

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS



**“CLONACIÓN EN PLÁSMIDOS PARA LA PRODUCCIÓN Y
SECRECIÓN DE PÉPTIDOS O PROTEÍNAS EN
Saccharomyces cerevisiae”**

Presentada por:

SANDY NELLY MANSILLA GARCÍA

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGA

Lima – Perú

2021

**La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación
(Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual)**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“CLONACIÓN EN PLÁSMIDOS PARA LA PRODUCCIÓN Y
SECRECIÓN DE PÉPTIDOS O PROTEÍNAS EN
Saccharomyces cerevisiae”**

Presentada por:

SANDY NELLY MANSILLA GARCÍA

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGA

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Dra. Rosa Amelia Espejo Joya
PRESIDENTE

Mg.Sc. Roberto Carlos Mansilla Samaniego
MIEMBRO

Dr. Ernesto Aldo Ormeño Orillo
MIEMBRO

Dra. Ana Akemi Kitazono Sugahara
ASESORA

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis formadores, profesores de mi amada Universidad Nacional Agraria La Molina, personas con hermosa vocación de enseñar a quienes en gran parte les debo haber llegado al punto en el que me encuentro. En especial a mi asesora Ana Akemi Kitazono Sugahara, quien con sus conocimientos y apoyo me guio y motivó a cumplir con este gran proyecto.

También quiero agradecer a mis compañeros y amigos del Laboratorio de Química Biológica y Bioanálisis por compartir conmigo su tiempo, su esfuerzo y su amistad.

Por último, quiero agradecer profundamente a todos mis seres amados. Me siento bendecida de estar rodeada de personas y gatitos tan especiales día a día. Son mi fortaleza y alegría de todos los días.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|------|
| RESUMEN | viii |
| ABSTRACT | ix |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA | 3 |
| 2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 3 |
| 2.1.1. La ruta secretora..... | 3 |
| 2.1.2. Incremento de la eficiencia de secreción mediante la sobreproducción de las proteínas Sec16 y Glo3 | 6 |
| 2.1.3. Uso del péptido señal para la secreción de proteínas..... | 7 |
| 2.2. Plásmido de clonación..... | 9 |
| 2.2.1. Construcción de plásmidos mediante clonación <i>in vivo</i> | 11 |
| 2.2.2. Glutation S-Transferasa (GST) | 12 |
| 2.3. Fotoprotección y péptidos bioactivos | 13 |
| III. METODOLOGÍA | 14 |
| 3.1. Lugar de ejecución | 14 |
| 3.2. Materiales..... | 14 |
| 3.2.1. Cepas y plásmidos..... | 14 |
| 3.2.2. Cebadores..... | 15 |
| 3.2.3. Materiales..... | 15 |
| 3.2.4. Medios de cultivo..... | 16 |
| 3.2.5. Soluciones y reactivos..... | 16 |
| 3.2.6. Reactivos de Biología molecular | 16 |
| 3.2.7 Equipos | 17 |
| 3.3. Métodos..... | 17 |
| 3.3.1. Clonación <i>in vivo</i> para la construcción de nuevos plásmidos..... | 17 |
| 3.3.2. Verificación de la correcta clonación mediante PCR analítico..... | 22 |

| | |
|---|----|
| 3.3.3. Transformación de <i>E. coli</i> por electroporación, purificación y secuenciación de plásmidos amplificados | 23 |
| 3.3.4. Retransformación en cepa deficiente en triosa fosfato isomerasa con la vía secretora nativa o modificada | 24 |
| 3.3.5. Inoculación de retransformantes, toma y preparación de muestras | 24 |
| 3.3.6. Detección de GST mediante Western blot | 25 |
| 3.3.7. Análisis de la actividad fotoprotectora de los oligopéptidos sintetizados | 26 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 28 |
| 4.1. Clonación <i>in vivo</i> para la construcción de nuevos plásmidos | 28 |
| 4.1.1. Plásmidos controles que incluyen las secuencias codificantes para los <i>PS-Alfa</i> y <i>PS-Sintético</i> | 28 |
| 4.1.2. Plásmidos que incluyen las secuencias codificantes para el PS-Alfa o PS-Sintético fusionados a GST | 30 |
| 4.1.3. Plásmidos que contienen las secuencias codificantes para el PS-Alfa fusionado a los oligopéptidos fotoprotectores | 32 |
| 4.2. Transformación y morfología de las cepas deficientes en triosafosfato isomerasa con el sistema de secreción nativo (tfiNEG) o modificado (tfiNEG-SS) | 34 |
| 4.3. Determinación de los niveles de secreción de GST | 35 |
| 4.4. Análisis de la actividad fotoprotectora de los oligopéptidos sintetizados | 40 |
| V. CONCLUSIONES | 43 |
| VI. RECOMENDACIONES | 44 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA | 45 |
| VIII. ANEXOS | 51 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Ejemplos de péptidos señal para <i>S. cerevisiae</i> | 8 |
| Tabla 2. Cepas utilizadas | 14 |
| Tabla 3. Plásmidos utilizados | 14 |
| Tabla 4. Cebadores utilizados..... | 15 |
| Tabla 5. Resumen de plásmidos construidos..... | 21 |
| Tabla 6. Transformantes obtenidos para la evaluación de los niveles de secreción..... | 24 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Secreción de péptidos y proteínas..... | 5 |
| Figura 2: Transporte anterógrado y retrógrado entre el retículo endoplásmico y la red cis-Golgi..... | 6 |
| Figura 3: Participación de Sec16 y Glo3 en el tráfico de vesículas. | 7 |
| Figura 4: Principales características del plásmido pJN1. | 10 |
| Figura 5: Vía de degradación de glucosa en mutantes de <i>S. cerevisiae</i> que carecen de la triosa fosfato isomerasa (<i>tpi1Δ</i>). | 11 |
| Figura 6: Ejemplo de uso de recombinación homóloga en <i>S. cerevisiae</i> para clonar dos fragmentos en un plásmido previamente linealizado. | 12 |
| Figura 7: Representación de la reacción de PCR utilizada para la obtención de los fragmentos PS-Alfa y PS-Sintético. | 19 |
| Figura 8: Representación de la reacción de PCR utilizada para la obtención de los fragmentos PS-Alfa y PS-Sintético que se unirán al fragmento GST..... | 19 |
| Figura 9: Representación de la reacción de PCR utilizada para la obtención del fragmento GST a clonar. | 20 |
| Figura 10: Representación de la reacción de PCR utilizada para la obtención de los fragmentos que codifican para las fusiones PS-AlfaP1, PS-AlfaP1 y PS-AlfaP3. | 20 |
| Figura 11: Representación de la estrategia utilizada para la construcción de los plásmidos controles pSint y pAlfa. | 21 |
| Figura 12: Representación de la estrategia utilizada para la construcción de los plásmidos pSintGST y pAlfaGST..... | 22 |
| Figura 13: Representación de la estrategia utilizada para la construcción de los plásmidos pAlfaP1, pAlfaP2 y pAlfaP3. | 22 |
| Figura 14: Descripción de la estrategia seguida para la determinación de los niveles de GST intracelular y secretado..... | 25 |

| | |
|---|----|
| Figura 15: Descripción del protocolo seguido para determinar los niveles de fotoprotección conferidos por la producción de los oligopéptidos P1, P2 y P3..... | 27 |
| Figura 16: Linealización y defosforilación del plásmido pJN1 y obtención de los fragmentos PS-Alfa y PS-Sintético. | 28 |
| Figura 17: Transformantes de levadura obtenidos por clonación in vivo de los fragmentos PS-Alfa y PS-Sintético..... | 29 |
| Figura 18: Análisis electroforético de fragmentos clonados en los plásmidos pAlfa y pSint. | 30 |
| Figura 19: Obtención de los fragmentos que incluyen las secuencias codificantes para PS-Alfa, PS-Sintético y GST. | 30 |
| Figura 20: Transformantes de levadura obtenidos por clonación in vivo de los fragmentos PS-Alfa, PS-Sintético y GST. | 31 |
| Figura 21: Análisis electroforético de fragmentos amplificados en los plásmidos pAlfaGST y pSintGST. | 32 |
| Figura 22: Obtención de los fragmentos que incluyen las secuencias codificantes para los oligopéptidos P1, P2 y P3 fusionados a PS-Alfa..... | 32 |
| Figura 23: Transformantes de levadura obtenidos por clonación in vivo de los fragmentos PS-Alfa-P1, PS-Alfa-P2 y PS-Alfa-P3 en el plásmido pJN1..... | 33 |
| Figura 24: Análisis electroforético de fragmentos clonados en los plásmidos pAlfaP1, pAlfaP2 y pAlfaP3..... | 33 |
| Figura 25: Observación de levaduras tfi^{NEG} y tfi^{NEG-SS} transformadas con los plásmidos pAlfa, pSint, pAlfaGST y pSintGST. | 34 |
| Figura 26: Resultados del Western blot para el análisis de secreción de GST a diferentes horas usando pAlfaGST y pSintGST en la cepa tfi^{NEG} | 35 |
| Figura 27: Resultados del Western blot para el análisis de producción y secreción de GST usando el plásmido pSintGST en la cepa tfi^{NEG} | 36 |
| Figura 28: Resultados del Western blot para el análisis de producción y secreción de GST usando pAlfaGST en la cepa tfi^{NEG} | 37 |

| | |
|---|----|
| Figura 29: Resultados del Western Blot para el análisis de producción y secreción de GST usando los plásmidos pAlfaGST y pSintGST en la cepa tfi^{NEG} | 38 |
| Figura 30: Resultados del Western blot para el análisis de producción y secreción de GST usando el líder sintético y líder alfa en la cepa tfi^{NEG-SS} | 40 |
| Figura 31: Cepa tfi^{NEG} transformada con los plásmidos pAlfa, pAlfaP1, pAlfaP2 o pAlfaP3. | 41 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|---|----|
| Anexo 1: ELIMINACIÓN DE PLÁSMIDO DE UNA CEPA TRANSFORMADA MEDIANTE CRECIMIENTO EN MEDIO NO SELECTIVO | 52 |
| Anexo 2: FOTOGRAFIAS DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL | 55 |
| Anexo 3: ESPECIFICACIONES DE EQUIPOS Y KITS USADOS PARA WESTERN BLOT | 56 |

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo investigar la secreción de glutatión S-transferasa (GST) y oligopéptidos en *Saccharomyces cerevisiae* mediante la clonación de los respectivos genes en plásmidos. La clonación se realizó mediante la técnica denominada “*in vivo*”, y su correcta ejecución fue comprobada mediante PCR y posterior secuenciación. Los plásmidos construidos incluían las secuencias codificantes para dos tipos de péptidos señal: el PS-Alfa (derivado del factor de apareamiento alfa) y un PS-Sintético (diseñado a partir de secuencias de consenso derivadas de las proteínas Yps1/Yap3/TA57). La producción y secreción de GST fueron comprobadas mediante ensayos de Western blot, obteniendo como resultado la detección de bandas del tamaño esperado (26 kDa) y otras de mayor tamaño, dependiendo del péptido señal (PS) utilizado. A pesar de estas diferencias, las eficiencias de secreción observadas fueron similares. Sin embargo, la GST hallada intracelularmente para el caso del PS-sintético mostró mayor tamaño, sugiriendo una mayor cantidad de glicosilaciones.

Posteriormente, se desarrolló un ensayo que permite comparar los efectos fotoprotectores de péptidos previamente identificados en nuestro laboratorio. Se evaluó la capacidad de supervivencia de las células transformadas con los plásmidos de secreción, sometiéndolas a irradiación UV. Los resultados sugieren una moderada capacidad fotoprotectora pero se requiere ampliar estos estudios.

En conclusión, la maquinaria de recombinación homóloga de *S. cerevisiae* permite la óptima clonación de insertos para la construcción de plásmidos. La proteína GST puede ser secretada utilizando los péptidos señal PS-Alfa y PS-Sintético, pero este último causa un mayor número de modificaciones.

Palabras clave: levadura, glutatión S-transferasa (GST), clonación *in vivo*, péptidos fotoprotectores.

ABSTRACT

The main goal of this thesis was to investigate the secretion of glutathione S-transferase (GST) and a few oligopeptides in *Saccharomyces cerevisiae* by cloning the respective genes in plasmids. The constructed plasmids included also the sequences coding for two types of signal peptides (PS): “PS-Alpha”, derived from the alpha mating factor and “PS-Synthetic”, designed from the consensus sequences for the PSs of the Yps1/Yap3/TA57 proteins. All plasmids were assembled *in vivo*, and the inserts were verified by analytical PCR and then by nucleotide sequencing. GST production and secretion were verified by Western blot assays, resulting in the detection of bands of the expected size (26 kDa) and others of larger size, depending on the signal peptide (PS) used. Interestingly, while the secretion efficiencies observed were similar for both PSs, in the case of PS-Synthetic the GST found intracellularly showed larger sizes, suggesting a greater amount of glycosylations.

Likewise, a simple assay was designed to compare the photoprotective effects of peptides previously identified in our laboratory. The survivability of the cells transformed with the secretion plasmids was evaluated by irradiating them with UV. The results suggest a moderate photoprotective capacity but it is necessary to expand these studies.

In conclusion, the *S. cerevisiae* homologous recombination machinery allows optimal cloning of inserts for plasmid construction. The GST protein can be secreted by using the signal peptides PS-Alpha and PS-Synthetic, but the last causes a greater number of modifications.

Keywords: yeast, glutathione S-transferase (GST), *in vivo* cloning, photoprotective peptides.

I. INTRODUCCIÓN

Saccharomyces cerevisiae es un microorganismo ampliamente utilizado en investigación y en procesos biotecnológicos gracias a que presenta ventajas como rápido crecimiento, fácil cultivo y manipulación genética, y un simple pero eficiente sistema de secreción de proteínas. Esta última característica es muy importante a nivel industrial y de laboratorio porque facilita la etapa de purificación de proteínas al reducir la cantidad de procesos requeridos para aislar sólo la proteína de interés (Bao *et al.*, 2018; Mori *et al.*, 2015). Debido a esto, se han desarrollado numerosas investigaciones buscando optimizar el rendimiento de secreción proteica.

Para lograr la secreción de una proteína de interés es necesaria la presencia de una secuencia de péptido señal (PS), cuya secuencia codificante puede estar incluida en el plásmido de expresión. Varios investigadores han demostrado que la eficacia de secreción de una proteína depende en parte de la secuencia del PS, la que puede optimizarse originando los llamados PS sintéticos (Mori *et al.*, 2015). Otra forma de aumentar la cantidad de proteína secretada consiste en la modificación de la vía de secreción. Según Bao *et al.* (2018), una vía secretora modificada mediante la sobreexpresión de los genes *SEC16* y *GLO3*, logra una secreción notablemente superior a la basal. Esto es posible porque las proteínas codificadas por estos genes tienen roles importantes en este proceso: Sec16 participa en el tráfico anterógrado (transporte de la proteína de carga desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi), y Glo3 en el tráfico retrógrado que recupera los componentes necesarios para permitir el tráfico anterógrado.

Dentro de la amplia gama de péptidos y proteínas cuya secreción puede ser de interés, se encuentran aquellos que tienen actividad fotoprotectora. Anteriores investigaciones han comprobado que *S. cerevisiae* es un organismo modelo adecuado para medir el daño que puede provocar la radiación UV, midiendo de forma semicuantitativa la supervivencia de la levadura tras su exposición (Merino *et al.*, 2018). Asimismo, posteriores experimentos permitieron la obtención de péptidos que al ser sobreproducidos dentro de la levadura aumentan su supervivencia tras la exposición a irradiación (Merino, 2019).

