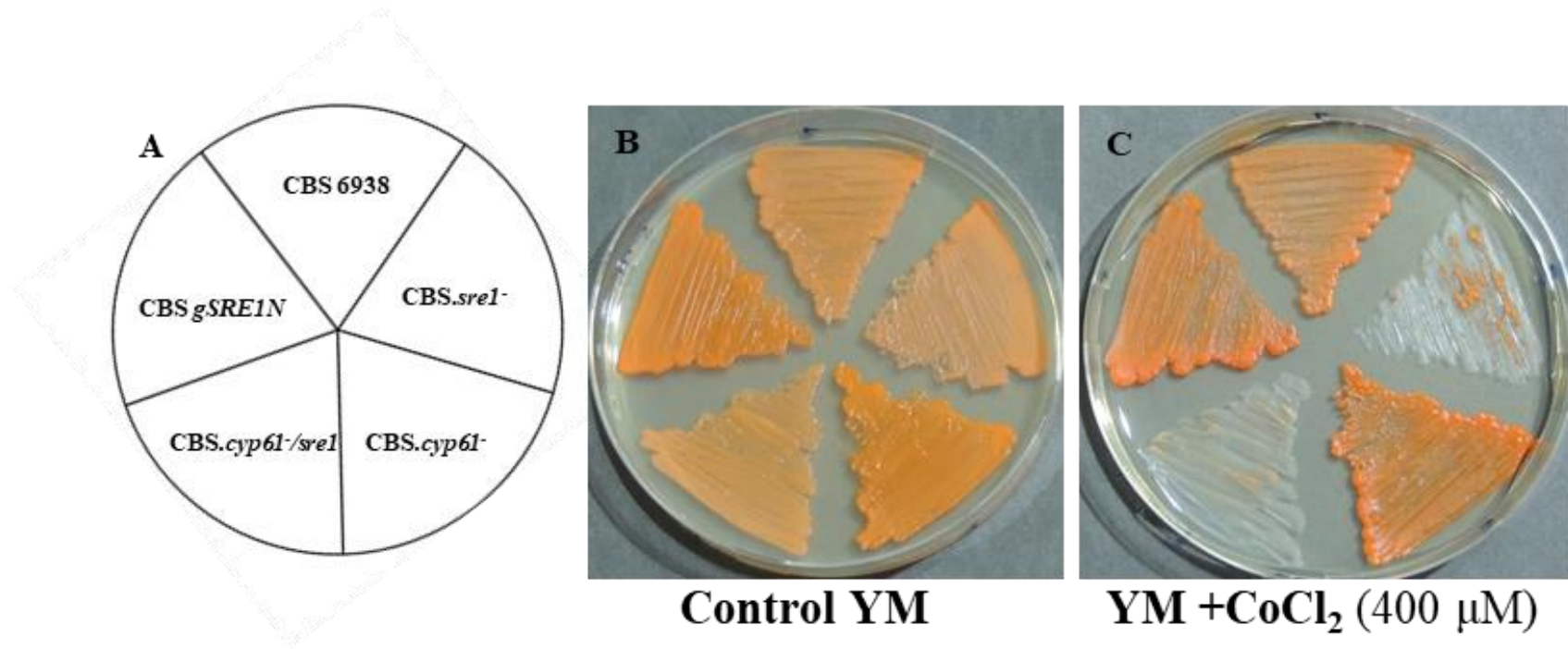
Para esto, cultivaron las cepas CBS 6938, CBS.*sreI*<sup>-</sup>, CBS.*cyp6I*<sup>-</sup> y CBS.*cyp6I*<sup>-</sup>/*sreI*<sup>-</sup> en una cámara de hipoxia a 22 °C y se evaluaron concentraciones de O<sub>2</sub> de 1,3 y 5 ± 1 %. Como se observa en la Figura 17, solo fue posible apreciar una diferencia en el crecimiento entre la mutante CBS.*sreI*<sup>-</sup> respecto a su parental a una concentración de oxígeno entre un 2-3 %; si bien la cepa silvestre CBS 6938 y CBS.*sreI*<sup>-</sup> crecen débilmente bajo esta condición, se puede apreciar una leve diferencia en el crecimiento entre ambas, donde aparentemente la mutante CBS.*sreI*<sup>-</sup> se ve más afectada. Interesantemente, un efecto contrario se observa en las cepas CBS.*cyp6I*<sup>-</sup> y CBS.*cyp6I*<sup>-</sup>/*sreI*<sup>-</sup>, entre las cuales no se ve diferencia aparente en su crecimiento; sin embargo, ambas crecen mejor que la cepa silvestre.



**Figura 17. Crecimiento en condiciones de hipoxia de los mutantes del gen *SRE1* de *X. dendrorhous*.** Las cepas CBS 6938, CBS.*sre1*<sup>-</sup>, CBS.*cyp61*<sup>-</sup> y CBS.*cyp61*<sup>-</sup>/*sre1*<sup>-</sup> fueron cultivadas por 8 días en medio completo YM en condiciones de normoxia (21% de oxígeno) e hipoxia (2-3% de oxígeno) en *Anaerobic Chamber* Coy Lab Products.



Dado que las condiciones de hipoxia evaluadas no permitieron determinar una diferencia significativa en el crecimiento entre mutantes *sreI*<sup>-</sup> y sus respectivas cepas parentales, se utilizó medios de cultivos suplementados con cloruro de cobalto. Para esto se evaluó el crecimiento de *X. dendrorhous* bajo diferentes concentraciones de cloruro de cobalto entre 200 a 1.000  $\mu\text{M}$  y se determinó que 400  $\mu\text{M}$  es una concentración que permite observar crecimiento diferencial entre las cepas parentales y mutantes *sreI*<sup>-</sup>; a dicha concentración, solo fue posible observar crecimiento de las cepas parentales y de la mutante CBS.gSREIN (Figura 18).



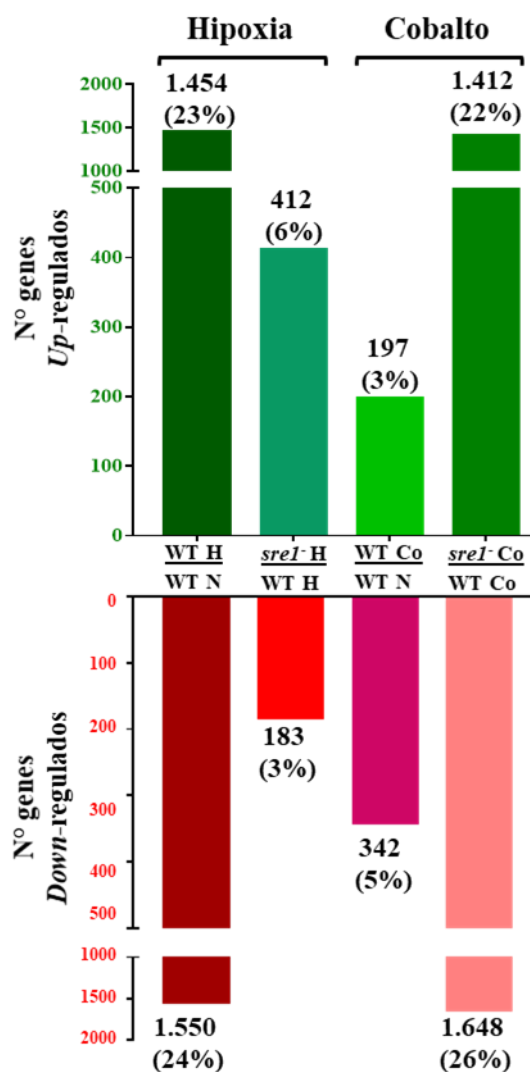
**Figura 18. Crecimiento en cloruro de cobalto de las cepas parentales y mutantes del gen *SRE1*.** Cada cepa fue cultivada durante cinco días en medio completo (YM) y en medio YM con cloruro de cobalto (CoCl<sub>2</sub>, 400 μM) a 22 °C

### 3.3.2. Análisis transcriptómico de cultivos bajo condiciones de normoxia o hipoxia o en presencia de cloruro de cobalto.

Para comprender de manera global el mecanismo de regulación del factor de transcripción Sre1 de *X. dendrorhous* mediado por oxígeno, se compararon los perfiles de expresión mediante RNAseq de cultivos de la cepa silvestre CBS 6938 (con un total de 6.385 ORFs identificados y anotados) y mutante CBS.*sre1*<sup>-</sup> bajo condiciones de normoxia, hipoxia o en presencia de cloruro de cobalto. Para ello se cultivaron ambas cepas por triplicado durante 36 h hasta alcanzar fase exponencial (DO<sub>600nm</sub> 2-4). Luego, los cultivos se sometieron a las condiciones antes mencionadas durante 6 h y posteriormente, se extrajo el RNA que fue cuantificado y su integridad verificada.

En primer lugar, se evaluó la respuesta transcripcional en relación a la cantidad de posibles genes (CDS) que aumentan o disminuyen en cada cepa sometida a las distintas condiciones. Para esto se realizaron las siguientes comparaciones de los DEGs: i) cepa silvestre CBS 6938 en hipoxia (WT H) respecto a esta misma cepa en normoxia (WT N), ii) cepa CBS.*sre1*<sup>-</sup> en hipoxia (*sre1*<sup>-</sup> H) respecto a la cepa silvestre en hipoxia (WT H), iii) cepa silvestre en presencia de CoCl<sub>2</sub> (WT Co) respecto a esta misma cepa en normoxia (WT N) y iv) cepa CBS.*sre1*<sup>-</sup> en presencia de CoCl<sub>2</sub> (*sre1*<sup>-</sup> Co) respecto a la cepa silvestre en hipoxia (WT Co). En la Figura 19 se puede observar el efecto de estas condiciones en cuanto a la cantidad de genes que se inducen (*Up*-regulados) o reprimen (*Down*-regulados) en cada comparación. Al comparar los DEGs de WT H / WT N se observa el gran impacto en la respuesta transcripcional de la levadura a la condición de hipoxia, siendo un 23% de los genes *Up*-regulados y un 24 % *Down*-regulados. Para evaluar el efecto de la delección

del gen *SRE1* sobre la respuesta transcripcional, se realizó la comparación de los DEGs *sre1*<sup>-</sup> H / WT H; en este caso la respuesta transcripcional disminuye drásticamente siendo un 6 % de los genes inducidos y un 3 % reprimidos en hipoxia. La disminución de la cantidad de genes tanto *Up*-regulados como *Down*-regulados en el mutante *sre1*<sup>-</sup> en hipoxia podría dar cuenta de la participación del factor de transcripción Sre1 en la regulación de genes que responden a esta condición. Posteriormente, se determinó aquellos genes que serían regulados por Sre1 en condición de hipoxia; para esto se seleccionaron aquellos genes que por un lado se inducen en hipoxia en la comparación WT H / WT N (de un total de 1.454 genes activados en hipoxia) y que además disminuyen su expresión en la comparación *sre1*<sup>-</sup> H / WT H (de un total de 183 genes Sre1-dependientes en hipoxia). Los genes que cumplen con estas dos condiciones deberían ser regulados directa o indirectamente por Sre1, dado que no serían expresados diferencialmente en hipoxia en ausencia del factor de transcripción Sre1 (en mutante *sre1*<sup>-</sup>); un total de 75 genes cumplieron con ambas condiciones (Figura 20 A). Entre ellos se puede destacar a los genes *SRE1* y *MVD1*, además de genes de la biosíntesis de carbohidratos, componentes integrales de membrana (estructurales y transportadores), entre otros (Anexo I, genes en negritas).



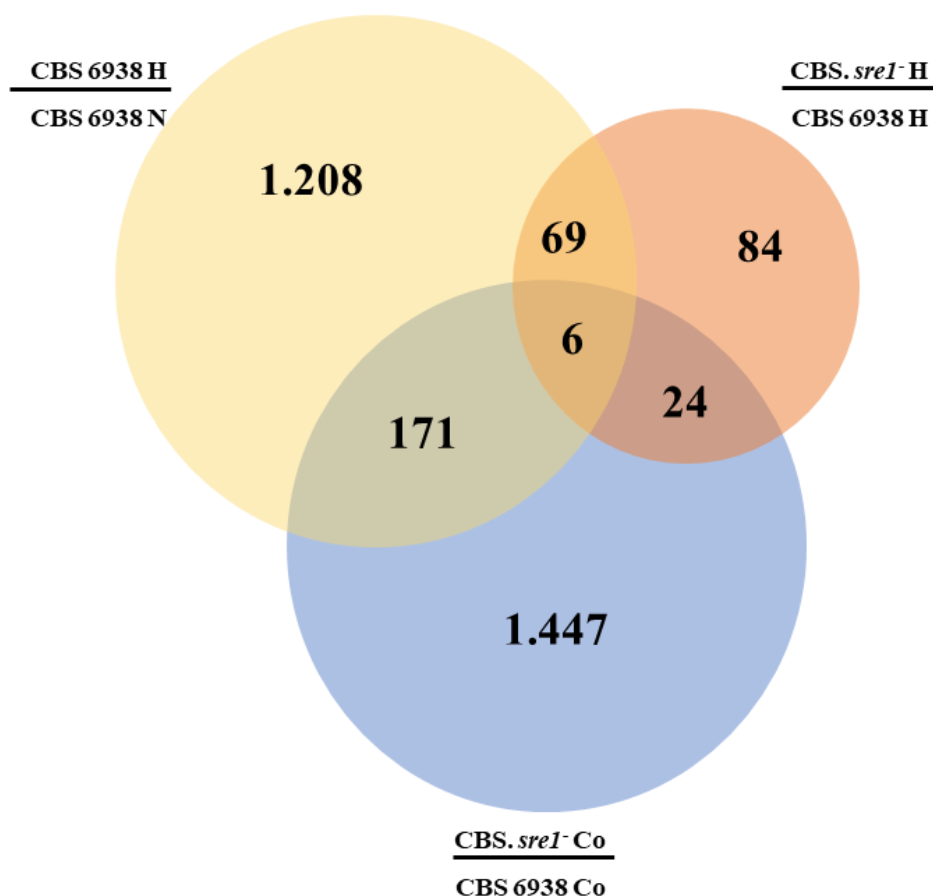
**Figura 19.** Respuesta transcripcional a la condición de hipoxia (H) y en presencia de Cloruro de Cobalto (Co) de las cepas CBS 6938 (WT) y mutante CBS.*sreI*<sup>-</sup> (*sreI*<sup>-</sup>). En la parte superior se observa la cantidad de genes diferencialmente expresados (DEGs) que aumentan su expresión (*Up*-regulados) en Hipoxia o Cloruro de Cobalto II en la cepa silvestre y mutante, y en la parte inferior de la figura se los DEGs que disminuyen su expresión (*Down*-regulados) en estas mismas condiciones y cepas.

