



UCH-FC
Biotecnología
G 643
C. 1

UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO



“Efecto de la delección del gen del factor transcripcional Sre1 en la expresión de sus genes blanco en la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*”

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

Ana María González Soto

Director del Seminario de Título:

Dra. Jennifer Cecilia Alcaíno Gorman

Co-Director:

Dr. Víctor Hugo Cifuentes Guzmán

Noviembre 2016

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por la candidata:

ANA MARÍA GONZÁLEZ SOTO

“Efecto en la delección del gen del factor transcripcional Sre1 en la expresión de sus genes blanco en la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

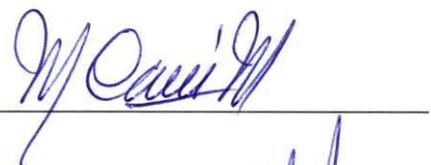
Dra. Jennifer Alcaíno Gorman
Directora Seminario de Título


Firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal. A la derecha se encuentra un sello circular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, con el texto "FACULTAD DE CIENCIAS", "BIBLIOTECA CENTRAL" y "U. DE CHILE".

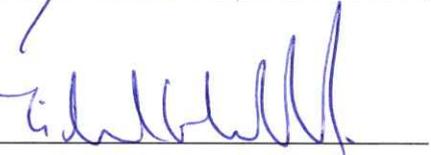
Dr. Víctor Cifuentes Guzmán
Co-Director Seminario de Título

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Margarita Carú Marambio
Presidenta


Firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal.

Dr. Michael Handford
Integrante


Firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, Noviembre de 2016

BIOGRAFÍA



Nací un miércoles 23 de Diciembre de 1992, en la comuna de Ñuñoa.

Mis estudios de enseñanza básica fueron realizados en los colegios Coronel Eleuterio Ramírez Molina, Monteverde y Carmela Carvajal de Prat, siguiendo en este último durante toda la enseñanza media, egresando en el año 2010.

Ingresé a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile el año 2011, obteniendo la Licencia de Ingeniería en Biotecnología Molecular el año 2015.

Ingresé al laboratorio de Genética el año 2013, comenzando mi seminario de título el 2015 bajo la dirección de la Dra Jennifer Alcaíno. El año 2016 ingresé al programa de Magíster en Ciencias Biológicas bajo la misma dirección, el cual desarrollo en la actualidad.

AGRADECIMIENTOS

Gracias al laboratorio de Genética por todo lo aprendido (y lo que se continúa aprendiendo), la buena onda y la buena disposición que existe. Gracias a Sole por recibirme en el laboratorio, responder siempre todas mis dudas, por la amistad y por todo. Gracias a Dony, Salva y Rafa, por estar siempre ahí cuando se les necesita.

Gracias a la profe Jenny, por ser una excelente tutora, preocupada y por confiar en mí.

Gracias a las nenas Nati y Fabi, por ser las mejores hermanitas y apoyarme en todo, aguantar mis enojos y soportar la luz prendida en las noches de pruebas. Gracias a mi mami la cual es mi apoyo, mi mejor amiga y la que siempre ha confiado en mí en todo lo que me he propuesto. Espero convertirme en al menos la mitad de buena persona que eres tu, porque es imposible igualarte.

Gracias a mis tatas, por los valores entregados, por cuidarnos todos estos años. Se que en el cielo el tatita es el más contento de que por fin tenga un título.

Gracias a mi pololo Igna, por ser como es. Por orientarme, por darme ánimo, estar siempre conmigo, y ser el mejor compañero que podría tener. Eres sin duda lo mejor que me ha pasado en la U.

Gracias a todos mis amigos, del colegio, de la U, del lab, los cuales de una u otra forma han estado presentes en toda esta etapa. Gracias por las risas y la distracción.

Gracias finalmente a los FONDECYT 11121200 y 1160202 por el financiamiento durante esta etapa.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|------|
| Biografía | ii |
| Agradecimientos | iii |
| Índice de Tablas | vi |
| Índice de figuras | viii |
| Lista de abreviaturas | x |
| Resumen | |
| Abstract | |
| Introducción | 1 |
| Hipótesis | 14 |
| Objetivos | 14 |
| Objetivo General | 14 |
| Objetivos Específicos | 14 |
| Materiales y Métodos | 15 |
| Cepas en estudio y condiciones de cultivo | 15 |
| Análisis fenotípico de crecimiento frente a inhibidores de los mutantes <i>CBSΔsre1</i> y <i>CBSΔcyp61Δsre1</i> | 15 |
| Análisis de regiones promotoras de genes seleccionados | 17 |
| Curvas de crecimiento de las cepas CBS 6938, <i>CBSΔcyp61Δ</i> , <i>CBSΔcyp61Δsre1</i> y <i>CBSΔsre1</i> | 19 |
| Extracción de ARN y síntesis de ADNc | 19 |
| Determinación del nivel relativo de mensajero mediante RT-qPCR | 19 |

| | |
|---|-----------|
| Resultados | 21 |
| Análisis fenotípico de las cepas CBS 6938, CBS <i>Scyp61</i> , CBS <i>Scyp61</i> Δ <i>sre1</i> y CBS Δ <i>sre1</i> mediante crecimiento en Césped | 23 |
| Análisis fenotípico de las cepas CBS 6938, CBS <i>Scyp61</i> , CBS <i>Scyp61</i> Δ <i>sre1</i> y CBS Δ <i>sre1</i> mediante microgotas | 25 |
| Análisis de regiones promotoras de genes de interés en <i>X. dendrorhous</i> | 30 |
| Análisis de regiones promotoras de genes homólogos de <i>C.neoformans</i> en <i>X. dendrorhous</i> | 38 |
| Análisis mediante RT-qPCR de los niveles de transcrito en las cepas CBS 6938, CBS <i>Scyp61</i> , CBS <i>Scyp61</i> Δ <i>sre1</i> y CBS Δ <i>sre1</i> | 46 |
| Discusión | 53 |
| Conclusiones | 60 |
| Bibliografía | 61 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----------|
| Tabla I. Genes utilizados para la búsqueda de secuencias SRE en <i>X. dendrorhous</i> . | 18 |
| Tabla II. Partidores utilizados para análisis de RT-qPCR. | 20 |
| Tabla III. Posibles secuencias SRE identificadas con la base de datos de JASPAR para genes de interés en <i>X. dendrorhous</i> . | 32 |
| Tabla IV. Posibles secuencias SRE identificadas utilizando el programa Tfbind, MATCH y PATCH para genes de interés en <i>X. dendrorhous</i> . | 34 |
| Tabla V. Posibles secuencias SRE identificadas por más de un programa para la misma región promotora de un gen. | 36 |
| Tabla VI. Proteínas de <i>X. dendrorhous</i> homólogas a las descritas en <i>C. neoformans</i> posiblemente regulados por Sre1. | 38 |
| Tabla VII. Secuencias SRE identificadas con la base de datos de JASPAR, MATCH y PATCH en las regiones promotoras de genes de <i>X. dendrorhous</i> homólogos a los descritos en <i>C. neoformans</i> que posiblemente son regulados por Sre1. | 41 |
| Tabla VIII. Secuencias SRE identificadas con el programa Tfbind en las regiones promotoras de genes de <i>X. dendrorhous</i> homólogos a los descritos en <i>C. neoformans</i> que posiblemente son regulados por Sre1. | 44 |

Tabla IX. Secuencias SRE identificadas por más de un programa en la misma región promotora de genes de *X. dendrorhous* homólogos a los descritos en *C. neoformans* que posiblemente son regulados por Sre1.

45

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Vía de síntesis de astaxantina y ergosterol en la levadura <i>X. dendrorhous</i> . | 5 |
| Figura 2. Vía SREBP en mamíferos. | 7 |
| Figura 3. Crecimiento en placa mediante siembra de césped de las cepas CBS 6938, CBS Δ sre1, CBS <i>Scyp61</i> ⁻ , CBS <i>Scyp61</i> ⁻ Δ sre1 utilizando compuestos antifúngicos. | 22 |
| Figura 4. Crecimiento en placa mediante siembra de céped de las cepas CBS 6938, CBS Δ sre1, CBS <i>Scyp61</i> ⁻ , CBS <i>Scyp61</i> ⁻ Δ sre1 utilizando agentes inductores de estrés oxidativo. | 24 |
| Figura 5. Crecimiento en placa de las cepas CBS 6938, CBS Δ sre1, CBS <i>Scyp61</i> ⁻ , CBS <i>Scyp61</i> ⁻ Δ sre1 mediante diluciones seriadas de los cultivos utilizando compuestos antifúngicos. | 26 |
| Figura 6. Crecimiento en placa de las cepas CBS 6938, CBS Δ sre1, CBS <i>Scyp61</i> ⁻ , CBS <i>Scyp61</i> ⁻ Δ sre1 mediante diluciones seriadas de los cultivos utilizando agentes inductores de estrés oxidativo. | 28 |
| Figura 7. Secuencia SRE consenso de <i>X. dendrorhous</i> obtenida utilizando las secuencias provenientes de la Tabla V. | 37 |
| Figura 8. Secuencia logo obtenida utilizando las secuencias provenientes de la Tabla IX. | 46 |
| Figura 9. Curva de crecimiento de las cepas CBS 6938, CBS <i>Scyp61</i> ⁻ , CBS <i>Scyp61</i> ⁻ Δ sre1 y CBS Δ sre1. | 47 |

Figura 10. Nivel de expresión de los genes *HMGS*, *crtR*, *CYP61*,
STP1, *HMGR*, *crtS*, *DAP1* y *PDC* mediante RT-qPCR

51

LISTA DE ABREVIATURAS

ADNc: ADN complementario.

ARNm: ARN mensajero.

bHLH: basic helix-loop-helix.

DEM: Maleato de dietilo.

DMAPP: Dimetilalil pirofosfato.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

Dsc: Defective for SREBP cleavage.

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno.

FPP: Farnesil pirofosfato.

GGPP: Geranilgeranil pirofosfato.

HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A.

INSIG: Insulin-Induced Gene.

IPP: Isopentenil pirofosfato.

LDL: Lipoproteína de baja densidad.

Nro1: Negative regulator of Ofd1.

Ofd1: 2-oxoglutarate and Fe(II) dioxygenase 1.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

RT-qPCR: PCR cuantitativa tras transcripción inversa.

SCAP: SREBP Cleavage Activating Protein.

SREBP: Sterol Regulatory Element Binding Protein.

SSD: Sterol Sensing Domain.

S1P: Site-1 Protease.

S2P: Site-2 Protease.

UV: Radiación Ultravioleta.

RESUMEN

La levadura carotenogénica *Xanthophyllomyces dendrorhous* es capaz de producir astaxantina, pigmento de interés industrial principalmente en el área acuícola. En esta levadura, la interrupción de la vía de síntesis de ergosterol en el paso catalizado por la enzima Cyp61, genera una mayor producción de astaxantina, sugiriendo un rol regulador del ergosterol sobre la carotenogénesis. La principal vía de regulación por esteroides es la vía SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*), vía que aún no ha sido descrita en *X. dendrorhous*.

La vía SREBP ha sido ampliamente estudiada en mamíferos, y recientemente en levaduras como *Schizosaccharomyces pombe* y *Cryptococcus neoformans*, siendo un mecanismo importante en la regulación de la homeostasis de esteroides en la célula. En esta vía, la proteína SREBP (denominada como Sre1 en hongos) es un factor transcripcional que regula la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de esteroides, donde los genes blanco poseen en su región promotora la secuencia SRE (*Sterol Regulatory Element*) la cual permite la unión de SREBP y así activar su expresión génica cuando los niveles de esteroides disminuyen. En *X. dendrorhous*, el posible gen *SRE1* ha sido identificado y se han obtenido mutantes Δ sre1 en esta levadura. Es así como el objetivo de este trabajo fue caracterizar fenotípicamente dichas mutantes y estudiar la expresión de genes implicados en las rutas de biosíntesis de mevalonato, ergosterol y carotenoides que posiblemente están regulados por Sre1.

De acuerdo con los análisis fenotípicos realizados, se observó que el crecimiento de los mutantes Δ sre1 se vio principalmente afectado en presencia de los antifúngicos anfotericina B y azoles como itraconazol, y también en la presencia de menadiona, compuesto que genera estrés oxidativo a través del ciclo de las quinonas.

Además, bioinformáticamente se identificó elementos SRE en la región promotora de varios genes de la levadura y entre estos últimos, además se encontró que los niveles relativos de los transcritos de los genes *HMGS* y *HMGR* (de la vía del mevalonato), *crtS* (de la síntesis de carotenoides), *crtR* (involucrado en la síntesis de carotenoides y de esteroides) y *CYP61* (de la síntesis de esteroides), son más bajos en los mutantes Δ *sre1* respecto a sus parentales. En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo indican que la vía SREBP se encuentra operativa en *X. dendrorhous* y que ésta regularía al menos la expresión de genes implicados en las vías de síntesis de carotenoides y esteroides, y de la vía del mevalonato. De esta manera, la mutación Δ *sre1* afecta el crecimiento de la levadura en presencia de antimicóticos, ya que alteraría la síntesis de ergosterol.

ABSTRACT

The carotenogenic yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* produces astaxanthin, a pigment of commercial interest mainly in aquaculture. In this yeast, the interruption of the ergosterol synthesis at the step catalysed by Cyp61 favors astaxanthin production, suggesting a regulatory role of ergosterol over carotenogenesis. The main regulatory pathway by sterols is the SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein) pathway, that has not been described yet in this yeast.

The SREBP pathway has been well studied in mammals, and recently in yeasts like *Schizosaccharomyces pombe* and *Cryptococcus neoformans*, where it regulates sterol homeostasis. In this pathway, SREBP (named as Sre1 in fungi) is a transcription factor that regulates the expression of genes related to sterols biosynthesis having a SRE sequence at their promoter region that allows SREBP binding for gene expression activation when sterol levels in the cell decrease.

In *X. dendrorhous*, a potential Sre1 encoding gene (*SRE1*) has been identified and Δ *sre1* mutants have been obtained. Then, the aim of this work was to characterize the mutant phenotype and to study the gene expression of genes involved in the mevalonate pathway and the biosynthesis of sterols and carotenoids.

As a result, it was observed that growth of the Δ *sre1* mutants is mainly affected in the presence of antifungals like amphotericin B and azoles such as itraconazole, and also in the presence of menadione, which is a compound that generates oxidative stress through quinones cycle. Also, SRE elements were bioinformatically identified in the promoter of several analyzed genes and among them, the relative transcript levels of genes *HMGS* and *HMGR* (from the mevalonate pathway), *crtS* (from the synthesis of

carotenoids), *crtR* (involved in the synthesis of carotenoids and sterols) and *CYP61* (from the synthesis of sterols), were lower in the $\Delta sre1$ mutants respect to their parental strains.

In summary, these results indicate that the SREBP pathway is functional in *X. dendrorhous* and it is involved in the regulation of the mevalonate pathway, and the synthesis of carotenoids and sterols. The $\Delta sre1$ mutation affects the yeast growth in the presence of antifungals, because Sre1 regulates ergosterol biosynthesis.

INTRODUCCIÓN

Los carotenoides, por sus propiedades antioxidantes, su coloración, su acción como precursor de la vitamina A, entre otros, son pigmentos de importancia en variadas industrias como la farmacéutica, química, alimenticia y otras. En general, estas moléculas no pueden ser sintetizadas por animales y si lo son por organismos fotosintéticos y algunas bacterias y hongos. Entre los principales derivados se tiene a los carotenos y a las xantófilas, siendo éstas últimas derivados que poseen oxígeno en su estructura. Entre la familia de las xantófilas se tiene a la zeaxantina, donde el oxígeno se encuentra presente en el grupo OH, la cantaxantina, con el oxígeno en su grupo ceto, y la astaxantina que presenta ambos grupos funcionales (Higuera-Ciapara y col., 2006).

La astaxantina (3,3'-dihydroxy- β , β' -carotene-4,4'-dione) es una molécula de 40 átomos de carbono que contiene dos anillos β -ionona en sus extremos que poseen un grupo hidroxilo y ceto unidos por una cadena de polieno con dobles enlaces conjugados. La presencia del doble enlace conjugado en el centro de la molécula le otorga, por un lado, la pigmentación característica (rojo-anaranjado), además de permitir su acción antioxidante mediante la reacción con radicales libres presentes en la célula convirtiéndolos en compuestos más estables (Ambati y col., 2014). Además de proteger frente al daño oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), la astaxantina preserva la estructura de la membrana citoplasmática mediante la inhibición de la peroxidación de lípidos, posee acción anti-inflamatoria y anti-cancerígena, reduce el daño oxidativo en las células beta del páncreas causado por hiperglicemia en pacientes con diabetes mellitus, modula el sistema inmune, protege frente a la radiación UV, entre otras funciones (Ambati y

col., 2014). Por estas propiedades, el consumo de astaxantina en la población ha ido en aumento, ya sea en la forma de suplementos alimenticios o por la ingesta de alimentos en la dieta que lo posean.

La producción a nivel industrial de astaxantina es llevada a cabo principalmente por síntesis química dado su bajo costo en comparación con la obtención desde fuentes naturales (Ye y col., 2015). La producción de astaxantina bajo este método genera una mezcla racémica de astaxantina de la forma 1:2:1 de los isómeros (3S, 3S'), (3R, 3S') y (3R, 3R'), respectivamente. Esto se debe a que en su estructura molecular existen dos centros quirales en C-3 y en C-3', existiendo por tanto dos enantiómeros (3R, 3R') y (3S, 3S'), y una forma meso (3R, 3S') (Higuera-Ciapara y col., 2006).

A pesar del bajo costo de la síntesis química, la obtención de astaxantina desde fuentes naturales se hace necesaria debido a la creciente demanda del mercado ya que astaxantina obtenida bajo este método no puede ser utilizada como suplemento en la dieta debido a que puede contener residuos químicos tóxicos para la población (Ye y col., 2015). Entre los organismos capaces de sintetizar astaxantina *de novo*, se encuentran la microalga verde *Haematococcus pluvialis* y la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*, estos microorganismos acumulan mayor cantidad de astaxantina en comparación con otras especies productoras siendo blanco de estudios de optimización de condiciones de cultivo y de mejoramiento genético para aumentar la producción del pigmento para competir con la astaxantina obtenida a partir del método químico (Ye y col., 2015).