El presente estudio tuvo como finalidad determinar los niveles de secreción que pueden alcanzarse al usar dos tipos de PS: un PS nativo (PS-Alfa, derivado del factor de apareamiento alfa) y otro sintético de secuencia optimizada (PS-Sintético). A su vez, se ensayaron dos tipos de cepas: una con una vía secretora nativa y otra con las modificaciones que permiten la sobreproducción de Sec16 y Glo3. Finalmente, una vez que se lograron establecer las condiciones que permiten la más eficiente secreción de proteínas, estas fueron aplicadas para confirmar las actividades fotoprotectoras de tres oligopéptidos previamente identificados.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Por muchas décadas *S. cerevisiae* fue solo importante para la producción de alimentos y bebidas. Sin embargo, hoy en día este organismo es usado para un gran número de diferentes procesos, sobre todo aquellos que involucran manipulación genética. Dentro del campo de la investigación, su cualidad de fácil manipulación la ha convertido en el microorganismo por excelencia para la producción de proteínas heterólogas. Es un hospedero muy recomendado debido a que posee la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales y secreción, permitiendo reducir drásticamente los costos de la purificación y modificación de las proteínas producidas (Ostergard *et al.*, 2000). *S. cerevisiae* es el organismo eucariota más profundamente estudiado y por ello, la más importante referencia para entender de manera general a la célula eucariota. Asimismo, otra importante característica que hace muy útil a esta levadura es que se trata de un organismo GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro, por las siglas en inglés).

Dadas las anteriores características, *S. cerevisiae* se utiliza para estudios de diversos procesos biológicos, sobre el cáncer (Simon & Bedalov, 2004; Ferreira *et al.*, 2018), enfermedades neurodegenerativas (Khurana *et al.*, 2010), resistencia a antibióticos (Goldstein & Mcusker, 1999), daño causado por la radiación UV (Paiva *et al.*, 2014; Gutiérrez *et al.*, 2017; Merino *et al.*, 2018), etc.

2.1.1. La ruta secretora

La ruta secretora en *S. cerevisiae* fue la primera claramente comprendida, principalmente gracias al trabajo realizado en el laboratorio de Randy Schekman en la década de 1980. La síntesis de una proteína empieza en el citosol mediante la traducción del ARNm por un ribosoma. El proceso se completa en el citosol a menos que los primeros aminoácidos constituyan un PS que dirige al polipéptido emergente hacia el retículo endoplásmico. Un complejo proteico llamado partícula de reconocimiento de la señal (SRP) reconoce el PS y

lo guía hacia una translocasa ubicada en la membrana del retículo endoplásmico. Por lo general, la síntesis del polipéptido continúa de modo tal que este es liberado dentro del lumen pero, si se trata de una proteína de membrana es prontamente embebida en la membrana del retículo endoplásmico.

Es en el lumen donde ocurre el plegamiento y las primeras modificaciones postraduccionales de la proteína, como la N-glicosilación, la hidroxilación de residuos de prolina o la adición de glicolípidos (Lee *et al.*, 2004). Las chaperonas y enzimas de glicosilación se encargan del control de calidad de este proceso, y determinan el momento en que las proteínas formadas abandonan el retículo endoplásmico para ser transportadas mediante vesículas al aparato de Golgi (Smith & Lupashin, 2008). Si las proteínas no se plegaran adecuadamente dentro de un cierto tiempo, son reclutadas por la vía de degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD), que las retrotransloca de manera eficiente al citosol para su degradación a través del sistema ubiquitina-proteasoma (Gardner *et al.*, 2013).

Una vez en el aparato de Golgi, las proteínas recorren las sucesivas cisternas siendo modificadas de manera secuencial mediante la elaboración de estructuras carbohidratadas complejas; fosforilación, sulfatación y/o proteólisis. En el subcompartimento más distal, las proteínas son seleccionadas y enviadas también a través de vesículas hacia su lugar final de residencia: espacio extracelular, membrana plasmática, o gránulos de secreción (Pérez, 2016).

Una característica muy útil para el diseño de estrategias de secreción, es el uso de un PS con secuencias denotadas “pre-pro” que facilitan la secreción del producto proteico. La parte “pre” es la responsable de dirigir el péptido o proteína para que éste sea translocado al retículo endoplásmico, mientras que la parte “pro” está diseñada para aumentar tanto la solubilidad del producto (Kjeldsen *et al.*, 1999) como la eficiencia del tráfico a través del transporte inter-organelos y la focalización de la ruta vacuolar (Rakestraw *et al.*, 2009).

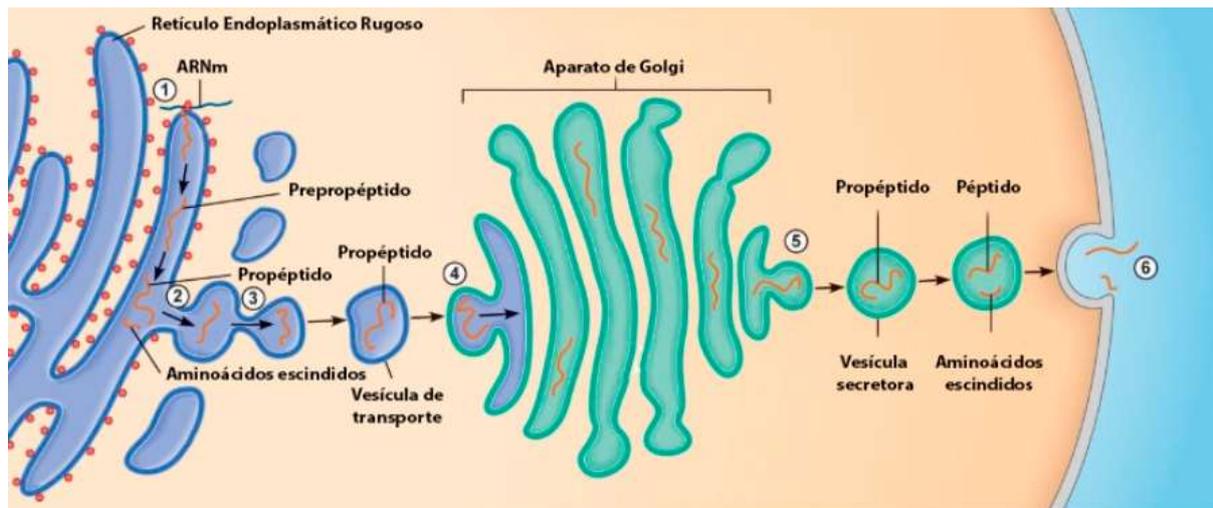


Figura 1: Secreción de péptidos y proteínas. 1. Un prepro péptido se sintetiza y se libera en el retículo endoplásmico rugoso (RER). 2. Las enzimas proteolíticas en el RER separan algunos aminoácidos para producir propéptidos o proproteínas. 3. En el retículo endoplásmico liso, los propéptidos o proproteínas se empaquetan en vesículas de transporte. 4. Las vesículas son transportadas al aparato de Golgi. 5 y 6. Los propéptidos o proproteínas son empaquetados en vesículas secretoras en el aparato de Golgi. Posteriormente, ya sea en el aparato de Golgi o en las vesículas secretoras, se escinden más aminoácidos para producir los péptidos o proteínas finales que son liberados por exocitosis.

FUENTE: Stanfield, 2013.

La levadura, al ser una célula eucariota, necesita que su sistema de endomembranas mantenga una organización adecuada y conserve su identidad molecular. Para ello existen diferentes mecanismos que retienen a las moléculas en sus lugares de residencia, un ejemplo importante es el flujo bidireccional –compuesto por el transporte anterógrado y transporte retrógrado– que se da entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. El transporte anterógrado desde el retículo endoplásmico permite la salida de las proteínas de secreción, mientras que el transporte retrógrado desde el aparato de Golgi, mantiene los niveles requeridos de proteínas endógenas en el retículo endoplásmico, evita que las proteínas mal plegadas avancen por la ruta secretora, y recicla los materiales necesarios para futuras rondas de transporte anterógrado (Bao *et al.*, 2018). El proceso de las dos rutas vistas anteriormente consta de los siguientes procesos: formación de vesículas, translocación de vesículas, anclaje de vesículas y fusión de vesículas con el compartimiento objetivo (Wang *et al.*, 2017).

La formación de vesículas comienza con la emergencia de las vesículas desde el compartimento donante mediado por el complejo de proteínas de cubierta vesicular II (COPII) para el transporte anterógrado, y el complejo de proteínas de cubierta vesicular I (COPI) para el transporte retrógrado. Este proceso involucra gasto de energía, mediado por proteínas de la familia de las guanosina trifosfatasa (GTPasas) (Perez, 2016). Seguidamente, la translocación de las vesículas es impulsada por proteínas motoras, como

las kinesinas y las dineínas, que mueven a las vesículas a lo largo del citoesqueleto. Luego, las proteínas de anclaje y GTPasas regulan el acoplamiento de las vesículas al compartimento aceptor. El proceso culmina con la fusión de las vesículas gracias a una familia de proteínas llamadas SNARE. El emparejamiento específico de las proteínas v-SNARE, ubicadas en la vesícula, con las t-SNARE, ubicadas en el organelo diana, forman el "complejo SNARE" que impulsa la fusión de las membranas (Wang *et al.*, 2017).

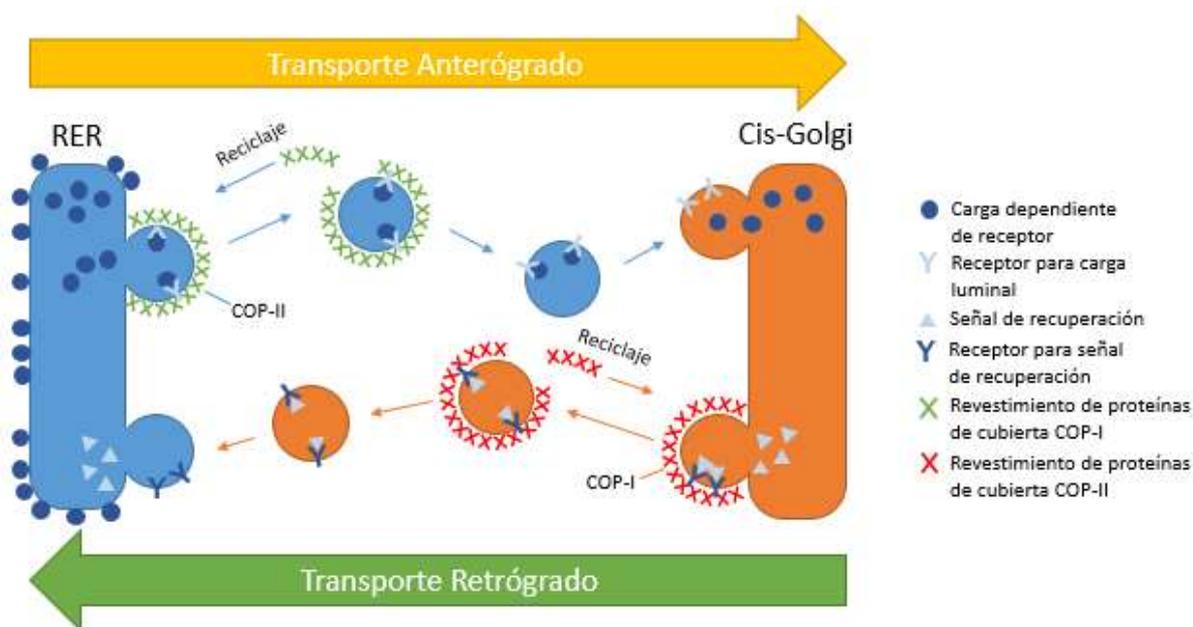


Figura 2: Transporte anterógrado y retrógrado entre el retículo endoplásmico y la red cis-Golgi. El complejo COPII interviene en el transporte anterógrado hacia la red cis-Golgi y el complejo COPI participa en el transporte retrógrado hacia el retículo endoplásmico. Después de la formación de una vesícula, los componentes de su cubierta se disocian y se reciclan hacia su sitio de origen.

FUENTE: Elaboración propia basada en Alberts et al. 2002.

2.1.2. Incremento de la eficiencia de secreción mediante la sobreproducción de las proteínas Sec16 y Glo3

S. cerevisiae secreta de forma natural solo unas pocas proteínas, como la aspartil proteasa, la invertasa, y los factores de apareamiento “a” y “alfa” (Carlson *et al.*, 1983, Hou *et al.*, 2012); por lo tanto, cuenta con una vía secretora con una capacidad relativamente baja. Bao *et al.* (2018) diseñaron una fábrica celular que mediante la expresión moderada de *SEC16* y la sobreexpresión de *GLO3*, presenta una mayor producción de proteínas secretadas. Como muestra la Figura 3, estos investigadores amplificaron la ruta del tráfico anterógrado y retrógrado para aumentar la secreción de proteínas en la levadura.

Cuando se empezó a estudiar la vía secretora, los primeros mutantes aislados por Randy Schekman y su equipo fueron mutantes *sec* incapaces de secretar una enzima extracelular,

por lo que estos genes *SEC* se identificaron como codificadores para diversas proteínas de la maquinaria secretora (Feyder *et al.*, 2015). En específico, Sec16 es una proteína esencial de 241.6 kDa, que se asocia a la cara citosólica del retículo endoplásmico, donde interacciona con los componentes del complejo COPII (Pérez, 2016) para facilitar el ensamblaje de vesículas. Sin embargo, en *S. cerevisiae*, el nivel de síntesis de Sec16 es menor que el de las otras proteínas y, por lo tanto, puede ser el factor limitante en la formación de las respectivas vesículas (Feizi *et al.*, 2013). Por otro lado, la proteína Glo3, de la familia de las GTPasas, influye en la formación de vesículas de transporte retrógrado promoviendo la hidrólisis de GTP y causando así el desensamblaje de los complejos proteicos iniciales.

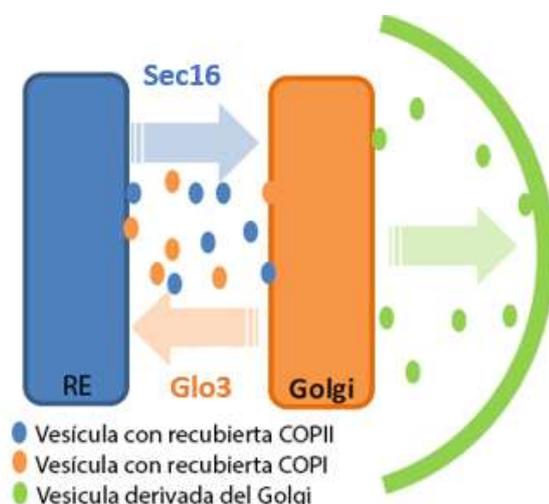


Figura 3: Participación de Sec16 y Glo3 en el tráfico de vesículas. Sec16 interviene en la formación de vesículas COPII que participan en el transporte anterógrado, desde el retículo endoplásmico (RE) hacia el aparato de Golgi. Por otro lado, Glo3 contribuye en la formación de vesículas COPI, que participan en el transporte retrógrado, en sentido opuesto.

FUENTE: Bao *et al.*, 2018.