Al evaluar el efecto del cloruro de cobalto en la respuesta transcripcional, se observa que un 3 % de los genes incrementan los niveles de sus transcritos (*Up*-regulados) y un 5 % los disminuyen (*Down*-regulados) al someter a la levadura a este compuesto. Un mayor porcentaje de genes cambia cuando el factor de transcripción no está presente (*sreI*<sup>-</sup> Co / WT Co), donde un 22 % de los genes aumentan sus transcritos y un 26 % los disminuyen (Figura 19). Interesantemente, dentro de los genes diferencialmente expresados que disminuyen sus niveles en la comparación *sreI*<sup>-</sup> Co / WT Co (1.648 genes Sre1-dependientes en CoCl<sub>2</sub>), un total de 30 genes muestra dependencia del factor de transcripción Sre1 tanto bajo condición de hipoxia como en presencia de CoCl<sub>2</sub>: estos genes presentan un mayor nivel de expresión en la cepa silvestre comparada con la mutante *sreI*<sup>-</sup> en ambas condiciones (Figura 20 A). Dentro de estos genes se encuentran algunos de la biosíntesis de mevalonato y ergosterol como *HMGS*, *MVD1*, *ERG6*, *ERG24*, *ERG25* y *CYP51*. Sin embargo, la coincidencia general de genes Sre1-dependientes en CoCl<sub>2</sub> y aquellos Sre1-dependientes en hipoxia es baja, dado que la respuesta transcripcional al tratamiento con CoCl<sub>2</sub> fue mayor en cuanto a la cantidad de genes que aumentan su expresión en la cepa silvestre respecto a la mutante comparado en hipoxia. Entre los genes Sre1-dependientes en CoCl<sub>2</sub> se detectó un mayor número de genes que participarían en procesos metabólicos como transporte de electrones, metabolismo de carbohidratos y aminoácidos, entre otros (Anexo II) que entre los genes Sre1-dependientes en hipoxia. Esta clase de genes no son diferencialmente expresados entre la cepa silvestre y mutante *sreI*<sup>-</sup> en hipoxia, por lo cual es posible que Sre1 en *X. dendrorhous* regule un grupo de genes distinto bajo condiciones de hipoxia que en CoCl<sub>2</sub>. Además, fue posible detectar 6 genes que además de ser Sre1-dependientes en hipoxia, lo son en CoCl<sub>2</sub>, ya que

aumentan su expresión en la cepa silvestre en hipoxia respecto a esta misma cepa en normoxia, por lo cual se inducen en condiciones de hipoxia en la cepa silvestre (Figura 20B).

Con los resultados antes mencionados es posible catalogar a Sre1 de *X. dendrorhous* como un regulador transcripcional necesario para la respuesta transcripcional en condiciones celulares de bajos niveles de oxígeno y, además, que el cloruro de cobalto imitaría esta respuesta transcripcional en la levadura al menos en la regulación de 5 genes activados en hipoxia, entre ellos el gen *MVD1*.

A



B

Nº acceso	Descripción Uniprot	Nombre gen en <i>X.d</i>	Veces de Cambio		
			$\frac{WT\ H}{WT\ N}$	$\frac{sreI\text{-}H}{WT\ H}$	$\frac{sreI\text{-}Co}{WT\ Co}$
CDZ98428	Proteína tipo Myc (dominio bHLH)	<i>SRE1</i>	4,2	1,9	4,6
CED83746	Proteína no caracterizada		2,3	1,6	1,3
CDZ96460	Proteína no caracterizada (Familia SERF)		2,1	1,5	1,6
CDZ97564	Fostatasa ácida		1,9	2,5	2,2
CDZ97996	Proteína con dominio START-like		1,6	1,6	1,5
CED83492	Difosfo-mevalonato de carboxilasa	<i>MVD1</i>	1,6	1,7	1,4

**Figura 20. Genes diferencialmente expresados en Hipoxia y Cloruro de cobalto.** **A)** Diagrama de Venn que representa los genes que disminuyen su expresión en las condiciones de Hipoxia (H) o Cloruro de Cobalto (Co). Circulo amarillo: Genes aumenta su expresión en Hipoxia en la cepa silvestre, circulo naranja: genes *Sre1*-dependientes en hipoxia, corresponde a aquellos que disminuyen su expresión en la cepa *sreI*<sup>-</sup> respecto a la silvestre, circulo celeste: genes *Sre1*-dependientes en Co, corresponde a aquellos que disminuyen su expresión en la cepa *sreI*<sup>-</sup> respecto a la silvestre en Co. **B)** Genes que se expresan diferencialmente en las tres comparativas en hipoxia y Cloruro de Cobalto (DESeq2, p adj >0,5).



### 3.4. Rol de Sre1 en la regulación transcripcional en *X. dendrorhous*.

#### 3.4.1. Análisis transcriptómico de mutantes del gen *SRE1*.

Para evaluar el efecto de la delección del gen *SRE1* y la expresión constitutiva del dominio activador de la transcripción Sre1N, se realizaron análisis de RNAseq de la cepa silvestre CBS 6938 y mutantes CBS.*sre1*<sup>-</sup>, CBS.*cyp61*<sup>-</sup>, CBS.*cyp61*<sup>-</sup>/*sre1*<sup>-</sup> y CBS.*gSRE1N* en condición de normoxia, mediante el procedimiento antes descrito realizándose las siguientes comparaciones: i) CBS.*sre1*<sup>-</sup> respecto a CBS 6938, ii) CBS.*cyp61*<sup>-</sup>/*sre1*<sup>-</sup> respecto a CBS.*cyp61*<sup>-</sup> iii) CBS.*gSRE1N* respecto CBS 6938 y iv) CBS.*cyp61*<sup>-</sup> respecto a CBS 6938.

Una manera de conocer los posibles genes regulados por Sre1 es comparar las cepas mutantes *sre1*<sup>-</sup> respecto a sus parentales, así aquellos genes que disminuyan su expresión en estas cepas serían los que requieren de Sre1 para su activación y por lo tanto estarían regulados por el factor de transcripción. Entonces al comparar la cepa mutante CBS.*sre1*<sup>-</sup> respecto a la silvestre se determinó que sólo 17 genes cambian su expresión diferencialmente: entre ellos, 15 disminuyen y 2 aumentan su expresión en la cepa mutante. En la comparación CBS.*cyp61*<sup>-</sup>/*sre1*<sup>-</sup> respecto a su parental CBS.*cyp61*<sup>-</sup> se observó que 139 genes disminuyen y 84 genes aumentan su expresión. Luego se evaluó cuáles de los genes que disminuyen su expresión, y por lo tanto son Sre1-dependientes, son compartidos en ambas cepas mutantes *sre1*<sup>-</sup>, determinándose un total de 12 genes principalmente de la vía del mevalonato y biosíntesis de esteroides como *HMGS*, *HMGR*, *ERG3*, *ERG6*, *ERG7*, *ERG24*, *ERG25* y *CYP51* (Figura 21 B). Cabe destacar, que esto explicaría en cierta forma el fenotipo observado en cuanto a la producción de esteroides de

la cepa mutante *CBS.sre1<sup>-</sup>*, en la cual caen significativamente los niveles de esteroides totales. Por lo tanto, Sre1 sería funcional a niveles basales de esteroides y oxígeno activando genes de la biosíntesis de esteroides principalmente. Sin embargo, al comparar el efecto de la delección del gen *SRE1* entre ambas cepas mutantes se observa que el efecto es mucho mayor en la cepa *CBS.cyp61<sup>-</sup>/sre1<sup>-</sup>*. Esto se explicaría porque en esta cepa la vía SREBP se encontraría activada dado la ausencia de ergosterol.

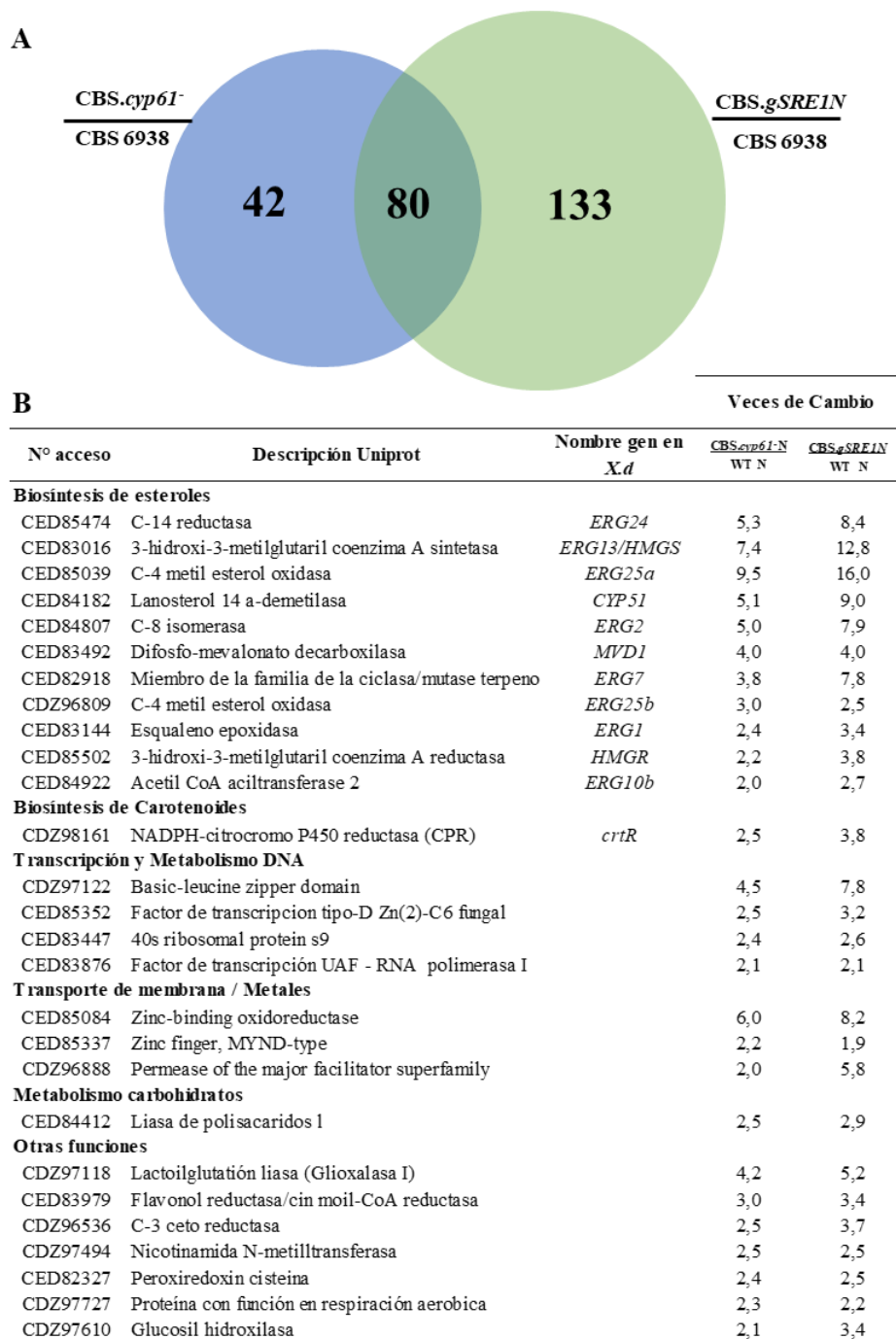


**Figura 21 Genes diferencialmente expresados en mutantes *sre1<sup>-</sup>* en normoxia. A)** Diagrama de Venn que representa la cantidad de genes que disminuyen en cada cepa mutante *sre1<sup>-</sup>* respecto a su cepa parental. **B)** Genes que disminuyen su expresión en ambas mutantes *sre1<sup>-</sup>*, en la tabla se indican los ORFs que tienen función biológica anotada (DESeq2, p adj > 0,05).