El área económica de mayor relevancia en la industria de astaxantina es la acuicultura donde ésta es necesaria para la adecuada pigmentación, crecimiento y reproducción de salmónidos. La producción en gran escala de salmónidos requiere que éstos sean criados en cautiverio, condición en la cual los peces no tienen acceso a las fuentes naturales de astaxantina. Por esta razón, este pigmento debe ser adicionado externamente para satisfacer la demanda de los consumidores respecto a la coloración característica de la carne de los peces (Schmidt y col., 2011). La astaxantina utilizada en la industria del salmón es principalmente obtenida por síntesis química, donde los peces son capaces de fijar cualquiera de los enantiómeros presentes en la mezcla racémica. Sin embargo, fuentes naturales de astaxantina tienden a producir solo uno de los enantiómeros, donde *H. pluvialis* produce en mayor proporción la forma (3S, 3S'), que es precisamente la forma que fijan mayoritariamente salmónidos no crecidos en cautiverio. En cambio, la levadura *X. dendrorhous* produce en mayor proporción el enantiómero (3R, 3R'), pero de forma no esterificada lo que representa una ventaja. A pesar que existen efectos nutracéuticos para la población al consumir formulaciones con astaxantina esterificada (como ocurre con la astaxantina proveniente de *H. pluvialis*), astaxantina no esterificada como la que produce principalmente *X. dendrorhous* (alrededor de un 97% de astaxantina como enantiómero libre) es más accesible que la producida por *H. pluvialis*, ya que un paso clave para la biodisponibilidad del carotenoide es la hidrólisis del enlace éster (Rodríguez-Sáiz y col., 2010).

X. dendrorhous es una levadura basidiomicete que fue aislada a partir de exudados de árboles de Japón en la década de los años 60, bajo su forma anomórfica *Phaffia rhodozyma*. Luego que su ciclo de vida fuera descrito, se conoció el estado

telomórfico de esta levadura que se llamó *X. dendrorhous* (Golubev, 1995). Este microorganismo es capaz de producir astaxantina a partir de β -caroteno mediante un sistema citocromo P450 conformado por la enzima astaxantina sintasa CrtS, la cual recibe electrones de la citocromo P450 reductasa CrtR para la oxigenación del sustrato, el β -caroteno (Gutiérrez y col., 2015).

La vía de síntesis de carotenoides en *X. dendrorhous* (Figura 1) se inicia a partir del acetil-CoA, el cual luego de sucesivas reacciones químicas en la ruta del mevalonato, da a lugar a isopentenil pirofosfato (IPP, C₅) siendo éste la unidad básica estructural de los componentes posteriores en la vía. Luego, IPP es condensado a su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP, C₅) formando geranil pirofosfato (GPP, C₁₀), al cual se le adiciona otra molécula de IPP formándose farnesil pirofosfato (FPP, C₁₅). El FPP es el precursor de la síntesis de esteroides (con la condensación de dos moléculas de FPP para formar escualeno), pero, por otro lado, la adición de una molécula de IPP a FPP genera geranilgeranil pirofosfato (GGPP, C₂₀) que es el precursor de los carotenoides.

El ergosterol es el principal esteroide en levaduras, el cual es un componente estructural y regulador de la membrana plasmática de estos organismos (Loto y col., 2012). Se ha observado que interrumpir la vía de síntesis de ergosterol mediante la delección del gen CYP61, que controla uno de los últimos pasos de la vía, produce un aumento en la síntesis de astaxantina, observándose una coloración más rojiza en los mutantes (Loto y col., 2012) sugiriendo un rol regulador del ergosterol sobre la carotenogénesis.

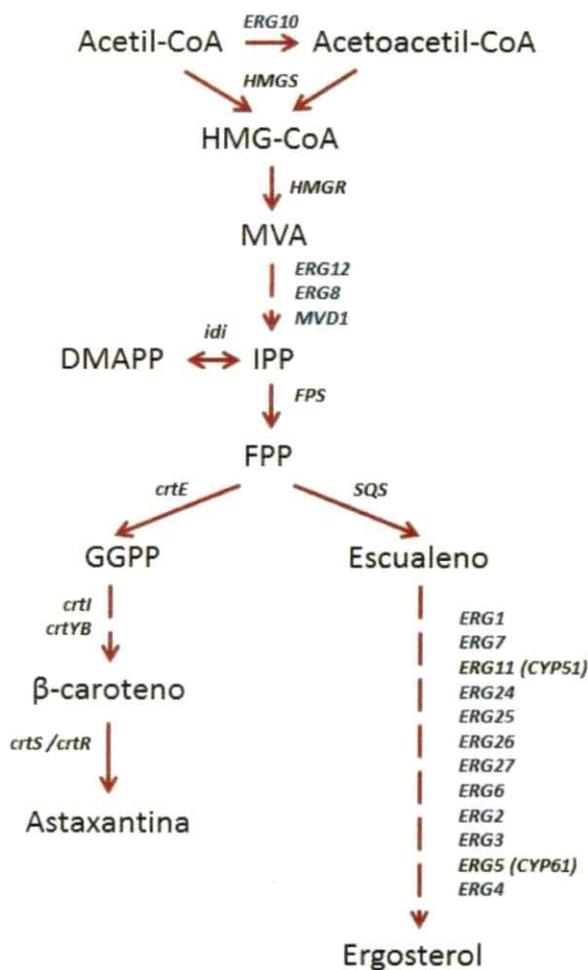


Figura 1. Vía de síntesis de astaxantina y ergosterol en la levadura *X. dendrorhous*. Las flechas indican las reacciones catalizadas por las enzimas codificadas por los genes mostrados en azul y negro, que se encuentran de manera adyacente a la flecha. Líneas punteadas indican más de una reacción química llevada a cabo por dos o más enzimas. Los genes indicados en azul siguen la nomenclatura descrita para *S. cerevisiae* y que aun no han sido caracterizados funcionalmente en *X. dendrorhous*. Los genes indicados en negro, han sido caracterizados funcionalmente en *X. dendrorhous*. El código GenBank de los genes que han sido descritos funcionalmente en la levadura son: *ERG10* (LN483124.1), *HMGS* (DI059433.1), *HMGR* (AJ884949), *idi* (DQ235686), *FPS* (DI032788.1), *crtE* (DQ012943), *crtYB* (DQ016503), *crtI* (Y15007), *crtS* (EU713462), *crtR* (EU884133), *SQS* (EA489199), *CYP51* (KP317478) y *CYP61* (JX183240.1). El código GenBank para genes que han sido anotados por Sharma y col., 2010, son las siguientes: *ERG12* (LN483124.1), *ERG8* (LN483167.1), *MVD1* (LN483142.1), *ERG1* (LN483142.1), *ERG7* (LN483142.1), *ERG24* (LN483332.1), *ERG25* (LN483157.1), *ERG27* (LN483144.1), *ERG6* (LN483332.1), *ERG2* (LN483166.1), *ERG3* (LN483124.1), *ERG4* (LN483142.1). Abreviaturas: 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA), dimetilalil pirofosfato (DMAPP), isopentenil pirofosfato (IPP), farnesil pirofosfato (FPP) y geranilgeranil pirofosfato (GGPP).

La regulación por esteroides fue en primer lugar estudiada en mamíferos, siendo la vía SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*, Figura 2) el principal sistema de regulación de la homeostasis del colesterol. Esta vía en mamíferos (revisada en Bien y Espenshade, 2010) se encuentra conformada por el factor transcripcional SREBP que se sintetiza como un precursor inactivo anclado a la membrana del retículo endoplásmico. Si los niveles de esteroides son suficientes, la proteína SCAP (*SREBP Cleavage Activating Protein*) es capaz de sensorarlo, reteniendo a SREBP en el retículo endoplasmático gracias a la interacción con la proteína INSIG (*Insulin-Induced Gene*). Si los niveles de esteroides disminuyen, SCAP cambia su conformación, lo que interrumpe su interacción con INSIG permitiendo la movilización del complejo SCAP-SREBP hacia el Aparato de Golgi, donde es sucesivamente cortado por las proteasas S1P y S2P (*Site-1 Protease* y *Site-2 Protease*), liberando el dominio N-terminal de SREBP (SREBPN, proteína activa) el cual viaja hacia el núcleo y cumple su función como factor transcripcional. En el núcleo, SREBPN reconoce y se une a secuencias SRE (*Sterol Regulatory Element*) en la región promotora de genes blanco, promoviendo así la transcripción de genes relacionados con la síntesis de colesterol a partir del Acetil-CoA y con su captación desde el medio extracelular mediante el receptor de LDL (Bien y Espenshade, 2010).

El factor transcripcional SREBP está compuesto principalmente por dos dominios. El dominio N-terminal posee el dominio de unión a DNA el cual es del tipo básico hélice vuelta hélice (bHLH por sus siglas en inglés), el cual difiere de otros factores de esta familia ya que posee una tirosina conservada en lugar de una arginina en la región básica de este motivo. Esta diferencia le otorga la posibilidad de unirse no solo a invertidos E-box (5'-CANNTG-3') sino también a secuencias SRE (por ejemplo,

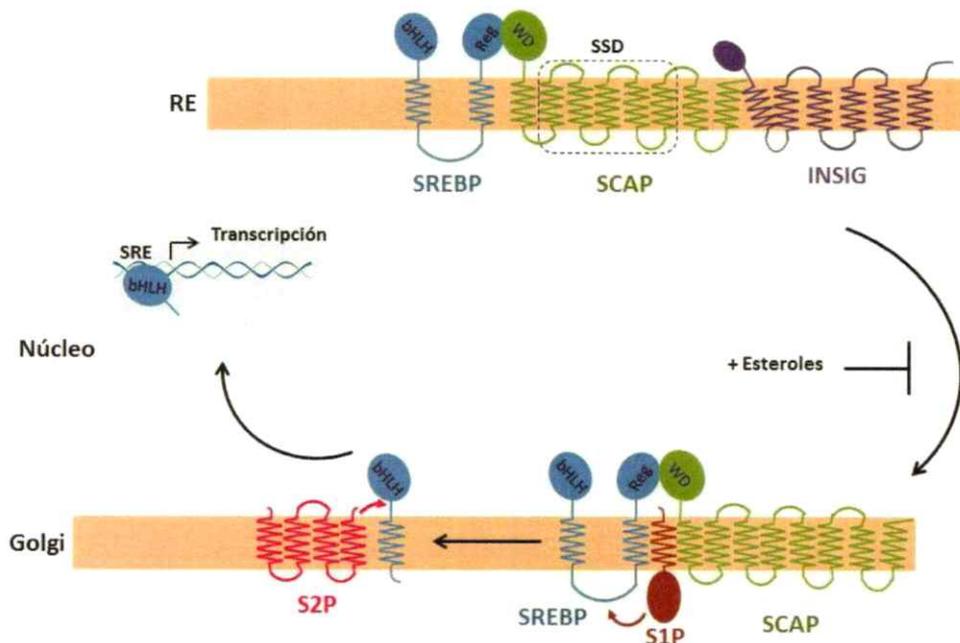


Figura 2. Vía SREBP en mamíferos. El factor transcripcional SREBP se encuentra anclado en el retículo endoplásmico (RE) unido por su dominio regulatorio (Reg) a repetidos de residuos de triptófano aspártico (WD) de SCAP, el cual une esteroides en su dominio *Sterol Sensing Domain* (SSD). Si los niveles de esteroides son suficientes, el complejo SREBP-SCAP se mantiene anclado en retículo retenido por la proteína INSIG. Si los niveles de esteroides disminuyen, SREBP-SCAP es transportado al aparato de Golgi donde es sucesivamente cortado por las proteasas S1P y S2P, liberando el N-terminal que posee el dominio de unión a DNA (bHLH), el cual en el núcleo se une a elementos SRE promoviendo la transcripción de sus genes blanco.

5'-TCACNCCAC -3') (Rawson, 2003). El segundo dominio corresponde al dominio carboxilo terminal, el cual cumple una función regulatoria uniéndose a SCAP y activándose en condiciones de bajo colesterol. Estos dos dominios se encuentran separados por dos segmentos de transmembrana permitiendo su inserción en la membrana del retículo endoplásmico. En mamíferos, SREBP se encuentra en tres isoformas: SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2, donde las dos primeras provienen de un mismo gen cuyo ARNm es procesado de dos maneras mediante splicing alternativo. Estas tres isoformas pueden activar todos los genes dependientes de SREBP, aunque difieren en la eficiencia de la activación, siendo SREBP-1c el más débil por poseer un

dominio de transactivación más corto. SREBP-1a y -1c preferentemente activan genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos y su incorporación como triglicéridos y fosfolípidos, en cambio SREBP-2 activa preferentemente genes de la biosíntesis de colesterol y el receptor de LDL (Rawson, 2003; Horton y col., 2003 y Amemiya-Kudo y col., 2002).

La activación de SREBP es dependiente de la proteína SCAP, la cual posee dos dominios. El dominio N-terminal se encuentra compuesto por 8 segmentos de transmembrana, donde 5 de ellos (hélices 2 a la 6) comprenden al dominio que detecta esteroides, el dominio SSD (*Sterol Sensing Domain*). Mutaciones en aminoácidos claves de este dominio producen una activación constitutiva de SREBP, activándose de manera independiente de los niveles de colesterol (Rawson, 2003). El dominio carboxilo terminal de SCAP posee múltiples repetidos WD (repetidos de triptófano y aspartato) que median la interacción proteína-proteína, en este caso entre SREBP y SCAP.

La proteína que interactúa con el complejo SREBP-SCAP es INSIG, la cual es capaz de interactuar con las hélices de transmembrana 1 a la 6 de SCAP (donde se encuentra comprendido el dominio SSD de esta proteína). Esta proteína existe en dos isoformas, INSIG-1 e INSIG-2, siendo ambas muy hidrofóbicas, ya que la mayor parte de la proteína consiste en 6 segmentos de transmembrana, donde una porción muy corta del segmento amino y carboxilo terminal se proyecta al espacio citosólico. La mayor diferencia entre estas dos proteínas es la regulación en su expresión, ya que INSIG-1 es un blanco de SREBP y por tanto su expresión se induce en deficiencia de colesterol; no así INSIG-2, que se expresa de manera constitutiva. Cuando los niveles de esterol son bajos, INSIG-1 es ubiquitinado para su degradación vía proteosoma, en

cambio en presencia de esteroides unidos a SCAP, INSIG se estabiliza previniendo la ubiquitinación (Goldstein y col., 2006 y Rawson, 2003).

Las proteínas S1P y S2P son dos proteasas que se encuentran ancladas en el aparato de Golgi. S1P es una serina proteasa que se encuentra insertada en el Golgi por solo un segmento de transmembrana, dejando al dominio catalítico hacia el lumen del Golgi. En este dominio catalítico, la triada de residuos aspártico-serina-histidina son necesarios y fundamentales para el corte de SREBP, cortando entre los residuos leucina y serina de la secuencia RSLV presente en el loop hidrofílico de SREBP localizado en el lumen del Golgi (Rawson y col., 1997 y Rawson, 2003). S2P es una zinc metaloproteasa que posee la secuencia consenso característica HEXXH. Además, S2P posee la secuencia LDG en su extremo C-terminal que contribuye a la unión de zinc. Esta proteína también es altamente hidrofóbica, lo que la distingue de otros miembros de esta familia de proteasas, otorgándole la propiedad de poder cortar entre un segmento de transmembrana como ocurre con SREBP lográndose así la liberación del dominio N-terminal que corresponde a la proteína activa. En SREBP-2, la secuencia que es reconocida por S2P es DRSRILLC, cortando entre la leucina y la cisteína (Brown y Goldstein, 1999).

Para la regulación por colesterol, la presencia de la secuencia SRE en la región promotora de sus genes blanco es fundamental. La secuencia SRE fue en primer lugar identificada en el gen que codifica el receptor de LDL, siendo en este caso 5' ATCACCCAC 3'. Se ha observado que mutaciones en esta secuencia *cis* del gen del receptor de LDL produce un defecto en el crecimiento en condiciones con bajo colesterol, indicando que ella es esencial para la activación de la transcripción de este gen (Edwards y col., 2000). Dada la importancia de la regulación por colesterol en

mamíferos, esta vía ha sido estudiada arduamente. Se han identificado genes regulados por SREBP y las secuencias SRE se han identificado inicialmente utilizando ensayos como EMSA y luego con ensayos a gran escala mediante la utilización de inmunoprecipitación de cromatina acoplado con secuenciación (ChIP-seq) (Seo y col., 2009) permitiendo recopilar una gran base de datos al respecto. De acuerdo con estudios realizados, genes que poseen secuencias SRE y que son regulados por SREBP están relacionados con la síntesis y obtención de colesterol desde el medio extracelular, como las enzimas HMG-CoA reductasa y el propio receptor de LDL, respectivamente, junto con genes relacionados con la síntesis de lípidos como el de la acetil-CoA- carboxilasa (Edwards y col., 2000).

Recientemente se ha determinado que la vía SREBP se encuentra conservada en hongos filamentosos y levaduras. Se han buscado ortólogos de las proteínas de esta vía en microorganismos como *Schizosaccharomyces pombe*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus*. A pesar de la baja identidad de secuencia entre los ortólogos encontrados, éstos poseen una función similar que en mamíferos (Bien y Espenshade, 2010).

La vía SREBP en microorganismos ha sido mayormente estudiada en la levadura modelo *S. pombe*, donde se han encontrado ortólogos de SREBP (Sre1 y Sre2), SCAP (Scp1) e INSIG (Ins1). Si bien no se han encontrado ortólogos de las proteasas en la levadura de fisión, el corte del precursor inactivo de Sre1 es llevado a cabo por un complejo en el aparato de Golgi denominado Dsc (*Defective for SREBP cleavage*) (Stewart, y col., 2011). En esta levadura se ha encontrado además que la vía SREBP es dependiente de los niveles de oxígeno: en condiciones de normoxia, Ofd1 (*2-oxoglutarate and Fe(II) dioxygenase 1*) promueve la degradación proteosómica

nuclear de Sre1N, pero en hipoxia, Ofd1 es inhibido por la proteína Nro1 (*Negative regulator of Ofd1*) (Bien y Espenshade, 2010). Esta regulación por oxígeno se explica ya que la vía de síntesis de esteroides requiere moléculas de oxígeno en varios de sus pasos. De esta manera, los genes que regula Sre1 están implicados en vías que requieren de oxígeno, como lo es precisamente la biosíntesis de ergosterol, junto con el metabolismo de esfingolípidos, la biosíntesis del grupo hemo, entre otros (Todd y col., 2006).