2.1.3. Uso del péptido señal para la secreción de proteínas

Para propósitos de la secreción de proteínas, el PS incluido puede ser nativo, heterólogo, o sintético (diseñado). A menudo se encuentra que un PS funciona con éxito solo para una (o algunas) proteína(s). Esto se puede explicar por la complejidad de su procesamiento (plegamiento, glicosilación, formación de enlaces disulfuro, etc.) y la eficiencia de las vías de secreción empleadas (Hou *et al.*, 2012). La secreción de proteínas glicosiladas en *S. cerevisiae* puede verse afectada por la hiperglicosilación y el plegamiento incorrecto de proteínas, por ello, se han estudiado y diseñado distintos PS que presentan muy pocos o ningún sitio de glicosilación. (Liu *et al.*, 2012). Debido a estas características aún no es

posible predecir qué tipo de PS es óptimo para cada proteína y, por tanto, la eficiencia de secreción en cada caso debe ser confirmada experimentalmente.

Tabla 1. Ejemplos de péptidos señal para *S. cerevisiae*

| PS | Secuencia de aminoácidos | Proteína original |
|-----------------------|--|---|
| Nativos | | |
| MF(alfa)1 | MRFPSIFTAVLFAASSALA~APVNTTTEDETAQI PAEAVIGYLDLEGDFDVAVLFPFSNSTNGLLFIN TTIASIAAKEEGVSLDKR | Factor de apareamiento alfa |
| Crh1 | MKVLDLLTVLSASSLLSTFAAA~ESTATADSTTA ASSTASCNPLKTTGCTPDTALATSFSEDFSSSSK | Transglicosilasa quitina-glucano |
| Heterólogos | | |
| LKiller | MNIFYIFLFLLSFVQG~LEHTRRRGSLDKR | Toxina asesina de <i>Kluyveromyces lactis</i> |
| HSA | MKWVSFISLLFLFSSAYS~RGVFRR | Albúmina de suero humano |
| Sintéticos | | |
| Yps1/Yap3/TA57 | MKLKTVRSVAVLSSLFASQVLG~QPIDDTESTTS VNLMADDTESAFATQTNSGGLDVVGLIS | Proteasa Aspártica 3 / pro-péptido genéticamente modificado |
| HSA/MF(alfa)1 | MKWVSFISLLFLFSSAYS~RSLDKR | Albúmina de suero humano/Factor de apareamiento alfa |

~ señala la zona de escisión del PS.

Las secuencias necesarias para la elaboración de este cuadro fueron obtenidas de Liu *et al.* 2012 y Sleep, D. *et al.* 1990.

Para propósitos del desarrollo de este proyecto se utilizaron dos PS de distintas características.

a. Péptido señal del factor de apareamiento alfa

Las células haploides de *S. cerevisiae* pueden ser de dos sexos, denotados “a” y “alfa”. Las células a producen el "factor a" y la alfa producen el “factor alfa”, ambos son feromonas peptídicas que indican la presencia de células del sexo opuesto, que al ser reconocidas desencadenan respuestas que permiten posteriormente el apareamiento. El factor alfa posee un PS con parte pre de 19 aminoácidos y una región pro de 64 aminoácidos con tres sitios de glicosilación (Mateljak *et al.*, 2017).

b. Péptido señal sintético Yps1/Yap3/TA57

Yps1/Yap3 o proteasa 3 aspártica de levadura, es un miembro hiperglicosilado de la familia de proteasas de yapsina, unido a la membrana plasmática a través de un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI). El PS de Yps1/Yap3 proporciona usualmente una eficiente secreción de proteínas heterólogas en la levadura. Sin embargo, preferiblemente se utiliza conjuntamente con una secuencia pro-péptido, la cual puede ser nativa o sintética, como en el caso de TA57 (perteneciente a una extensa familia de pro-líderes sintetizados y estudiados por Kjeldsen *et al.*, 1999). La principal diferencia entre el PS del factor alfa y el de Yps1/Yap3/TA57, es que el primero presenta tres sitios de glicosilación y el segundo, ninguno. En ambos, estas características pueden favorecer la secreción de ciertas proteínas (Chigira *et al.*, 2008; Robinson *et al.*, 1994).

2.2. Plásmido de clonación

El plásmido pJN1, proveído por el Dr. Jens Nielsen, jefe del Departamento de Biología e Ingeniería Biológica, Universidad Tecnológica de Chalmers, Suecia, fue usado para todos los experimentos de secreción. Se clonó en este plásmido a las secuencias que codifican para la proteína glutatión-S- transferasa (GST) fusionada con el PS del factor alfa o el sintético (Yps1/Yap3/TA57).

La selección del plásmido pJN1 está basada en la reposición de la vía de la glucólisis, a través de la inserción del gen marcador *tpi1*⁺ de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* (denominación asignada según las reglas generales de nomenclatura para *S. pombe*). Para la selección del plásmido en *S. cerevisiae* se utiliza una cepa que tiene el gen homólogo deletado (*tfi*^{NEG}).

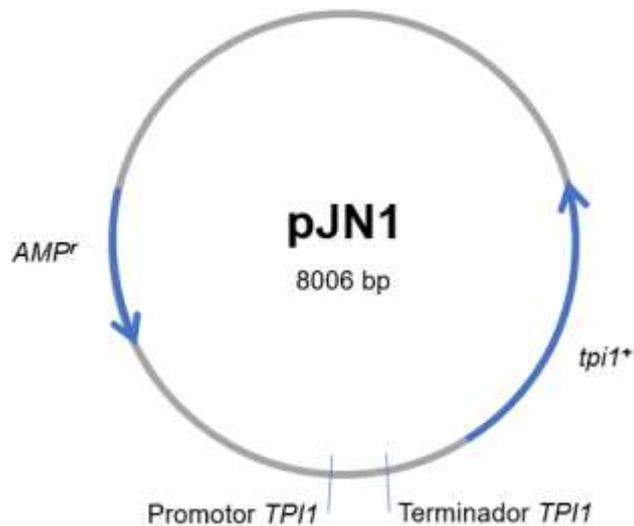


Figura 4: Principales características del plásmido pJN1. El gen AMP^r otorga resistencia a ampicilina a los transformantes de *E. coli*, mientras que el gen $tpi1^+$ repone la vía de la glucólisis en *S. cerevisiae*. El promotor y terminador *TPI1* sirven para la óptima expresión del gen clonado.

FUENTE: Elaboración propia basado en Liu *et al.* 2012.

La inactivación de *TPI1*, el gen de *S. cerevisiae* que codifica para la triosa fosfato isomerasa (tfi), impide la interconversión entre gliceraldehído-3-fosfato (GA3F) y dihidroxiacetona fosfato (DHAF) lo cual disminuye la eficiencia de la vía glicolítica. En mutantes nulos tfi^{NEG} se observa la acumulación intracelular de DHAF la cual puede convertirse en metilglioxal, un compuesto tóxico que inhibe el crecimiento (Inoue *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 2001). Según Overkamp *et al.*, (2002) el efecto tóxico podría prevenirse si hubiese suficiente NADH para reducir la DHAF a glicerol-3-fosfato, no obstante, otras reacciones compiten por el NADH, causando la acumulación de DHAF (y por tanto de metilglioxal). Por esta razón la cepa tfi^{NEG} no prolifera en medios que contiene concentraciones moderadas de glucosa, además, el medio no selectivo debe contener bajas cantidades de la misma para evitar la acumulación de metilglioxal.

Adicionalmente, según Liu *et al.* (2012), las condiciones respiratorias que prevalecen durante el crecimiento con etanol pueden tener un efecto beneficioso en el proceso de plegamiento de proteínas. La conversión de etanol en acetaldehído requiere NADP, y el NADPH obtenido podría servir para la reducción de especies reactivas del oxígeno (ROS) generada por el estrés del plegamiento de proteínas o mediante la conversión de glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH). El medio no selectivo para el plásmido pJN1 contiene etanol y glucosa en bajas concentraciones, mientras que el medio selectivo tendrá concentraciones altas de glucosa. Cuando la cepa con mutación en el gen *TPI1* se complementa a través de un plásmido que incluye una copia funcional de este como es el

caso del gen *tpi1*⁺ de *S. pombe*, la célula transformante retoma su capacidad de crecimiento en medio que contiene glucosa. El gen *tpi1*⁺ se puede usar como marcador muy efectivo debido a que no presenta la desventaja de los sistemas de expresión de marcadores de auxotrofia que tienen que mantenerse en un medio sintético. Por el contrario, los sistemas de expresión basados en *tpi1*⁺ tienen la ventaja de tener una alta estabilidad del plásmido aún en medio rico, lo que puede generar mayor crecimiento celular y mayor producción de proteína.

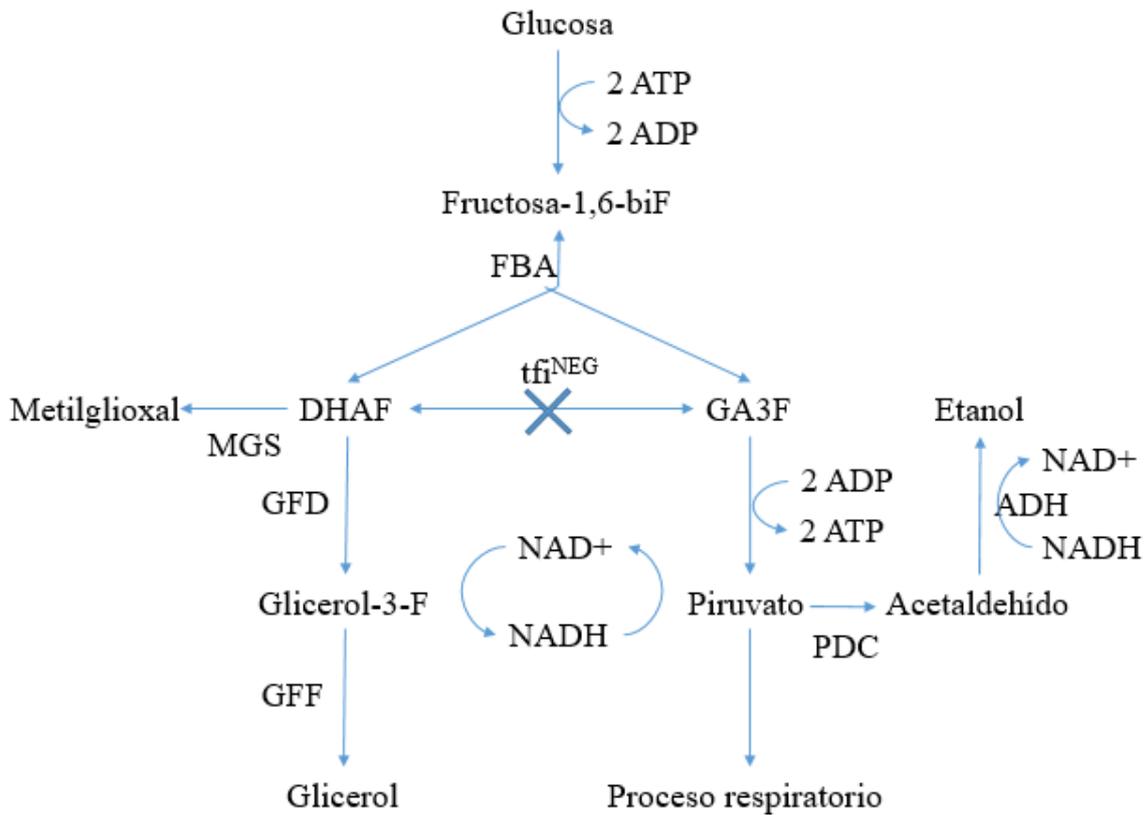


Figura 5: Vía de degradación de glucosa en mutantes de *S. cerevisiae* que carecen de la triosa fosfato isomerasa (*tpi1* Δ). La toxicidad que puede dar el exceso de dihidroxiacetona fosfato (DHAF) se disipa por su reducción a glicerol-3-fosfato, que es luego defosforilado a glicerol. Cuando la reducción de DHAF no ocurre por falta de NADH, se produce metilglioxal que es citotóxico. Abreviaturas: GAF, gliceraldehído-3-fosfato; FBA, fructosa-1,6-bifosfato aldolasa; MGS, metilglioxal sintetasa; GFD, deshidrogenasa citosólica de G3P; GFF, glicerol fosfatasa; PDC, piruvato descarboxilasa; ADH, alcohol deshidrogenasa.

FUENTE: Elaboración propia basado en Overkamp *et al.* 2002.

2.2.1. Construcción de plásmidos mediante clonación *in vivo*

S. cerevisiae posee una maquinaria de recombinación homóloga muy eficaz que ha permitido su uso como herramienta de clonación *in vivo*, lo que lo hace útil para lograr la eficiente construcción de bibliotecas de plásmidos (Alcalde, 2010), creación de genes híbridos, estudios de evolución dirigida de enzimas (Cherry *et al.*, 1999), delección e inserción de genes

(David & Siewers, 2015), construcción de plásmidos (Shao *et al.*, 2008), ensamblaje de cromosomas (Li *et al.*, 2016), etc.

Por ejemplo y como se observa en la Figura 6, es posible lograr la clonación de dos o más fragmentos en un plásmido simplemente mediante la transformación de *S. cerevisiae*. Primero, se realizan dos (o más) reacciones de PCR utilizando cebadores para producir dos (o más) fragmentos que comparten secuencias homólogas en los extremos. Estos productos y un plásmido linealizado son unidos por *S. cerevisiae* a través de sus sitios de recombinación para dar lugar a un único producto.

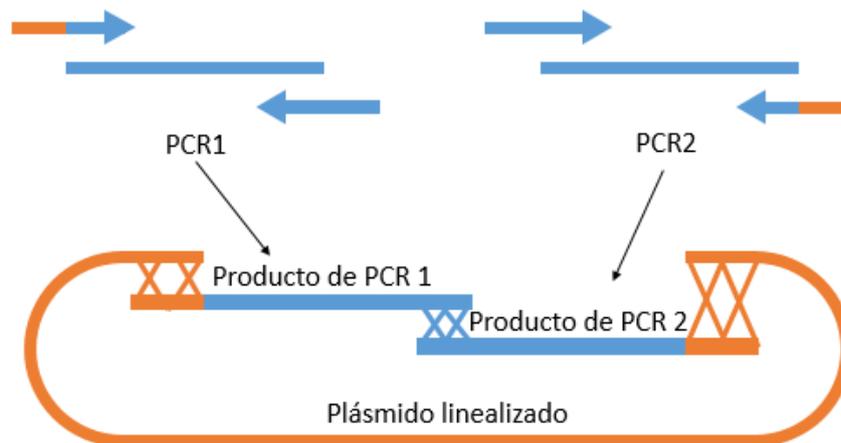


Figura 6: Ejemplo de uso de recombinación homóloga en *S. cerevisiae* para clonar dos fragmentos en un plásmido previamente linealizado.

FUENTE: Elaboración propia.

2.2.2. Glutathion S-Transferasa (GST)

La GST es una proteína de 211 aminoácidos (26 kDa) cuyo gen se usa frecuentemente en vectores de expresión para la producción de proteínas recombinantes de fusión (Frangioni & Neel, 1993). Debido a que GST se pliega rápidamente en una proteína estable y altamente soluble tras su síntesis, la inclusión de la etiqueta GST a menudo promueve una mayor producción y solubilidad de las proteínas de fusión.

Además, estas proteínas de fusión pueden ser purificadas en función de la capacidad de GST (como enzima) para unirse a su sustrato glutatión reducido o GSH (γ -Glu-Cis-Gli). Este es un tripéptido antioxidante que contiene un enlace peptídico inusual entre el grupo amino de la cisteína y el grupo carboxilo de la cadena lateral de un glutamato (Harper & Speicher, 2011). La GST cataliza la conjugación de glutatión con compuestos electrófilos reactivos. Para capturar proteínas fusionadas a GST, el glutatión es inmovilizado por su grupo

sulfhidrilo central en un soporte de agarosa o sefarosa. Este método está bien documentado y se puede adaptar a diversas escalas (Schäfer *et al.*, 2015).