Del mismo modo, para determinar cuáles genes serían activados por Sre1 se compararon los niveles de transcritos de las cepas *CBS.cyp61<sup>-</sup>* y *CBS.gSREIN* respecto a silvestre CBS 6938, dado que se espera que en estas cepas mutantes el factor de transcripción se encuentre activado por la ausencia del ergosterol en *CBS.cyp61<sup>-</sup>* o por la expresión constitutiva de Sre1N en *CBS.gSREIN*. Por lo tanto, se buscaron los genes que aumentan su expresión en estas cepas mutantes. En la cepa *CBS.cyp61<sup>-</sup>*, 122 genes aumentan su expresión y 148 disminuyen, y en la cepa *CBS.gSREIN*, 213 genes aumentan y 131 genes disminuyen su expresión. Interesantemente, se determinó que 80 de los genes que aumentan su expresión coinciden en ambas cepas (Figura 22 A), representando un 65 % del total de genes que aumentan su expresión en la cepa *CBS.cyp61<sup>-</sup>*, resultado que apoya la hipótesis de que esta cepa mutante posee la vía SREBP activada, ya que la mayoría de los genes que se sobreexpresan lo hacen también en *CBS.gSREIN*. Interesantemente, en la cepa *CBS.gSREIN* se observa un mayor aumento de la expresión de los genes (veces de cambio) comparado con la cepa *CBS.cyp61<sup>-</sup>*; por ejemplo, al comparar la expresión del gen *HMGS* en las cepas mutantes *CBS.gSREIN* o *CBS.cyp61<sup>-</sup>* respecto a la cepa silvestre, éste presenta 12,8 y 7,4 veces de cambio, respectivamente (Figura 22 B). Lo anterior se puede deber a que en la cepa *CBS.gSREIN*, el factor Sre1 no depende de otras proteínas para su activación a diferencia de *CBS.cyp61<sup>-</sup>*, por lo cual podría ejercer la activación de sus genes blanco de manera más eficiente. Dentro de los genes que están activados en estas dos cepas mutantes, se encuentran algunos de los genes de la biosíntesis de esteroides, otros de transporte de membrana y además *crtR*, el cual tiene función tanto en la síntesis de esteroides como carotenoides (y posiblemente, en otros procesos biológicos donde participen enzimas P450s aún no estudiados). La activación de

genes de la vía del mevalonato como *HMGS*, *HMGR*, *MVD1* en conjunto con la del gen *crtR*, podría explicar de cierta forma el fenotipo sobreproductor de carotenoides de ambas cepas.

En conjunto, tanto el análisis transcriptómico de las cepas mutantes *sreI*<sup>-</sup> y como en las cepas *CBS.cyp61*<sup>-</sup> y *CBS.gSREIN*, en las cuales Sre1 estaría activado, confirman algunos de los genes blancos de regulación por el factor de transcripción, tales como: *HMGR*, *HMGS*, *ERG7*, *ERG24*, *ERG25* y *CYP51*.



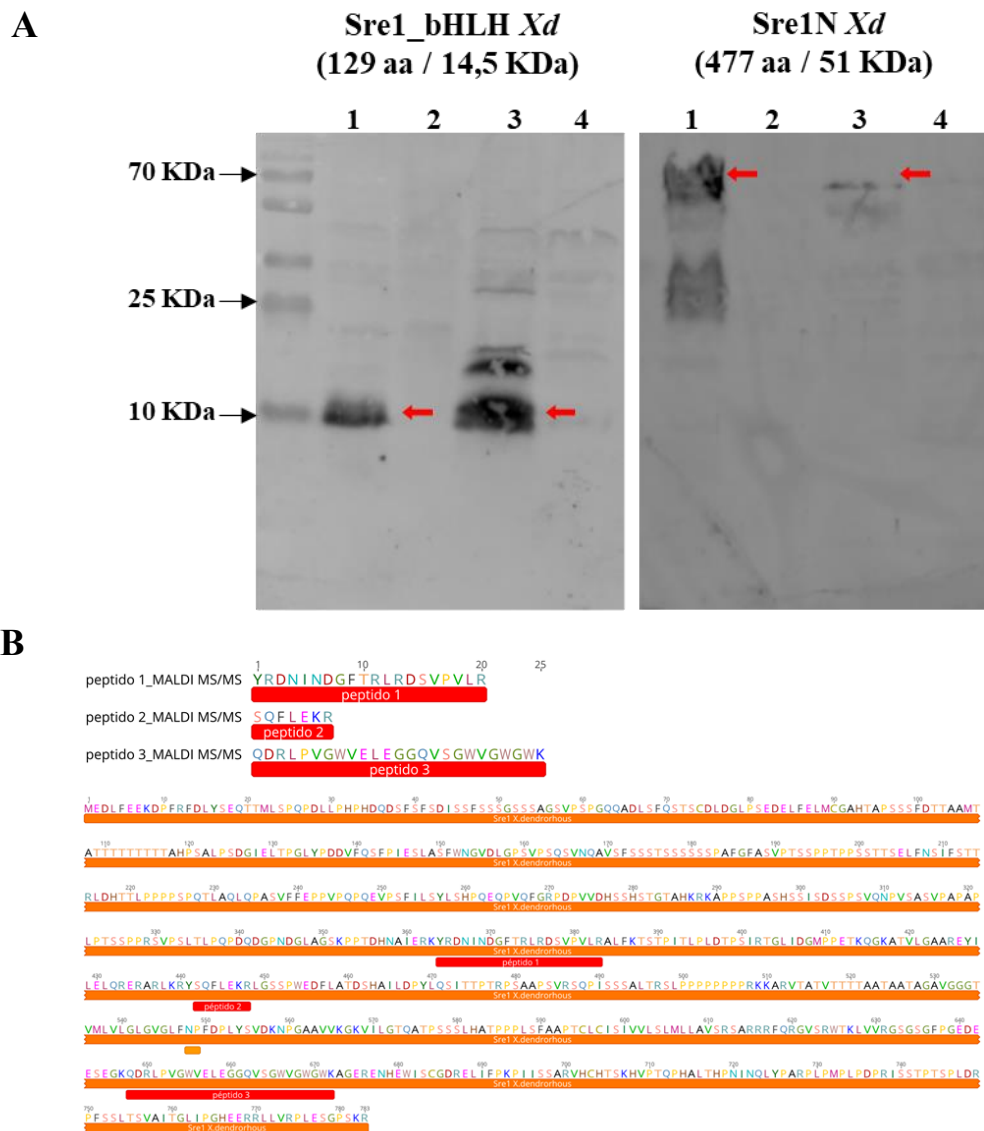
**Figura 22. Genes diferencialmente expresados que aumentan en las cepas *CBS.cyp61-* y *CBS.gSREIN* respecto a la silvestre. A) Diagrama de Venn que representa la cantidad de genes aumentan su expresión en ambas cepas mutantes respecto a la silvestre. B) Genes que se sobreexpresan en ambas mutantes respecto a la cepa silvestre, en la tabla se indican 40 de los genes que tienen función biológica anotada (DESeq2, p adj < 0,05).**

### 3.5. Evaluación la interacción de SREBP con los elementos SRE identificados.

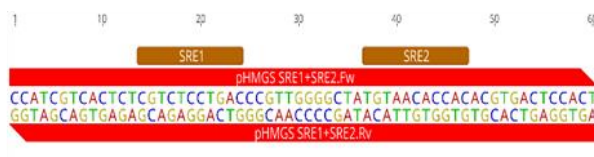
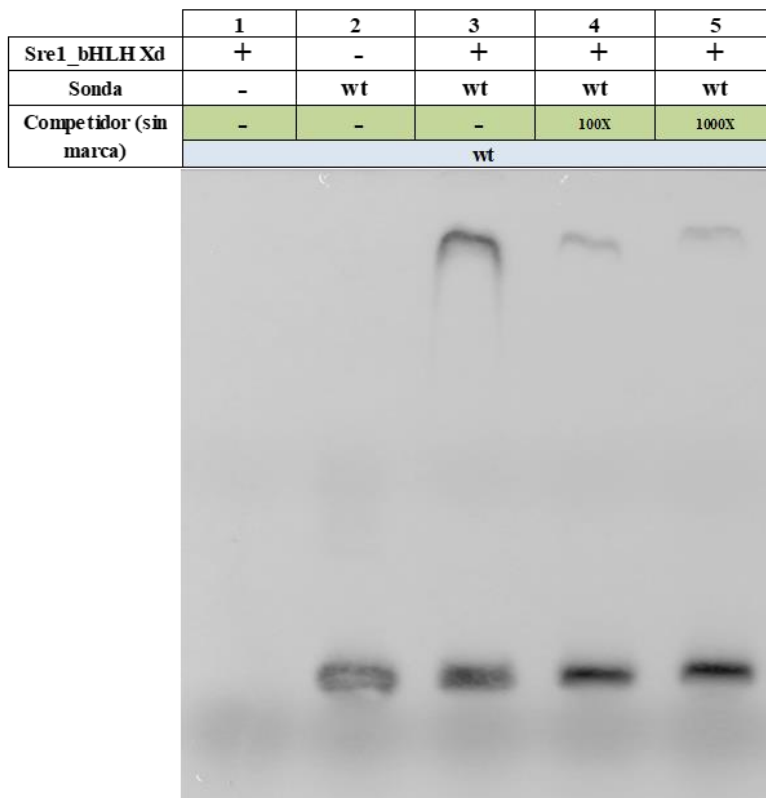
Para determinar si Sre1 de *X. dendrorhous* interacciona *in vitro* con posibles elementos regulatorios SRE de sus genes blancos, se realizaron ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA). Para ello, primero fue necesario expresar de manera heteróloga en *E. coli* el motivo de unión a DNA bHLH y el dominio N-terminal de Sre1 para purificar a las proteínas y hacer dichos ensayos. Se evaluó la inducción de las proteínas mediante diferentes condiciones de tiempo (4 y 16 h) y temperatura (22 y 37 °C), siendo las condiciones de 16 h a 22 °C las que dieron mejores resultados. En la Figura 23 A, se muestra un análisis de WesternBlot de las proteínas purificadas en el cual se utilizó un anticuerpo contra la cola de histidinas que contiene cada proteína por el vector de expresión que se utilizó, esto permitió corroborar los tamaños aproximados de cada una. El polipéptido que sólo contiene el dominio de unión de DNA *bHLH*, denominado Sre1 *Xd\_bHLH*, de 129 aa tiene un tamaño predicho de 15.4 KDa y la proteína Sre1N que contiene todo el dominio N-terminal de Sre1 es de 477 aa y un posible tamaño de 51 KDa. Estos tamaños se corroboraron por la migración de cada banda en el gel de poliacrilamida. Además, la banda de Sre1N fue purificada desde el gel de poliacrilamida y luego identificada mediante MALDI MS/MS: en la Figura 23 B se muestran la secuencia de los 3 péptidos identificados mediante esta técnica los cuales fueron alineados con la secuencia aminoácidica de Sre1 corroborándose que efectivamente corresponde a esta proteína. Posteriormente, utilizando la secuencia de la región promotora del gen *HMGS* y los posibles elementos SRE identificados previamente en ella, se diseñaron sondas de 60 pb, las que fueron sintetizadas y marcadas en el extremo 3' con biotina (Figura 24 A).

Se realizaron varios ensayos EMSA utilizando tanto la proteína Sre1N como Sre1 *Xd\_bHLH*. Sin embargo, el llevar a cabo estos experimentos de manera satisfactoria y reproducible resultó muy difícil y, por lo tanto, los resultados obtenidos no fueron del todo concluyentes. Pese a ello, luego de varios intentos evaluando diferentes condiciones de concentración de las proteínas, sonda y competidor, se logró determinar una posible interacción de la proteína Sre1 *Xd\_bHLH* con la sonda para el promotor del gen *HMGS* (Figura 24 A carril 3), esta interacción proteína-DNA disminuye al incorporar a la reacción un competidor frío, que corresponde a la misma secuencia de la sonda, pero sin la marca de biotina. Esto se puede ver en los carriles 4 y 5 de la Figura 24 B donde se observa una menor intensidad de la sonda retenida dado la adición del competidor frío (100 y 1000 veces mayor cantidad que la sonda). Cabe mencionar que es necesario la repetición de estos experimentos con otras sondas y competidores para asegurar que esta interacción proteína-DNA es específica.





**Figura 23. Purificación e identificación de proteínas expresadas heterológicamente.** A) WesternBlot de las proteínas Sre1\_bHLH *Xd* y Sre1N *Xd* purificadas (flecha roja) Carril 1: Fracción Soluble Inducida, Carril 2: Fracción Soluble No inducida, Carril 3: Fracción Insoluble Inducida, Carril 4: Fracción Insoluble No inducida). B) Péptidos de Sre1N *Xd* identificados por MALDI MS/MS y el alineamiento de estos péptidos con la secuencia aminoacídica de Sre1 de *X. dendrorhous*.

**A****Sonda *HMGS* wt:****B**

**Figura 24. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética.** **A)** Sonda diseñada para el promotor del gen *HMGS*, contiene ambas posibles secuencias SRE identificadas. **B)** Movilidad electroforética de la sonda, Carril 1: Sólo proteína, Carril 2: Sonda sin proteína, Carril 3: Sonda con proteína, Carril 4: Sonda con proteína y competidor 100 veces la concentración de la sonda, Carril 5: Sonda con proteína y competidor 1000 veces la concentración de la sonda

## 4. DISCUSIÓN

---

### 4.1. Identificación y caracterización bioinformática de los genes ortólogos de la vía SREBP presentes en *X. dendrorhous* y determinación de la existencia de elementos SRE en la región promotora de genes que participan en la biosíntesis de carotenoides y ergosterol.