Respecto a la región del ADN a la cual se une Sre1, análisis muestran que la secuencia SRE se encuentra conservada en este microorganismo. Mediante estudios *in vitro* se ha observado que Sre1 puede unirse a la secuencia SRE del gen del receptor de LDL, aunque análisis de la región promotora de genes blanco indican que la secuencia a la que se unen en la levadura no es exactamente la misma. Como en mamíferos, Sre1 regula su propia transcripción, donde la región promotora de Sre1 posee tres posibles secuencias SRE denominadas SRE1, SRE2 y SRE3. En condiciones de hipoxia, Sre1 se une a SRE2 y SRE3, secuencias que difieren en muy pocas bases con la secuencia clásica identificada en humanos (Todd y col., 2006).

Otro microorganismo donde se ha descrito esta vía es en *C. neoformans* que al igual que *X. dendrorhous*, corresponde a un basidiomicete. En este hongo se han encontrado genes homólogos de Sre1 y Scp1, y de la proteasa S2P presente en mamíferos, denominada en este microorganismo como Stp1. Análisis por microarreglos mostraron que en hipoxia, la cepa silvestre en comparación con la cepa *knockout* de *SRE1*, sobreexpresa genes relacionados con la biosíntesis de ergosterol, captación de metales como hierro y cobre, entre otros, indicando que la vía SREBP regula la expresión de genes involucrados en la síntesis de ergosterol y para la mantención de la

homeostasis de metales en respuesta a hipoxia. En este mismo análisis, se observó que en la cepa mutante en comparación con la silvestre hay una mayor expresión de genes relacionados con la respuesta frente a estrés celular, indicando que la cepa mutante experimenta más estrés en condiciones de bajo oxígeno (Chang y col., 2007). Dada la regulación de la vía SREBP en la síntesis de ergosterol, la cepa mutante es hipersensible al tratamiento con drogas antifúngicas azólicas como fluconazol, itraconazol y voriconazol, drogas que inhiben la biosíntesis de ergosterol mediante la unión a la citocromo P450 esterol 14- α desmetilasa (Cyp51/Erg11 en *S. cerevisiae*). Esta cepa además es más sensible a daño causado por reactivos como peróxido de hidrógeno, paraquat, menadiona o maleato de dietilo (DEM), agentes que inducen estrés oxidativo por diversos mecanismos. Ya que en este microorganismo Sre1 es inducido en hipoxia, agentes que imitan esta condición como el CoCl_2 produce una disminución del crecimiento en cepas mutantes de delección del factor transcripcional (Chang y col., 2007; Chang y col., 2009).

La caracterización fenotípica de los mutantes de delección en las distintas levaduras principalmente se ha llevado a cabo mediante la utilización de drogas azólicas, como el itraconazol. Sin embargo, existen otros compuestos cuyo blanco es el propio ergosterol, como lo es la anfotericina B. La anfotericina B es un antibiótico derivado del actinomicete *Streptomyces nodosus* que es capaz de unirse al ergosterol presente en la membrana plasmática de hongos produciendo una disrupción de su integridad con la liberación de iones como potasio y magnesio (Brajtburg y col., 1990). Se ha observado que en la levadura modelo *S. cerevisiae*, levadura que no posee la vía SREBP pero si un mecanismo compuesto por los factores transcripcionales Upc2p y Ecm22p que regulan la homeostasis de esteroides, mutantes de delección para ambos

genes son más resistentes al tratamiento con este antibiótico. Esto se debe precisamente a que al no existir regulación por ergosterol en estas cepas, poseen menos esteroides en la membrana plasmática por lo que son más resistentes al antibiótico que la cepa silvestre, no así cuando la cepa mutante es tratada con drogas que inhiben la biosíntesis de ergosterol, como la lovastina o compactina (inhiben a la enzima HMG-CoA reductasa de la vía del mevalonato) (Vik y Rine, 2001).

En *X. dendrorhous*, la vía SREBP no se encuentra descrita, pero estudios preliminares de nuestro laboratorio han identificado posibles genes de Sre1, Ofd1, Stp1 y de Nro1 en el genoma de la levadura. Lo anterior sugiere fuertemente que esta vía si sería operativa en *X. dendrorhous* y que podría explicar, al menos en parte, el fenotipo sobreproductor de carotenoides en los mutantes que no producen ergosterol. Se han generado mutantes de delección del posible gen de Sre1, los cuales presentan diferencias en cuanto a su pigmentación con respecto a sus cepas parentales y de crecimiento en presencia de CoCl_2 (Gutiérrez, Tesis de Doctorado en progreso). En estas cepas, se desconoce el efecto en la expresión génica de los genes regulados por Sre1 y no se ha caracterizado su comportamiento frente a compuestos inhibidores de la síntesis de ergosterol o que inducen estrés oxidativo.

En atención a los antecedentes expuestos, la hipótesis y objetivos de este trabajo son:



Hipótesis

Si en *Xanthophyllomyces dendrorhous* la vía de regulación SREBP es operativa y regula la biosíntesis de isoprenoides como esteroides y carotenoides, entonces la delección del gen *SRE1* afectará el crecimiento de la levadura en presencia de azoles o de agentes inductores de estrés oxidativo, y la expresión de genes que contienen elementos SRE en su región promotora.

Objetivos

Objetivo General

Caracterizar fenotípicamente mutantes $\Delta sre1$ de *Xanthophyllomyces dendrorhous* y estudiar la expresión de genes implicados en las rutas de biosíntesis de mevalonato, ergosterol y carotenoides.

Objetivos Específicos

1. Analizar el fenotipo de crecimiento de mutantes $\Delta sre1$ en presencia de inhibidores de la síntesis de ergosterol y agentes que inducen la formación de especies reactivas de oxígeno.
2. Identificar bioinformáticamente genes de *X. dendrorhous* que posiblemente sean regulados por la vía SREBP e identificar potenciales secuencias SREs en su región promotora.
3. Analizar la expresión de posibles genes regulados por la vía SREBP en *X. dendrorhous* identificados en (2) en 4 cepas de la levadura: CBS 6938 (silvestre), CBS $\Delta sre1$, CBS $cyp61^-$ (no produce ergosterol y sobre produce carotenoides) y CBS $cyp61^- \Delta sre1$.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas en estudio y condiciones de cultivo

Las cepas de *X. dendrorhous* utilizadas en este trabajo corresponden a las cepas CBS 6938, CBS*Scyp61*⁻, CBS*Δsre1* y CBS*Scyp61*⁻*Δsre1*. La cepa CBS 6938 corresponde a la cepa silvestre y en la cepa CBS*Scyp61*⁻, que deriva de CBS 6938, el gen *CYP61* que codifica a la esterol C-22 desaturasa está interrumpido por un módulo que confiere resistencia al antibiótico higromicina B (Loto y col., 2012). La cepa CBS*Scyp61*⁻*Δsre1*, que deriva de CBS*Scyp61*⁻, además posee una delección del posible gen que codifica el factor transcripcional Sre1, siendo resistente a higromicina B y zeocina. La cepa CBS*Δsre1*, que deriva de CBS 6938, posee una delección del posible gen del factor transcripcional Sre1, presentando resistencia al antibiótico zeocina. Las cepas de *X. dendrorhous* que se utilizaron en este trabajo se cultivaron a 22 °C con agitación constante en medio YM (extracto de levadura 0,3 %, extracto de malta 0,3 % y peptona 0,5 %) suplementado con glucosa 1 %. Para el crecimiento en placa se utilizó placas YM-agar 1,5 % con los inhibidores correspondientes.

Análisis fenotípico de crecimiento frente a inhibidores de los mutantes CBS*Δsre1* y CBS*Scyp61*⁻*Δsre1*.

Para el análisis fenotípico de las cepas mutantes se utilizaron los compuestos menadiona (Sigma), maleato de dietilo (DEM) (Sigma), agua oxigenada (H₂O₂) (Merck), clotrimazol (Sigma), ketoconazol (Sigma), itraconazol (Sigma) y anfotericina B (Sigma). Los compuestos clotrimazol, ketoconazol y menadiona fueron suspendido en DMSO (Calbiochem) como solvente e itraconazol en cloroformo (Merck) de acuerdo a las

indicaciones del proveedor. Las concentraciones utilizadas fueron determinadas en este trabajo.

El análisis fenotípico de crecimiento se llevó a cabo de dos maneras: i) mediante la aplicación del compuesto sobre un césped de las cepas sembradas en placas de Petri con medio YM y ii) mediante el uso de microgotas de diluciones seriadas de las cepas a analizar sobre placas con medio YM suplementado con los distintos compuestos. Para el primer caso, el césped se confeccionó con cultivos de dos días de las cepas CBS 6938, CBS*cyp61*⁻, CBS*Δsre1* y CBS*cyp61*⁻*Δsre1*, cultivos de los cuales se tomaron muestras para el conteo de células en cámara de Neubauer para luego sembrar aproximadamente $1,6 \times 10^6$ células de cada cultivo en las placas YM-agar que se dejaron secar para luego colocar un filtro estéril en forma de disco al que se le adicionó 10 μ L de cada compuesto a la concentración del stock (itraconazol 0,12 mM; clotrimazol 300 μ g/mL; ketoconazol 400 μ G/mL; anfotericina B 250 μ g/mL; menadiona 1 mg/mL; DEM 5,63 M y H₂O₂ 9,8 M). Se utilizó como control, 10 μ L de DMSO y cloroformo en placas con medio YM.

Para el crecimiento de microgotas, los compuestos mencionados fueron utilizados para la preparación de placas YM-agar con el compuesto respectivo. Para ello, el medio YM se autoclavó de manera independiente, dejándolo enfriar hasta alcanzar una temperatura entre 40-50 °C para la adición del compuesto correspondiente. Las concentraciones utilizadas de cada uno fueron: itraconazol 5 nM; clotrimazol 0,1 μ g/mL; ketoconazol 0,1 μ g/mL; anfotericina B 0,25 μ g/mL; menadiona 5 μ g/MI, DEM 2 mM y H₂O₂ 1,5 mM. Se realizaron diluciones seriadas de un cultivo de 2 días de las distintas cepas, adicionando 10 μ L de cada dilución en las distintas placas. Se utilizó como control, placas solo con YM, YM-DMSO e YM-Cloroformo.

Análisis de regiones promotoras de genes seleccionados.

Se analizaron aproximadamente 1.000 nucleótidos río arriba del inicio de la traducción de los genes seleccionados (Tabla I), correspondientes a genes de la ruta del mevalonato, carotenogénesis y biosíntesis de ergosterol, genes a los cuales se les ha identificado su producto génico como citocromo P450 y genes implicados en un sistema dador alternativo de electrones a citocromos P450, y el gen que codifica a Sre1 en *X. dendrorhous*. Así mismo, se analizó genes que de acuerdo a la literatura son regulados por Sre1 en *C. neoformans* (Chang y col., 2007). Las secuencias génicas se obtuvieron a partir de la base de datos existente en GenBank de NCBI para *X. dendrorhous*, y se buscaron mediante la herramienta BLAST los genes de *X. dendrorhous* homólogos a los identificados en *C. neoformans*.

Las regiones promotoras de estos genes se analizaron con cuatro programas: MATCH (Kel y col., 2003), PATCH (ambos disponibles en <http://www.generegulation.com/pub/programs.html>), Tfbind (Tsunoda y Takagi, 1999) (disponible en <http://tfbind.hgc.jp/>) y JASPAR (Mathelier y col., 2013) (disponible en <http://jaspar.genereg.net/>), programas que se encuentran en línea para la búsqueda de elementos regulatorios en *cis*. Estos programas utilizan la base de datos de TRANSFAC para el caso de MATCH, PATCH y Tfbind, y la base de datos de JASPAR para el faltante. Con estos programas se identificaron posibles secuencias SRE de acuerdo con la base de datos, que en todos los casos corresponde a células de mamíferos (no de hongos).

Tabla I. Genes utilizados para la búsqueda de secuencias SRE en *X. dendrorrhous*.

| Gen | Ruta del mevalonato | | Carotenogénesis | | Síntesis ergosterol | | Otros | |
|-----------------|---------------------|--------------|-------------------|---------------|---------------------|---------|-------------------|--|
| | N° acceso Genbank | Gen | N° acceso Genbank | Gen | N° acceso Genbank | Gen | N° acceso Genbank | |
| ERG10a | CED82454.1 | <i>crtE</i> | AAY33921.1 | FPS | AHW57996.1 | P450.01 | ND | |
| ERG10b | CED84922.1 | <i>crtYB</i> | AAO73816.1 | ERG9 (SQS) | CDZ96456.1 | P450.02 | ND | |
| ERG13 (HMGS) | CED83016.1 | <i>crtI</i> | CAA75240.1 | ERG1 | CED83144.1 | P450.03 | ND | |
| HMGR | CED85502.1 | <i>crtS</i> | ACH73Q153.1 | ERG7 | CED82918.1 | P450.04 | ND | |
| ERG12 | CED82307.1 | <i>crtR</i> | ACI43097.1 | ERG11 | AKE49346.1 | P450.05 | ND | |
| ERG8 | CDZ97430.1 | | | ERG24 | CED85474.1 | P450.06 | ND | |
| MVD1 | CED83492.1 | | | ERG25 | CED83720.1 | P450.07 | ND | |
| Idi | BAA33979.1 | | | ERG26 | CDZ96655.1 | P450.08 | ND | |
| | | | | ERG27 | CDZ96536.1 | P450.11 | ND | |
| | | | | ERG6 | CED85039.1 | P450.12 | ND | |
| | | | | ERG2 | CED84807.1 | SRE1 | ND | |
| | | | | ERG3 | CED82095.1 | CBR.1 | ALP32221.1 | |
| | | | | ERG5 | AFV30193.1 | CBR.2 | ALP32223.1 | |
| | | | | ERG4 | CED83198.1 | CYB5 | ALP32222.1 | |

ND: No disponible en Genbank.

Una vez identificadas las posibles secuencias SRE con cada programa, se compararon los resultados obtenidos seleccionando aquellos genes cuyas regiones promotoras contienen la misma secuencia SRE identificada mediante al menos dos programas diferentes. Las secuencias SRE seleccionadas se alinearon utilizando el programa GENIO/logo (<http://www.biogenio.com/logo/logo.cgi>) para obtener la secuencia consenso de *X. dendrorhous*.

Curvas de crecimiento de las cepas CBS 6938, CBS $cyp61$, CBS $cyp61\Delta sre1$ y CBS $\Delta sre1$

Las cepas CBS 6938, CBS $cyp61$, CBS $\Delta sre1$ y CBS $cyp61\Delta sre1$ se incubaron por triplicado a 22 °C en matraces de 500 mL conteniendo 200 mL de medio YM para la construcción de una curva de crecimiento de la cual se tomó muestra luego de las 100 h de cultivo. Se tomaron tres muestras de 5 mL de cultivo cada una para la extracción de ARN.

Extracción de ARN y síntesis de ADNc

El ARN total se extrajo utilizando el kit comercial de Ambion y se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm. La síntesis de ADNc se llevó a cabo utilizando la enzima M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) de acuerdo al protocolo del fabricante utilizando 5 µg del ARN total en un volumen final de 20 µL.

Determinación del nivel relativo de mensajero mediante RT-qPCR

La medición de la expresión relativa de los genes *crtR*, *crtS*, *HMGS*, *HMGR*, *DAP1*, *PDC*, *STP1*, *CYP61* y *ACT*, se realizó utilizando 1 µL de cDNA y 0,25 µM de

cada partididor utilizando un par de partididores específicos para cada gen (Tabla II) en un volumen final de 20 μ L.

Tabla II. Partidores utilizados para análisis de RT-qPCR.

| Gen | Nombre | Orientación | Secuencia (5' a 3') |
|--------------|---------------|-------------|--------------------------|
| <i>crtR</i> | mcrtRF-RT | F | ctgggaaacaagacc |
| <i>crtR</i> | mcrtRR-RT | R | cggaacctcggttacg |
| <i>crtS</i> | crtS.RT.F | F | tatctctggaccagagcttgc |
| <i>crtS</i> | crtS.RT.R | R | acctgcaaacgcatctggtac |
| <i>HMGS</i> | hmgS.RT2.F | F | aagcaggttgagcctggaatga |
| <i>HMGS</i> | hmgS.RT2.R | R | aaagcgggtgagctcttgacct |
| <i>HMGR</i> | HMGR_Real_2_F | F | ggccgatcgctatacatccgitt |
| <i>HMGR</i> | HMGR_Real_2_R | R | atgcagttgatggcagaaggct |
| <i>DAP1</i> | Dap1.RT2.F | F | agcgatggtcggattctttgg |
| <i>DAP1</i> | Dap1.RT2.R | R | tcagaaggcgtgaggtctgt |
| <i>PDC</i> | PDC.RT2.F | F | tgccgacctgttacttgacct |
| <i>PDC</i> | PDC.RT2.R | R | tgggatcgacactgtccttgta |
| <i>CYP61</i> | RT_CYP61.F | F | catggaaagggtcacgccgagtat |
| <i>CYP61</i> | RT_CYP61.R | R | aaagaccgggaggaagttccat |
| <i>STP1</i> | STP1.RT.F | F | ggcaggggtccgagtgatcaat |
| <i>STP1</i> | STP1.RT.R | R | agaatccgcatccaacagact |
| <i>ACT</i> | mACTF-RT | F | ccgccctcgtgattgataac |
| <i>ACT</i> | mACTR-RT | R | tcaccaacgtaggagtcctt |

Nota: Los partididores para los genes *crtR*, *HMGR*, *CYP61* y *ACT* ya estaban disponibles en el laboratorio.

RESULTADOS

Análisis fenotípico de las cepas CBS 6938, CBS*Scyp61*, CBS*Scyp61* Δ *sre1* y CBS Δ *sre1* mediante crecimiento en césped.

Para conocer si los compuestos tienen algún efecto en las cepas en estudio, en primera instancia se analizó el crecimiento de las cepas mediante el crecimiento en césped, colocando el compuesto sobre un filtro estéril para visualizar posteriormente halos de inhibición del crecimiento, utilizando las concentraciones del stock.

Los primeros agentes analizados fueron los compuestos azólicos clotrimazol, ketoconazol e itraconazol, junto con la droga anfotericina B. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.