2.3. Fotoprotección y péptidos bioactivos

La radiación ultravioleta (UV) es una fracción del espectro electromagnético con longitudes de onda de 100 a 400 nm, que se clasifica convencionalmente como radiaciones UV-A (315 a 400 nm), UV-B (280 a 315 nm) y UV-C (100 a 280 nm) (ICNIRP, 2004). De estas solo las UV-A y UV-B llegan a la superficie terrestre debido a que las ondas de longitudes de onda más bajas no pueden atravesar la capa de ozono. Actualmente, la manera más común de hacerle frente a este problema es usando bloqueadores solares. Estas son sustancias que contienen filtros fotoestables y están hechos con formulaciones cosméticamente aceptables para el público general (Mancuso *et al.*, 2017).

Los oligopéptidos bioactivos son fragmentos proteicos específicos que tienen un impacto positivo en las funciones y condiciones del organismo (Kitts & Weiler, 2003). Recientemente, la industria dermatológica y cosmética ha implementado el uso de péptidos cortos, estables y sintéticos porque tienen un efecto positivo sobre la piel en temas de pigmentación, inmunidad e inflamación (Pai *et al.*, 2017). Varios estudios recientemente publicados dan atisbo de la función fotoprotectora de algunos péptidos nativos o derivados, por lo que resulta de mucho interés poder ahondar en esta capacidad de bloqueo (Lampel, 2017; Hengke, 2020).

III. METODOLOGÍA

3.1. Lugar de ejecución

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Química Biológica y Bioanálisis del Departamento Académico de Química de la Facultad de Ciencias en la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.2. Materiales

3.2.1. Cepas y plásmidos

Tabla 2. Cepas utilizadas

| Cepas | Descripción | Referencia |
|---|--|-------------------------|
| <i>S. cerevisiae</i> W303 | Genotipo: <i>MATα URA3 HIS3 LEU2 TRP1 SUC2 MAL2-8c</i> | Thomas y Rothstein 1989 |
| <i>S. cerevisiae</i> tfi ^{NEG} | Derivado de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK (<i>tpi1(41-707)::loxP</i>) | Liu et al. 2012 |
| <i>S. cerevisiae</i> tfi ^{NEG} pJN2-ALFA | Derivado de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK (<i>tpi1(41-707)::loxP P_{GPD}-SEC16 P_{TEF}-GLO3</i>), incluye el plásmido pJN2-ALFA | Liu et al. 2012 |
| <i>S. cerevisiae</i> tfi ^{NEG-SS} | Derivado de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK (<i>tpi1(41-707)::loxP</i>) que sobreexpresa los genes <i>GLO3</i> y <i>SEC16</i> | Este estudio |
| <i>E. coli</i> TOP10 | Cepa de <i>E. coli</i> (<i>F– mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)-Φ80lacZΔM15-ΔlacX74 recA1 araD139-Δ(araleu) galU galK rps 7697 L (StrR) endA1 nupG</i>) | Invitrogen |

Tabla 3. Plásmidos utilizados

| Plásmidos | Descripción | Referencia |
|-----------|--|-------------------------------------|
| pJN1 | Incluye el marcador <i>tpi1</i> ⁺ de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> | Liu et al. 2012 |
| pJN2-ALFA | pJN1 que incluye el gen que codifica para el PS-Alfa seguido del gen de amilasa | Liu et al. 2012 |
| pJN3-SYN | pJN1 que incluye el gen que codifica para el PS-Sintético seguido del gen de amilasa | Liu et al. 2012 |
| pEGH | Plásmido que incluye el gen que codifica para glutatión-S-transferasa (GST) | Mitchell, Marshall y Deschenes 1993 |
| pAlfa | pJN1 que incluye el gen que codifica para el PS-Alfa | Este estudio |
| pSint | pJN1 que incluye el gen que codifica para el PS-Sintético | Este estudio |
| pAlfaGST | pJN1 que incluye las secuencias codificantes para el PS-Alfa fusionado a GST | Este estudio |

Continuación...

| | | |
|-----------------|---|--------------|
| pSintGST | pJN1 que incluye las secuencias codificantes para el PS-Sintético fusionado a GST | Este estudio |
| pAlfaP1 | pJN1 que incluye las secuencias codificantes para el PS-Alfa fusionado al oligopéptido P1 | Este estudio |
| pAlfaP2 | pJN1 que incluye las secuencias codificantes para el PS-Alfa fusionado al oligopéptido P2 | Este estudio |
| pAlfaP3 | pJN1 que incluye las secuencias codificantes para el PS-Alfa fusionado al oligopéptido P3 | Este estudio |

3.2.2. Cebadores

Tabla 4. Cebadores utilizados

| NOMBRE | SECUENCIA (número de bases) |
|---------------|--|
| 01FW | AGGAGTTTAGTGAACCTTGCAAC (22) |
| 01RV | CGTCCCTTACAAGAACATTCAC (22) |
| 02FW | TAAATCTATAACTACAAAAACACATACATAAACTAAAAGGTACC (45) |
| 02RV | GGCCCTTAATTTTCCAATAACCTAGTTTTGGTTCACCTTCTTCTTTTAKCC (53) |
| 02.1RV | TTTTATATAATTATATTAATCTTAGTTTCTAGACTCGAGGCTAGCTCACGATGAATTAAGCTTG |
| 02.2RV | TTTTATATAATTATATTAATCTTAGTTTCTAGACTCGAGGCTAGCTTACTCATAATACAACCAGA AGTAAGATAAAGTTTTGGTTCACCTTCTTCTTTTATCC (106) |
| 02.3RV | TTTTATATAATTATATTAATCTTAGTTTCTAGACTCGAGGCTAGCTTACTGATAGTGCGTAAAAT ATACCACAAGTTTTGGTTCACCTTCTTCTTTTATCC (103) |
| 02.4RV | AATTATATTAATCTTAGTTTCTAGACTCGAGGCTAGCTTAATAACAATATGCTACTTCGTACACG AAACCATATGCACCTTATGTATGGCAAATTTTTGGTTCACCTTCTTCTTTTATCC (122) |
| 03FW | GAGAAGAAGGTGAACCAAACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCC (45) |
| 03RV | TTTTATATAATTATATTAATCTTAGTTTCTAGACTCGAGGCTAGCTCACGATGAATTAAGCTTG (64) |
| 04FW | GGCTGCTCCAGTTAATACTAC (21) |
| 05FW | TGTTTTGTCTTCTTTGTTTGC (21) |
| 4.5RV | GTCATACAACATGAAGTCAGG (21) |

3.2.3. Materiales

- Matrices
- Placas Petri
- Micropipetas
- Palitos de dientes estériles
- Pipetas de 5, 10 y 25 ml
- Tubos de ensayo estériles de 15 ml y 50 ml
- Agua destilada estéril
- Tubos de microcentrífuga
- Films de Rayos X
- Cassette para films de Rayos X

- Erlenmeyer de 25, 50 y 250 ml
- Fiolas y probetas de 10, 50, 250 y 1000 ml
- Papel filtro

3.2.4. Medios de cultivo

- Medio YPD (Medio completo para crecimiento de levadura conteniendo 2% glucosa)
- Medio YPE (Medio completo conteniendo 0.05% glucosa, 1% etanol)
- Medio Luria Bertani

3.2.5. Soluciones y reactivos

- Acetato de Litio/TE
- Alcohol de 70°, 90° y 96°
- Glicina
- Hidróxido de sodio
- Kit de revelado de film de Rayos X
 - o Líquido revelador
 - o Líquido fijador
- Kit Pierce ECL Western Blot (Thermo Scientific)
- Kit de tinción de proteínas reversible para membranas de nitrocelulosa
 - o Solución de teñido reversible
 - o Solución de desteñido
 - o Solución borradora de tinte
- SDS/NaOH (1:1)
- Solución tampón 0.5X TE
- Solución tampón de electroforesis TBE 0.5X
- Solución tampón de lisis
- Indicador rojo neutro
- Tetrametiletildiamina – TEMED
- Acrilamida:Bis-acrilamida (37.5:1)
- Persulfato de amonio
- Lauril sulfato de sodio (SDS)
- Leche en polvo descremada
- Buffer Tris-glicina-SDS (TGS)
- Tris base
- Ácido clorhídrico
- Ácido tricloroacético

3.2.6. Reactivos de Biología molecular

- ADN de esperma de salmón
- Agarosa
- Azul de bromofenol

- Bromuro de etidio
- Buffer para ADN polimerasa termoestable
- Cloruro de magnesio
- Desoxirribonucleótidos (dNTPs)
- Enzima de restricción *KpnI* (Promega)
- Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1)
- Marcador 100bp de ADN
- Marcador 1kb de ADN
- Phusion ADN polimerasa (Termoscientific)
- Taq ADN polimerasa (Termoscientific)

3.2.7 Equipos

- Agitador magnético
- Agitador rotatorio
- Balanza analítica
- Baño María
- Centrífuga con sistema de refrigeración
- Congeladoras de -20°C y -80°C
- Documentador de imágenes para electroforesis
- Sistemas de electroforesis horizontal y vertical
- Sistema de transferencia de proteínas (Western blot)
- Incubadora
- Mezclador de vórtice
- Microcentrífuga
- pH-metro
- Refrigeradora
- Sonicador
- Termobloque
- Termociclador
- Transiluminador
- Cabina de bioseguridad

3.3. Métodos

3.3.1. Clonación *in vivo* para la construcción de nuevos plásmidos

El plásmido pJN1 que incluye el marcador *tpi1*⁺ de *Schizosaccharomyces pombe* se usó como vector para insertar los genes de interés. Los plásmidos pJN2-ALFA y pJN3-SYN (Tabla 3) sirvieron como moldes para obtener las secuencias que codifican para los PS-Alfa y PS-Sintético, respectivamente (los tres plásmidos fueron proveídos por Jens Nielsen,

Universidad Tecnológica de Chalmers, Suecia). El plásmido pEGH se usó para obtener la secuencia que codifica para GST.

Para la primera parte de la investigación se requirió el diseño de cuatro versiones del plásmido base pJN1. Dos de ellos son los controles que expresan sólo los PS insertados: alfa y sintético; las otras dos versiones permiten la producción de los respectivos PS unidos a GST. Estos plásmidos nos permitieron verificar los niveles de secreción que se podían alcanzar con cada PS. Para la segunda parte, se diseñaron tres versiones del plásmido, que permiten la producción de tres oligopéptidos de presunta actividad fotoprotectora, precedidos por el PS alfa.

a. Digestión del plásmido pJN1 y tratamiento con fosfatasa

Se trató 5µg del plásmido pJN1 con la enzima de restricción KpnI (secuencia de reconocimiento: ggtac/c) por 3 horas. Luego se inactivó a la enzima mediante tratamiento a 65°C por 20 minutos, se purificó el ADN digerido removiendo proteínas y sales del medio mediante tratamiento con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y finalmente se precipitó con etanol. Inmediatamente se trató con la enzima fosfatasa antártica (New England Biolabs) para la desfosforilación de los extremos 5' - del ADN plasmídico y evitar su posible recircularización.

b. Amplificación de fragmentos por PCR

Como se indica en las figuras 7 a 10, se diseñaron cebadores que permitieron la generación de fragmentos con secuencias homólogas, en los extremos de los insertos a amplificar como en los del sitio de inserción en el plásmido. Estas características permitieron lograr la reconstrucción del plásmido mediante recombinación homóloga dentro de la levadura.

En todos los casos, la reacción de PCR se llevó a cabo con un volumen final de 25µl y se utilizó 0.5µl de la plantilla (100 ng/µl), 1µl de los cebadores (10mM), 0.25µl de la enzima Phusion polimerasa, 5µl del 5X HF buffer, 0.5µl de dNTPs (10mM) y 1µl de MgCl₂ (50mM).

i. *Para la construcción de los plásmidos controles que contienen solamente las secuencias codificantes para el PS-Alfa o PS-sintético*

Para la amplificación de las secuencias codificantes para los PS-Alfa y PS-Sintético se utilizaron los cebadores 02FW y 02.1RV y como plantillas los plásmidos pJN2-ALFA y pJN3-SYN, respectivamente.

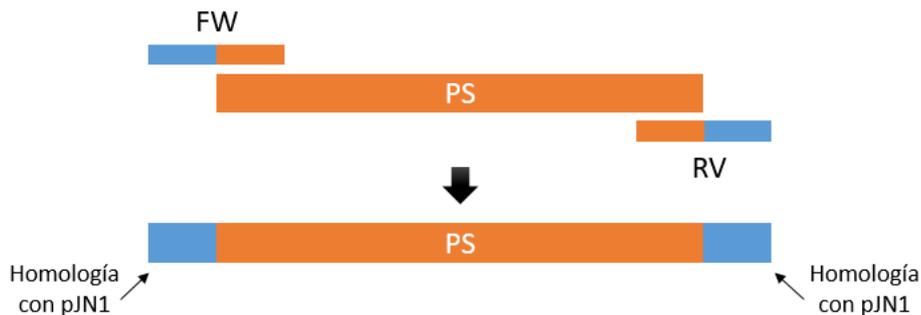


Figura 7: Representación de la reacción de PCR utilizada para la obtención de los fragmentos PS-Alfa y PS-Sintético.

FUENTE: Elaboración propia.

Los parámetros que se utilizaron fueron:

Primeros 10 ciclos:

Desnaturalización: 95°C por 10 s.

Hibridación: 60°C por 20 s.

Extensión: 72°C por 30 s.

Siguientes 20 ciclos:

Desnaturalización: 95°C por 10 s.

Hibridación: 65°C por 20 s.

Extensión: 72°C por 30 s.

- ii. *Para la construcción de los plásmidos que contienen las secuencias codificantes para el PS-Alfa o PS-Sintético fusionados a GST*

Para la amplificación de ambos PS-Alfa y PS-Sintético se utilizaron los cebadores 02FW y 02RV, y como plantillas los plásmidos pJN2-ALFA y pJN3-SYN, respectivamente.

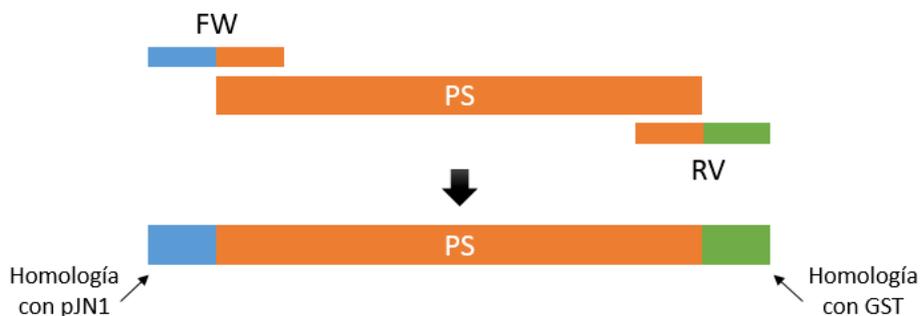


Figura 8: Representación de la reacción de PCR utilizada para la obtención de los fragmentos PS-Alfa y PS-Sintético que se unirán al fragmento GST.

FUENTE: Elaboración propia.

Los parámetros de PCR utilizados fueron:

Primeros 10 ciclos:

Desnaturalización: 95°C por 10 s.

Hibridación: 55°C por 20 s.

Extensión: 72°C por 30 s.

Siguientes 20 ciclos:

Desnaturalización: 95°C por 10 s.

Hibridación: 65°C por 20 s.