En primer lugar, se identificó los posibles genes *SRE1*, *SCP1*, *STP1* y *OFD1* en el genoma de *X. dendrorhous*. Por el contrario, no fue posible identificar un gen homólogo a *INSIG* que coincide con lo previamente descrito en *C. neoformans* (Chang y cols., 2007). Además, si bien en *S. pombe* se identificó un homólogo a *Insig* se demostró que éste no es necesario para la activación de *Sre1* en este organismo (Hughes y cols., 2005). Por lo tanto, el mecanismo que controla el transporte de *Sre1*-*Scp1* desde el RE al aparato de Golgi en *X. dendrorhous* debiera ser distinto a lo que ocurre en células de mamífero. Dado que se obtuvo tanto la información genómica y transcriptómica de los genes identificados fue posible determinar la estructura exón – intrón y, por ende, deducir la posible secuencia aminoacídica de cada uno. Con esta secuencia se realizaron alineamientos de las posibles proteínas de la vía SREBP de *X. dendrorhous* con los ortólogos más cercanos de otras especies y se determinó que existe en general un bajo porcentaje de identidad entre ellos, siendo los más altos con aquellos de la levadura *C. neoformans* que pertenece al mismo *phylum* que *X. dendrorhous*. Particularmente, el gen *SRE1* posee un tamaño de 2.816 pb, una secuencia codificante de 2.352 pb que codificaría una proteína de 783 aminoácidos. Además, la proteína *Sre1* deducida de nuestro análisis, presenta las tres características particulares de este tipo de factores de transcripción: primero, posee el dominio activador

de la transcripción del tipo bHLH y éste contiene la tirosina conservada en todos los factores de transcripción SREBP (Parraga y cols., 1998; Hughes y cols., 2015). Segundo, tal como en mamíferos y hongos, la región N-terminal de Sre1 de *X. dendrorhous* posee una región rica en serina y prolina (35 %) que precede al motivo bHLH. Tercero, Sre1 presentaría los dos segmentos transmembrana característicos, por lo cual sería un factor de transcripción unido a membrana con una topología similar a la de otras SREBPs identificadas a la fecha.

Dado que la regulación transcripcional mediada por Sre1 requiere de la interacción del factor de transcripción y su elemento *cis*, denominado SRE, se buscó esta secuencia en regiones de 1.000 pb río arriba del codón de inicio de los genes de la vía SREBP y del mevalonato, biosíntesis de esteroides y carotenoides utilizando las bases de datos con matrices de posición JASPAR y TRANSFAC. A pesar que estas bases de datos contienen principalmente información recopilada de organismos superiores, se logró identificar secuencias SRE en la mayoría de los genes analizados lo que entrega información respecto a posibles genes blanco de Sre1. Sin embargo, similar a lo que ocurren en mamíferos y en *S. pombe* (Todd y cols., 2006), no fue posible definir una secuencia consenso estricta de los elementos SRE en *X. dendrorhous*, ya que de acuerdo con la secuencia logo predicha, esta presenta solo en las posiciones 3, 4, 5 y 10 un porcentaje de conservación mayor o igual a un 80 %.

Acorde a los análisis descritos anteriormente, se sugiere que el gen *SRE1* de *X. dendrorhous* identificado, codificaría la proteína ortóloga del factor de transcripción Sre1/SREBP descritos en otros organismos.

#### 4.2. Caracterización funcional del gen *SRE1* de *X. dendrorhous*.

La caracterización funcional del gen *SRE1* de *X. dendrorhous* se abordó mediante: i) delección del gen *SRE1*, ii) expresión del dominio activador de la transcripción de Sre1 en la levadura y iii) complementación heteróloga del gen *SRE1* de *X. dendrorhous* en *S. pombe*. La primera estrategia de delección del gen *SRE1* se realizó tanto en la cepa silvestre CBS 6938 como en la cepa CBS.*cyp61*<sup>-</sup>; la importancia de evaluar el efecto de la delección en esta última es porque ella no produce ergosterol y sobreproduce carotenoides. Como se sabe, el mecanismo principal de activación de la vía SREBP tanto en organismos superiores como en levaduras depende directamente de los niveles de esteroides en la célula (Horton y cols., 2003; Hughes y cols., 2005; Chang y cols., 2007), por lo que probablemente la sobreproducción de carotenoides en la cepa CBS.*cyp61*<sup>-</sup> se deba a un mecanismo dependiente de los niveles de esteroides. Es por esto que la cepa CBS.*cyp61*<sup>-</sup> de *X. dendrorhous* representa un excelente modelo para estudiar la relación del ergosterol en la regulación de la transcripción mediada por el factor de transcripción Sre1. Para la segunda estrategia, se construyó una cepa que expresa solo la región del gen que codifica el dominio activador de la transcripción de Sre1 (Sre1N), de tal manera de que se sintetice como una proteína soluble independiente de un mecanismo de activación que requiera de su liberación de la membrana del aparato de Golgi. Las cepas CBS.*sre1*<sup>-</sup>, CBS.*cyp61*<sup>-</sup>/*sre1*<sup>-</sup> y CBS.g*SRE1N* utilizadas en ambas estrategias mantienen el fondo genético de su parental silvestre CBS 6938 y permite hacer una disección genética fina de este mecanismo de regulación. Se evaluó el crecimiento de estas cepas en presencia de clotrimazol, un inhibidor de la biosíntesis de esteroides, y se observó que el gen *SRE1* es necesario para el crecimiento en presencia de este compuesto. Además, dado que la cepa CBS.g*SRE1N*

creció de igual forma que la cepa silvestre en esta condición, se confirma que la expresión del dominio activador de la transcripción es funcional en la levadura (Figura 10). Estos resultados, coinciden con lo determinado previamente en *C. neoformans*, donde se demostró que tanto Sre1 como Stp1 son necesarios para la viabilidad celular en presencia de azoles tales como clotrimazol e itraconazol (Chang y cols., 2007). Los azoles inhiben la síntesis de esteroides ya que interaccionan con el sitio catalítico de la enzima Cyp51 (*ERG11*) favoreciéndose la producción de esteroides tóxicos para la célula que afectan la permeabilidad y fluidez de la membrana. Además, en *A. fumigatus* se demostró que la susceptibilidad del mutante *sre1*<sup>-</sup> ( $\Delta$ *srba*) a fluconazol está dada por la disminución de los niveles de transcrito del gen *CYP51* (Blosser y Cramer., 2011).

Como Sre1 es uno de los principales reguladores de la expresión de genes que participan en la biosíntesis de esteroides, se evaluó si los mutantes de Sre1 presentan cambios en los niveles y composición de estos metabolitos. Ambas cepas mutantes *sre1*<sup>-</sup> presentan una disminución significativa en la producción de esteroides respecto a sus cepas parentales (Figura 12A). Particularmente, dado que la delección del gen *SRE1* afecta significativamente a la cepa silvestre en condiciones donde se espera que la vía no este activada (niveles normales de ergosterol y oxígeno), hace presumir que la vía SREBP en *X. dendrorhous* se encontraría basalmente activa sin requerir de un cambio en los niveles de esteroides ni de oxígeno. Se reportó en *S. pombe* y *C. neoformans* una baja activación de Sre1 en condiciones normales; esto se determinó por *Western-blot* en los que se observaron bajos niveles de la forma nuclear de Sre1 (Sre1N) en las cepas silvestres (Hughes y cols., 2005; Chang y cols., 2007). Dado lo anterior, si bien podrían existir bajos

niveles de la forma activa de Sre1 en *X. dendrorhous*, éstos serían necesarios y suficientes para regular la biosíntesis de esteroides. Previamente se observó que la cepa CBS.*cyp61*<sup>-</sup>, a pesar de no producir ergosterol, aumenta la producción de esteroides totales respecto a la cepa silvestre (Loto y cols., 2012). Este fenotipo sobreproductor de esteroides es anulado por la delección del gen *SRE1*, ya que la producción de esteroides cae en un 30 % en la cepa mutante CBS.*cyp61/sre1*<sup>-</sup>, alcanzando niveles similares a los de la cepa CBS.*sre1*<sup>-</sup>. Esto permite deducir que la sobreproducción de esteroides en la mutante CBS.*cyp61*<sup>-</sup> se debe a la activación de la vía SREBP probablemente por la ausencia de ergosterol en esta cepa o por el cambio en la composición de estos metabolitos. En contraste, la producción de esteroides en la cepa CBS *gSRE1N* aumenta en un 25 % respecto a la cepa silvestre, siendo incluso mayor que en la cepa CBS.*cyp61*<sup>-</sup>; por lo tanto, la expresión constitutiva del factor de transcripción Sre1N en su forma activa genera un fenotipo sobreproductor de esteroides que se debería a la activación de genes de la biosíntesis de esteroides.

A la fecha, los mecanismos moleculares de regulación de la biosíntesis de carotenoides en *X. dendrorhous* han sido pobremente estudiados, por lo que es interesante conocer si la vía SREBP estaría regulando este proceso; además, a la fecha no se ha descrito ningún organismo donde Sre1 participe en la regulación de la síntesis de este tipo de metabolitos. Similar a lo determinado en cuanto a la producción de esteroides, la producción de carotenoides también se ve afectada por la delección del gen *SRE1*. La cepa CBS.*sre1*<sup>-</sup> produce menos carotenoides que la cepa silvestre; sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas. La sobreproducción de carotenoides de la cepa CBS.*cyp61*<sup>-</sup> (2 veces superior a la de la cepa silvestre) decae drásticamente por efecto de

la delección del gen *SRE1* alcanzando una producción equivalente a la cepa silvestre. Niveles similares de carotenoides a CBS.*cyp61*<sup>-</sup> produjo la cepa CBS *gSRE1N*. Las diferencias observadas en la composición de carotenoides en la cepa CBS *gSRE1N*, en cuanto al aumento significativo de la producción de  $\beta$ -caroteno respecto a la cepa parental sugieren un aumento en la producción de metabolitos río arriba de  $\beta$ -caroteno que no sería transformado en astaxantina en su totalidad de manera similar a lo que ocurre en la cepa CBS.*cyp61*<sup>-</sup>. En conjunto, los resultados de producción de esteroides y carotenoides sugieren fuertemente que el fenotipo sobreproductor de estos metabolitos en la cepa CBS.*cyp61*<sup>-</sup>, se podría deber a la activación de la vía SREBP y con ello un aumento en los niveles de transcritos de genes que codifiquen productos que actúen ya sea directamente en la ruta de síntesis de carotenoides, esteroides u otros, que favorecen la producción de estos metabolitos mediado por Sre1.

La determinación de los niveles de transcritos de algunos genes por RT-qPCR en las cepas mutantes del gen *SRE1* permitió tener una primera aproximación en cuanto a la funcionalidad del factor de transcripción Sre1. Se escogieron los genes *HMGS* y *HMGR* por ser genes blancos de Sre1 en otros organismos y también los genes *crtR* y *crtS* que participan en la última etapa de la biosíntesis de carotenoides; además, *crtR* está involucrado en la biosíntesis de ergosterol. En este análisis sólo fue posible detectar una disminución estadísticamente significativa en los niveles de transcritos de los genes *HMGS* y *HMGR* en la cepa CBS.*cyp61*<sup>-</sup>/*sre1*<sup>-</sup> respecto a su parental CBS.*cyp61*<sup>-</sup>. Por el contrario, como era de esperar, se observó un aumento significativo de los niveles de transcritos de estos mismos genes en la cepa CBS.*gSRE1N* respecto a la cepa silvestre.



La tercera estrategia abordada para estudiar la funcionalidad del gen *SRE1* fue complementar heterológamente la cepa *S. pombe sre1<sup>-</sup>* (*Sp.sre1<sup>-</sup>*) con la porción del gen *SRE1* de *X. dendrorhous* que codifica la forma activa Sre1N y evaluar el fenotipo de las cepas resultantes en cuanto a su crecimiento en condiciones de hipoxia y en presencia de cloruro de cobalto. Esto dado que previamente, se demostró en *S. pombe* que Sre1 es necesario para el crecimiento bajo estas condiciones. *Sp.sre1<sup>-</sup>* al ser complementada homológamente con Sre1N restaura el fenotipo silvestre en cuanto a su crecimiento eficiente en condiciones de hipoxia (Hughes, et al 2005). Al evaluar el fenotipo de la cepa *S. Sp.sre1<sup>-</sup> + SRE1N\_Xd* se apreció un mejor crecimiento tanto en condición de hipoxia como en presencia de CoCl<sub>2</sub> de ambas cepas comparado con la cepa *Sp.sre1<sup>-</sup>* y el control *Sp.sre1<sup>-</sup> + EV* (con vector vacío). Dado lo anterior, Sre1N de *X. dendrorhous* complementaría parcialmente la mutación *sre1<sup>-</sup>* en *S. pombe*, al menos en el crecimiento en condiciones de hipoxia.

### **4.3. Determinar la regulación de la vía SREBP mediada por oxígeno en *X. dendrorhous*.**

#### **4.3.1. Crecimiento en condiciones de hipoxia o en presencia de cloruro de cobalto.**

La activación de la vía SREBP en mamíferos está dada principalmente por una disminución de los niveles de esteroides en la célula; sin embargo, en hongos y levaduras se determinó que la activación de la vía además está mediada por los niveles de oxígeno celular. Inicialmente, se demostró en *S. pombe* y *C. neoformans* que SREBP juega un papel en la regulación de la biosíntesis de ergosterol y la adaptación a la condición de hipoxia. En estos hongos, Sre1 detecta los niveles de esteroides como una medida indirecta de la disponibilidad de oxígeno, y la disminución de los esteroides en condición de bajo oxígeno desencadena la activación de Sre1 por la escisión proteolítica del dominio N-terminal de Sre1 unido a membrana (Hughes, et al 2005; Chang y cols., 2007).