Al utilizar las concentraciones del stock de los azoles clotrimazol, ketoconazol e itraconazol, el halo de inhibición de crecimiento en las cepas Δ *sre1* fue de mayor diámetro en comparación con el de las cepas parentales de las cuales derivan. Por lo tanto, las cepas que no poseen el gen *SRE1* son más sensibles a los antifúngicos usados. La cepa CBS*Scyp61* Δ *sre1* fue la más afectada, presentando un mayor halo de inhibición al comparar con las otras tres cepas.

En presencia de anfotericina B, no se logró observar diferencias en el tamaño de los halos entre la cepa CBS Δ *sre1* y la cepa parental CBS 6938, aunque si en el caso de las cepa CBS*Scyp61* Δ *sre1* y su parental CBS*Scyp61*, siendo en este caso la cepa parental la que presenta un halo de inhibición de mayor tamaño.

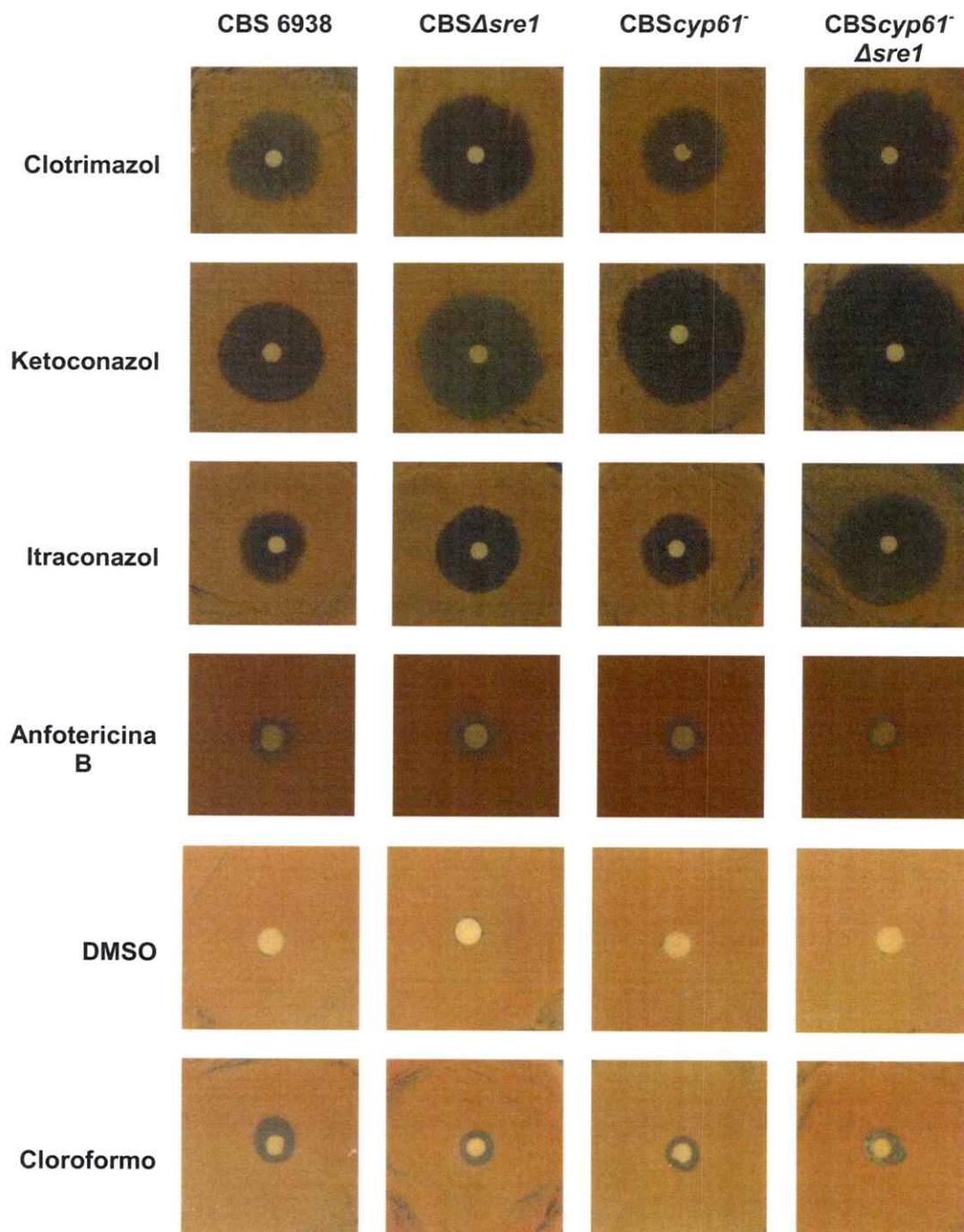


Figura 3. Crecimiento en placa mediante siembra de césped de las cepas CBS 6938, CBS Δ sre1, CBS Δ scyp61, CBS Δ scyp61 Δ sre1 utilizando compuestos antifúngicos. Sobre los filtros, se agregó 10 μ L de los compuestos utilizados a las concentraciones del stock (clotrimazol 300 μ g/mL; ketoconazol 400 μ g/mL; itraconazol 0,12 mM; anfotericina B 250 μ g/mL). Los compuestos DMSO y cloroformo fueron utilizados como solventes e incluidos como control (DMSO para clotrimazol, ketoconazol, y anfotericina, y cloroformo para itraconazol).

El cloroformo afecta levemente el crecimiento de los cultivos controles, por su parte DMSO no produce halos de inhibición en ninguna de las cepas. Cabe mencionar que itraconazol es el único compuesto que fue disuelto en cloroformo, donde en todos los casos los halos generados por este compuesto son de mayor tamaño en comparación con los encontrados en las cepas a las que sólo se les adicionó cloroformo.

El crecimiento de las cepas en estudio en presencia de agentes que causan estrés oxidativo (DEM, H₂O₂ y menadiona) se muestra en la Figura 4.

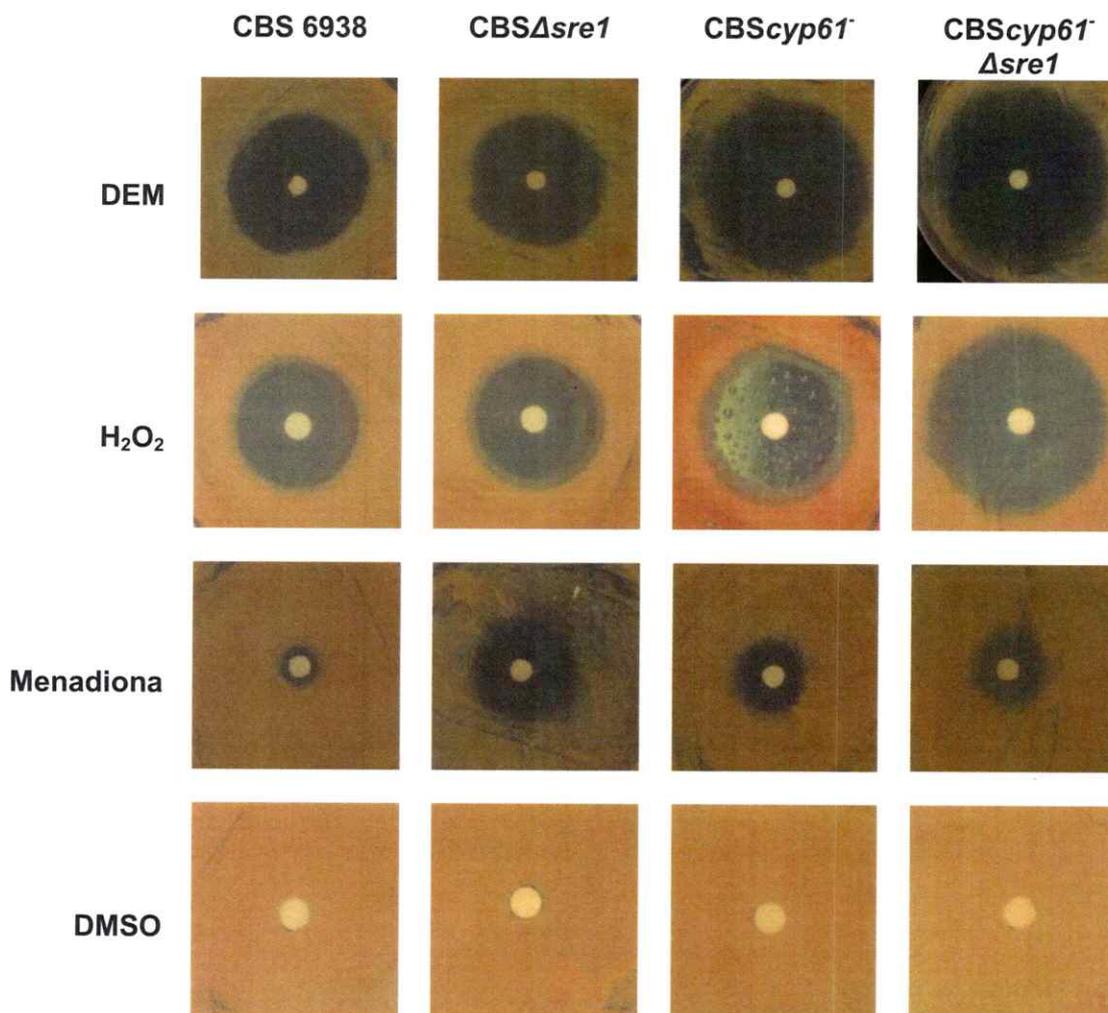


Figura 4. Crecimiento en placa mediante siembra de césped de las cepas CBS 6938, CBS Δ sre1, CBS Δ cyp61, CBS Δ cyp61 Δ sre1 utilizando agentes inductores de estrés oxidativo. Sobre los filtros, se agregó 10 μ L de los compuestos utilizados a las concentraciones del stock (DEM 5,63 M; H₂O₂ 9,8 M y menadiona 1 mg/mL). El compuesto DMSO fue utilizado como solvente e incluido como control.

En el caso del compuesto DEM, no se observaron diferencias entre la cepa CBS Δ sre1 y su parental CBS 6938, presentándose halos de tamaño similar. En el caso de las cepas con la delección del gen CYP61, se pudo observar que la cepa CBS Δ cyp61 Δ sre1 posee un halo más grande en comparación con su cepa parental, siendo estas dos últimas cepas las que presentan un mayor halo en comparación con las dos cepas

restantes. En el caso del peróxido de hidrógeno, se observó un fenómeno similar al observado con DEM: no se observó diferencias con respecto al tamaño del halo generado entre las cepas *CBSΔsre1* y su parental CBS 6938, pero en el caso de las cepas *CBScyp61Δsre1* y su parental *CBScyp61*, se pudo observar en la primera un halo de inhibición de mayor tamaño, siendo también las cepas que poseen la interrupción del gen *CYP61* las que presentaron un halo mayor.

Utilizando el compuesto menadiona, se observó halos de inhibición pequeños, siendo la cepa *CBSΔsre1* la que presenta el halo de mayor tamaño en comparación con su parental CBS 6938, no distinguiéndose diferencias entre las cepas que poseen una interrupción del gen *CYP61* (*CBScyp61Δsre1* y *CBScyp61*). Este compuesto fue disuelto en DMSO, y como se puede observar en la Figura 4, la adición de DMSO no genera halos de inhibición en las cepas.

Análisis fenotípico de las cepas CBS 6938, *CBScyp61*, *CBScyp61Δsre1* y *CBSΔsre1* mediante microgotas

Adicionalmente el efecto de los compuestos sobre el crecimiento de las cepas estudiadas se determinó mediante el método de la microgota de diluciones seriadas. Los primeros compuestos analizados corresponden a los agentes antifúngicos (clotrimazol, ketoconazol, itraconazol y anfotericina B), cuyos resultados se muestran en la Figura 5.

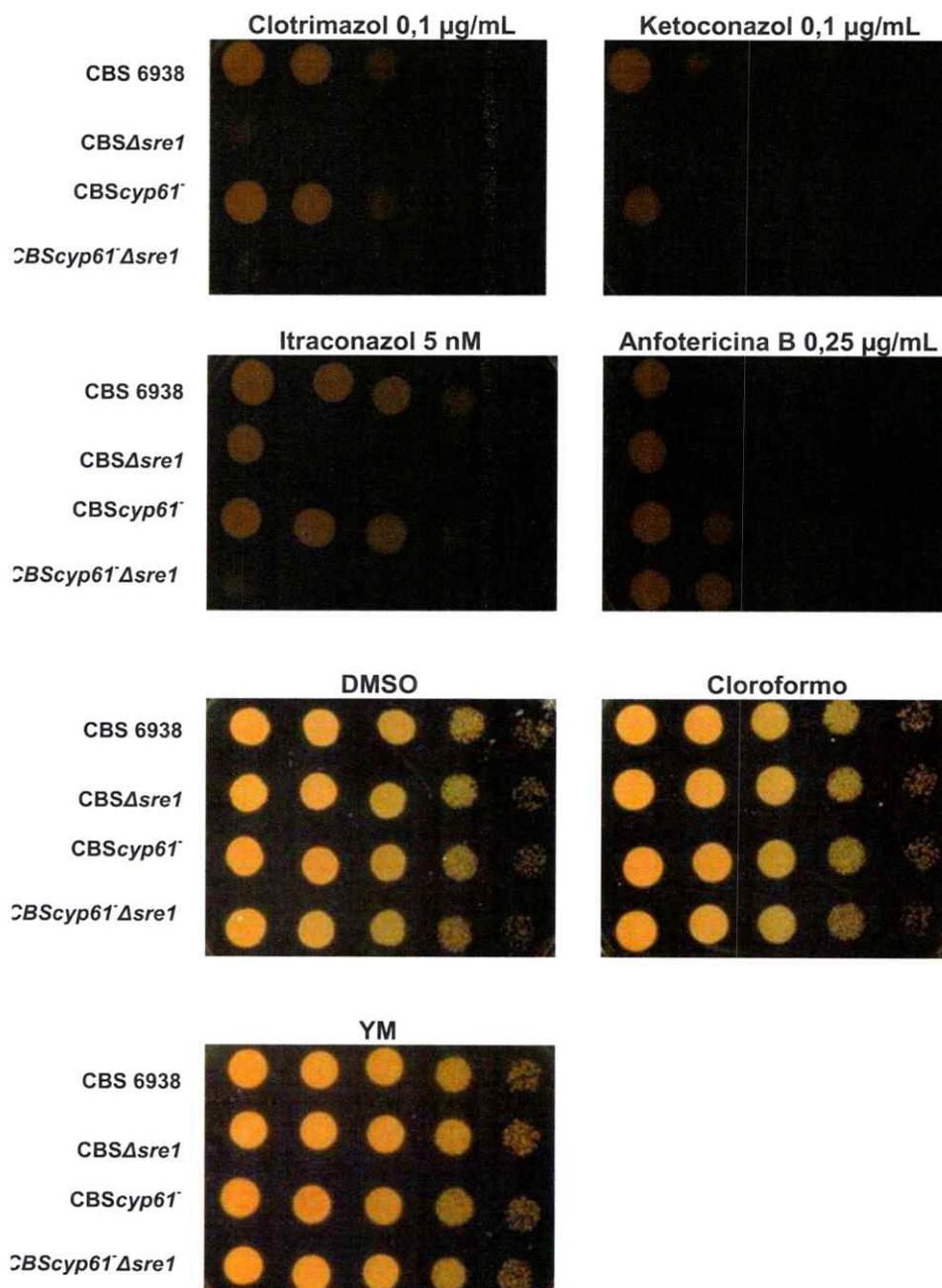


Figura 5. Crecimiento en placa de las cepas CBS 6938, CBS Δ sre1, CBSscyp61, CBSscyp61 Δ sre1 mediante diluciones seriadas de los cultivos utilizando compuestos antifúngicos. Se sembró 10 μ L de cada dilución para realizar la microgota, sobre placas YM-agar suplementadas con los compuestos clotrimazol, ketoconazol, itraconazol o anfotericina B a las concentraciones indicadas en la figura. Como control se utilizaron placas con DMSO y cloroformo, compuestos que fueron utilizados como solvente (DMSO para clotrimazol, ketoconazol, y anfotericina, y cloroformo para itraconazol). Las diluciones se encuentran en orden creciente hacia la derecha para cada cepa utilizando los distintos compuestos, en el siguiente orden: Sin diluir, -1, -2, -3, -4.

Se observó que al utilizar cualquiera de los tres azoles (clotrimazol, ketoconazol e itraconazol), las cepas mutantes $\Delta sre1$: $CBS\Delta sre1$ y $CBS_{cyp61}\Delta sre1$, presentan un defecto notorio en el crecimiento en comparación con las cepas parentales de las cuales derivan CBS 6938 y CBS_{cyp61} , respectivamente. Se observó que al utilizar clotrimazol o ketoconazol a la concentración de 0,1 $\mu\text{g/mL}$, el crecimiento de las cepas parentales también se ve afectado, siendo mucho más pronunciado el efecto utilizando ketoconazol. Al utilizar itraconazol, no se observó diferencias de crecimiento entre las cepas parentales aunque si en las mutantes, notando un efecto mucho más pronunciado en la cepa $CBS_{cyp61}\Delta sre1$ con el crecimiento de unas pocas colonias cuando se sembró el cultivo sin diluir. No se observaron diferencias en crecimiento entre las cepas al utilizar DMSO o cloroformo, que corresponden a los solventes utilizados en los distintos compuestos analizados, con respecto a la placa YM (sin compuesto adicionado).

Al utilizar el compuesto anfotericina B, se observó que las cepas que no producen ergosterol porque poseen el gen *CYP61* interrumpido, presentaron una mayor sobrevida en comparación con las cepas CBS 6938 y $CBS\Delta sre1$, siendo la cepa $CBS_{cyp61}\Delta sre1$ la más resistente al compuesto. Entre las cepas CBS 6938 y $CBS\Delta sre1$ se observó un comportamiento similar, mayor sobrevida en la cepa $CBS\Delta sre1$ en comparación con la cepa silvestre CBS 6938.

Los siguientes compuestos analizados corresponde a aquellos que generan estrés oxidativo (DEM, H_2O_2 y menadiona), cuyos resultados se muestran en la Figura 6.