Extensión: 72°C por 30 s.

Para la amplificación del gen GST se utilizaron los cebadores 03FW y 03RV, y como plantilla el plásmido pEGH.



Figura 9: Representación de la reacción de PCR utilizada para la obtención del fragmento GST a clonar.
FUENTE: Elaboración propia.

Los parámetros de PCR que se utilizaron fueron:

Primeros 10 ciclos:

Desnaturalización: 95°C por 10 s.

Hibridación: 55°C por 20 s.

Extensión: 72°C por 30 s.

Siguientes 20 ciclos:

Desnaturalización: 95°C por 10 s.

Hibridación: 70°C por 20 s.

Extensión: 72°C por 30 s.

- iii. *Para la construcción de los plásmidos que contienen las secuencias codificantes para el PS-Alfa fusionados a los oligopéptidos fotoprotectores*

Para la amplificación de PS-Alfa unido a los péptidos P1, P2 o P3 se utilizaron los cebadores 02FW y 02.2RV, 02.3RV o 02.4RV, respectivamente, y como plantilla el plásmido pJN2-ALFA.

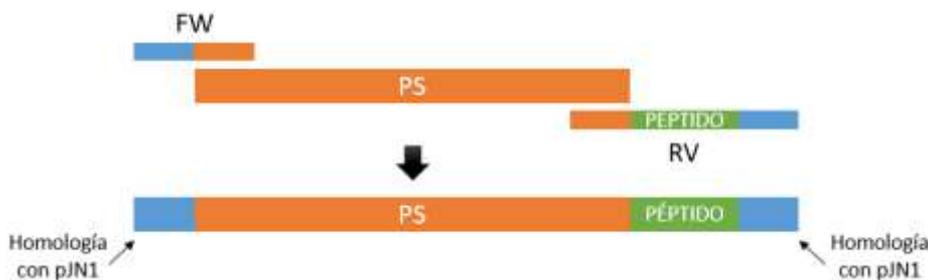


Figura 10: Representación de la reacción de PCR utilizada para la obtención de los fragmentos que codifican para las fusiones PS-AlfaP1, PS-AlfaP2 y PS-AlfaP3.
FUENTE: Elaboración propia.

Los parámetros de PCR fueron:

Primeros 10 ciclos:

Desnaturalización: 95°C por 30 s.

Hibridación: 60°C por 30 s.

Extensión: 72°C por 30 s.

Siguientes 20 ciclos:

Desnaturalización: 95°C por 30 s.

Hibridación: 65°C por 30 s.

Extensión: 72°C por 30 s.

Tabla 5. Resumen de plásmidos construidos

| NOMBRE | DESCRIPCIÓN | USO |
|----------|--------------------------------------|--|
| pAlfa | pJN1 con inserto PS-Alfa | Control negativo de secreción de GST |
| pSint | pJN1 con inserto PS-Sintético | Control negativo de secreción de GST |
| pAlfaGST | pJN1 con insertos PS-Alfa y GST | Secreción de GST mediante el PS-Alfa |
| pSintGST | pJN1 con insertos PS-Sintético y GST | Secreción de GST mediante el PS-Sintético |
| pAlfaP1 | pJN1 con inserto PS-Alfa y P1 | Secreción del péptido P1 mediante el PS-Alfa |
| pAlfaP2 | pJN1 con inserto PS-Alfa y P2 | Secreción del péptido P2 mediante el PS-Alfa |
| pAlfaP3 | pJN1 con inserto PS-Alfa y P3 | Secreción del péptido P3 mediante el PS-Alfa |

c. Transformación y clonación *in vivo*

Para realizar la transformación y clonación *in vivo* se utilizó una suspensión de la cepa *tft^{NEG}* (mutante $\Delta tpi1$) junto con el plásmido pJN1 digerido por *KpnI* y los fragmentos a clonar. Asimismo, la transformación sólo con el plásmido pJN1 digerido por *KpnI* fue utilizado como control negativo, y la transformación con el plásmido pJN1 sin digerir fue el control positivo. Se empleó un protocolo de transformación que utiliza acetato de litio y choque térmico a 42°C. Se incubaron a los transformantes en placas con medio selectivo YPD a 30°C y pasados 3 días se seleccionaron los posibles transformantes.

i. Para la obtención de los plásmidos controles pSint y pAlfa

Se utilizó 170ng de pJN1 digerido y en cada caso, 30ng de fragmento PS-Sintético o PS-Alfa.

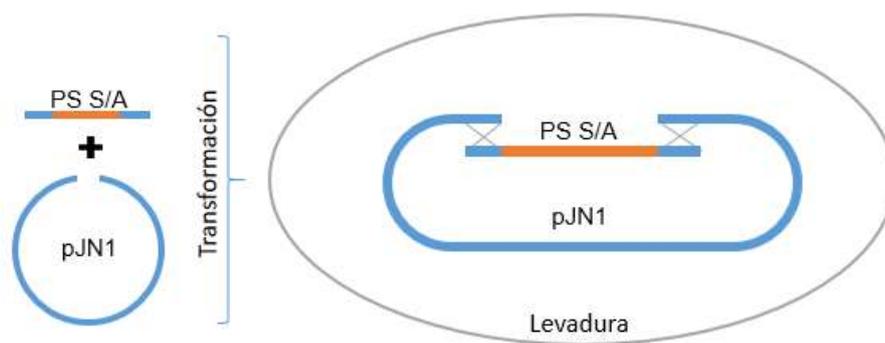


Figura 11: Representación de la estrategia utilizada para la construcción de los plásmidos controles pSint y pAlfa.

FUENTE: Elaboración propia.

ii. Para la obtención de los plásmidos pAlfaGST y pSintGST

Se utilizó 170ng de pJN1 digerido, 20ng del fragmento GST y 10ng del fragmento PS-Sintético o PS-Alfa.

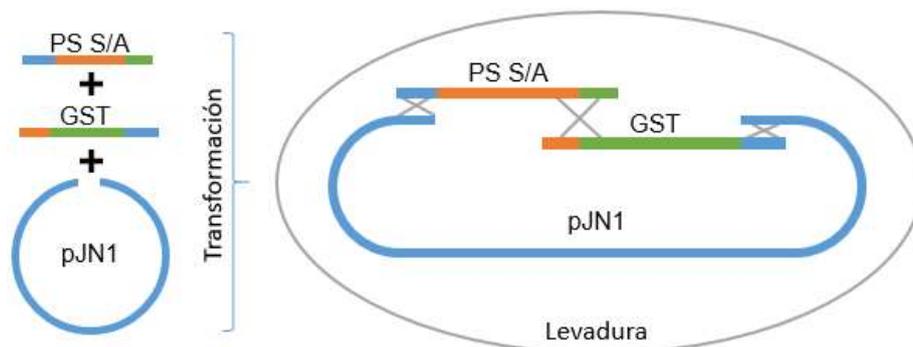


Figura 12: Representación de la estrategia utilizada para la construcción de los plásmidos pSintGST y pAlfaGST.

FUENTE: Elaboración propia.

iii. Para la obtención de los plásmidos pAlfaP1, pAlfaP2 y pAlfaP3

Se utilizó 170ng de pJN1 digerido y 30ng de fragmento PS-AlfaP1, PS-AlfaP2 o PS-AlfaP3.

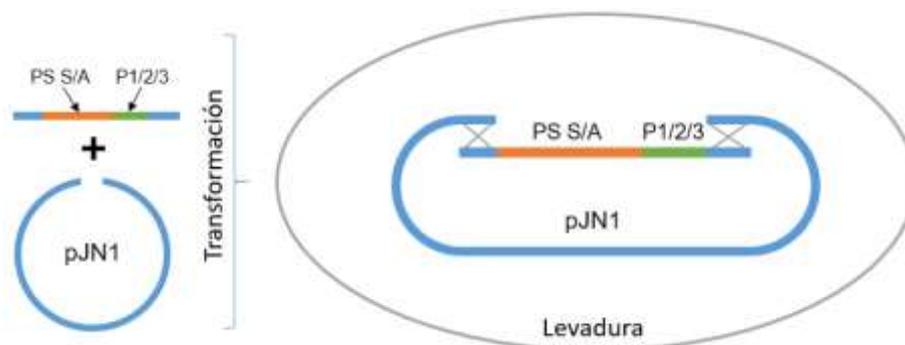


Figura 13: Representación de la estrategia utilizada para la construcción de los plásmidos pAlfaP1, pAlfaP2 y pAlfaP3.

FUENTE: Elaboración propia.

3.3.2. Verificación de la correcta clonación mediante PCR analítico

Los transformantes de levadura seleccionados fueron sembrados en 3ml de YPD y se incubaron con agitación por toda la noche a 30°C. Las suspensiones fueron centrifugadas y se eliminó el sobrenadante. A cada sedimento se agregó 200 µl del buffer de lisis (1.2% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA), además, se agregaron suficientes perlitas de vidrio (2 a 3 mm de diámetro, mitad del volumen) y 200 µl de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). Se mezcló en el agitador de vórtice por aproximadamente 2 minutos y luego se centrifugó a máxima velocidad. El sobrenadante acuoso fue retirado y transferido a un tubo nuevo. Se precipitó a los ácidos nucleicos tratando con acetato de amonio 10 M y alcohol etílico helado. El sedimento de ADN lavado fue resuspendido en 50 µl de solución tampón TE (Guthrie & Fink, 1991). Este protocolo permite la obtención de ácidos nucleicos totales de la levadura.

Para comprobar que el ADN extraído de cada uno de los transformantes de levadura contenía el plásmido deseado, se realizaron ampliaciones mediante PCR. Para la verificación en los plásmidos controles se utilizaron los cebadores 02FW y 02.1RV los cuales amplificaron un fragmento de 369pb si contenía el inserto PS-Alfa y 309pb de contenerse el inserto PS-Sint. Para la verificación de la inserción del fragmento PS-Sint-GST se amplificó un fragmento de 646pb usando los cebadores 05FW y 4.5RV, mientras que para el inserto PS-Alfa-GST se amplificó 679pb con los cebadores 04FW y 4.5RV. Finalmente, para los plásmidos que debían contener PS-Alfa-P1/P2/P3, se amplificó 369pb usando los cebadores 02FW y 02.1RV. Asimismo, en todos los casos evaluados, se realizó una ampliación control del gen *CIN5*, de la cual se obtuvo un fragmento de 200pb utilizando los cebadores C5B y C5Z.

3.3.3. Transformación de *E. coli* por electroporación, purificación y secuenciación de plásmidos amplificados

Para lograr la recuperación y ampliación de los plásmidos construidos en la levadura, se transformó con cada ADN total purificado, a la cepa TOP10 de *Escherichia coli*. Para la preparación de las células electrocompetentes se cultivó un inóculo en 20ml de caldo LB a 37°C durante toda la noche. Luego se diluyó hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) de 0.1 en 50ml de caldo LB, y se dejó crecer hasta una DO_{600nm} de 0.5. Se centrifugó el volumen total a 4°C por 10 minutos y luego se realizaron dos lavados con agua destilada estéril helada. Se resuspendió en 1ml de agua destilada estéril.

Para la electroporación se mezclaron 40µl de la suspensión celular competente con 1µl de la solución de ADN total recuperado de cada transformante de levadura. Se sometió la mezcla a un pulso eléctrico de 1700V utilizando cubetas de electroporación de 1mm. Inmediatamente después, se añadió 1ml de caldo LB y se transfirió la suspensión a tubos de microcentrífuga para incubarlos a 37°C por una hora. Finalmente, se plaqueó en medio LB-ampicilina.

Para la purificación de plásmidos se realizó un cultivo de 3ml de caldo LB-ampicilina y se dejó incubando por una noche. Se colectaron las células por centrifugación y luego se eliminó el sobrenadante. A cada tubo se le añadió 100µl de la solución tampón fría GTE. Se agitó en el agitador de vórtice y se añadió 200µl de SDS/NaOH. Luego, se mezcló por inversión, se añadió 100 µl de una mezcla 7:3 de 3M acetato de potasio con

fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1) y se mezcló vigorosamente por 30 segundos. Se centrifugó y recuperó el sobrenadante con el cual se realizó la precipitación de ácidos nucleicos utilizando isopropanol. Se realizaron lavados con etanol al 90° y luego se disolvió al sedimento con 50µl de la solución tampón TE conteniendo RNAsa 20 µg/ml. Se dejó incubar por 30 minutos a 37°C y las soluciones se guardaron a -20°C hasta su uso.

Para la secuenciación de los plásmidos seleccionados, estos fueron purificados utilizando el kit Zyppy Plasmid Miniprep de ZYMO RESEARCH. Los análisis de secuenciación fueron realizados por la compañía Macrogen Inc., Seúl-Corea del Sur (www.macrogen.com).

3.3.4. Retransformación en cepa deficiente en triosa fosfato isomerasa con la vía secretora nativa o modificada

Se utilizaron suspensiones de cepas *S. cerevisiae* tfi^{NEG} y tfi^{NEG-SS} , y se transformaron con los plásmidos pAlfaGST, pSintGST, pAlfa y pSint. Para la transformación se utilizó choque térmico en tampón TE que contiene acetato de litio/PEG3550. Para aumentar la precisión, se mantuvo la cantidad total de ADN en menos de 200ng según (Kitazono, 2009). Los ocho transformantes obtenidos se utilizaron para el análisis de producción y secreción de GST.

Otra suspensión de tfi^{NEG} se utilizó para ser transformada con los plásmidos pAlfa, pAlfaP1, pAlfaP2 y pAlfaP3. Se ejecutó el mismo protocolo de transformación previamente mencionado. Los cuatro transformantes obtenidos se utilizaron para la comprobación del efecto protector de los oligopéptidos secretados.

3.3.5. Inoculación de retransformantes, toma y preparación de muestras

Se utilizaron cultivos de las células retransformadas para evaluar el nivel de expresión génica producida.

Tabla 6. Transformantes obtenidos para la evaluación de los niveles de secreción

| CEPA | PLÁSMIDO | INSERTO |
|----------------|----------|--------------------|
| tfi^{NEG} | pAlfa | PS-Alfa |
| tfi^{NEG} | pSint | PS-Sintético |
| tfi^{NEG} | pAlfaGST | PS-Alfa + GST |
| tfi^{NEG} | pSintGST | PS-Sintético + GST |
| tfi^{NEG-SS} | pAlfa | PS-Alfa |
| tfi^{NEG-SS} | pSint | PS-Sintético |
| tfi^{NEG-SS} | pAlfaGST | PS-Alfa + GST |
| tfi^{NEG-SS} | pSintGST | PS-Sintético + GST |

Cada uno de los ocho transformantes fue inoculado en 20ml YPD a una DO_{600nm} inicial de 0.05. Se dejó incubando en agitación a 30°C a 2000 RPM. Pasadas 30 horas, se recogieron las muestras M1 (medio + células), M2 (sólo células) y M3 (sólo sobrenadante).