Dado lo mencionado anteriormente, se evaluó el fenotipo de las cepas parentales y mutantes del gen *SRE1* en cuanto a su crecimiento en condiciones de hipoxia y en presencia de cloruro de cobalto. Se ha demostrado que el cloruro de cobalto induce una respuesta molecular y bioquímica en las células similar a lo observado en condición de bajo oxígeno (Golberg y cols., 1987, Huang y cols., 2003; Lee y cols., 2007). En este estudio se observó que *X. dendrorhous* no crece en condiciones de anaerobiosis. Sin embargo, crece en presencia de un 8 % de oxígeno, aunque débilmente y sin mostrar pigmentación. Esto dado que la síntesis de carotenoides es un proceso oxígeno-dependiente, ya que la mayoría de estos compuestos tiene en su estructura de oxígeno. Al

cultivar las cepas mutantes *sreI*<sup>-</sup> con 2 a 3 % de oxígeno fue posible detectar que la cepa mutante CBS.*sreI*<sup>-</sup> crece más débilmente que la cepa silvestre. Interesantemente, un efecto contrario se observó en las cepas CBS.*cyp6I*<sup>-</sup> y CBS.*cyp6I*<sup>-</sup>/*sreI*<sup>-</sup>, donde no se ve diferencia aparente en su crecimiento y ambas crecen mejor que la cepa silvestre. Se desconoce que efecto podría provocar este fenotipo y que ventaja podría gatillar el crecimiento en condición de hipoxia, para ahondar de mejor manera en este fenómeno se requerirían de mayores análisis bajo esta condición. Por otro lado, el gen *SRE1* es esencial para el crecimiento en presencia de cloruro de cobalto (Figura 18), ya que las mutantes *sreI*<sup>-</sup> son incapaces de crecer en presencia de este compuesto. Interesantemente, las cepas parentales CBS 6938, CBS.*cyp6I*<sup>-</sup> y la mutante CBS.*gSRE1N* presentan una pigmentación más anaranjada en cloruro de cobalto comparado con el control en medio YM. Dado que este trabajo es el primero en el cual se cultiva *X. dendrorhous* en presencia de cloruro de cobalto, abre una atractiva pregunta para estudiar el efecto de este compuesto en la levadura y en la producción de carotenoides y esteroides.

#### **4.3.2. Análisis transcriptómico de cultivos bajo condiciones de normoxia o hipoxia o en presencia de cloruro de cobalto.**

Por otro lado, para abordar de manera global la respuesta transcripcional de *X. dendrorhous* frente a condiciones de crecimiento en normoxia (N), hipoxia (H) y en presencia de cloruro de cobalto (Co), se obtuvo los perfiles de expresión mediante RNAseq de las cepas silvestre CBS 6938 (WT) y mutante CBS.*sreI*<sup>-</sup> bajo estas condiciones, los que se compraron obteniéndose los genes diferencialmente expresados en cada comparativa. Para la determinación de los genes diferencialmente expresados se

utilizo la herramienta DESeq2, la cual comparada con otras herramientas ofrece una alta precisión y sensibilidad y permite controlar la tasa de falsos positivos (Love y cols., 2014; Gentleman y cols., 2004), dentro de los parámetros utilizado fue  $p$  ajustado  $> 0,05$  y FDR  $< 1\%$ . De acuerdo a esto, de los 6.385 posibles genes de la levadura, 3.004 genes (47 %) cambian diferencialmente su expresión como respuesta a la condición de hipoxia en la cepa silvestre, de los que un 23 % de los genes aumentan y un 24 % disminuyen su expresión en esta condición. Particularmente, algunos de los genes que aumenta significativamente su expresión son *SRE1*, *crtR*, *ERG8*, *ERG26* y *GPD1*. En *S. pombe*, el gen *SRE1* y *GPD1* también fueron inducidos en esta condición e interesantemente, en un nivel similar a las determinadas en *X. dendrorhous* (Todd y cols., 2006). Se determinaron los genes Sre1-dependientes en hipoxia como aquellos que bajo esta condición aumentan su expresión en la comparación WT H / WT N (1.454 genes activados en hipoxia) y que además disminuyen su expresión en la comparación *sre1*<sup>-</sup> H / WT H (183 genes). Un total de 75 genes cumplieron con ambas condiciones, los que deberían ser regulados directa o indirectamente por Sre1, dado que no serían expresados en hipoxia en ausencia del factor de transcripción Sre1 (en mutante *sre1*<sup>-</sup>); (Figura 20 A). Entre ellos se puede destacar los genes *SRE1* y *MVD1*, además de genes de la biosíntesis de carbohidratos, componentes integrales de membrana (estructurales y transportadores). Esto contrasta con lo determinado en *C. neoformans*, donde varios genes Sre1-dependientes en hipoxia corresponden a genes de la biosíntesis de esteroides (Chang y cols., 2007).

La respuesta transcripcional de *X. dendrorhous* al cloruro de cobalto es mayor cuando Sre1 no está presente. Entre los genes diferencialmente expresados que

disminuyen sus niveles en la comparación *sreI*<sup>-</sup> Co / WT Co, 30 muestran dependencia del factor de transcripción Sre1, tanto bajo condición de hipoxia como en presencia de CoCl<sub>2</sub>: estos genes presentan un mayor nivel de expresión en la cepa silvestre comparada con la mutante *sreI*<sup>-</sup> en ambas condiciones y entre ellos se encuentran algunos de la biosíntesis de mevalonato y ergosterol como *HMGS*, *MVD1*, *ERG6*, *ERG24*, *ERG25* y *CYP51* (Figura 20 A y Anexo II genes subrayados). Al buscar genes que sean tanto Sre1-dependientes en hipoxia como en Co, existe una baja coincidencia, siendo sólo 6 genes que cumplen con esta condición. Esto puede ser debido a que Sre1 es requerido en mayor manera para la respuesta celular en presencia del cloruro de cobalto. Esta idea coincide con que Sre1 es estrictamente requerido por la levadura para crecen en presencia de este compuesto; por el contrario, los mutantes *sreI*<sup>-</sup> son capaces de crecer en hipoxia, aunque débilmente. Por otro lado, la condición de hipoxia a la cual fue sometida la levadura podría no haber sido suficiente para generar una mayor respuesta transcripcional y por lo cual la baja coincidencia de genes se podría deber también a un problema experimental. Debido a que la respuesta transcripcional frente a la hipoxia y Cloruro de Cobalto parecen ser diferentes en *X. dendrorhous* y que la presencia de este compuesto hace más restrictiva la presencia del factor de transcripción representa un buen modelo para evaluar nuevos componentes de la vía SREBP.

Dado estos resultados, Sre1 en *X. dendrorhous* sería un regulador transcripcional necesario para la respuesta a condiciones celulares de bajos niveles de oxígeno y, además, el cloruro de cobalto imitaría esta respuesta transcripcional en la levadura al menos en algunos genes de la biosíntesis de esteroides.

#### 4.4. Rol de Sre1 en la regulación transcripcional en *X. dendrorhous*.

##### 4.4.1. Análisis transcriptómico de mutantes del gen *SRE1*.

El efecto de la delección del gen *SRE1* a nivel transcriptómico se determinó comparando los análisis de RNAseq de las cepas *sre1<sup>-</sup>* respecto a sus cepas parentales a niveles normales de oxígeno (21 %). La comparativa CBS.*sre1<sup>-</sup>* respecto a CBS 6938 reveló un bajo efecto en respuesta a la ausencia de Sre1, ya que sólo 15 genes disminuyen su expresión en la cepa mutante (Sre1-dependientes) de los que 12 participan en la vía del mevalonato y biosíntesis de esteroides como: *HMGS*, *HMGR*, *ERG3*, *ERG6*, *ERG7*, *ERG24* y *ERG25* y *CYP51*. Estos resultados explicarían en parte la caída en la producción de esteroides de la cepa CBS.*sre1<sup>-</sup>* y por lo tanto apoyan la hipótesis de que la vía SREBP estaría basalmente activada a niveles normales de oxígeno y esteroides. Estos resultados coinciden con los determinados recientemente en los hongos *Pinicillium digitatum* (Ruan y cols., 2017) y *Neurospora crassa* (Qin y cols., 2017). En ambos trabajos citados se evaluó la respuesta transcripcional mediante RNAseq de cepas mutantes *sre1<sup>-</sup>* las que no fueron sometidas a ningún estímulo para la activación de la vía y se observó una disminución de los genes de la vía del mevalonato y biosíntesis de esteroides. Por otra parte, se determinó una mayor cantidad de genes Sre1-dependientes en la comparativa CBS.*cyp61<sup>-</sup>/sre1<sup>-</sup>* respecto a su parental CBS.*cyp61<sup>-</sup>*, en la que 127 genes disminuyeron su expresión en la mutante *sre1<sup>-</sup>*, este mayor efecto se debería a que en la cepa CBS.*cyp61<sup>-</sup>* la vía se encontraría activada, por su composición particular de esteroides. Esto concuerda con que los niveles de cambio (veces de cambio) son mucho mayores en la comparativa CBS.*cyp61<sup>-</sup>/sre1<sup>-</sup>* vs CBS.*cyp61<sup>-</sup>* (Figura 21 B).

La identificación de los genes que aumentan sus niveles de transcritos en el análisis transcriptómico de las mutantes *CBS.cyp61<sup>-</sup>* y *CBS.gSREIN* respecto a la cepa silvestre CBS 6938, es otra forma de caracterizar los blancos de regulación de Sre1, ya que en estas cepas mutantes el factor de transcripción se encuentra activado dado la ausencia de ergosterol en *CBS.cyp61<sup>-</sup>* y por la expresión constitutiva de Sre1N en *CBS.gSREIN*. Fueron 122 genes los que aumentan su expresión en la cepa *CBS.cyp61<sup>-</sup>* y 213 genes en *CBS.gSREIN*, tanto el alto número de genes como el mayor nivel de cambio de éstos en *CBS.gSREIN*, es probable se deba a que en esta cepa Sre1 no requiere del proceso de activación dependiente de proteólisis. Interesantemente, se determinó que 80 de los genes que aumentan su expresión coinciden en ambas cepas, dentro de los cuales se encuentran 7 de los genes Sre1-dependientes determinados en las comparativas de las cepas mutantes *sre1<sup>-</sup>*. Algunos de los genes que están activados en estas dos cepas mutantes son de la biosíntesis de esteroides, otros de transporte de membrana y además *crtR* el que tiene participación tanto en la síntesis de esteroides como de carotenoides (y posiblemente, en otros procesos biológicos aún no estudiados donde participen enzimas P450s). En conjunto, la activación de genes de la vía del mevalonato como *HMGS*, *HMGR*, *MVD1* y además de *crtR*, podría explicar de cierta forma el fenotipo sobreproductor de carotenoides de ambas cepas.

Gracias a los análisis transcriptómicos de las cepas mutantes *sre1<sup>-</sup>* y de las cepas *CBS.cyp61<sup>-</sup>* y *CBS.gSREIN* fue posible determinar los genes blancos de regulación por Sre1, ya sea de manera directa o indirecta, entre los que se destacan los genes de la biosíntesis de esteroides, tales como: *HMGR*, *HMGS*, *ERG7*, *ERG24*, *ERG25* y *CYP51*.

#### 4.5. Evaluar la interacción de SREBP con los elementos SRE identificados.

Tanto el análisis de las secuencias promotoras de diversos genes en busca de elementos SRE, como los resultados de RT-qPCR y RNAseq permitieron seleccionar al gen *HMGS* como un candidato óptimo para evaluar la interacción de sus posibles elementos SRE con el dominio de unión a DNA purificado de Sre1, Sre1\_bHLH *Xd*. Luego de varios intentos evaluando diversas condiciones se determinó una posible interacción proteína-DNA entre Sre1\_bHLH *Xd* y la sonda del promotor del gen *HMGS*. Dicha interacción fue afectada al utilizar un competidor frío no marcado de igual secuencia que la sonda. Sin embargo, estos ensayos requieren de la repetición de los experimentos con otras sondas y competidores, además de la utilización de un anticuerpo contra Sre1 de *X. dendrorhous* de tal manera de generar un mayor retardo de la movilidad electroforética (*supershift assay*) dado por la interacción específica del anticuerpo y la proteína. En *A. fumigatus* se determinó por EMSA *supershift assay* la interacción de SrBA (Sre1) con el promotor del gen *ERG11* (Blosser y Cramer., 2011). Actualmente, en nuestro laboratorio se están abordando otras estrategias para evaluar *in vivo* la interacción de Sre1, entre las que se encuentran, la inmunoprecipitación de cromatina y secuenciación (ChIP-seq), gracias al diseño de diferentes módulos para marcar con epítopos comerciales al factor de transcripción Sre1 en *X. dendrorhous*. Esto ha sido posible ya que durante el desarrollo de esta Tesis se implementó y adaptó la técnica de DNA *assembler in vivo* en *S. cerevisiae* en nuestro laboratorio, lo que ha sido de gran ayuda para facilitar la construcción de módulos de mayor complejidad.



En general, todos estos resultados aportan a la caracterización de la vía SREBP en *X. dendrorhous*, este conocimiento permite dilucidar los mecanismos de regulación transcripcional en la levadura, y además, es útil para el desarrollo de cepas sobreproductoras de esteroides y de carotenoides.

## 5. CONCLUSIONES

---

En este estudio se demostró que la levadura carotenogénica *X. dendrorhous* posee los componentes de la vía SREBP. En particular se confirmó que el factor de transcripción Sre1 es funcional dado que su delección disminuye el contenido de esteroides en la célula; por lo tanto, la regulación de la biosíntesis de esteroides se encuentra conservada y es mediada por Sre1 en esta levadura.

El factor de transcripción Sre1 además participa en la regulación de la biosíntesis de carotenoides en la levadura, dado que su forma activa aumenta los niveles de transcritos de algunos genes carotenogénicos y otros río arriba de esta vía.

El gen *SRE1* es esencial para el crecimiento en presencia de azoles y el agente imitador de hipoxia, cloruro de cobalto.

La vía SREBP además regula mecanismos de respuesta a la condición de hipoxia, que estarían conservados en *X. dendrorhous*.

El gen *SRE1* de *X. dendrorhous* complementa parcialmente la mutación *sre1<sup>-</sup>* en *S. pombe*.