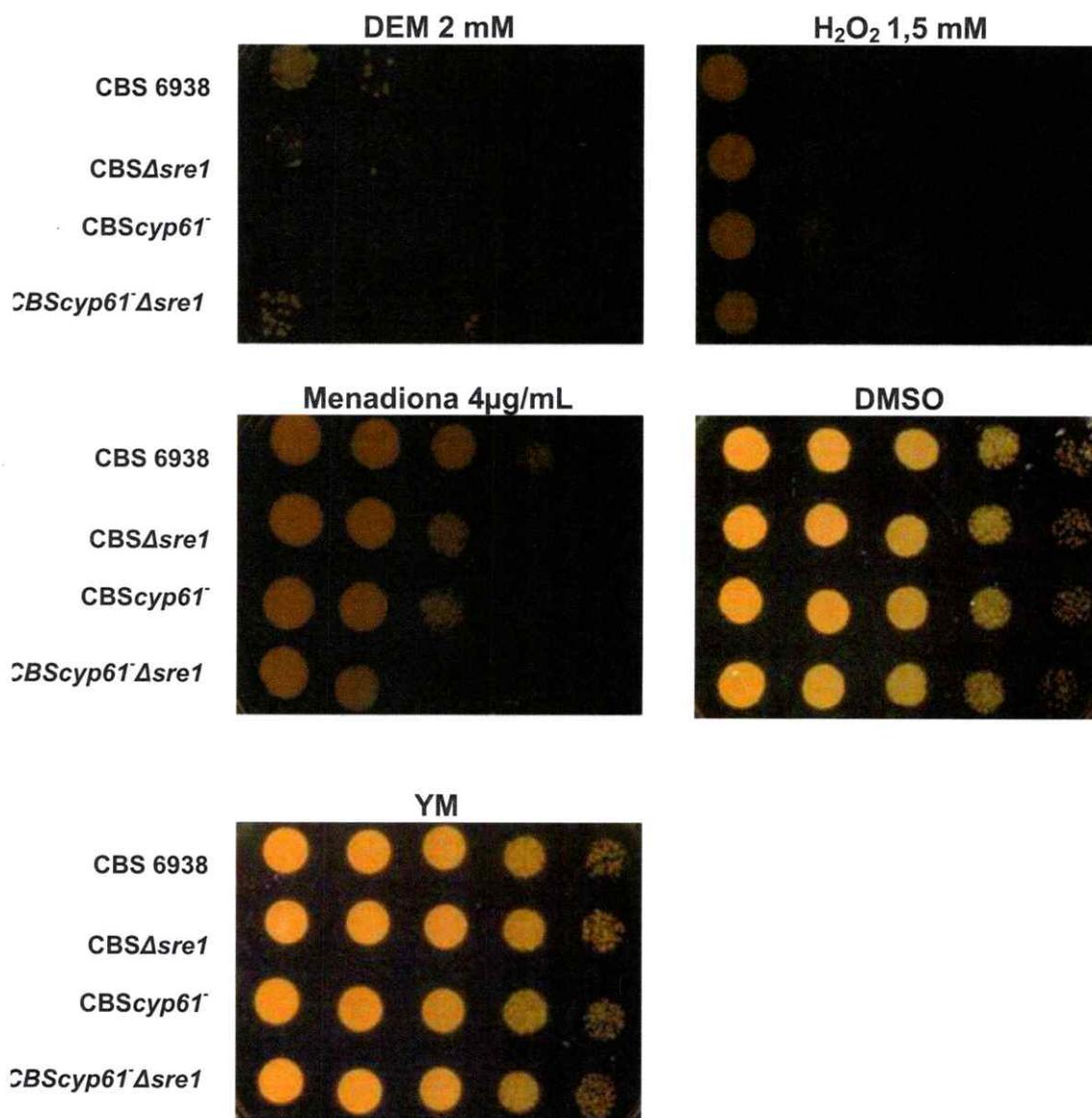


Figura 6. Crecimiento en placa de las cepas CBS 6938, CBS Δ sre1, CBSScyp61-, CBSScyp61- Δ sre1 mediante diluciones seriadas de los cultivos utilizando agentes inductores de estrés oxidativo. Se sembró 10 μ L de cada dilución para realizar la microgota sobre placas YM-agar suplementadas con los compuestos DEM, H₂O₂ o menadiona a las concentraciones indicadas en la figura. Como control se utilizaron placas con DMSO, compuesto que fue utilizado como solvente. Las diluciones se encuentran en orden creciente hacia la derecha para cada cepa utilizando los distintos compuestos, en el siguiente orden: Sin diluir, -1, -2, -3, -4.



Al utilizar placas con una concentración de 2 mM de DEM, se observó que la cepa *CBS Δ sre1* presentó un menor crecimiento en comparación con la cepa parental CBS 6938, presentando solo unas pocas colonias en la microgota sin dilución en comparación con la cepa parental que presenta colonias incluso en la dilución -1. Al comparar la cepa *CBScyp61 Δ sre1* con su parental *CBScyp61 Δ* , se observó que esta última no crece a esta concentración, no así la cepa *CBScyp61 Δ sre1* que presentaron colonias en la microgota sin dilución del cultivo original. Se puede observar que DEM afecta el crecimiento de todas las cepas, comparando con el control en YM sin DEM.

Utilizando H_2O_2 a una concentración de 1,5 mM, se observó que todas las cepas presentan una disminución del crecimiento al compararlas con la condición control (YM), siendo la cepa *CBS Δ sre1* la que presenta un mayor crecimiento en comparación con su parental (CBS 6938). Las cepas que poseen el gen *CYP61* interrumpido presentaron un efecto contrario, donde la cepa *CBScyp61 Δ sre1* presenta un menor crecimiento en comparación con su cepa parental *CBScyp61 Δ* .

Utilizando menadiona a 4 μ g/mL, se observó que los mutantes *Δ sre1* (*CBS Δ sre1* y *CBScyp61 Δ sre1*) se ven más afectados con el compuesto respecto a la cepa de la cual derivan (CBS 6938 y *CBScyp61 Δ* , respectivamente), siendo en este caso las cepas CBS 6938 y *CBS Δ sre1* las que presentan un mayor crecimiento en comparación con las cepas que poseen el gen *CYP61* interrumpido. Al igual que en los casos anteriores, al comparar con la placa control (YM) y con la placa que posee el solvente (DMSO) se observó que todas las cepas presentan un defecto en su crecimiento al utilizar menadiona.

En resumen, las cepas mutantes *CBS Δ sre1* y *CBScyp61 Δ sre1* son más sensibles a los antifúngicos clotrimazol, ketoconazol e itraconazol, obteniendo un

resultado opuesto al ser expuestas a anfotericina B, donde las cepas parentales CBS 6938 y CBS*Scyp61* son más sensibles que sus mutantes Δ *sre1*. Al utilizar compuestos que generan estrés oxidativo, DEM, H₂O₂ o menadiona, se obtienen resultados diversos, observando solo al utilizar menadiona que las cepas mutantes CBS Δ *sre1* y CBS*Scyp61* Δ *sre1* son más sensibles que las parentales.

Análisis de regiones promotoras de genes de interés en *Xanthophyllomyces dendrorhous*

La predicción de los sitios de unión de factores de transcripción requiere una compilación de datos obtenidos de manera experimental, alinear dichas secuencias para posteriormente poder generar una secuencia logo o consenso que permita la búsqueda de la secuencia *cis* en la región a analizar. Principalmente existen dos bases de datos de este tipo de elementos, TRANSFAC y JASPAR, las cuales poseen buscadores en línea para identificar posibles sitios de unión a diversos factores de transcripción.

Se conoce que el factor transcripcional Sre1 regula genes pertenecientes a la ruta de síntesis del ergosterol. Para la biosíntesis de este compuesto, el IPP es un precursor que proviene de la ruta del mevalonato, el cual también es precursor para la biosíntesis de carotenoides (Figura 1). Por este motivo, se analizaron los genes que controlan estas tres vías en búsqueda de elementos SRE en su región promotora. Además, se incluyeron genes que posiblemente codificarían a citocromos P450, a Sre1 y a genes que conformarían una vía alternativa donadora de electrones a las P450, *CBR.1*, *CBR.2* y *CYB5*.

La búsqueda de secuencias SRE en las regiones promotoras de genes en *X. dendrorhous* utilizando la base de datos de JASPAR identificó posibles secuencias SRE en todos los genes estudiados, excepto en *P450.02* y *P450.11*. De las secuencias encontradas, se descartaron aquellas que se encontraron en la hebra antisentido al gen estudiado, ya que de acuerdo con lo observado en la levadura *S. pombe*, la unión del factor transcripcional Sre1p a posibles secuencias SRE identificadas en los genes *SRE1*, *HEM13*, *ERG3* y *OSM1* en la hebra antisentido presentan una unión muy baja o nula *in vitro* (Todd y col., 2006). Bajo estas condiciones, los genes que poseen una posible secuencia SRE y la secuencia en cuestión, se detalla en la Tabla III.

La búsqueda de secuencias SRE en las regiones promotoras de genes en *X. dendrorhous* utilizando el programa Tfbind encontró posibles secuencias SRE en todos los genes estudiados excepto en el gen *P450.11*. Las regiones promotoras de los genes que poseen posibles secuencias SRE en sentido se detallan en la Tabla IV. Utilizando el programa MATCH, las regiones promotoras de los genes *crtI*, *ERG1*, *ERG6* y *P450.04* presentaron posibles secuencias SRE, donde sólo *crtI* y *P450.04* poseen secuencias en sentido, las cuales se encuentran detalladas en la Tabla IV. Finalmente, utilizando el programa PATCH, las regiones promotoras de los genes *ERG10a*, *ERG8*, *MVD1*, *crtS*, *ERG1*, *ERG11*, *ERG25*, *ERG6*, *P450.01*, *P450.04*, *P450.05*, *P450.07* y *CBR.2* poseen posibles secuencias SRE. Las regiones promotoras de los genes que poseen secuencias en sentido se encuentran en la Tabla IV.

Tabla III. Posibles secuencias SRE identificadas con la base de datos de JASPAR para genes de interés en *X. dendrorhous*.

| Gen | Secuencia 1 | Secuencia 2 | Secuencia 3 | Secuencia 4 | Secuencia 5 | Secuencia 6 |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| ERG10a | ATCAGGGGAC | | | | | |
| ERG10b | CTCACTTGAC | ATCATCTCAC | ATCTCACCAT | GTCTCGTCAT | | |
| ERG13 | GTCTCCTGAC | GTAACACCCAC | | | | |
| ERG12 | CTCACGTCAA | | | | | |
| ERG8 | GTCTGCCCAT | TTCACGTGAT | ATCACCTCTT | | | |
| MVD1 | GTAACGGGAT | GTCAGATCAT | CTCACTCGAT | GTCGGCCCAC | CCCACGCCAT | AACACACCAC |
| crfYB | TTCAGGTCAT | ATCACCCGGCT | CTCAACTCAG | ATCACGTGAG | | |
| crfI | ATCACATCAA | | | | | |
| crfS | ATCAGGGGCAC | GACACACCCAT | | | | |
| crfR | CTCACGTGAC | TTCACGCAAC | ATCTCCTCAC | CTCAGGTCAG | | |
| FPS | ATCATCTCAC | CTCACACCTC | GTCAGGCGAG | | | |
| ERG9 | GTCACCTCAA | AGCACGCCAT | ATCAGGCCTT | | | |
| ERG1 | ATCAACCAAT | TTCACCCCAAC | AACACTCCAC | | | |
| ERG7 | GTC AACCGAC | ATCATCTCAT | ATCACCCACAG | | | |
| ERG11/CYP51 | TGGATCTTTT | | | | | |
| ERG24 | GTCATCCCAT | | | | | |
| ERG25 | ATCAGCCCCAC | CTCACGCTAG | CTCACGGCCCG | | | |
| ERG26 | ACGAGCTGAT | | | | | |
| ERG2 | CTCACGTGAC | | | | | |

| | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| ERG5/CYP61 | ATCAGCCAAG | CTCAGATCAG | ATCAGATCAC | ATCACCAGAG | CTCACACCTT |
| ERG4 | GTCAGACCAG | | | | |
| P450.01 | ATCACATGAT | | | | |
| P450.04 | ATCACGTCAC | CTCACITCAC | ATCACACCAT | | |
| P450.05 | ATCAACCCAC | GGCACGCCAG | | | |
| P450.06 | GTCAGATCAG | | | | |
| P450.07 | ATCATCCCAT | ATCGCCCGAC | ATGACACCAT | CTGACCCGAT | |
| P450.08 | GTCAGITCAC | ATCACGTGAA | | | |
| P450.12 | ATCACACAAT | | | | |
| CBR.1 | CTCACCTCAT | CTCAACCCAT | | | |
| CBR.2 | CTCACCTCTG | ATCACATCAC | ATCACATCAC | ATCACCCATC | |
| CYB5 | CITAGCCCAT | ATCCCCCAAT | GTCGCCCAT | ACCACCCAAC | |

Nota: La tabla sólo muestra las posibles secuencias SRE identificadas en la hebra sentido

Tabla IV. Posibles secuencias SRE identificadas utilizando el programa Tfbind, MATCH y PATCH para genes de interés en *X. dendrorhous*.

| Gen | Tfbind | | | | MATCH | PATCH |
|-----------------|--------------|-------------|-------------|-------------|----------------|------------|
| | Secuencia 1 | Secuencia 2 | Secuencia 3 | Secuencia 4 | | |
| ERG10a | GATCAGGGGAC | GTGCACGTGAT | | | | CATGTG |
| ERG10b | CACCACCTTGAT | GCTCACTTGAC | | | | |
| ERG13 | CGTCTCCTGAC | TGTAACACCAC | TAACACCACAC | CCACACGTGAC | | |
| ERG12 | TCTCACCTGAT | GAACATCTGAT | | | | |
| ERG8 | GTTCACGTGAT | GATCACCTCTT | | | | |
| MVD1 | | | | | | |
| <i>crtYB</i> | GATCACGTGAG | | | | | CATGTG |
| <i>crtI</i> | AGACACGTGAG | CAGCACGTGAC | | | CTATTACGCCAAGC | |
| <i>crtS</i> | CAGCAGGTGAT | | | | | CATGTG |
| <i>crtR</i> | GCTCACGTGAC | TATCTCCTCAC | | | | |
| FPS | GATCATCTCAC | | | | | |
| ERG9 | GATCACCTGGG | GATCATCTGCT | | | | |
| ERG1 | TGTCACGTGGT | TTTCACCCAAC | GAACACTCCAC | | | |
| ERG7 | GATCACCACAG | | | | | |
| ERG11/ CYP51 | GATCACCTCTC | | | | | CATGTG |
| ERG24 | GATCAACTGAG | | | | | |
| ERG25 | CATCAGCCCAC | CATGATGTGAG | GATCTCGTGTG | | | ATCAGCCCAC |
| ERG2 | CATCACGTTTT | TCTCACGTGAC | | | | |

| | | | |
|----------------|--------------|-------------|------------------|
| ERG5/ CYP61 | AATCAGCTGCG | CATCACCAGAG | TTTCATCTGAC |
| ERG4 | AATCAAGTGAC | GGTCACTCCTC | |
| P450.01 | CATCACATGAT | | |
| P450.03 | TAACACGGTGCG | | |
| P450.04 | CATCACGTCAC | CGTCACGTGTC | AAACACGTGCA |
| P450.05 | CATCAACCCAC | | CATCACCTATC |
| P450.07 | TATCGCCCGGAC | | ACCATCACACCCATAT |
| P450.08 | CGTCACGGTGTG | AATCACGTGAA | ATCAACCCAC |

Nota: La tabla sólo muestra las posibles secuencias SRE identificadas en la hebra sentido.

Las secuencias obtenidas por los distintos programas para cada gen se compararon y se seleccionaron aquellas secuencias que fueron encontradas por más de un programa, las que se encuentran resumidas en la Tabla V. Las posibles secuencias SRE identificadas con los distintos programas no son del mismo tamaño, por lo que se verificó que las secuencias identificadas por más de un programa estuvieran en la misma posición en la región promotora del gen.

Tabla V. Posibles secuencias SRE identificadas por más de un programa para la misma región promotora de un gen.

| Ruta del mevalonato | Secuencia 1 | Secuencia 2 | Predictor |
|------------------------|-------------|-------------|----------------------|
| <i>ERG10a</i> | GATCAGGCGAC | - | Tfbind/ JASPAR |
| <i>ERG10b</i> | GCTCACTTGAC | - | Tfbind/ JASPAR |
| <i>ERG13 (HMGS)</i> | CGTCTCCTGAC | TGTAACACCAC | Tfbind/ JASPAR |
| <i>ERG8</i> | GTTACAGTGAT | GATCACCTCTT | Tfbind/ JASPAR |
| Carotenogénesis | Secuencia 1 | Secuencia 2 | Predictor |
| <i>CrtYB</i> | GATCACGTGAG | - | Tfbind/ JASPAR |
| <i>CrtR</i> | GCTCACGTGAC | TATCTCCTCAC | Tfbind/ JASPAR |
| Síntesis de Ergosterol | Secuencia 1 | Secuencia 2 | Predictor |
| <i>FPS</i> | GATCATCTCAC | - | Tfbind/ JASPAR |
| <i>ERG1</i> | TTTCACCCAAC | GAACACTCCAC | Tfbind/ JASPAR |
| <i>ERG7</i> | GATCACACAG | - | Tfbind/ JASPAR |
| <i>ERG25</i> | CATCAGCCCAC | - | Tfbind/ JASPAR/PATCH |
| <i>ERG2</i> | TCTCACGTGAC | - | Tfbind/ JASPAR |
| <i>ERG5/CYP61</i> | CATCACAGAG | - | Tfbind/ JASPAR |
| Otros | Secuencia 1 | Secuencia 2 | Predictor |
| <i>P450.01</i> | CATCACATGAT | - | Tfbind/ JASPAR |
| <i>P450.04</i> | CATCACGTCAC | - | Tfbind/ JASPAR |
| <i>P450.05</i> | CATCAACCCAC | - | Tfbind/ JASPAR/PATCH |
| <i>P450.07</i> | TATCGCCCGAC | - | Tfbind/ JASPAR |
| <i>P450.08</i> | AATCACGTGAA | - | Tfbind/ JASPAR |

Nota: La tabla sólo muestra las posibles secuencias SRE identificadas en la hebra sentido.

Se conoce que el factor transcripcional Sre1 en *S. pombe* es capaz de regular su propia expresión (Todd y col., 2006); sin embargo, con los programas utilizados, posibles secuencias SRE se encontraron mayoritariamente en la hebra antisentido del promotor del gen, sólo encontrando una secuencia en sentido con el programa Tfbind.