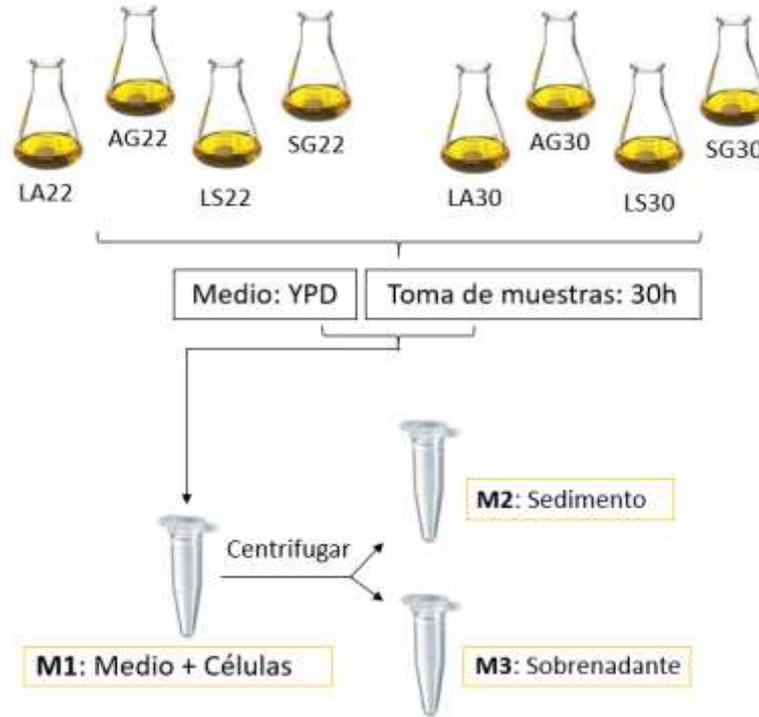


Figura 14: Descripción de la estrategia seguida para la determinación de los niveles de GST intracelular y secretado.

FUENTE: Elaboración propia.

En todos los casos se usó 250µl de cada suspensión para la preparación de las muestras a analizar. A cada 250µl de suspensión se le agregó ácido tricloroacético (TCA) hasta alcanzar una concentración de 15%, se agitó y guardó a -20°C por un día. Pasado este tiempo, se centrifugó a 13500 RPM por 15min y se desechó el sobrenadante. Se hizo tres lavados con etanol de 96°, dejando los tubos a -20°C por 10min antes de centrifugar. Después se dejó secar el sedimento a temperatura ambiente. En caso de las muestras M1 y M2 (ambas contienen células), los sedimentos fueron resuspendidos en 40µl SDS(1%)/NaOH(0.1N), y se agregó 15µl del buffer de muestra concentrado (4X) (Tris-HCl, SDS, glicerol, β-mercaptoetanol, azul de bromofenol). Las muestras M3 recibieron directamente 55µl del buffer de muestra. Finalmente, todas las muestras fueron tratadas a 96°C por 5 min.

3.3.6. Detección de GST mediante Western blot

Se cargaron las muestras preparadas en un gel discontinuo de poliacrilamida-SDS para realizar la electroforesis (15x10 cm, gel de concentración 6%, gel de separación 12%). Se

usaron dos marcadores diferentes Novex Sharp Pre-Stained Protein Standards (Invitrogen) y PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas). La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante (55V) por 10 horas. Las proteínas así separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa usando un sistema líquido (buffer Tris, glicina, SDS conteniendo 20% etanol) a voltaje constante (20V, 12 horas). Para comprobar si las transferencias de las proteínas fueron óptimas, las membranas de nitrocelulosa fueron sometidas a tinción de manera reversible con el kit “Memcode” (Thermo Scientific Pierce). La membrana fue tratada por 30 minutos con una suspensión de leche descremada al 5% en buffer TBS-T 1X (Tris base, NaCl, HCl, Tween 20), luego se lavó brevemente con TBS-T 1X. La detección se realizó usando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-GST (Novagen) diluido 1:5000 y un anticuerpo secundario de cabra conjugado a peroxidasa (1:1000), que reconoce inmunoglobulinas G (IgG) de ratón (ThermoFisher Pierce). Ambos tratamientos se realizaron a temperatura ambiente por una hora. Para la detección, se usó un kit de quimioluminiscencia (Pierce) y autoradiografía con 15 minutos de exposición. El revelado de los films de rayos X se realizó manualmente.

3.3.7. Análisis de la actividad fotoprotectora de los oligopéptidos sintetizados

Se utilizaron cultivos de las cepas retransformadas para evaluar la actividad fotoprotectora de los oligopéptidos sintetizados ante una exposición a radiación UV.

Los ensayos se realizaron con cultivos de los respectivos transformantes en medio sólido YPD, mediante inoculaciones en parches o diluciones seriadas. Para esta última, se dejó crecer cada transformante hasta alcanzar la saturación en caldo YPD y luego se realizaron diluciones seriadas. Alícuotas de estas fueron dispuestas en medio sólido y las placas fueron preincubadas por 4 horas a 30°C. Transcurrido este tiempo se irradiaron las placas por 15 o 25 segundos usando una lámpara UVB (302nm), proveniente de un transiluminador VWR de cuatro tubos de 8W. Inmediatamente después, se cubrieron todas las placas con una cubierta negra para evitar la autoreparación del daño genómico y se dejó incubando por 36 horas a 30°C. Finalmente, tras comparar el crecimiento del control versus las muestras se determinó la respectiva capacidad fotoprotectora.

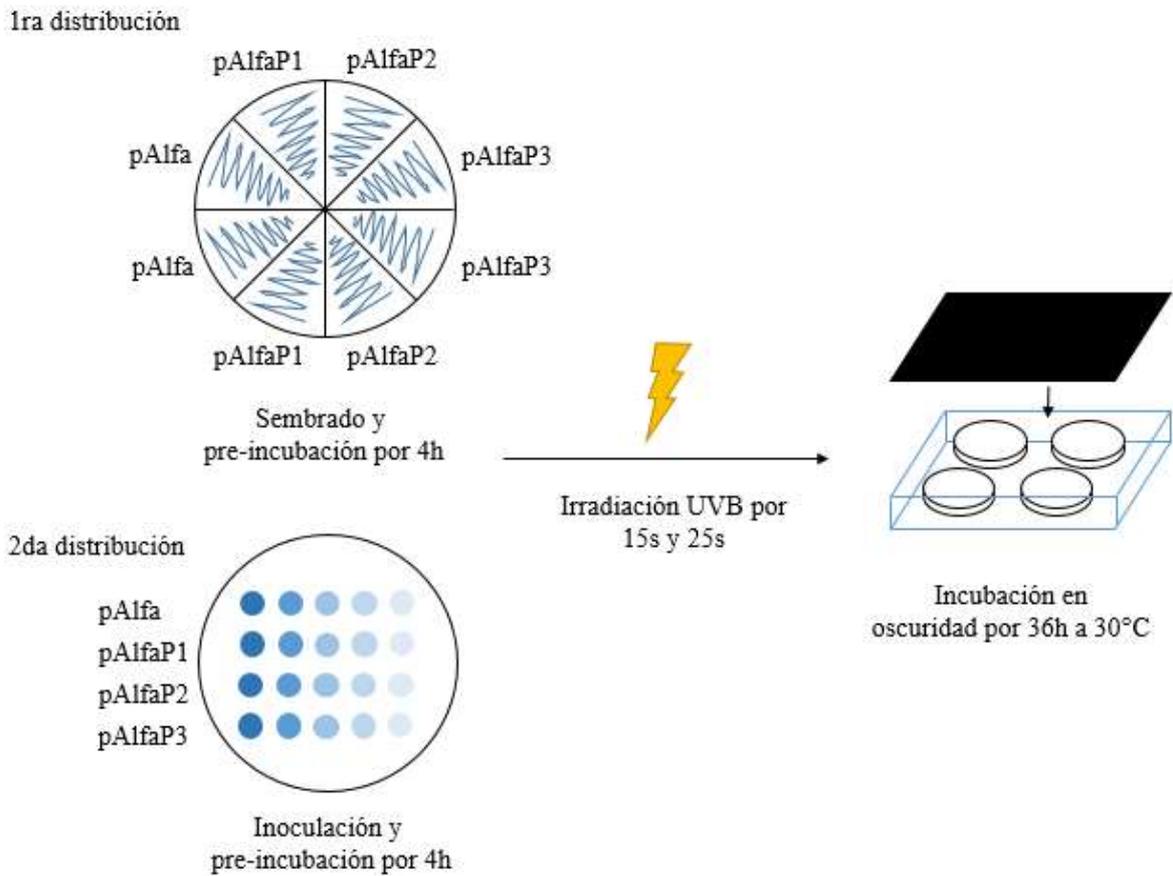


Figura 15: Descripción del protocolo seguido para determinar los niveles de fotoprotección conferidos por la producción de los oligopéptidos P1, P2 y P3, usando el método de parches (“1ra distribución”) o diluciones seriadas (“2da. distribución”).

FUENTE: Elaboración propia.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Clonación *in vivo* para la construcción de nuevos plásmidos

4.1.1. Plásmidos controles que incluyen las secuencias codificantes para los *PS-Alfa* y *PS-Sintético*

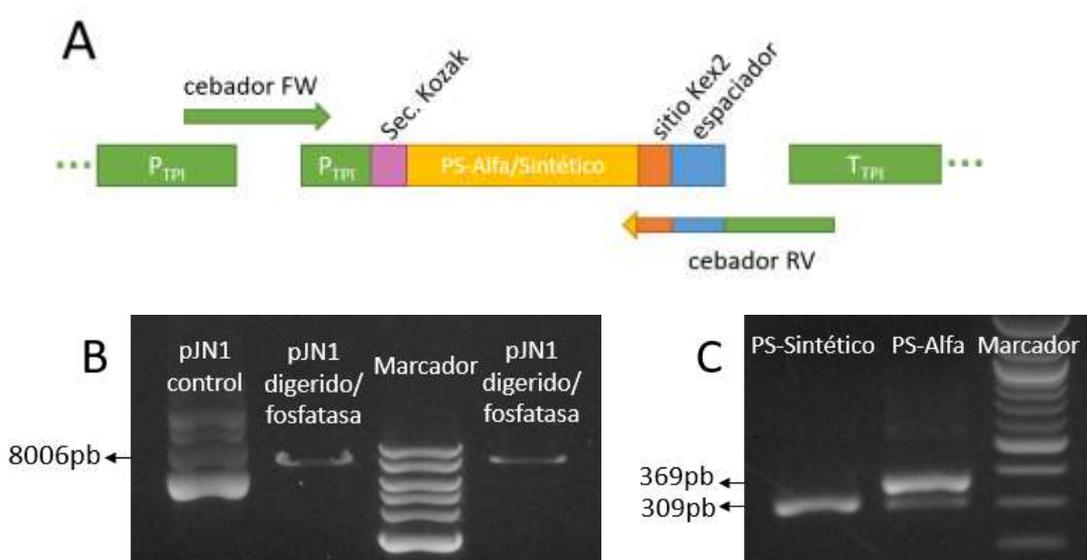


Figura 16: Linealización y defosforilación del plásmido pJN1 y obtención de los fragmentos PS-Alfa y PS-Sintético. **A.** Representación de las estructuras flanqueantes a las secuencias codificantes para PS-Alfa y PS-Sintético, incluyendo la secuencia Kozak (morado), el sitio Kex2 (naranja) y un espaciador (celeste). **B.** Análisis electroforético en gel de agarosa 0.8% del plásmido pJN1 digerido con la enzima KpnI y tratado con la enzima fosfatasa antártica. El tamaño esperado del vector linealizado es de 8 kb. Como control se utilizó al plásmido pJN1 sin digerir. Marcador de 1 kb, New England BioLabs. **C.** Análisis electroforético en gel de agarosa 1.2% de la amplificación de los fragmentos PS-Alfa y PS-Sintético, de 369 pb y 309 pb, respectivamente. Marcador de 100 pb, New England BioLabs.

Para la construcción de los plásmidos controles primero se obtuvieron el plásmido pJN1 linealizado y los fragmentos PS-Alfa y PS-Sintético. Para ello, el plásmido pJN1 fue digerido con la enzima *KpnI* y defosforilado con la enzima fosfatasa antártica (Figura 16-B). De otro lado, usando como base los plásmidos pJN2-ALFA y pJN3-SYN (Tabla 3), se amplificaron los fragmentos que incluían las secuencias codificantes para PS-Alfa y PS-Sintético (Figura 16-C). Para ambos casos se usaron el mismo juego de cebadores porque comparten secuencias idénticas antes y después del PS en los dos plásmidos (Figura 16-A), estas son: previo al PS la secuencia Kozak (aacaaa) y después del PS las secuencias de un sitio kex2 (aaaaga) y un espaciador (gaagaaggtgaacaaaa). La secuencia Kozak tiene el propósito de aumentar la eficiencia de la traducción en *S. cerevisiae*, mientras que el kex2 y el espaciador aumentan la eficiencia de escisión de los pro-líderes en la vía secretora tardía (Liu *et al.*, 2012).

Después de aplicar el protocolo de transformación usando el plásmido linealizado y los fragmentos amplificados, las suspensiones fueron plaqueadas en medio selectivo YPD, y las placas fueron incubadas por 3 días a 30°C. Como se observa en la Figura 17 las células que adquirieron el plásmido mostraron un crecimiento más acelerado formando colonias de mayor tamaño. De izquierda a derecha, la primera imagen es la placa control donde solo se usó plásmido digerido y tratado con fosfatasa, en la que el crecimiento de 8 colonias nos indica la presencia de una cantidad de plásmido que no fue completamente digerido o fue recircularizado. La segunda placa, que es un ejemplo representativo de la clonación del PS-Alfa en el plásmido, presentó el crecimiento de 13 colonias, mientras la tercera placa donde se usó PS-Sintético mostró el crecimiento de 18 colonias. Finalmente, la última placa es un control que presenta a los transformantes que recibieron plásmido intacto sin digerir.



Figura 17: Transformantes de levadura obtenidos por clonación in vivo de los fragmentos PS-Alfa y PS-Sintético. De izquierda a derecha, la primera es la placa control con solo plásmido linealizado, la segunda muestra a los transformantes que incorporaron PS-Alfa al plásmido, la tercera muestra a los transformantes que incorporaron PS-Sintético al plásmido, y la última placa es la placa control donde se usó el plásmido intacto (circular).

Para diferenciar a los transformantes que incluían a los plásmidos correctamente construidos, se realizó la extracción de ADN total de cada uno y se procedió a una amplificación por PCR. Se evaluaron 13 candidatos a tener plásmido con el inserto PS-Alfa y 4 mostraron resultados positivos (Figura 18-A). Del mismo modo se evaluaron 12 candidatos para el inserto PS-Sintético, de ellos se obtuvieron otras 4 muestras positivas (Figura 18-B). Después de esto los plásmidos fueron recuperados mediante transformación de *E. coli* para lograr su amplificación y purificación. Los plásmidos obtenidos fueron sometidos a secuenciación de nucleótidos para así confirmar la correcta clonación. Las secuencias correspondieron al fragmento esperado, sin ninguna mutación.

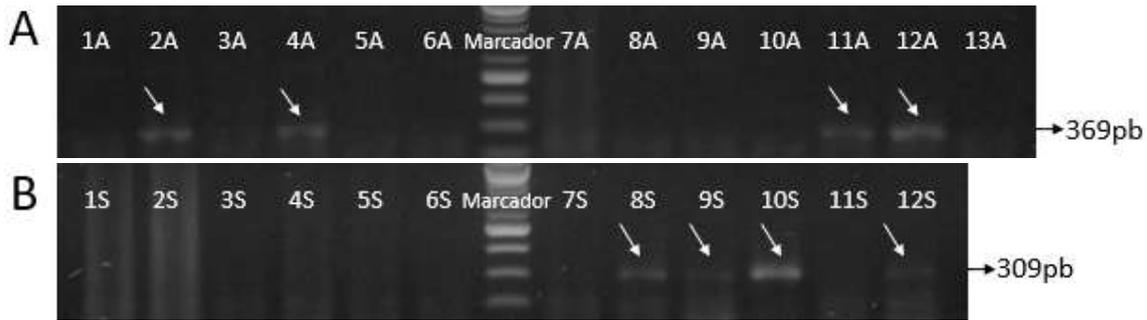


Figura 18: Análisis electroforético en geles de agarosa 1.2% de fragmentos amplificados en los 25 candidatos seleccionados como posibles transformantes que construyeron el plásmido pAlfa y pSint. Para la amplificación se utilizó el ADN total extraído de los transformantes seleccionados y los cebadores 02FW y 02RV. Marcador de 100 pb, New England BioLabs. **A.** Cuatro de los 13 candidatos clonaron el fragmento codificante para PS-Alfa, para los que se observa una banda de 369pb. **B.** Cuatro de los 12 candidatos clonaron el fragmento codificante para PS-Sintético, los que presentan una banda de 309pb.