La obtención de la cepa que expresa solo el dominio N-terminal de Sre1, el cual fue funcional en la levadura permitió esquivar el mecanismo de activación del factor de transcripción favoreciendo la producción de esteroides y carotenoides.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- 
- Alcaíno, J., Barahona, S., Carmona, M., Lozano, C., Marcoleta, A., Niklitschek, M. y Cifuentes, V. (2008). Cloning of the cytochrome p450 reductase (*crtR*) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *BMC Microbiology*, 8:169. doi:10.1186/1471-2180-8-169
- Alcaíno, J., Romero, I., Niklitschek, M., Sepúlveda, D., Rojas, M. C., Baeza, M., y Cifuentes, V. (2014). Functional characterization of the *Xanthophyllomyces dendrorhous* farnesyl pyrophosphate synthase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase encoding genes that are involved in the synthesis of isoprenoid precursors. *PLoS ONE*, 9(5): 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0096626
- An, G., Schuman D. y Johnson. E. (1989). Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(1): 116-124, doi: 10.1016/S0922-338X(97)82996-0
- Baeza, M., Alcaíno, J., Barahona, S., Sepúlveda, D., y Cifuentes, V. (2015). Codon usage and codon context bias in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Genomics*, 16(1): 293. doi:10.1186/s12864-015-1493-5
- Bellora, N., Moliné, M., David-Palma, M., Coelho, M. A., Hittinger, C. T., Sampaio, J. P., Libkind, D. (2017). Comparative genomics provides new insights into the diversity, physiology, and sexuality of the only industrially exploited tremellomycete: *Phaffia rhodozyma*. *BMC Genomics*, 17:901, doi: 10.1186/s12864-016-3244-7
- Bien, C., Chang, Y., Nes, D., Kwon-Chung, K., y Espenshade, P. (2009). *Cryptococcus neoformans* Site-2 protease is required for virulence and survival in the presence of azole drugs. *Molecular Microbiology*, 74(3): 672-690, doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06895.x
- Bien, C. M., y Espenshade, P. J. (2010). Sterol regulatory element binding proteins in fungi: hypoxic transcription factors linked to pathogenesis. *Eukaryotic Cell*, 9(3): 352-369, doi: 10.1128/EC.00358-09
- Miki, W (1991) Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure and Applied Chemistry* . 63, 141-146. <http://dx.doi.org/10.1351/pac199163010141>
- Blatzer, M., Barker, B., Willger, S., Beckmann, N., Blosser, S., Cornish, E., Mazurie, A., Grahl, N., Haas, H., Cramer, R. (2011). SREBP coordinates iron and ergosterol homeostasis to mediate triazole drug and hypoxia responses in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genetics*, 7(12), e1002374, doi:10.1371/journal.pgen.1002374
- Britton, G. (2005) Structure and Properties of Carotenoids in Relation to Function. *FASEB Journal*, 9: 1551-1558.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., y Pfander, H. (2004). Carotenoids handbook, Switzerland, Birkhäuser Verlag
- Chang, Y. C., Bien, C. M., Lee, H., Espenshade, P. J. and Kwon-Chung, K. J. (2007), Sre1p, a regulator of oxygen sensing and sterol homeostasis, is required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 64: 614-629. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05676.x
- Chun, C. D., Liu, O. W., y Madhani, H. D. (2007). A link between virulence and homeostatic responses to hypoxia during infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathogens*, 3(2): 225–238, doi:10.1371/journal.ppat.0030022
- Córdova, P., Alcaíno, J., Bravo, N., Barahona, S., Sepúlveda, D., Fernández-Lobato, M., y Cifuentes, V. (2016). Regulation of carotenogenesis in the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*: The role of

- the transcriptional co-repressor complex Cyc8-Tup1 involved in catabolic repression. *Microbial Cell Factories*, 15(1): 1–19, doi:10.1186/s12934-016-0597-1
- Córdova, P., Gonzalez, A.-M., Nelson, D. R., Gutiérrez, M.-S., Baeza, M., Cifuentes, V., y Alcaíno, J. (2017). Characterization of the cytochrome P450 monooxygenase genes (P450<sub>ome</sub>) from the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Genomics*, 18(1), doi:10.1186/s12864-017-3942-9
- De la Fuente, J. L., Rodríguez-Sáiz, M., Schleissner, C., Díez, B., Peiro, E., y Barredo, J. L. (2010). High-titer production of astaxanthin by the semi-industrial fermentation of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of Biotechnology*, 148(2–3): 144–146. doi: 10.1016/J.JBIOTEC.2010.05.004
- Flores, L., Martín, R., y Sánchez, S. (2001). Citrate, a possible precursor of astaxanthin in *Phaffia rhodozyma*: Influence of varying levels of ammonium, phosphate and citrate in a chemically defined medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(3):341-7. doi:10.1007/s002530000498
- Forsburg S. L. (1993). Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Research*, 25;21(12): 2955-2956, doi: 10.1093/nar/21.12.2955
- Frengova, G. I., y Beshkova, D. M. (2009). Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: Yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36(2):163-80, doi:10.1007/s10295-008-0492-9
- Gu, W. L., An, G. H., y Johnson, E. A. (1997). Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19(2), 114–117. doi: 10.1038/sj.jim.2900425
- Gutiérrez, M. S., Rojas, M. C., Sepúlveda, D., Baeza, M., Cifuentes, V., y Alcaíno, J. (2015). Molecular characterization and functional analysis of cytochrome b5 reductase (CBR) encoding genes from the carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *PLoS ONE*, 10(10) art. no. A970, doi: 10.1371/journal.pone.0140424
- Goldberg, E. B., Arbel, T., Chen, J., Karpel, R., Mackie, G. A., Schuldiner, S., y Padan, E. (1987). Characterization of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(9): 2615-2619, doi: 10.1073/pnas.84.9.2615
- Goldstein, L J., A DeBose-Boyd, R., y Brown, S M. (2006). Protein Sensors for Membrane Sterols. *Cell*. Vol. 124(1) 35-46, doi: 10.1016/j.cell.2005.12.022
- 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.
- Higuera-Ciapara, I., Félix-Valenzuela, L., y Goycoolea, F. M. (2006). Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(2), 185–196. doi: 10.1080/10408690590957188
- Horton, J. D., Goldstein, J. L., y Brown, M. S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(9), 1125–1131., doi: 10.1172/JCI200215593
- Horton, J. D., Shimomura, I., Brown, M. S., Hammer, R. E., Goldstein, J. L., y Shimano, H. (1998). Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(11), 2331-2339, doi: 10.1172/JCI2961
- Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K., y Pease, L. R. (1989). Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, 77(1), 61–68,

doi:10.1016/0378-1119(89)90359-4

- Hua, X., Nohturfft, A., Goldstein, J. L., y Brown, M. S. (1996). Sterol Resistance in CHO Cells Traced to Point Mutation in SREBP Cleavage Activating Protein. *Cell*, 87(3), 415–426, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81362-8
- Hua, X., Yokoyama, C., Wu, J., Briggs, M. R., Brown, M. S., Goldstein, J. L., y Wang, X. (1993). SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element, *Proceedings of the National Academy of Sciences*.ec 1993, 90 (24): 11603-11607; doi: 10.1073/pnas.90.24.11603
- Huang, Y., Du, K., Xue, Z., Yan, H., Li, D., Liu, y W., Chen, G. (2003). Cobalt chloride and low oxygen tension trigger differentiation of acute myeloid leukemic cells: possible mediation of hypoxia-inducible factor-1 a, *Molecular Targets for Therapy* (MTT) 17: 2065–2073, doi: 10.1038/sj.leu.2403141
- 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, doi:10.1016/j.cell.2005.01.012
- Hwang, J., Ribbens, D., Raychaudhuri, S., Cairns, L., Gu, H., Frost, A., Espenshade, P. J. (2016). A Golgi rhomboid protease Rbd2 recruits Cdc48 to cleave yeast SREBP. *The EMBO Journal*, 35(21): 2332–2349, doi: 10.15252/emj
- Johnson, E. A., y J. Lewis, M. (1979). Astaxanthin Formation by the Yeast *Phaffia rhodozyma*. *Microbiology-sgm*, 115: 173-183, doi:10.1099/00221287-115-1-173
- Johnson, E. (2003). *Phaffia rhodozyma*: Colorful odyssey, *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology* 6(3): 169 - 174. doi: 10.1007/s10123-003-0130-3
- Kajiwara, S., Fraser, P. D., Kondo, K., y Misawa, N. (1997). Expression of an exogenous isopentenyl diphosphate isomerase gene enhances isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *The Biochemical Journal*, 324 (Pt 2): 421-426. doi: no encontrado
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12): 1647–1649, doi: 10.1093/bioinformatics/bts199
- Kuijpers, N. G. A., Solis-escalante, D., Bosman, L., Broek, M. Van Den, Pronk, J. T., Daran, J., y Daran-lapujade, P. (2013). A versatile , efficient strategy for assembly of multi-fragment expression vectors in *Saccharomyces cerevisiae* using 60 bp synthetic recombination sequences, *Microbial Cell Factories*, 12: 47, doi: 10.1186/1475-2859-12-47
- Lee, C. S., Stewart, E. V, Hughes, B. T., y Espenshade, P. J. (2009). Oxygen-dependent binding of Nro1 to the prolyl hydroxylase Ofd1 regulates SREBP degradation in yeast, *The EMBO journal*, 28(2): 135–143, doi: 10.1038/emboj.2008.271
- Lee, H., Bien, C. M., Hughes, A. L., Espenshade, P. J., Kwon-chung, K. J., y Chang, Y. C. (2007). Cobalt chloride , a hypoxia-mimicking agent , targets sterol synthesis in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*, *Molecular Microbiology*, 65(4): 1018–1033, doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05844.x
- Leiva, K., Werner, N., Sepúlveda, D., Barahona, S., Baeza, M., Cifuentes, V., y Alcaíno, J. (2015). Identification and functional characterization of the *CYP51* gene from the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* that is involved in ergosterol biosynthesis. *BMC Microbiology*, 25; 15:89, doi: 10.1186/s12866-015-0428-2
- Libkind, D., Moline, M.,y Van Broock, M. (2011). Production of the UVB-absorbing compound mycosporine-glutaminol-glucoside by *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *FEMS Yeast Research*. 11(1): 52-59, doi: 10.1111/j.1567-1364.2010.00688.x

- Libkind, D., Ruffini, A., Van Broock, M., Alves, L., y Sampaio, J. P. (2007). Biogeography, host specificity, and molecular phylogeny of the basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma* and its sexual form, *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(4), 1120–1125, doi: 10.1128/AEM.01432-06
- Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . *Methods*, 25(4), 402–408, doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Lodato, P., Alcaíno, J., Barahona, S., Retamales, P., y Cifuentes, V. (2003). Alternative splicing of transcripts from *crtI* and *crtYB* genes of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4676–4682, doi: 10.1128/AEM.69.8.4676
- Loto, I., Gutiérrez, M. S., Barahona, S., Sepúlveda, D., Martínez-Moya, P., Baeza, M., y Alcaíno, J. (2012). Enhancement of carotenoid production by disrupting the C22-sterol desaturase gene (*CYP61*) in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiology*, 12:235, doi:10.1186/1471-2180-12-235
- Love, M. I., Huber, W., y Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8
- Lu, S., y Li, L. (2008). *Carotenoid Metabolism: Biosynthesis, Regulation, and Beyond*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(7):778-85, doi: 10.1111/j.1744-7909.2008.00708.x
- Maoka, T. (2011). Carotenoids in marine animals. *Marine drugs*, 9(2), 278–293, doi: 10.3390/md9020278
- Margalith, P. (1989). Vitamin D: The biotechnology of ergosterol BT - Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors. En E. J. Vandamme (Ed.), 81–93. Dordrecht: Springer Netherlands, doi:10.1007/978-94-009-1111-6\_5
- Merkulov, S., Van Assema, F., Springer, J., Del Carmen, A. F., y Mooibroek, H. (2000). Cloning and characterization of the *Yarrowia lipolytica* squalene synthase (*SQS1*) gene and functional complementation of the *Saccharomyces cerevisiae* *erg9* mutation, *Yeast*, 16(3): 197–206, doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(200002)16:3<197::AID-YEA513>3.0.CO;2-L
- Niklitschek, M., Alcaíno, J., Barahona, S., Sepúlveda, D., Lozano, C., Carmona, M., y Cifuentes, V. (2008). Genomic organization of the structural genes controlling the astaxanthin biosynthesis pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biological Research*, 41(1): 93-108, doi:10.4067/S0716-97602008000100011
- Nohturfft, A., Brown, M. S., y Goldstein, J. L. (1998). Sterols regulate processing of carbohydrate chains of wild-type SREBP cleavage-activating protein (SCAP), but not sterol-resistant mutants Y298C or D443N. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(22): 12848–12853, doi:10.1073/PNAS.95.22.12848
- Nohturfft, A., y Zhang, S. C. (2009). Coordination of lipid metabolism in membrane biogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25: 539-566, doi: 10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175344
- Ojima, K., Breitenbach, J., Visser, H., Setoguchi, Y., Tabata, K., Hoshino, T., van den Berg, J., Sandmann, G. (2006). Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a  $\beta$ -carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. *Molecular Genetics and Genomics*, 275(2): 148 - 158, doi:10.1007/s00438-005-0072-x
- Onishi, M., Ko, N., Nishihama, R., y Pringle, J. R. (2013). Distinct roles of Rho1, Cdc42, and Cyk3 in septum formation and abscission during yeast cytokinesis. *The Journal of Cell Biology*, 202(2): 311 - 329, doi: 10.1083/jcb.201302001.
- Parraga, A., Bellolell, L., Ferré-D'Amaré, A. R., y Burley, S. K. (1998). Co-crystal structure of sterol regulatory element binding protein 1a at 2.3 Å resolution. *Structure*, 15:6(5): 661–672, doi:

10.1016/S0969-2126(98)00067-7

- Phaff, H.J.; Miller, M.W.; Yoneyama, M.; Soneda, M. (1972). A comparative study of the yeast flora associated with trees on the Japanese Island and on the West Coast of North America. *Proceeding IV IFS Fermentation Technology Today, Kyoto. Society of Fermentation Technology, Osaka.*:759-774, doi: no encontrado
- Qin, L., Wu, V. W., y Glassa, N. L. (2017). Deciphering the regulatory network between the SREBP pathway and protein secretion in *Neurospora crassa*. *mBio*, 8(2): 1–16, doi: 10.1128/mBio.00233-17
- Raffatellu, M., Sun, Y.-H., Wilson, R. P., Tran, Q. T., Chessa, D., Andrews-Polymenis, H. L., y Bäumlér, A. J. (2005). Host restriction of *Salmonella enterica* Serotype Typhi is not caused by functional alteration of SipA, SopB, or SopD . *Infection and Immunity*, 73(12): 7817–7826, doi: 10.1128/IAI.73.12.7817-7826.2005
- Rawson, R. B. (2003). The SREBP pathway — insights from insigs and insects, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4: 631-640, doi:10.1038/nrm1174
- 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(3): 645-658, doi: 10.1007/s00253-010-2814-x
- Ruan, R., Wang, M., Liu, X., Sun, X., Chung, K. R., y Li, H. (2017). Functional analysis of two sterol regulatory element binding proteins in *Penicillium digitatum*. *PLoS ONE*, 12(5): 1–17, doi: 10.1371/journal.pone.0176485
- Sakai, J., Nohturfft, A., Cheng, D., Ho, Y. K., Brown, M. S., y Goldstein, J. L. (1997). Identification of complexes between the COOH-terminal domains of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) and SREBP cleavage-activating protein. *Journal of Biological Chemistry*, 272(32): 20213–20221, doi: 10.1074/jbc.272.32.20213
- Sambrook, J. y D. W. Russell. (2001). Molecular cloning. A laboratory manual, 3<sup>rd</sup> edition, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*
- Sandmann, G. (2001). Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385(1): 4–12, doi: 10.1006/abbi.2000.2170
- Schroeder, W. A., y Johnson, E. A. (1993). Antioxidant role of carotenoids in *Phafia rhodozyma*. *Journal of General Microbiology*, 139(5): 907–912, doi: 10.1099/00221287-139-5-907
- Sharma, R., Gassel, S., Steiger, S., Xia, X., Bauer, R., y Sandmann, G. (2015). The genome of the basal agaricomycete *Xanthophyllomyces dendrorhous* provides insights into the organization of its acetyl-CoA derived pathways and the evolution of Agaricomycotina, *BMC Genomics*, 16:233, doi: 10.1186/s12864-015-1380-0
- Shimano, H. (2001). Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes, *Progress in Lipid Research*, 40(6): 439–452, doi: 10.1016/S0163-7827(01)00010-8
- Shuai Liu, Y., y Wu, J. (2007). Perfusion culture process plus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulation for efficient astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnology and Bioengineering*, 15;97(3): 568-573, doi: 10.1002/bit.21256
- Smith, R., Johnson, A. (2000). Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Biochemistry Sci.*, 25: 325-330, doi: no encontrado
- Sprouffske, K., y Wagner, A. (2016). Growthcurver: An R package for obtaining interpretable metrics from microbial growth curves. *BMC Bioinformatics*, 17(1): 17–20, doi: 10.1186/s12859-016-1016-7

- Tarshis, L. C., Proteau, P. J., Kellogg, B. A., Sacchettini, J. C., y Poulter, C. D. (1996). Regulation of product chain length by isoprenyl diphosphate synthases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(26), 15018–15023, doi: 10.1073/pnas.93.26.15018
- Todd, B. L., Stewart, E. V., Burg, J. S., Hughes, A. L., Espenshade, P. J., y Al, T. E. T. (2006). Sterol Regulatory Element Binding Protein is a principal regulator of anaerobic gene expression in fission yeast, *Molecular and Cellular Biology*, 26(7), 2817–2831. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.7.2817>
- Trumbly, R.J. (1992). Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiol.* 6: 15-21, doi:10.1111/j.1365-2958.1992.tb00832.x
- Vázquez, M., Santos, V., y C Parajó, J. (1997). Effect of the carbon source on the carotenoid profiles of *Phaffia rhodozyma* strains. *Journal of Industrial Microbiology*, 19(4): 263-268, doi: 10.1038/sj.jim.2900376
- Venegas, M. (2018). Construcción y estudio funcional de mutantes de la biosíntesis de ergosterol de la levadura carotenogénica *Xanthophyllomyces dendrorhous* Tesis para optar al título profesional de Ingeniera en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Verdoes, J., P Krubasik, K., Sandmann, G., y J. J. van Ooyen, A. (1999). Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Molecular and General Genetics : MGG*, 262(3): 453-461, doi: 10.1007/s004380051105
- Verdoes, C. Misawa, N., y J. J. van Ooyen, A. (1999). Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthetic gene encoding phytoene desaturase of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnology and Bioengineering*, 63(6): 750-755, doi: 10.1002/(SICI)1097
- Verdoes, J. C., Sandmann, G., Visser, H., Diaz, M., Mossel, M. V. y Van Ooyen, A. J. (2003). Metabolic engineering of the carotenoid biosynthetic pathway in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 3728-3738, doi: 10.1128/AEM.69.7.3728-3738.2003
- Visser, H., Van Ooyen, A. J. J., y Verdoes, J. C. (2003). Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *FEMS Yeast Research*. 4(3):221-252, doi: 10.1016/S1567-1356(03)00158-2
- Weber, R. W. S., Becerra, J., Silva, M. J., y Davoli, P. (2008). An unusual *Xanthophyllomyces* strain from leaves of *Eucalyptus globulus* in Chile. *Mycological Research*, 112(Pt7): 861-867, doi: 10.1016/j.mycres.2007.11.019
- Werner, N., Gómez, M., Baeza, M., Cifuentes, V., y Alcaíno, J. (2016). Functional characterization of thiolase-encoding genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous* and their effects on carotenoid synthesis. *BMC Microbiology*, 16(1): 1–13, doi: 10.1186/s12866-016-0893-2
- Wery, J., Dalderup, M. J. M., Ter Linde, J., Boekhout, T., y Van Ooyen, A. J. J. (1996). Structural and phylogenetic analysis of the actin gene from the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Yeast*, 12(7), 641–651, doi:10.1002/(SICI)1097-0061(19960615)
- Willger, S. D., Puttikamonkul, S., Kim, K., Burritt, J. B., Grahl, N., Laurel, J., Barbuch R, Bard M, Lawrence CB y Cramer RA Jr. (2008). A Sterol-Regulatory Element Binding Protein Is Required for Cell Polarity , Hypoxia Adaptation , Azole Drug Resistance , and Virulence in *Aspergillus fumigatus*, *Plos Pathogens*, 4(11) e1000200, doi:10.1371/journal.ppat.1000200
- Yabe, D., Brown, M. S., y Goldstein, J. L. (2002). Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(20), 12753–12758, doi:



10.1073/pnas.162488899

Zhang, Y. Q., y Rao, R. (2010). Beyond ergosterol: Linking pH to antifungal mechanisms. *Virulence*, 1(6), 551–554, doi:10.4161/viru.1.6.13802

## 7. ANEXOS

**Anexo I.** Tabla de genes diferencialmente expresados comunes en las comparativas de cepa silvestre (WT) en condición de hipoxia (H) respecto a normoxia (N) (WT H / WT N) y comparación mutante *CBS.sreI<sup>-</sup>* en hipoxia respecto a la cepa silvestre en hipoxia.

Accession number	Uniprot description	Gene name	WT_H WT_N	size_L-H WT_H	KEEG id	Gene ontology (biological process)
CDZ97564	Acid phosphatase		1,9	2,5	K01078	NA
CED82331	Predicted sugar transporter		7,8	1,9	NA	integral component of membrane [GO:0016021]; carbohydrate transport [GO:0008643]; transmembrane transport [GO:0055085]
CED85345	Cation-transporting ATPase (EC 3.6.3.-)		7,5	2,3	K14950	integral component of membrane [GO:0016021]; ATP binding [GO:0005524]; ATPase activity [GO:0016887]; metal ion binding [GO:0046872]; cation transport [GO:0006812]
CED84500	Uncharacterized protein		5,7	2,2	NA	integral component of membrane [GO:0016021]
CED84913	Histidine phosphatase superfamily, clade-1		5,1	2,4	K15206	NA
CDZ98562	AAA-type ATPase containing the bromodomain		4,8	1,5	NA	ATP binding [GO:0005524]
CED84048	DsRNA-activated protein kinase inhibitor P58, contains TPR and DnaJ domains		4,7	4,3	K09523	kinase activity [GO:0016301]
CED84912	Uncharacterized protein		4,6	2,0	NA	NA
CED83946	Aspartate-trna ligase		4,3	3,6	K01876	cytoplasm [GO:0005737]; aminoacyl-tRNA ligase activity [GO:0004812]; ATP binding [GO:0005524]; tRNA aminoacylation for protein translation [GO:0006418]
CED84125	Uncharacterized protein		4,2	4,7	NA	integral component of endoplasmic reticulum membrane [GO:0030176]; regulation of store-operated calcium entry [GO:2001256]
CDZ98428	Myc-type, basic helix-loop-helix (BHLH) domain	<i>SREI</i>	4,2	1,9	NA	integral component of membrane [GO:0016021]; protein dimerization activity [GO:0046983]
CDZ98280	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone), mitochondrial (DHODEHase) (EC 1.3.5.2)		4,2	1,7	K00254	mitochondrial inner membrane [GO:0005743]; dihydroorotate dehydrogenase activity [GO:0004152]; 'de novo' pyrimidine nucleobase biosynthetic process [GO:0006207]; 'de novo' UMP biosynthetic process [GO:0044205]
CED83773	TatD-related DNase		4,1	2,0	K03424	hydrolase activity, acting on ester bonds [GO:0016788]
CED85353	Voltage-gated potassium channel		4,0	2,1	NA	voltage-gated potassium channel complex [GO:0008076]; voltage-gated potassium channel activity [GO:0005249]
CED82220	Coatmer subunit alpha		3,5	1,8	K05236	COPI vesicle coat [GO:0030126]; Golgi membrane [GO:0000139]; structural molecule activity [GO:0005198]; ubiquitin binding [GO:0043130]; ER to Golgi vesicle-mediated transport [GO:0006888]; intracellular protein transport [GO:0006886]; retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to ER [GO:0006890]
CED83282	Uncharacterized protein		3,5	2,0	NA	integral component of membrane [GO:0016021]
CDZ96534	Dihydroorotase		3,4	3,0	K01465	dihydroorotase activity [GO:0004151]; 'de novo' pyrimidine nucleobase biosynthetic process [GO:0006207]; pyrimidine nucleotide biosynthetic process [GO:0006221]
CED83850	Uncharacterized protein		3,4	2,9	NA	NA
CDZ98627	Uncharacterized protein		3,3	1,6	NA	NA
CDZ97396	Oligosaccharyltransferase, delta subunit (Ribophorin II)		3,3	1,7	K12667	integral component of membrane [GO:0016021]; oligosaccharyltransferase complex [GO:0008250]; transferase activity [GO:0016740]; protein N-linked glycosylation [GO:0006487]
CED84062	Carbohydrate kinase PfkB		3,2	1,9	NA	kinase activity [GO:0016301]
CED84666	Preprotein translocase subunit Sec66		3,0	2,4	K12273	integral component of membrane [GO:0016021]; Sec62/Sec63 complex [GO:0031207]; posttranslational protein targeting to membrane, translocation [GO:0031204]
CDZ96535	TPR repeat-containing protein		3,0	2,4	K16365	TRC complex [GO:0072380]; protein-containing complex scaffold activity [GO:0032947]; posttranslational protein targeting to endoplasmic reticulum membrane [GO:0006620]; response to heat [GO:0009408]
CED84223	Thioredoxin/protein disulfide isomerase		3,0	3,1	K09584	endoplasmic reticulum [GO:0005783]; isomerase activity [GO:0016853]; cell redox homeostasis [GO:0045454]
CED84005	Palmitoyltransferase (EC 2.3.1.225)		2,9	2,1	K20028	integral component of membrane [GO:0016021]; protein-cysteine S-palmitoyltransferase activity [GO:0019706]
CDZ96837	Mannosyltransferase 1, CMT1		2,8	1,6	K13690	transferase activity, transferring glycosyl groups [GO:0016757]
CED84457	Endoplasmic reticulum glucose-regulated protein (GRP94/endoplamin), HSP90 family		2,8	2,7	NA	ATP binding [GO:0005524]; unfolded protein binding [GO:0051082]; protein folding [GO:0006457]; response to stress [GO:0006950]
CDZ96915	Calcium-transporting ATPase (EC 3.6.3.8)		2,7	4,1	K01537	integral component of membrane [GO:0016021]; ATP binding [GO:0005524]; calcium-transporting ATPase activity [GO:0005388]
CED82657	Phosphoinositide phosphatase SAC1		2,6	1,5	NA	phosphoric ester hydrolase activity [GO:0042578]
CED83945	Uncharacterized protein		2,6	4,4	NA	NA
CED82332	Uncharacterized protein		2,5	3,6	NA	NA
CDZ96773	Translocase of outer mitochondrial membrane complex, subunit TOM20		2,5	1,5	K17770	mitochondrial outer membrane translocase complex [GO:0005742]; protein targeting [GO:0006605]
CED84254	Alpha/beta hydrolase		2,5	2,0	K07019	hydrolase activity [GO:0016787]
CED85420	FOG: Transposon-encoded proteins with TYA		2,4	162,1	NA	RNA-directed DNA polymerase activity [GO:0003964]
CED85609	Probable rho2-gtp binding protein rho2		2,4	1,7	K07975	cell division site [GO:0032153]; cell tip [GO:0051286]; intracellular [GO:0005622]; membrane [GO:0016020]; site of polarized growth [GO:0030427]; GTP binding [GO:0005525]; GTPase activity [GO:0003924]; establishment or maintenance of actin cytoskeleton polarity [GO:0030950]; establishment or maintenance of cell polarity regulating cell shape [GO:0071963]; regulation of alpha-glucan biosynthetic process [GO:0032949]; small GTPase mediated signal transduction [GO:0007264]
CED82462	Pattern-formation protein/guanine nucleotide exchange factor		2,3	1,7	K18443	ARF guanyl-nucleotide exchange factor activity [GO:0005086]; regulation of ARF protein signal transduction [GO:0032012]
CED83746	Uncharacterized protein		2,3	1,6	NA	NA
CDZ96821	Afadin/alpha-actinin-binding		2,2	2,1	NA	NA
CED85346	RNA pseudouridylate synthases		2,2	2,6	K22538	pseudouridine synthase activity [GO:0009982]; RNA binding [GO:0003723]; pseudouridine synthesis [GO:0001522]
CED84813	Uncharacterized conserved protein XAP-5		2,2	1,6	K13119	nucleus [GO:0005634]