Utilizando todas las secuencias obtenidas a partir de la Tabla V se obtuvo la secuencia consenso o logo mediante alineamiento de estas secuencias (Figura 7).

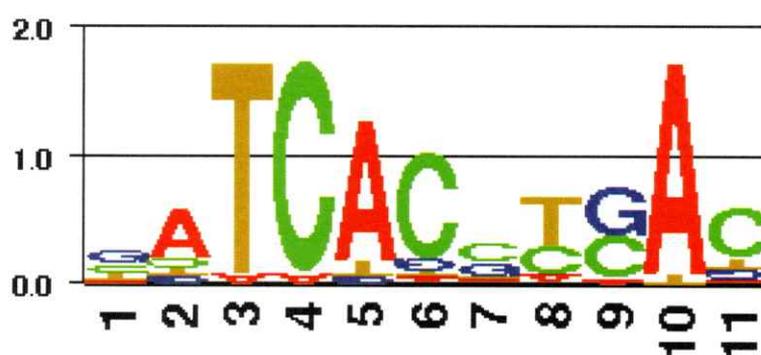


Figura 7. Secuencia SRE consenso de *X. dendrorhous* obtenida utilizando las secuencias provenientes de la Tabla V. Un mayor tamaño de un nucleótido indica una mayor conservación del nucleótido en dicha posición (señalada en la parte inferior). Las secuencias fueron generadas utilizando el programa GENIO/logo, disponible de manera online en <http://www.biogenio.com/logo/logo.cgi>.

A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron los genes *crtYB*, *crtR* y *HMGS* para su análisis mediante RT-qPCR en las cepas CBS 6938, CBS $scyp61$, CBS $scyp61\Delta sre1$ y CBS $\Delta sre1$.



Análisis de regiones promotoras de genes homólogos de *C. neoformans* en *X. dendrorhous*

Utilizando las secuencias proteicas de los genes regulados por Sre1 en el hongo *Cryptococcus neoformans*, se analizó el genoma de *X. dendrorhous* para la búsqueda de proteínas homólogas en este microorganismo. Se consideraron proteínas homólogas aquellas que tuvieran conservados los dominios característicos en la proteína original. Utilizando la secuencia nucleotídica de las proteínas seleccionadas, se analizó aproximadamente 1000 nucleótidos río arriba del codón de inicio de la traducción (ATG) en búsqueda de posibles secuencias SRE.

Los resultados del análisis mediante BLAST para la búsqueda de genes de *X. dendrorhous* homólogos a los de *C. neoformans* que posiblemente son regulados por Sre1 se resumen en la Tabla VI. Los genes involucrados en la síntesis de ergosterol no se incluyeron en esta tabla, ya que todos ellos fueron analizados en el ejercicio anterior.

Tabla VI. Proteínas de *X. dendrorhous* homólogas a las descritas en *C. neoformans* posiblemente reguladas por Sre1.

| Proteína <i>C. neoformans</i> N° GenBank | Producto génico | Proteína en <i>X. dendrorhous</i> N° GenBank |
|--|---|--|
| Función - Obtención de Hierro/Cobre: | | |
| CND01080 | copper transporter | CED82663.1 |
| CND00150 | Ferric reductase, NADH/NADPH oxidase and related proteins | CED83553.1 |
| CNM02420 | multicopper oxidases | CED83488.1 |
| CNN00540 | - | - |
| CNM02430 | iron permease FTR1 | CED82573.1 |

| | | |
|------------------------------|--|------------|
| CNA07920 | Predicted transporter (major facilitator superfamily) | CED82708.1 |
| Función - Transporte: | | |
| CNA02250 | ammonium transporter | CED83532.1 |
| CNA02250 | Permease of the major facilitator superfamily | CED82286.1 |
| CNE01880 | Permease of the major facilitator superfamily | CDZ96888.1 |
| CNJ02210 | mfs polyamine transporter | CED83626.1 |
| CND02440 | H /oligopeptide symporter | CDZ97807.1 |
| Otros: | | |
| CNH02490 | glycoside hydrolase | CDZ97258.1 |
| CNA01820 | - | - |
| CNA05000 | NADH-dehydrogenase (ubiquinone) | CDZ97938.1 |
| CNH00320 | Protein involved in meiotic recombination/predicted coiled-coil protein | CED85215.1 |
| CNF03000 | Negative regulator of COPII vesicle formation | CDZ96871.1 |
| CNA01280 | Monoxygenase, FAD-binding | CDZ97384.1 |
| CNC00920 | glutamate dehydrogenase | ACI46457.1 |
| CNH01390 | Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain | CDZ96180.1 |
| CNH00360 | Glycosyltransferase, DXD sugar-binding motif | CED85464.1 |
| CNE05300 | - | - |
| CNI02420 | uricase (urate oxidase) | CED82374.1 |
| CNA07950 | ap-domain-containing protein | CED82978.1 |
| CNB00220 | FAD-dependent oxidoreductase | CDZ98665.1 |
| CNI02360 | NADH:flavin oxidoreductase/12-oxophytodienoate reductase | CED83637.1 |
| CNA02460 | Kinesin-like protein | CDZ96863.1 |
| CNF02350 | Intramembrane metalloprotease (sterol-regulatory element-binding protein (SREBP) protease) | CED83298.1 |
| CNE00870 | Serine/threonine kinase TIP30/CC3 | CDZ97868.1 |

Nota: El símbolo (-) indica que no se encontró un homólogo para dicho gen.

Los homólogos encontrados en *X. dendrorhous* fueron analizados en su región promotora utilizando los programas JASPAR, Tfbind, MATCH y PATCH. Utilizando la

base de datos presente en JASPAR, se identificó posibles secuencias SRE en casi todos ellos, excepto en los genes de ammonium transporter (CED83532.1), Permease of the major facilitator superfamily (CDZ96888.1), Zn(2)-C6 fungal-type DNA-binding domain (CDZ96180.1), Glycosyltransferase, DXD sugar-binding motif (CED85464.1), FAD-dependent oxidoreductase (CDZ98665.1) y NADH:flavin oxidoreductase/12-oxophytodienoate reductase (CED83637.1). Utilizando el programa MATCH, sólo se encontró una posible secuencia SRE en el gen de la proteína Intramembrane metalloprotease (sterol-regulatory element-binding protein (SREBP) protease), proteína implicada en la vía SREBP identificada en *C. neoformans* como Stp1 (Tabla VII). En cambio, con el programa PATCH se identificó posibles secuencias SRE en la región promotora de los genes de Ferric reductase, NADH/NADPH oxidase and related proteins (CED83553.1), iron permease FTR1 (CED82573.1), Predicted transporter (major facilitator superfamily) (CED82708.1), ammonium transporter (CED83532.1), H⁺/oligopeptide symporter (CDZ97807.1), Protein involved in meiotic recombination/predicted coiled-coil protein (CED85215.1), Negative regulator of COPII vesicle formation (CDZ96871.1), Monooxygenase, FAD-binding (CDZ97384.1) y Intramembrane metalloprotease (sterol-regulatory element-binding protein (SREBP) protease) (CED83298.1). Las secuencias encontradas por los programas JASPAR, MATCH y PATCH se resumen en la Tabla VII.

Tabla VII. Secuencias SRE identificadas con la base de datos de JASPAR, MATCH y PATCH en las regiones promotoras de genes de *X. dendrorhous* homólogos a los descritos en *C. neoformans* que posiblemente son regulados por Sre1.

| N° acceso Genbank | JASPAR | | | | MATCH | | PATCH |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| | Secuencia 1 | Secuencia 2 | Secuencia 3 | Secuencia 4 | Secuencia 1 | Secuencia 1 | |
| CED82663.1 | ATCAAGTCAT | | | | | | |
| CED83553.1 | AGCAGCCCAC | GGCACGGCAT | | | | | CATGTG |
| CED83488.1 | GGCACCCGAC | | | | | | |
| CED82573.1 | ATTACTCCAT | CTCACCTCCC | | | | | CATGTG |
| CED82708.1 | GTCACCTCGAC | | | | | | CATGTG |
| CED83532.1 | | | | | | | CATGTG |
| CED82286.1 | GTCAACTCAT | ATCACACAAG | | | | | CATGTG |
| CED83626.1 | CTCATCTCAT | | | | | | |
| CDZ97807.1 | ATCAGCCCCAA | | | | | | CATGTG |
| CDZ97258.1 | TTCACGTGAC | | | | | | |
| CDZ97938.1 | GTCAGGTCAG | GTCAGCACAT | CTCACCTGAA | ATCACTCGAG | | | |
| CED85215.1 | GTCACCGAAT | | | | | | CATGTG |
| CDZ96871.1 | CTGACCCTCAG | ATCAAGCCAG | | | | | ATCACGCCAG |
| CDZ97384.1 | | | | | | | CATGTG |
| CDZ97384.1 | ATCACCAGAG | ATCACCTTAT | | | | | |
| ACI46457.1 | GTCAGCACAT | AGCACATCAC | ATCACCCACT | | | | |
| CED82374.1 | CTCACGTCTT | | | | | | |
| CED82978.1 | TACACCCCAC | ATCAGCGGAT | CTCATCTCAT | | | | |
| CDZ96863.1 | CTCACTCCAT | ATCCCCTGAC | CACACCTCAG | | | | |

CED83298.1 ATCACGTGAT
CDZ97868.1 CTGACCTCAC

GATCACGTGAT GATCACGTGAT

Utilizando el programa Tbind, se identificó posibles secuencias SRE en casi todos los genes excepto en los de copper transporter (CED82663.1), multicopper oxidases (CED83488.1), iron permease FTR1 (CED82573.1), Negative regulator of COPII vesicle formation (CDZ96871.1), Glycosyltransferase, DXD sugar-binding motif (CED85464.1) y FAD-dependent oxidoreductase (CDZ98665.1). Las secuencias identificadas mediante este programa se encuentran en la Tabla VIII.

Tabla VIII. Secuencias SRE identificadas con el programa Tfbind en las regiones promotoras de genes de *X. dendrorhous* homólogos a los descritos en *C. neoformans* que posiblemente son regulados por Sre1.

| N° acceso Genbank | Tfbind | | | | |
|----------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | Secuencia 1 | Secuencia 2 | Secuencia 3 | Secuencia 4 | Secuencia 5 |
| CED83553.1 | TAGCAGCCCAC | | | | |
| CED82708.1 | TGCCACGTGAT | GTTCATGTGAA | GGTCACTCGAC | | |
| CED83532.1 | GATCATGTGGT | | | | |
| CED82286.1 | CATCAGCTGTT | CTTCACTTGAC | | | |
| CDZ96888.1 | AACCACGTGTT | CATCATCTGTT | GACCACCTGGG | | |
| CED83626.1 | GATCACCTGTG | TATGCGCTGAC | ATTCACATGCT | | |
| CDZ97807.1 | GATCATCTGTG | GATCAGCCCAA | | | |
| CDZ97258.1 | CGTCACGGGAG | ATTCACGTGAC | | | |
| CDZ97938.1 | GACCAGGTGAT | GATGACATGAG | TCTCACCTGAA | CATCACCGGTC | TATAACATGAC |
| CED85215.1 | AATCCCCTGAT | | | | |
| CDZ97384.1 | TATCACCCAGAG | GACCTCGTGAC | GATCATATGAA | CATCACCTTAT | |
| AC146457.1 | AGACACGTGAT | | | | |
| CDZ96180.1 | CATGACCTGAA | | | | |
| CED82374.1 | GATCACGTTTC | | | | |
| CED82978.1 | CATCTGGTGAC | AATCAGCTGTT | | | |
| CED83637.1 | TACCACCTGCG | | | | |
| CDZ96863.1 | CATCCCCTGAC | | | | |
| CED83298.1 | GATCACGTGAT | CCTCACGTGTT | | | |
| CDZ97868.1 | GGTCAAGTGAA | | | | |

Las posibles secuencias SRE identificadas por más de un programa para el mismo gen fueron seleccionadas, las cuales se indican en la Tabla IX. Dentro de estas secuencias, solo la identificada para el posible homólogo de Stp1, implicado en la vía SREBP es reconocida por los 4 programas utilizados.

Tabla IX. Secuencias SRE identificadas por más de un programa en la misma región promotora de genes de *X. dendrorhous* homólogos a los descritos en *C. neoformans* que posiblemente son regulados por Sre1.

| Obtención de Hierro/Cobre | Secuencia 1 | Predictor |
|----------------------------------|--------------------|---------------------------|
| CED83553.1 | TAGCAGCCCAC | JASPAR/Tfbind |
| CED82708.1 | GGTCACTCGAC | JASPAR/Tfbind |
| Transporte | Secuencia 1 | Predictor |
| CED83532.1 | GATCATGTGGT | Tfbind/PATCH |
| CDZ97807.1 | GATCAGCCCAA | JASPAR/Tfbind |
| Otros | Secuencia 1 | Predictor |
| CDZ97258.1 | ATTCACGTGAC | JASPAR/Tfbind |
| CDZ97938.1 | TCTCACCTGAA | JASPAR/Tfbind |
| CDZ96871.1 | CATCAAGCCAG | JASPAR/PATCH |
| CDZ97384.1 | TATCACCAGAG | JASPAR/Tfbind |
| CDZ96863.1 | CATCCCCTGAC | JASPAR/Tfbind |
| CED83298.1 | GATCACGTGAT | JASPAR/Tfbind/PATCH/MATCH |

Utilizando todas las secuencias presentes en la Tabla IX, se construyó la secuencia logo que se encuentra en la Figura 8. Se puede observar que los nucleótidos más conservados presentes en la Figura 7 corresponden a los mismos encontrados en la Figura 8, utilizando secuencias provenientes de genes implicados en la carotenogénesis, biosíntesis de ergosterol y de enzimas citocromos P450 principalmente.

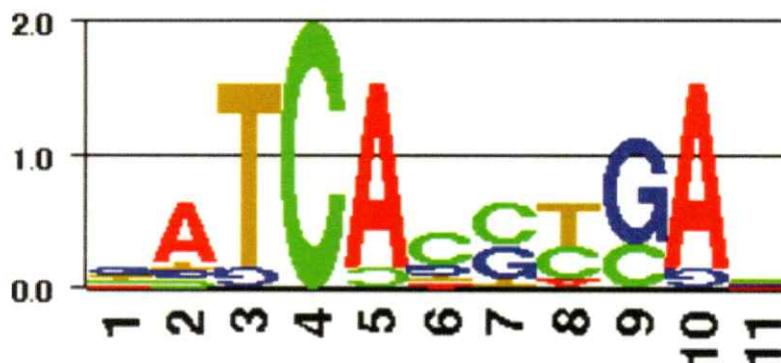


Figura 8. Secuencia logo obtenida utilizando las secuencias provenientes de la Tabla IX. Un mayor tamaño de un nucleótido indica una mayor conservación del nucleótido en dicha posición (señalada en la parte inferior). Las secuencias fueron generadas utilizando el programa GENIO/logo, disponible de manera online en <http://www.biogenio.com/logo/logo.cgi>.

Análisis mediante RT-qPCR de los niveles de transcrito en las cepas CBS 6938, CBS $cyp61^-$, CBS $cyp61^-Δsre1$ y CBS $Δsre1$.

Para la extracción de ARN y posterior análisis de los niveles de mensajero de los genes seleccionados, se realizó una curva de crecimiento utilizando las cepas en estudio (Figura 9).