4.1.2. Plásmidos que incluyen las secuencias codificantes para el PS-Alfa o PS-Sintético fusionados a GST

Los fragmentos PS-Alfa y PS-Sintético se amplificaron de los plásmidos pJN2-ALFA y pJN3-SYN, (Figura 19-A), y para amplificar GST se utilizó el plásmido pEGH (Figura 19-B). En estos casos, se incluyeron en la transformación, plásmido linealizado, el fragmento PS-Alfa o PS-Sintético, y el fragmento que incluía el gen que codifica para GST.

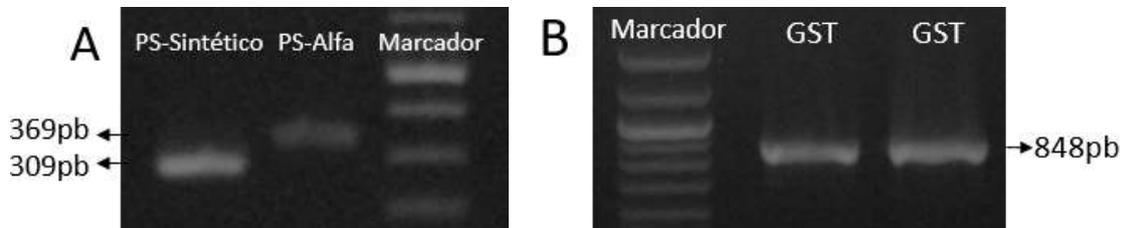


Figura 19: Obtención de los fragmentos que incluyen las secuencias codificantes para PS-Alfa, PS-Sintético y GST. Marcador de 100 pb, New England BioLabs. **A.** Análisis electroforético en gel de agarosa 1.2% de la amplificación de los fragmentos PS-Alfa y PS-Sintético, de tamaño 369pb y 309pb respectivamente. **B.** Análisis electroforético en gel de agarosa 1.0% de la amplificación del fragmento de GST (848pb).

Después de la transformación se plaquearon las suspensiones en el medio selectivo YPD y se dejó en crecimiento por 3 días a 30°C. La Figura 20 muestra el resultado obtenido, de izquierda a derecha, la primera imagen es la placa control con plásmido linealizado donde crecieron 12 colonias. La segunda placa, que representa la clonación del PS-Alfa y GST en el plásmido, presentó el crecimiento de 32 colonias, mientras la tercera placa donde se usó PS-Sintético y GST mostró el crecimiento de 44 colonias. Finalmente, la última placa es un control que presenta a los transformantes que recibieron plásmido circular, se observó 105 colonias.



Figura 20: Transformantes de levadura obtenidos por clonación in vivo de los fragmentos PS-Alfa, PS-Sintético y GST. De izquierda a derecha, la primera es la placa control de transformantes recircularizaron el plásmido, la segunda muestra a los transformantes que incorporaron PS-Alfa y GST al plásmido, la tercera muestra a los transformantes que incorporaron PS-Sintético y GST al plásmido, y la última placa es el control donde se usó el plásmido circular.

Para comprobar la presencia de los plásmidos correctamente construidos en los transformantes, se extrajo el ADN total de cada uno y se realizó un ensayo de PCR. De los seis candidatos evaluados a tener plásmido con los insertos PS-Alfa y GST, dos mostraron resultados positivos (Figura 21-A). Asimismo, se evaluaron seis candidatos con los insertos esperados PS-Sintético y GST, de ellos se obtuvo solo un resultado positivo (Figura 21-B). Posteriormente, los plásmidos fueron amplificados en *E. coli* y purificados para ser secuenciados. Las secuencias correspondieron al fragmento esperado en el caso de pSinGST, sin embargo, para pAlfaGST se halló un cambio de nucleótido. Dicho cambio de nucleótido se encontró en la secuencia que codifica para el PS-Alfa. Este evento se conoce como mutación puntual, cambio de un nucleótido por otro, y dependiendo de la polimerasa utilizada la amplificación puede contener más o menos mutaciones (mientras menos errores hay mayor fidelidad en el proceso) (Marx *et al.*, 2016). En este caso, la mutación es silenciosa, es decir, no cambia la secuencia de aminoácidos de la cadena polipéptidica por tanto no resulta en cambio estructural o funcional de la proteína.

Sin embargo, esta no implica cambio en el aminoácido expresado. En el caso de las secuencias correspondieron al fragmento esperado, sin ninguna modificación.

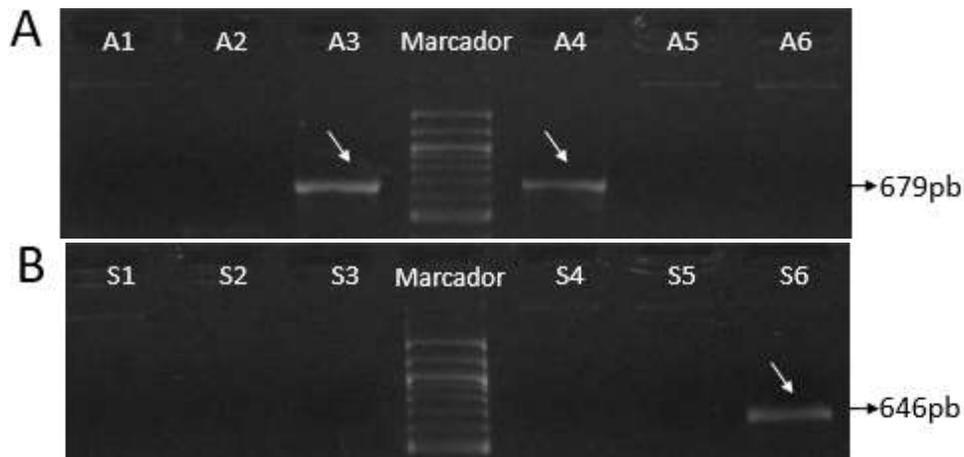


Figura 21: Análisis electroforético en gels de agarosa 1 % de fragmentos amplificados a partir del ADN total extraído de los 12 candidatos seleccionados durante la construcción de los plásmidos pAlfaGST y pSintGST. Se usaron los cebadores 05FW y 04.5RV que amplifican una zona que abarca entre PS-Alfa/Sintético y GST. Marcador de 100 pb, New England BioLabs. **A.** Dos de los seis candidatos clonaron el fragmento con la secuencia codificante para PS-Alfa-GST, mostrando una banda de 679pb. **B.** Uno de los seis candidatos clonó el fragmento con la secuencia codificante para PS-Sintético-GST, mostrando una banda de 646pb.

4.1.3. Plásmidos que contienen las secuencias codificantes para el PS-Alfa fusionado a los oligopéptidos fotoprotectores

En la Figura 22, se observan los tres fragmentos con las secuencias codificantes para los oligopéptidos P1, P2 y P3 unidos a el PS-Alfa, para obtenerlos se usó como base el plásmido pJN2-ALFA.



Figura 22: Obtención de los fragmentos que incluyen las secuencias codificantes para los oligopéptidos P1, P2 y P3 fusionados a PS-Alfa. Marcador de 100 pb, New England BioLabs. **A.** Análisis electroforético en gel de agarosa 1.2% de la amplificación de los fragmentos que incluyen a las secuencias codificantes para PS-Alfa-P1, PS-Alfa-P2 y PS-Alfa-P3 (402pb, 399pb y 426pb respectivamente). Marcador de 100 pb, New England BioLabs.

En la Figura 23 se observa a los transformantes en placas de YPD después de 3 días de crecimiento a 30°C. De izquierda a derecha, la primera imagen es la placa control donde solo se usó plásmido digerido y tratado con fosfatasa, se observó un crecimiento de solo 12 colonias. La segunda placa, que representa clonación de PS-AlfaP1 en el plásmido, presentó 27 colonias. La tercera placa donde se usó el fragmento PS-AlfaP2 mostró el crecimiento de

21 colonias. En la cuarta placa donde se usó el fragmento PS-AlfaP3 se observaron 23 colonias.

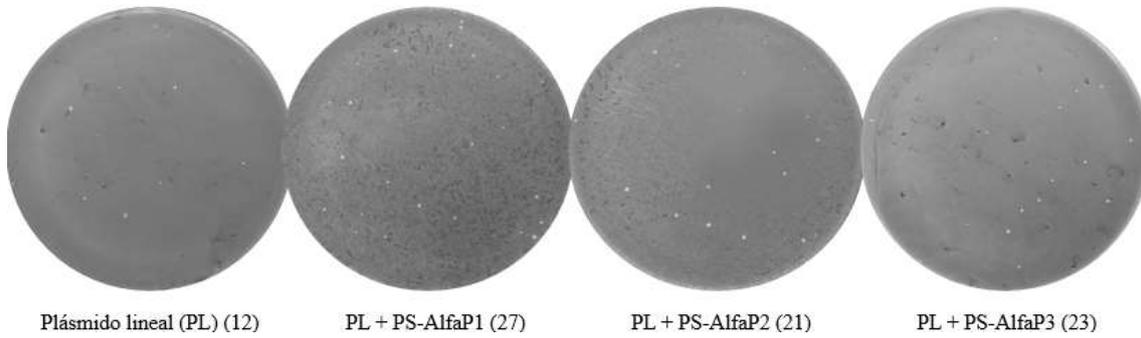


Figura 23: Transformantes de levadura obtenidos por clonación in vivo de los fragmentos PS-Alfa-P1, PS-Alfa-P2 y PS-Alfa-P3. De izquierda a derecha, la primera es la placa control de transformantes que recircularizaron el plásmido; y la segunda, tercera y cuarta placas muestran respectivamente, a los transformantes que incorporaron los fragmentos Alfa-P1, Alfa-P2, y Alfa-P3.

Finalmente, para verificar que la clonación se realizó óptimamente, se procedió a amplificar un fragmento del inserto (Figura 24). Se evaluaron cuatro candidatos de cada placa y en cada caso se encontró un resultado positivo. Posteriormente, los plásmidos fueron amplificados en *E. coli* y purificados para ser secuenciados. Para los plásmidos pAlfaP1, pAlfaP2 y pAlfaP3 se obtuvo en cada caso las secuencias esperadas.

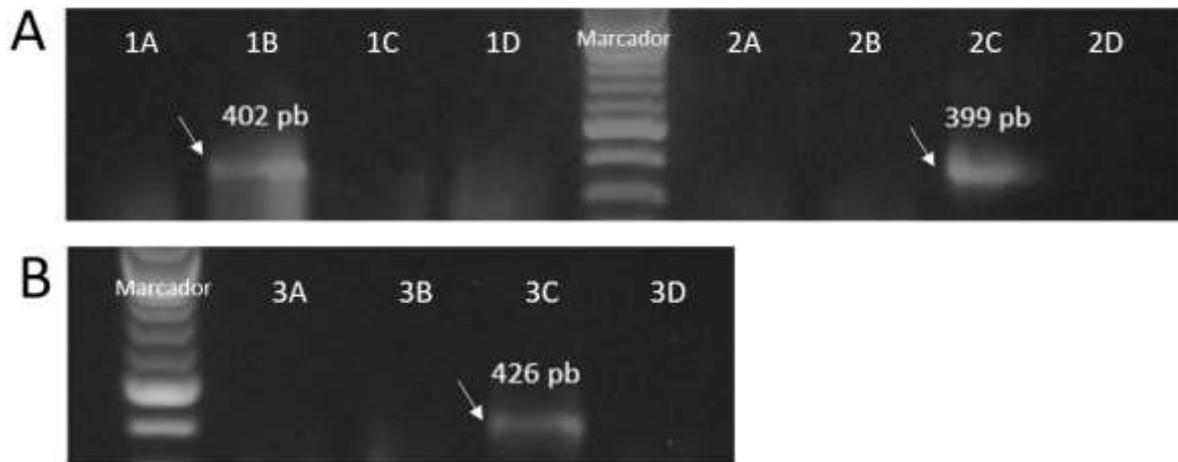


Figura 24: Análisis electroforético en geles de agarosa 1.2% de fragmentos amplificados a partir de los 12 transformantes seleccionados para la construcción de pAlfaP1, pAlfaP2 y pAlfaP3. Para la amplificación se utilizó el ADN total extraído y los cebadores 02FW y 02.2RV, 02.2RV y 02.3RV que amplifican Alfa-P1 (402pb), Alfa-P2 (399pb) y Alfa-P3 (426pb), respectivamente. Marcador de 100 pb, New England BioLabs. **A.** El transformante 1B clonó el fragmento Alfa-P1, mientras que el 2D clonó el fragmento Alfa-P2. **B.** El transformante 3C clonó el fragmento Alfa-P3.

4.2. Transformación y morfología de las cepas deficientes en triosafosfato isomerasa con el sistema de secreción nativo (tfi^{NEG}) o modificado (tfi^{NEG-SS})

Para los estudios preliminares de secreción se utilizaron las cepas de levadura tfi^{NEG} y tfi^{NEG-SS} (Tablas 2 y 6). Ambas fueron transformadas con los plásmidos, pAlfa, pSint, pAlfaGST y pSintGST, para obtener representantes de los ocho transformantes. Es importante resaltar que la cepa tfi^{NEG-SS} presentó un crecimiento más lento, el mismo que era acentuado con la producción de GST, como se muestra en la figura 25-A.

Como se observa en la Figura 25-B (2) y (4) los transformantes tfi^{NEG-SS} tienen modificados su morfología celular y patrón de crecimiento. El crecimiento agregado muchas veces se presenta en respuesta a la limitación de nutrientes (falta de nitrógeno, fuentes pobres de carbono, alcohol en medio, etc) y otras condiciones de estrés (Chow *et al.*, 2019). La literatura sugiere también que esta forma alargada podría proporcionar una ventaja selectiva a las células de *S. cerevisiae* no móviles, ya que facilitaría la búsqueda de nutrientes escasos a una distancia de su posición inicial (Casalone *et al.*, 2019; Gagiano *et al.*, 2002).