Accession number	Uniprot description	Gene name	WT H WT N	size H size N	KEEG id	Gene ontology (biological process)
CDZ96582	26s proteasome subunit p45		2,1	1,5	K03062	cytoplasm [GO:0005737]; proteasome complex [GO:0000502]; ATP binding [GO:0005524]; proteasome-activating ATPase activity [GO:0036402]; protein catabolic process [GO:0030163]
CDZ96460	Uncharacterized protein family SERF		2,1	1,5	NA	NA
CED84526	Atp-dependent peptidase		2,1	2,4	K08955	integral component of membrane [GO:0016021]; ATP binding [GO:0005524]; metalloendopeptidase activity [GO:0004222]; oxygen-dependent protoporphyrinogen oxidase activity [GO:0004729]; porphyrin-containing compound biosynthetic process [GO:0006779]
CED84595	Kynurenine 3-monoxygenase (EC 1.14.13.9) (Biosynthesis of nicotinic acid protein 4) (Kynurenine 3-hydroxylase)		2,0	1,6	K00486	integral component of membrane [GO:0016021]; mitochondrial outer membrane [GO:0005741]; FAD binding [GO:0071949]; kynurenine 3-monoxygenase activity [GO:0004502]; NAD(P)H oxidase activity [GO:0016174]; 'de novo' NAD biosynthetic process from tryptophan [GO:0034354]; anthranilate metabolic process [GO:0043420]; kynurenine metabolic process [GO:0070189]; quinolinate biosynthetic process [GO:0019805]; tryptophan catabolic process [GO:0006569]
CED84251	Predicted RNA binding protein, contains G-patch domain		2,0	1,8	K13123	nucleic acid binding [GO:0003676]; mRNA processing [GO:0006397]
CED83460	Adenosine kinase		1,9	2,4	K00856	adenosine kinase activity [GO:0004001]; purine nucleobase metabolic process [GO:0006144]; purine ribonucleoside salvage [GO:0006166]
CED83912	Mip family channel protein		1,9	2,0	K09885	integral component of membrane [GO:0016021]; channel activity [GO:0015267]
CDZ97614	Glycine-trna ligase		1,9	1,5	K01880	cytoplasm [GO:0005737]; ATP binding [GO:0005524]; glycine-tRNA ligase activity [GO:0004820]; glycyl-tRNA aminoacylation [GO:0006426]
CED85578	Translation initiation factor 2B, gamma subunit (EIF-2Bgamma/GCD1)		1,9	1,7	K03241	nucleotidyltransferase activity [GO:0016779]; translation initiation factor activity [GO:0003743]
CDZ97740	Gtp-binding protein		1,8	2,0	K06207	GTP binding [GO:0005525]; GTPase activity [GO:0003924]
CED84630	Uncharacterized protein		1,8	1,7	NA	NA
CED83085	Tyrosine--tRNA ligase (EC 6.1.1.1) (Tyrosyl-tRNA synthetase)		1,8	1,9	K01866	cytoplasm [GO:0005737]; ATP binding [GO:0005524]; tyrosine-tRNA ligase activity [GO:0004831]; tyrosyl-tRNA aminoacylation [GO:0006437]
CDZ96167	Uncharacterized protein		1,8	2,2	NA	NA
CED82463	Endoplasmic reticulum membrane-associated oxidoreductin involved in disulfide bond formation		1,8	1,8	NA	endoplasmic reticulum [GO:0005783]; oxidoreductase activity, acting on a sulfur group of donors, disulfide as acceptor [GO:0016671]; protein disulfide isomerase activity [GO:0003756]
CDZ97316	Chorismate synthase (EC 4.2.3.5)		1,8	1,6	K01736	chorismate synthase activity [GO:0004107]; aromatic amino acid family biosynthetic process [GO:0009073]; chorismate biosynthetic process [GO:0009423]
CED83536	N-terminal acetyltransferase		1,7	1,8	K20792	transferase activity [GO:0016740]
CED84162	Protein transport protein Sec61 subunit beta		1,7	2,1	K09481	integral component of membrane [GO:0016021]; Sec61 translocon complex [GO:0005784]; intracellular protein transport [GO:0006886]
CED83034	Threonyl-tRNA synthetase		1,7	1,6	K01868	cytoplasm [GO:0005737]; ATP binding [GO:0005524]; threonine-tRNA ligase activity [GO:0004829]; threonyl-tRNA aminoacylation [GO:0006435]
CED83514	Methionine aminopeptidase 2 (MAP 2) (MetAP 2) (EC 3.4.11.18) (Peptidase M)		1,7	1,7	K01265	cytoplasm [GO:0005737]; metal ion binding [GO:0046872]; metalloaminopeptidase activity [GO:0070006]; protein initiator methionine removal [GO:0070084]
CDZ96901	Tetratricopeptide-like helical		1,6	1,7	NA	NA
CED84514	Uncharacterized protein		1,6	1,6	NA	integral component of membrane [GO:0016021]
CED85234	Prefoldin alpha subunit		1,6	1,6	K04797	prefoldin complex [GO:0016272]; unfolded protein binding [GO:0051082]; protein folding [GO:0006457]
CDZ97996	START-like domain		1,6	1,6	NA	integral component of membrane [GO:0016021]; lipid binding [GO:0008289]
CED84255	OTU (Ovarian tumor)-like cysteine protease		1,6	1,8	NA	peptidase activity [GO:0008233]
CDZ97180	Pseudouridine synthase		1,6	1,6	K06173	pseudouridine synthase activity [GO:0009982]; RNA binding [GO:0003723]; pseudouridine synthesis [GO:0001522]
CED83492	Diphosphomevalonate decarboxylase (EC 4.1.1.33)	<i>MVD1</i>	1,6	1,7	K01597	cytosol [GO:0005829]; ATP binding [GO:0005524]; diphosphomevalonate decarboxylase activity [GO:0004163]; isopentenyl diphosphate biosynthetic process, mevalonate pathway [GO:0019287]; sterol biosynthetic process [GO:0016126]
CDZ97179	Uncharacterized protein		1,5	2,0	NA	integral component of membrane [GO:0016021]
CDZ96577	G10 protein		1,5	2,1	K12873	nucleus [GO:0005634]
CED84243	Gmp synthase		1,5	1,5	K01951	ATP binding [GO:0005524]; GMP synthase (glutamine-hydrolyzing) activity [GO:0003922]; pyrophosphatase activity [GO:0016462]; glutamine metabolic process [GO:0006541]; GMP biosynthetic process [GO:0006177]
CED85247	Mitochondrial elongation factor		1,5	2,5	K02355	GTP binding [GO:0005525]; GTPase activity [GO:0003924]; translation elongation factor activity [GO:0003746]
CDZ97018	T-complex protein 1 epsilon subunit		1,5	1,7	K09497	chaperonin-containing T-complex [GO:0005832]; ATP binding [GO:0005524]; unfolded protein binding [GO:0051082]; protein folding [GO:0006457]
CDZ98226	Uncharacterized conserved protein		1,4	1,8	K21989	integral component of membrane [GO:0016021]
CED83402	AAA-type ATPase		1,4	2,1	K14575	intracellular [GO:0005622]; preribosome, large subunit precursor [GO:0030687]; ATP binding [GO:0005524]; ATPase activity [GO:0016887]; protein hexamerization [GO:0034214]; response to drug [GO:0042493]; ribosomal large subunit biogenesis [GO:0042273]
CDZ97928	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase 2		1,4	2,1	K00058	NAD binding [GO:0051287]; phosphoglycerate dehydrogenase activity [GO:0004617]; L-serine biosynthetic process [GO:0006564]
CED83716	E3 ubiquitin ligase		1,4	1,7	K10601	Hrd1p ubiquitin ligase complex [GO:0000836]; integral component of membrane [GO:0016021]; ligase activity [GO:0016874]; ubiquitin protein ligase activity [GO:0061630]; zinc ion binding [GO:0008270]; ubiquitin-dependent ERAD pathway [GO:0030433]

**Anexo II.** Determinación de los genes diferencialmente expresados por TPM (*Transcripts per million*).

N° acceso	Descripción Uniprot	Nombre gen en <i>X.d</i>	<u><i>CBS.sreI</i></u>	<u><i>cyp61.sreI</i></u>	<u><i>cyp61</i></u>	<u><i>gSRE1N</i></u>
			WT	<i>CBS.cyp61</i>	WT	WT
<b>Vía del Mevalonato</b>						
CED82454	Acetil CoA aciltransferasa	<i>ERG10</i>				
CED83016	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A sintetasa	<i>HMGs</i>				
CED85502	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa	<i>HMGs</i>				
CED83492	Difosfo-mevalonato decarboxilasa	<i>MVD1</i>				
CED82307	Mevalonato kinasa	<i>MVK</i>				
CDZ97430	Fosfomevalonato kinasa	<i>ERG8</i>				
CED82414	Isopentenil pirofosfato isomerasa	<i>idi</i>				
CED84209	FPP-sintasa	<i>FPS</i>				
<b>Biosíntesis de esteroides</b>						
CED84807	C-8 isomerasa	<i>ERG2</i>				
CED85474	C-14 reductasa	<i>ERG24</i>				
CED83720	C-4 metil esterol oxidasa	<i>ERG25a</i>				
CDZ96809	C-4 metil esterol oxidasa	<i>ERG25b</i>				
CED83486	C-3 esterol deshidrogenasa	<i>ERG26</i>				
CED82095	C-5 desaturasa	<i>ERG3</i>				
CED83198	C-24 reductasa	<i>ERG4</i>				
CED85039	Esterol C-24-metiltransferasa	<i>ERG6</i>				
CED82918	Miembro de la familia de la ciclasa	<i>ERG7</i>				
CED84182	Lanosterol 14 a-demetilasa	<i>CYP51</i>				
CED85128	C22-esterol desaturasa	<i>CYP61</i>				
<b>Biosíntesis de carotenoides</b>						
CDZ97186	Geranilgeranil pirofosphateo sintasa	<i>crtE</i>				
CED83449	fitoeno-β-caroteno sintasa	<i>crtYB</i>				
CED83513	Fitoene dehidrogenasa	<i>crtI</i>				
CED83940	Astaxantina sintasa	<i>crtS</i>				
CDZ98161	NADPH-citrocromo P450 reductasa	<i>crtR</i>				

-4 -2 0 2 4

**Anexo II (continuación).** Determinación de los genes diferencialmente expresados por TPM (*Transcripts per million*).

Nº acceso	Descripción Uniprot	Nombre gen en <i>X.d</i>	<u><i>CBS.sreI</i></u>	<u><i>cyp61.sreI</i></u>	<u><i>cyp61</i></u>	<u><i>gSREIN</i></u>
			WT	<i>CBS.cyp61</i>	WT	WT
<b>Via SREBP</b>						
CDZ98428	Proteína tipo Myc (dominio bHLH)	<i>SRE1</i>				
CDZ83298	Intramembrane metalloprotease	<i>STP1</i>				
<b>Transcripción y Metabolismo DNA</b>						
CDZ97122	Basic-leucine zipper domain					
CDZ85352	Factor de transcripción tipo-D Zn(2)-C6					
CDZ83447	40s ribosomal protein s9					
CDZ83876	Factor de transcripción UAF-RNA polimerasa I					
CDZ85337	Zinc finger, MYND-type					
<b>Transporte de membrana / Metales</b>						
CDZ96888	Permease of the major facilitator superfamily					
CDZ85084	Zinc-binding oxidoreductase					
<b>Metabolismo de Carbohidratos</b>						
CDZ97258	Glucosil hidroxilasa					
CDZ84412	Liasa de polisacaridos I					
CDZ97610	Glucosil hidroxilasa					
CDZ97118	Lactoilglutación liasa (Glioxalasa I)					
<b>Otras funciones</b>						
CDZ96536	C-3 ceto reductasa					
CDZ97494	Nicotinamida N-metiltransferasa					
CDZ97727	Proteína con función en respiración aerobica					
CDZ82327	Peroxiredoxin cisteina					
CDZ83979	Flavonol reductasa/cin mol-CoA reductasa					
CDZ85636	Proteína 22 Metil methanesulfonato-sensible					
CDZ84922	3 cetoacil CoA tiolasa	<i>POT1</i>				
CDZ96436	Alcohol deshidrogenasa	<i>ADH</i>				

Log<sub>2</sub> TPM  -4 -2 0 2 4