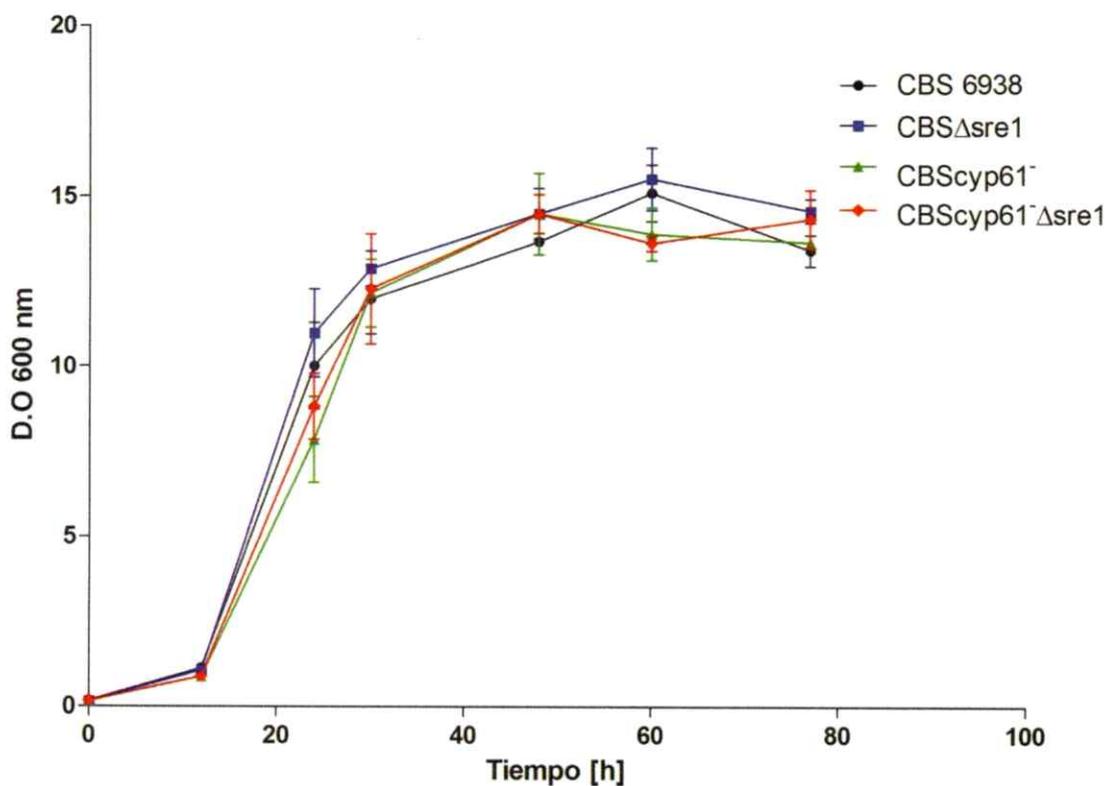
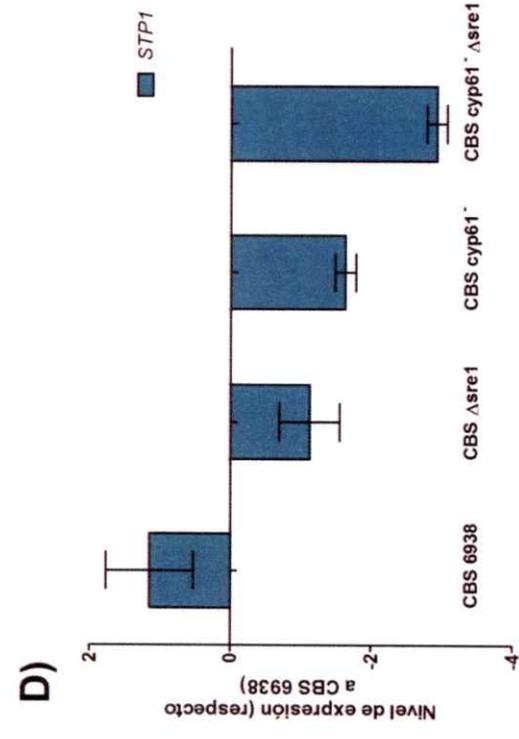
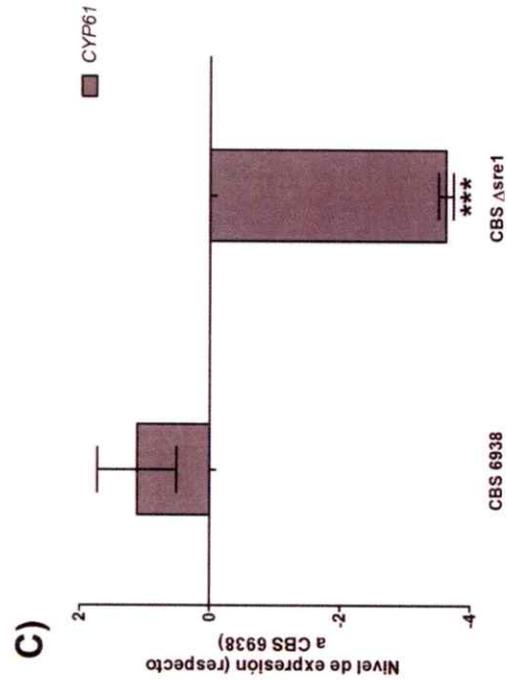
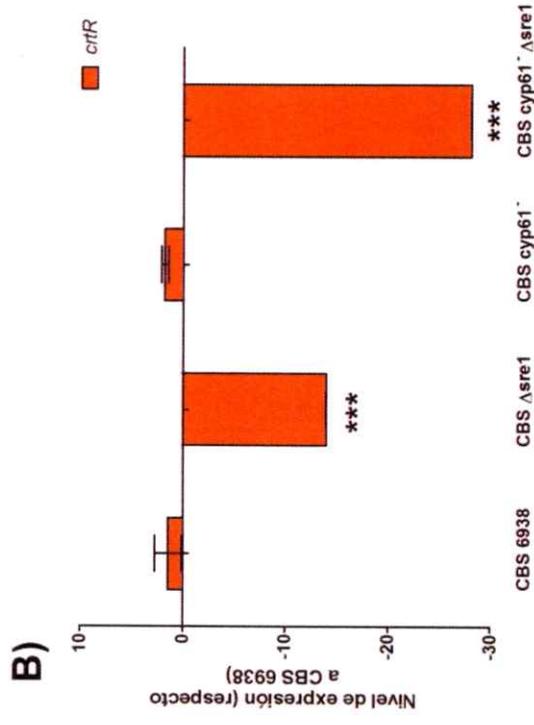
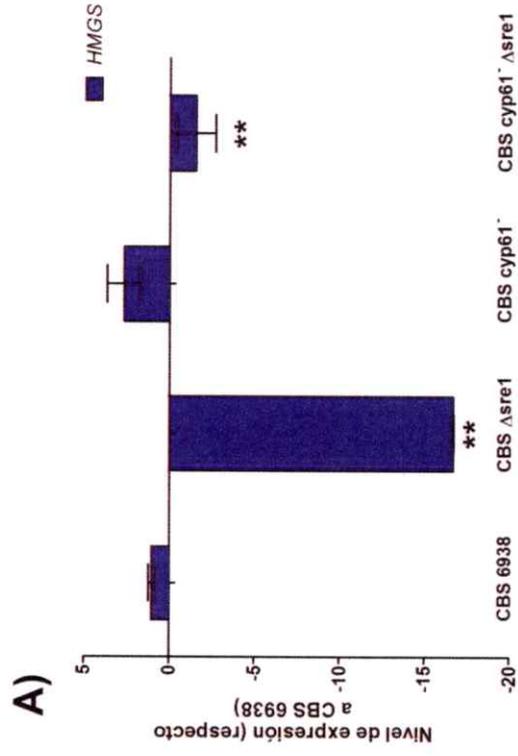


Figura 9. Curva de crecimiento de las cepas CBS 6938, CBS*Scyp61*⁻, CBS*Scyp61*⁻ Δ *sre1* y CBS Δ *sre1*. Las cepas fueron crecidas por triplicado en matraces de 250 mL con 100 mL de medio YM incubados a 22 °C con agitación constante (150 rpm). En el gráfico se indica el promedio \pm desviación estándar para cada medición realizada.

Como se puede observar en la Figura 9, no existen diferencias en el crecimiento entre las 4 cepas en estudio. Para el análisis del mensajero de los genes seleccionados, se tomaron muestras en el último punto medido, a las 77 horas aproximadamente.

De acuerdo con la búsqueda de secuencias SRE en la región promotora, se seleccionaron los genes, *HMGS*, *crtR*, *CYP61* y *STP1* para analizar su expresión relativa mediante RT-qPCR. *STP1* corresponde al gen posiblemente regulado por Sre1 en *C. neoformans* y en *X. dendrorhous* cuya secuencia SRE deducida fue identificada por los 4 programas de análisis utilizados (Tabla IX). Además, se analizó la expresión de los genes *HMGR*, *DAP1*, *crtS* y *PDC*. Los genes *HMGR* y *DAP1*, a pesar de no encontrar elementos SRE en su región promotora fueron analizados debido a que corresponden a un blanco de regulación por Sre1 en otros organismos: *DAP1* en *S. pombe* y *HMGR* en humanos (Hughes y col., 2007). El gen *crtS* fue incluido ya que a pesar que no se encontró una posible secuencia SRE con ninguno de los predictores, el mutante *CBScyp61 Δ sre1* posee un cambio en su coloración en comparación con su cepa parental *CBScyp61 Δ* (la cual posee una tonalidad rojiza muy intensa al contrario que el mutante), lo que sugiere un cambio en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de astaxantina, como *crtS*, el cual participa en la formación del producto final. El gen *PDC*, el cual codifica la piruvato descarboxilasa fue utilizado como control negativo, ya que se espera que Sre1 no participe en la regulación de su expresión.

Los resultados obtenidos para cada gen son presentados en la Figura 10.



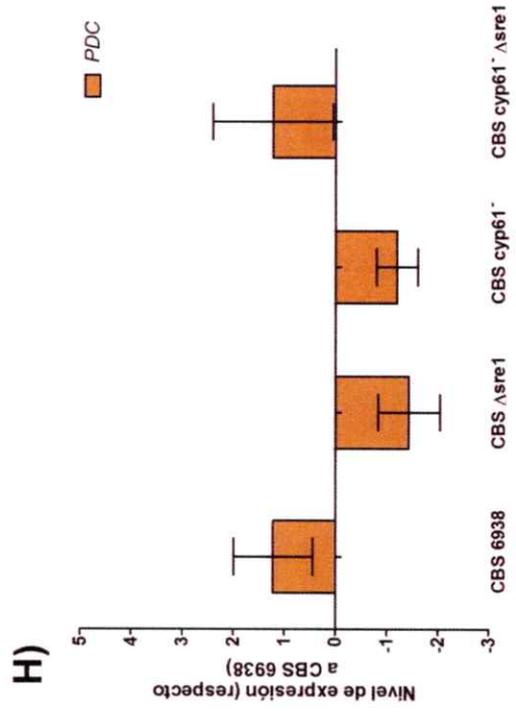
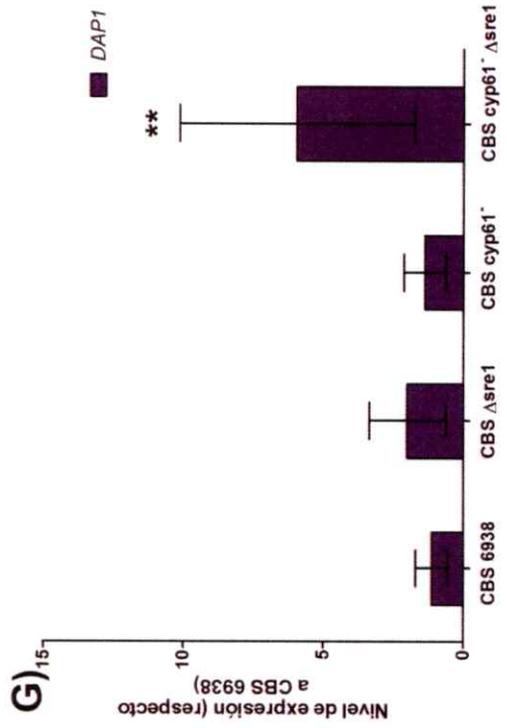
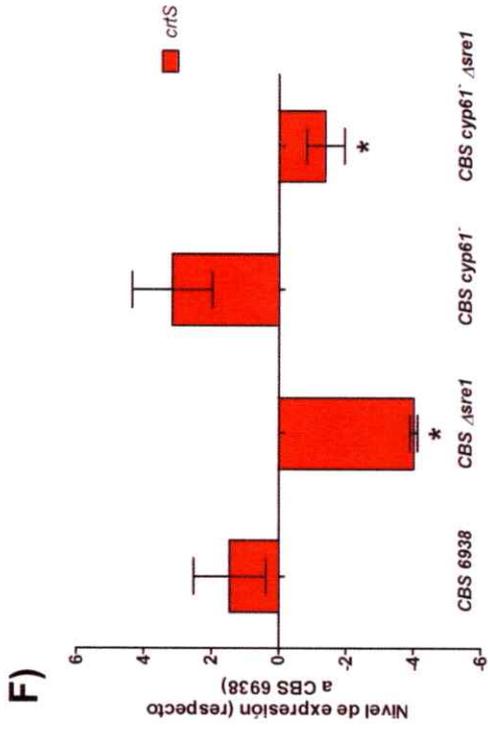
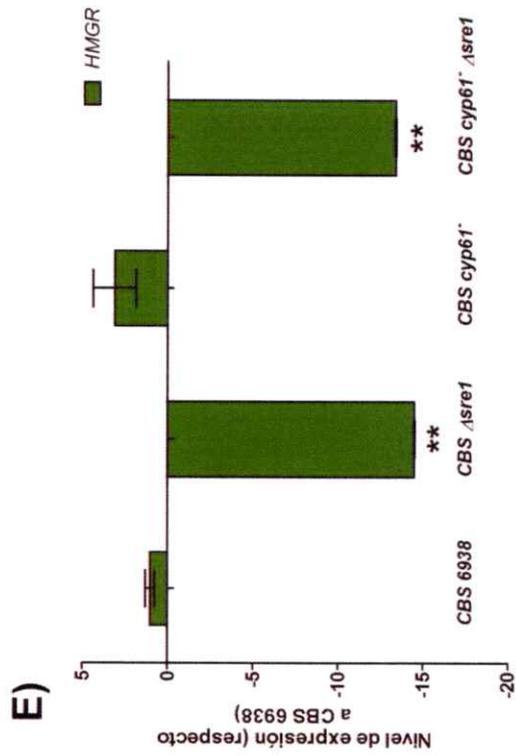


Figura 10. Nivel de expresión de los genes *HMGS*, *crtR*, *CYP61*, *STP1*, *HMGR*, *crtS*, *DAP1* y *PDC* mediante RT-qPCR. Los niveles de transcrito fueron analizados en las cepas CBS 6938, CBS Δ *sre1*, CBS*Scyp61*⁻ y CBS*Scyp61*⁻ Δ *sre1*. A) Corresponde a los niveles de transcrito del gen *HMGS*; B) *crtR*, C) *CYP61*, D) *stp1*, E) *hmgR*, F) *crtS* y G) *DAP1* y H) *PDC*. Los valores graficados corresponden al promedio \pm desviación estándar de tres cultivos independientes para cada cepa. Anova de una vía seguido del post test Tukey fueron utilizados como test estadístico para identificar diferencias significativas en los valores entre las cepas, indicando en los gráficos solo las diferencias entre parental y su respectivo mutante. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

De acuerdo con los resultados obtenidos, los genes *HMGS* y *crtR*, a los cuales se les había identificado una posible secuencia SRE en su región promotora, presentaron diferencias significativas en su expresión entre las cepas parentales CBS 6938 y CBS*Scyp61*⁻ Δ *sre1* y las cepas mutantes CBS Δ *sre1* y CBS*Scyp61*⁻ Δ *sre1* respectivamente (Figura 10A y 10B), observando una disminución en la expresión relativa de los genes analizados en las cepas mutantes. En cambio, para el gen *CYP61* (Figura 10C), se observaron diferencias significativas al analizar la cepa CBS Δ *sre1* y su parental (con una disminución en la expresión relativa en la cepa mutante). En este punto es importante destacar que si bien no se muestran la expresión del gen *CYP61* en aquellos mutantes que poseen una interrupción del mismo, si fue posible medir transcrito en ambas cepas (CBS*Scyp61*⁻ y CBS*Scyp61*⁻ Δ *sre1*), pero que no codificaría una proteína funcional. En la cepa CBS*Scyp61*⁻ los niveles de transcrito son bajos con respecto a la cepa CBS 6938, no encontrando diferencias entre esta y la cepa mutante y CBS*Scyp61*⁻ Δ *sre1*.

Con respecto a *STP1*, gen en el que se identificó una secuencia SRE en su región promotora al igual que en *C. neoformans* y que podría estar participando en la

vía SREBP (corte y liberación de N-terminal de Sre1), con el test estadístico realizado no se encontraron diferencias significativas entre las cepas analizadas.

Para los genes a los cuales consistentemente no se les identificó secuencias SRE con los programas utilizados, *HMGR* y *crtS*, se observó que los niveles de transcritos de ambos presentan diferencias significativas entre las cepas parentales y mutantes, donde se observó una disminución de la expresión de dicho gen en las cepas mutantes (*CBS Δ sre1* y *CBS cyp61 Δ sre1*) (Figura 10E y 10F, respectivamente). El gen *DAP1*, el cual se ha observado que disminuye su expresión en cepas mutantes de Sre1 en condiciones de hipoxia en *S. pombe*, se observó un fenómeno opuesto con una mayor expresión relativa en las cepas mutantes, con diferencias significativas entre las cepas que poseen una interrupción del gen *CYP61* (Figura 10G).

El gen utilizado como control *PDC* (Figura 10H) el cual se presume que no es regulado por Sre1, no presentó diferencias con respecto a su expresión relativa entre las cepas analizadas.

En resumen, se encontró diferencias en la expresión génica entre las cepas parentales CBS 6938 y *CBS $cyp61^-$* y sus respectivos mutantes *CBS Δ sre1* y *CBS $cyp61^-$ Δ sre1* para los genes *HMGS*, *crtR* y *CYP61*, a los cuales se les identificó una secuencia SRE en su región promotora, junto con encontrar diferencias al medir la expresión de los genes *HMGR* y *crtS*, genes a los cuales no se les identificó secuencia SRE con los programas utilizados.

DISCUSIÓN

La vía SREBP ha sido descrita recientemente en hongos como *S. pombe*, *C. neoformans* y *A. fumigatus*. Al igual que en mamíferos, SREBP es un activador transcripcional requerido para la mantención de la homeostasis de esteroides en la célula. De esta manera, mutantes de delección del gen de SREBP o de genes de proteínas implicadas en el transporte y corte de ésta, son más sensibles a drogas que inhiben la síntesis de ergosterol, como son los azoles. Las drogas azólicas han sido descritas principalmente como inhibidores de la enzima P450 Erg11 o CYP51 (esterol 14- α desmetilasa), produciendo una acumulación de lanosterol y el bloqueo o disminución del producto final, ergosterol (Carrillo-Muñoz y col., 2006).

En este trabajo se utilizaron tres agentes azólicos: clotrimazol, ketoconazol e itraconazol. La estructura básica de estos compuestos comprende a un anillo azol de cinco miembros unido por un enlace carbono-nitrógeno a un anillo aromático. La clase de drogas azólicas derivadas de imidazol poseen dos átomos de nitrógeno en el anillo azólico (como clotrimazol y ketoconazol), y los denominados triazoles poseen tres átomos de nitrógeno en dicho anillo (como itraconazol) (Saag y Dismukes, 1988). A pesar que el mecanismo de acción de estos compuestos es similar (el nitrógeno del azol compite por oxígeno con la molécula de hierro del grupo hemo en el sitio catalítico de la P450), la afinidad de cada compuesto por el sustrato varía, y por ende la inhibición ejercida (Bailey y col., 1990). En este trabajo, los mutantes $\Delta sre1$ al no poseer el factor transcripcional Sre1 son más sensibles al tratamiento con estas drogas, ya que al disminuir los niveles de esteroides en la célula, ésta no es capaz de responder y activar la transcripción de los genes blancos requeridos y por ende la sobrevivencia en estas cepas (comparadas con las cepas silvestres CBS 6938 y

CBS*cyp61*⁻) en presencia de estos compuestos disminuye (Figura 5). Caso contrario ocurre al utilizar anfotericina B, compuesto que corresponde a un polieno (anillo de 26 a 28 carbonos con poliinsaturaciones) el cual es capaz de formar poros en la membrana mediante la unión hidrofóbica de 8 moléculas de anfotericina B unidas al ergosterol presente, alterando la permeabilidad de la membrana y generando la liberación de componentes citoplasmáticos que llevan a la muerte celular (Carrillo-Muñoz y col., 2006). Los mutantes Δ *sre1*, al no contar con la regulación por esterol, poseen un nivel menor de ergosterol en la membrana (Gutiérrez, Tesis de Doctorado en progreso) lo que podría explicar su mayor resistencia a este tipo de tratamiento que las cepas silvestres (CBS 6938 y CBS*cyp61*⁻) (Figura 5). La cepa CBS*cyp61*⁻ no es capaz de producir ergosterol (Loto y col., 2012), razón por la cual podría presentar mayor resistencia a anfotericina B en comparación con la cepa parental CBS 6938. Si bien es posible observar una diferencia entre las cepas CBS*cyp61*⁻ y CBS*cyp61*⁻ Δ *sre1*, esto podría deberse a la unión de anfotericina B a otros esteroides acumulados debido a la mutación *cyp61*⁻ (Loto y col., 2012).

La cepa mutante Δ *sre1* de *C. neoformans* presenta un aumento en la expresión de genes relacionados con estrés celular, como catalasas, glutatión S-transferasas o chaperonas, entre otros (Chang y col., 2007). Junto con esto, mutantes que no poseen Sre1 son sensibles al agente químico CoCl₂, el cual se ha caracterizado como un imitador de las condiciones de hipoxia en este microorganismo (Lee y col., 2007). En *C. neoformans* y *S. pombe*, la activación de SREBP es dada por una disminución de los niveles de esteroides en la célula junto con una disminución en la presión de oxígeno. Por ello, en ambos microorganismos mutantes de delección de SREBP son sensibles a CoCl₂. Un análisis realizado en *C. neoformans* reveló que la mitocondria

Juega un rol fundamental en la tolerancia a bajas presiones de oxígeno o a la presencia de CoCl_2 , donde el cobalto se uniría a este compartimiento citoplasmático induciendo una deficiencia respiratoria en la levadura (Ingavale y col., 2008). Así mismo, este ión genera especies reactivas de oxígeno y la subsiguiente peroxidación de lípidos, por lo que mutantes $\Delta sre1$ además de ser sensibles a CoCl_2 , son sensibles a agentes químicos que generan estrés oxidativo como peróxido de hidrógeno, maleato de dietilo (DEM), menadiona, paraquat, entre otros (Chang y col., 2009).

En *X. dendrorhous*, se ha observado que CoCl_2 afecta el crecimiento de mutantes $\Delta sre1$ (Gutiérrez, Tesis de Doctorado en progreso), por lo que en este trabajo se evaluó si estas cepas son además más sensibles a agentes que causan estrés oxidativo. Los agentes estudiados fueron maleato de dietilo, H_2O_2 y menadiona. El maleato de dietilo es un agente que disminuye el glutatión presente en la célula (tripéptido capaz de reaccionar con los compuestos oxidantes para formar glutatión reducido), siendo una molécula antioxidante importante en levaduras (Jamieson, 1998). Por su parte, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) ha sido descrito como un agente clásico causante de ROS, el cual genera daño en el ADN, proteínas y lípidos (Jamieson, 1998; Chang y col., 2009). Finalmente, el compuesto químico menadiona corresponde a una quinona, el cual a través del ciclo de las quinonas es capaz de generar ROS (como el anión superóxido) (Chang y col., 2009). Al tratar las cepas mutantes $\Delta sre1$ con estos agentes, no se observaron diferencias consistentes entre los mutantes y las cepas parentales excepto con menadiona donde los mutantes $\Delta sre1$ presentaron un menor crecimiento frente al compuesto utilizado (Figura 6). A pesar que *C. neoformans* y *X. dendrorhous* pertenecen a la misma división (basidiomicete), los mecanismos de respuesta y expresión génica no necesariamente son los mismos. *C. neoformans*



corresponde a un hongo que puede generar enfermedades humanas como la criptococosis, enfermedad que requiere la adaptación de este microorganismo a menores presiones de oxígeno, donde la respuesta por la vía SREBP es fundamental. En cambio, en *X. dendrorhous* no se requiere esta adaptación y además, esta levadura es productora de astaxantina, xantófila reconocida por sus propiedades antioxidantes (Higuera-Ciajara y col., 2006), lo que podría explicar que no se hayan encontrado diferencias mayoritarias entre parentales y sus mutantes $\Delta sre1$.

La transcripción es un proceso que requiere, además de la unión de la ARN polimerasa, la presencia de moléculas *trans* encargadas de regular la transcripción de un determinado gen (promoviendo o reprimiendo su expresión) denominados factores transcripcionales, los cuales son capaces de unirse a secuencias *cis* que generalmente se encuentran cercanas a la zona de inicio de la transcripción. La predicción de sitios a los cuales estos factores se pueden unir permite, entre otras cosas, identificar funciones de genes no caracterizados mediante la predicción de su tipo de regulación (Bulyk, 2004). Las secuencias de unión de factores transcripcionales comprende una región pequeña de 5 a 15 nucleótidos, cuya composición puede variar en determinados residuos entre organismos (Bulyk, 2004). Estas diferencias de secuencias pueden conferir distintos niveles de actividad, promoviendo la transcripción de genes de acuerdo a las necesidades de la célula. Existen distintos métodos para predecir secuencias *cis* en el ADN, distinguiendo principalmente tres: aquellos basados en "phylogenetic footprinting", análisis de módulos de regulación, y análisis de secuencias mediante matrices de posición (PSSM por sus siglas en inglés) donde existen bases de datos que acumulan información proveniente de, por ejemplo, ensayos de inmunoprecipitación de cromatina como JASPAR y TRANSFAC (Bulyk, 2004).

En este trabajo se utilizó este último método, utilizando distintos programas que ocupan una u otra base de datos para la búsqueda de secuencias *cis* a las cuales se uniría Sre1 de *X. dendrorhous*. A pesar que las bases de datos comprenden principalmente datos obtenidos a partir de organismos superiores (como *Mus musculus* y *Homo sapiens*), se logró identificar secuencias SRE en genes pertenecientes a la ruta del mevalonato, biosíntesis de ergosterol y carotenogénesis (Tabla V), al igual que al realizar una búsqueda de secuencias homólogas de genes cuya expresión es regulada por Sre1 en *C. neoformans* (Tabla IX). Para identificar si efectivamente estos genes son regulados por Sre1, es necesario realizar ensayos como microarreglos para confirmarlo, ya que los programas varían en el número de secuencias SRE encontradas de acuerdo a las restricciones a los cuales se someta, al largo de la región promotora otorgada, entre otros.

Debido a que el análisis realizado corresponde a una predicción de los posibles genes regulados por Sre1 en *X. dendrorhous*, se seleccionaron genes a los cuales mediante RT-qPCR se les analizó los niveles relativos de transcrito en las cepas en estudio (Figura 10). Entre ellos, *HMGS*, *crtR* y *CYP61* presentaron una disminución en la expresión relativa comparando cepas parentales y mutantes. Estos genes participan en la vía de carotenogénesis (*crtR*), ergosterol (*crtR* y *CYP61*) y en la ruta de mevalonato (*HMGS*), lo que sugiere que Sre1 podría estar regulando genes clave en estas tres vías. Al analizar el gen *CYP61*, solo se observaron diferencias significativas entre la cepa CBS Δ *sre1* y su parental, no así al analizar aquellos mutantes que poseen una interrupción del gen *CYP61*. En la cepa CBS Δ *scyp61* la expresión relativa del gen *CYP61* es baja en comparación con la cepa CBS 6938, por lo que el doble mutante no puede disminuir aún más su expresión al compararlas. Es probable que el transcrito

aberrante generado por la interrupción del gen *CYP61* por módulo de resistencia antibiótico sea inestable y rápidamente degradado en las cepas *cyp61-*, y por este motivo en *CBS_{cyp61}* el transcrito detectado sea bajo. El gen *STP1* se predice que codifica a una zinc-metaloproteasa, la cual podría estar implicada en el corte proteolítico de Sre1 en el aparato de Golgi liberando a la proteína activa. Si bien los cuatro predictores encontraron la misma secuencia SRE, los niveles de transcrito de este gen no presentó diferencias significativas entre las cepas en estudio, lo que puede indicar que existen diferentes blancos de Sre1 entre estos organismos.

La proteína HMG-CoA reductasa es descrita como una enzima limitante en la vía del mevalonato para la producción de esteroides y la mantención de la homeostasis lipídica en humanos y levaduras (Burg y Espenshade, 2011). De acuerdo con Loto y col. 2012, la cepa *CBS_{cyp61}* posee un aumento en la expresión de dicho gen (*HMGR*) a nivel de transcrito, lo que podría contribuir al fenotipo sobreproductor de carotenoides en este mutante. *HMGR* es descrito en la literatura como un blanco clásico de la activación por SREBP, por lo que la disminución de esteroides podría activar esta vía en la levadura aumentando el contenido de carotenoides y en particular, astaxantina. Esta hipótesis concuerda con lo observado en este trabajo, donde la delección de Sre1 produce una disminución en la expresión relativa de dicho gen en las cepas mutantes (Figura 10E). Interesantemente, se observó una disminución en los niveles de transcrito del gen *crtS* que codifica la enzima P450 astaxantina sintasa que produce astaxantina desde beta-caroteno (Figura 10F). Lo anterior indica que Sre1 podría estar regulando la carotenogénesis en *X. dendrorhous*, regulando una de las enzimas claves en la producción de astaxantina.

La delección del gen *SRE1* en *X. dendrorhous* produce un aumento en la expresión relativa del gen *DAP1* (Figura 10G), el cual se ha visto que es un gen blanco de Sre1 en *S. pombe* (Todd y col., 2006). La proteína Dap1 se ha descrito como un regulador positivo de citocromos P450 como Cyp51 y Cyp61 en *S. pombe* (únicas P450s existentes en este microorganismo) (Hughes y col., 2007). Estos resultados indican diferencias entre los genes blanco de Sre1 entre *X. dendrorhous* y *S. pombe*. Debido a que los resultados de este trabajo sugieren la posible regulación de Sre1 en genes de citocromos P450s como *CYP61* y *crtS* en *X. dendrorhous*, es probable que la proteína Dap1 en este organismo sea requerida para favorecer la eficiencia de las enzimas codificadas por dichos genes debido a la disminución de sus transcritos en los mutantes $\Delta sre1$.

Finalmente, a pesar que efectivamente en este trabajo se encontró diferencias entre cepas parentales y sus respectivos mutantes $\Delta sre1$ en cuanto a los niveles de transcritos de genes que de acuerdo a la literatura y por la predicción de potenciales secuencias SRE en su región promotora posiblemente son regulados por la vía SREBP, se requiere de estudios adicionales para confirmar la interacción entre la proteína Sre1 y la determinada región promotora. Por ejemplo, mediante ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA), será posible confirmar si efectivamente la regulación de un gen en estudio es dada de manera directa por la unión de Sre1 a su región promotora.

CONCLUSIONES

- La delección del gen del posible factor transcripcional Sre1 de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (gen *SRE1*) aumenta la sensibilidad a compuestos antifúngicos como clotrimazol, ketoconazol e itraconazol, y aumenta la resistencia a anfotericina B, probablemente debido a una disminución de ergosterol en la membrana citoplasmática por la ausencia de la regulación ejercida por esta proteína.
- Si bien las herramientas bioinformáticas son predicciones, éstas resultaron ser útiles en la predicción de elementos SRE, ya que se confirmó cambios en los niveles de transcritos entre cepas parentales y sus mutantes $\Delta sre1$ en genes donde se encontraron este tipo de secuencias.
- Los análisis mediante RT-qPCR indican que en *X. dendrorhous*, genes que controlan la ruta del mevalonato, biosíntesis de ergosterol y de carotenoides son regulados por Sre1, ya que en ausencia de esta proteína la expresión relativa de genes como *HMGR*, *crtS* y *CYP61* a nivel de sus transcritos, se ve disminuida.

BIBLIOGRAFÍA

- Ambati, R. R., Phang, S. M., Ravi, S., & Aswathanarayana, R. G. (2014). Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications-A review. *Marine Drugs*, 12(1), 128-152.
- Amemiya-Kudo, M., Shimano, H., Hasty, A. H., Yahagi, N., Yoshikawa, T., Matsuzaka, T., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Osuga, J., Harada, K., Gotoda, T., Sato, R., Ishibashi, S., & Yamada, N. (2002). Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *Journal of Lipid Research*, 43(8), 1220-1235.
- Bailey, E. M., Krakovsky, D. J., & Rybak, M. J. (1990). The triazole antifungal agents: a review of itraconazole and fluconazole. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 10(2), 146-153.
- Bien, C. M., & Espenshade, P. J. (2010). Sterol regulatory element binding proteins in fungi: hypoxic transcription factors linked to pathogenesis. *Eukaryotic Cell*, 9(3), 352-359.
- Brajtburg, J., Powderly, W. G., Kobayashi, G. S., & Medoff, G. (1990). Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(2), 183-188.
- Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(20), 11041-11048.
- Bulyk, M. L. (2004). Computational prediction of transcription-factor binding site locations. *Genome Biology*, 5(1), 201-201.
- Burg, J. S., & Espenshade, P. J. (2011). Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. *Progress in Lipid Research*, 50(4), 403-410.
- Carrillo-Muñoz, A. J., Giusiano, G., Ezkurra, P. A., & Quindos, G. (2006). Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Revista Española de Quimioterapia*, 19(2), 130-139.
- Chang, Y. C., Bien, C. M., Lee, H., Espenshade, P. J., & Kwon-Chung, K. J. (2007). Sre1p, a regulator of oxygen sensing and sterol homeostasis, is required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 64(3), 614-629.
- Chang, Y. C., Ingavale, S. S., Bien, C., Espenshade, P., & Kwon-Chung, K. J. (2009). Conservation of the sterol regulatory element-binding protein pathway and its pathobiological importance in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 8(11), 1770-1779.

Edwards, P. A., Tabor, D., Kast, H. R., & Venkateswaran, A. (2000). Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1529(1), 103-113.

Goldstein, J. L., DeBose-Boyd, R. A., & Brown, M. S. (2006). Protein sensors for membrane sterols. *Cell*, 124(1), 35-46.

Golubev, W. I. (1995). Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Yeast*, 11(2), 101-110.

Gutiérrez, M. (en Progreso). Caracterización de la vía SREBP dependiente de los niveles de ergosterol y oxígeno en la biosíntesis de carotenoides y ergosterol en *X. dendrorhous* (Tesis de Doctorado). Universidad de Chile, Ñuñoa, Santiago.

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

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

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

Hughes, A. L., Powell, D. W., Bard, M., Eckstein, J., Barbuch, R., Link, A. J., & Espenshade, P. J. (2007). Dap1/PGRMC1 binds and regulates cytochrome P450 enzymes. *Cell Metabolism*, 5(2), 143-149.

Ingavale, S. S., Chang, Y. C., Lee, H., McClelland, C. M., Leong, M. L., & Kwon-Chung, K. J. (2008). Importance of mitochondria in survival of *Cryptococcus neoformans* under low oxygen conditions and tolerance to cobalt chloride. *PLoS Pathogens*, 4(9), 1-14.

Jamieson, D. J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(16), 1511-1527.

Kel, A. E., Gößling, E., Reuter, I., Cheremushkin, E., Kel-Margoulis, O. V., & Wingender, E. (2003). MATCHTM: a tool for searching transcription factor binding sites in DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3576-3579.

- Lee, H., Bien, C. M., Hughes, A. L., Espenshade, P. J., Kwon-Chung, K. J., & 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.
- Loto, I., Gutiérrez, M. S., Barahona, S., Sepúlveda, D., Martínez-Moya, P., Baeza, M., Cifuentes, V., & Alcaíno, J. (2012). Enhancement of carotenoid production by disrupting the C22-sterol desaturase gene (*CYP61*) in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *BMC Microbiology*, 12(1), 1-16.
- Mathelier, A., Zhao, X., Zhang, A. W., Parcy, F., Worsley-Hunt, R., Arenillas, D. J., Buchman, S., Chen, C., Chou, A., Ionescu, H., Lim, J., Shyr, C., Tan, G., Zhou, M., Lenhard, B., Sandelin, A., & Wasserman, W. W. (2013). JASPAR 2014: an extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Research*, 1-6.
- Olson, T. K., & Criddle, K. R. (2008). Industrial evolution: a case study of Chilean salmon aquaculture. *Aquaculture Economics & Management*, 12(2), 89-106.
- Rawson, R. B. (2003). The SREBP pathway-insights from Insigs and insects. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(8), 631-640.
- Rawson, R. B., Zelenski, N. G., Nijhawan, D., Ye, J., Sakai, J., Hasan, M. T., Chang, T. Y., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1997). Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs. *Molecular Cell*, 1(1), 47-57.
- Rodríguez-Sáiz, M., de la Fuente, J. L., & Barredo, J. L. (2010). *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88(3), 645-658.
- Saag, M. S., & Dismukes, W. E. (1988). Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(1), 1-8.
- Salgado, R. (2005). Análisis del desarrollo de la salmonicultura chilena. *Pontificia Universidad Católica de Chile, Proyecto de título presentado en la Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, para obtener el título de Ingeniero Agrónomo. Profesor guía Juan Ignacio Domínguez C, Santiago Chile.*
- Schmidt, I., Schewe, H., Gassel, S., Jin, C., Buckingham, J., Hümbelin, M., Sandmann, G., & Schrader, J. (2011). Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(3), 555-571.
- Seo, Y. K., Chong, H. K., Infante, A. M., Im, S. S., Xie, X., & Osborne, T. F. (2009). Genome-wide analysis of SREBP-1 binding in mouse liver chromatin reveals a preference for promoter proximal binding to a new motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(33), 13765-13769.

Sharma, R., Gassel, S., Steiger, S., Xia, X., Bauer, R., Sandmann, G., & Thines, M. (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(1), 1-13.

Stewart, E. V., Nwosu, C. C., Tong, Z., Roguev, A., Cummins, T. D., Kim, D. U., Hayles, J., Park, H. O., Hoe K, L., Powell D. W., Krogan N. J., & Espenshade, P. J. (2011). Yeast SREBP cleavage activation requires the Golgi Dsc E3 ligase complex. *Molecular Cell*, 42(2), 160-171.

Todd, B. L., Stewart, E. V., Burg, J. S., Hughes, A. L., & Espenshade, P. J. (2006). Sterol regulatory element binding protein is a principal regulator of anaerobic gene expression in fission yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 26(7), 2817-2831.

Tsunoda, T., & Takagi, T. (1999). Estimating transcription factor bindability on DNA. *Bioinformatics*, 15(7), 622-630.

Vik, Å., & Rine, J. (2001). Upc2p and Ecm22p, dual regulators of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 21(19), 6395-6405.

Ye, L., Xie., W., Zhou, P., & Yu, H. (2015). Biotechnological Production of Astaxanthin through Metabolic Engineering of Yeasts. *Chemical and Biomolecular Engineering Reviews*, 2(2), 107-117.