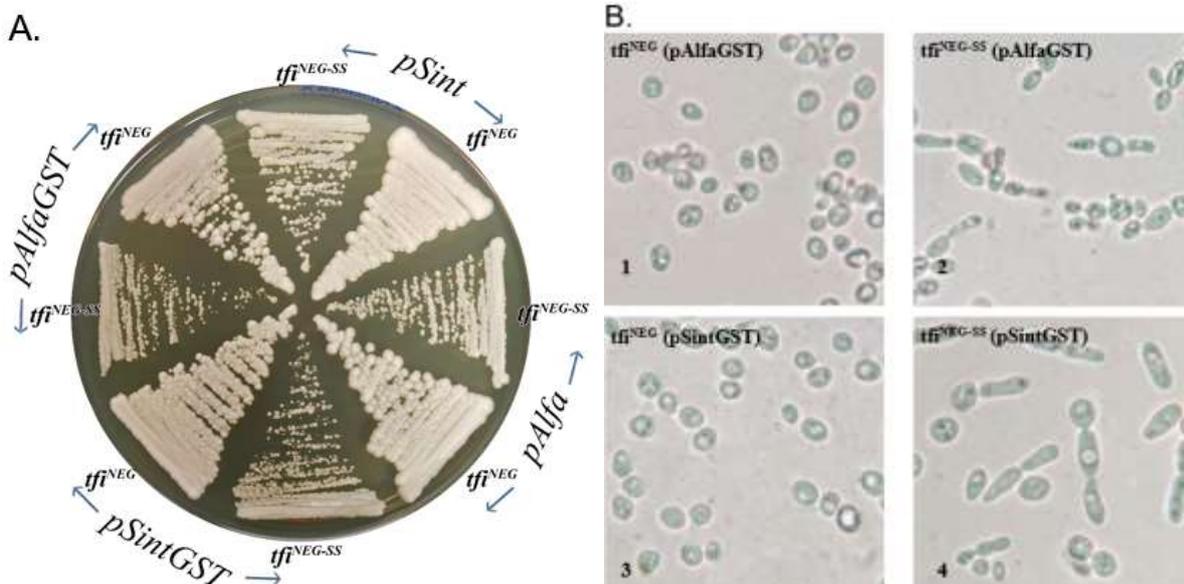


Figura 25: Observación de levaduras tfi^{NEG} y tfi^{NEG-SS} transformadas con los plásmidos pAlfa, pSint, pAlfaGST y pSintGST. A. Crecimiento de ocho transformantes en placa YPD. B. Visualización microscópica de levaduras secretoras de GST (400X). (1) Cepa tfi^{NEG} transformada con el plásmido pAlfaGST (2) Cepa tfi^{NEG-SS} transformada con el plásmido pAlfaGST (3) Cepa tfi^{NEG} transformada con el plásmido pSintGST (4) Cepa tfi^{NEG-SS} transformada con el plásmido pSintGST.

4.3. Determinación de los niveles de secreción de GST

Estos estudios se realizaron con dos cepas de levadura, tfi^{NEG} y tfi^{NEG-SS} , para determinar las respectivas eficiencias de secreción. Ambas cepas fueron transformadas con los plásmidos pAlfa, pSint, pAlfaGST y pSintGST.

Primero se optó por comparar directamente sólo el GST secretado por la cepa tfi^{NEG} al ser transformada con los plásmidos pAlfaGST y pSintGST. En la Figura 26, de izquierda a derecha, en los carriles 1, 2 y 3 se cargaron sobrenadantes de la cepa tfi^{NEG} (pAlfaGST) a 24, 36 y 48h de crecimiento, respectivamente. En los carriles 4, 5 y 6 se cargaron los sobrenadantes de la cepa tfi^{NEG} (pSintGST) a 24, 36 y 48h de crecimiento, respectivamente. Como se observa, el GST no modificado (26 kDa) es el que se encuentra en el sobrenadante en mayor cantidad. Sin embargo, existen hasta 2 versiones más de GST de mayor tamaño, probablemente debido a glicosilaciones, que también pueden ser secretados, aunque minoritariamente.

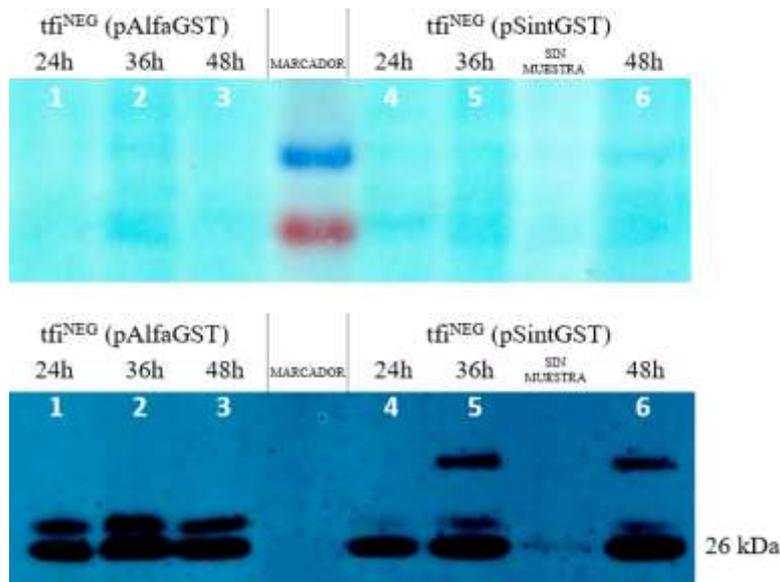


Figura 26: Resultados del Western blot para el análisis de secreción de GST a diferentes horas usando pAlfaGST y pSintGST en la cepa tfi^{NEG} . Marcador PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas). A. Proteínas teñidas en membrana de nitrocelulosa. B. Resultados del Western blot con el anticuerpo Anti-GST.

Según estos resultados, a las 24h las muestras con pAlfaGST presentan cerca del doble de GST respecto a pSintGST. Además, encontramos que la máxima cantidad de GST secretado para ambos casos se encuentra dentro del rango 24-48h.

Continuando con el análisis de secreción logrado con la cepa tfi^{NEG} , se decidió determinar la cantidad aproximada de GST que se encontraba en las diferentes fracciones colectadas:

sedimento (M2), sobrenadante (M3) y total (M1), como se muestra en la Figura 14. Para lograr esto, se utilizó un protocolo que permitió la eficiente lisis celular y precipitación de proteínas dependiendo del tipo de muestra. A modo de control positivo, se utilizó una cepa frecuentemente utilizada en nuestro laboratorio, W303 transformada con el plásmido pEGH, que ha demostrado una eficiente producción de GST.

Primero, se evaluó al plásmido pSintGST, como se observa en el Figura 27. De izquierda a derecha, los carriles 1 y 2 contienen las proteínas intracelulares y extracelulares del control positivo (W303), respectivamente. Los carriles 3 y 4 contienen las proteínas totales (intracelulares y extracelulares) y sólo las proteínas intracelulares del transformante evaluado, respectivamente. Se puede observar que el carril 3 muestra ligeramente mayor contenido de GST que el carril 4, como era de esperar ya que incluye la suma de proteínas totales. Finalmente, el carril 5 contiene sólo proteína extracelular.

Según estos resultados, la cantidad de GST extracelular (carril 5) sería mayor que en los carriles 3 y 4, sin embargo, esto no es teóricamente posible. El trabajar con TCA presenta algunas desventajas que podrían dar explicación a lo sucedido. Según Koontz (2014), para una mayor eficiencia de precipitación de TCA, la concentración de proteína debe ser bastante alta en la muestra.

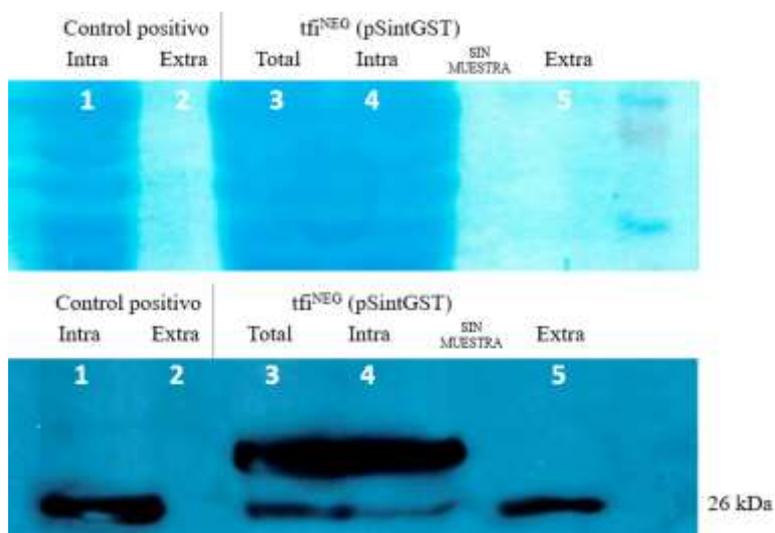


Figura 27: Resultados del Western blot para el análisis de producción y secreción de GST usando el plásmido pSintGST en la cepa tfi^{NEG} . Marcador Novex Sharp Pre-Stained Protein Standards (Invitrogen). **A.** Proteínas teñidas en membrana de nitrocelulosa. **B.** Resultados del Western blot con el anticuerpo Anti-GST.

De la misma forma se evaluó la secreción utilizando el plásmido pAlfaGST en tfi^{NEG} . En la figura 28, de izquierda a derecha, tenemos los carriles 1 y 2 que contienen las proteínas

intracelulares y extracelulares del control positivo (W303), respectivamente. Los carriles 3 y 4 contienen las proteínas totales (intracelulares y extracelulares) y sólo las proteínas intracelulares de nuestra cepa evaluada, respectivamente. Y se puede observar que el carril 3 muestra mayor contenido de GST que el carril 4, como era de esperar. Finalmente, el carril 5 contiene sólo proteína extracelular.

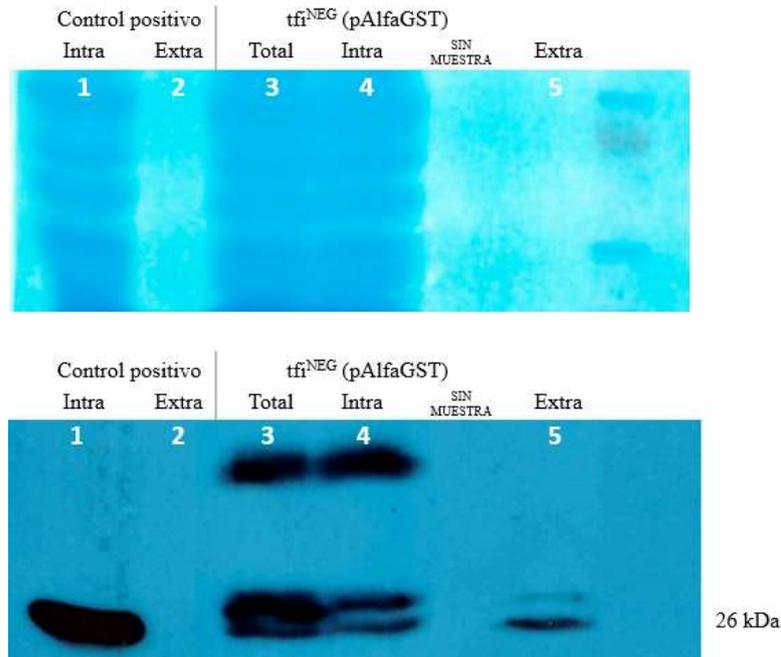


Figura 28: Resultados del Western blot para el análisis de producción y secreción de GST usando pAlfaGST en la cepa *tfi^{NEG}*. Marcador Novex Sharp Pre-Stained Protein Standards (Invitrogen). **A.** Proteínas teñidas en membrana de nitrocelulosa. **B.** Resultados del Western blot con el anticuerpo Anti-GST

En los siguientes western-blot, se corrieron muestras correspondientes a transformantes con pAlfaGST, pSintGST y pAlfa/pSint (control negativo), en un mismo gel. Esto se hizo con la finalidad de comparar las bandas obtenidas usando los distintos plásmidos.

En la Figura 29-A y B, de izquierda a derecha, el carril 1 y 2 contienen las proteínas intracelulares y extracelulares del control positivo (W303), respectivamente. Se observa claramente la banda esperada sólo en el carril 1, debido a que se espera un contenido netamente intracelular. Los carriles 3 y 4 contienen las proteínas totales (intracelulares y extracelulares) y sólo las proteínas intracelulares, respectivamente, del transformante con pSintGST. El carril 5 contiene las proteínas intracelulares del transformante con pAlfaGST, y el carril 6 contiene las proteínas totales del transformante con el plásmido vacío pSint que, como era de esperarse, no evidencia expresión de GST.

En la Figura 29-C y D, de izquierda a derecha, los carriles 1 y 2 contienen las proteínas intracelulares y extracelulares del control positivo (W303), respectivamente. Los carriles 3 y 4 contienen las proteínas totales (intracelulares y extracelulares) y sólo las proteínas intracelulares del transformante con pAlfaGST, respectivamente. El carril 5 contiene las proteínas intracelulares del transformante con pSintGST. Finalmente, el carril 6 contiene las proteínas totales del transformante con pAlfa que no evidencia expresión de GST.

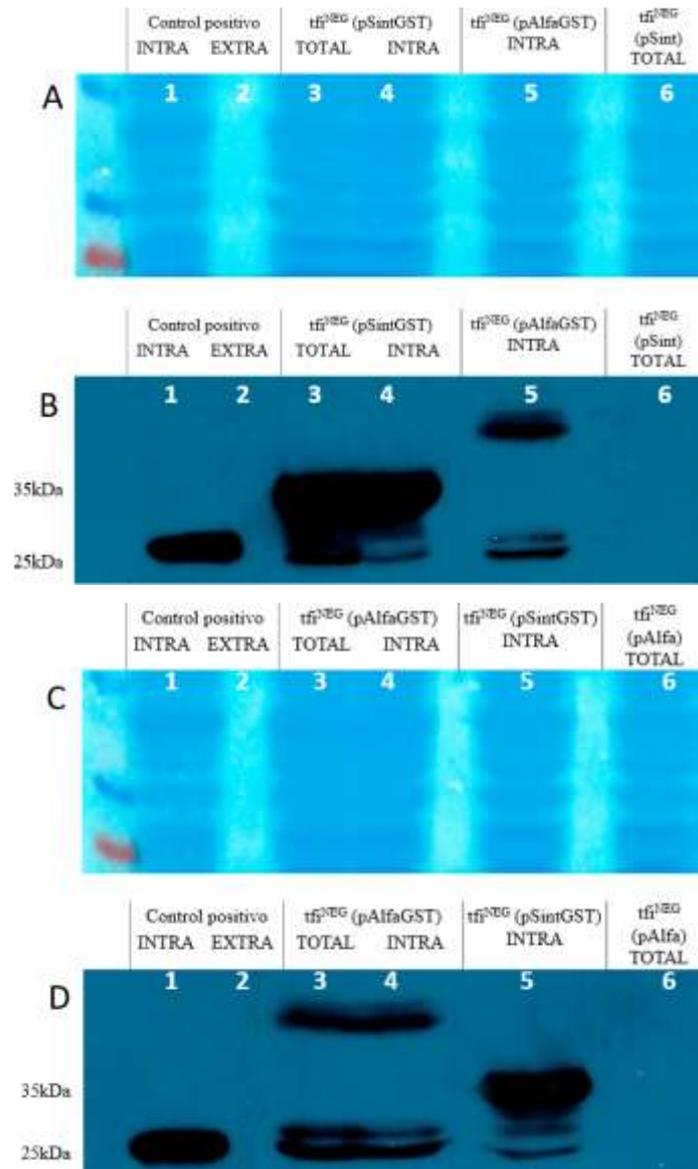


Figura 29: Resultados del Western Blot para el análisis de producción y secreción de GST usando los plásmidos pAlfaGST y pSintGST en la cepa *tfi^{NEG}*. Marcador PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas). **A.** y **C.** Tinción de las proteínas transferidas en la membrana de nitrocelulosa. **B.** y **D.** Resultados del Western blot con el anticuerpo Anti-GST.

Como se observa, GST se expresa en todos los transformantes con excepción de los controles negativos, es decir, los transformantes que tienen los plásmidos pAlfa y pSint. Sin embargo, también se pueden observar bandas en posiciones de mayor peso respecto al GST. Estas bandas podrían representar versiones glicosiladas de GST ya que según Liu *et al.* (2010), la secreción en *S. cerevisiae* generalmente da como resultado una hiperglicosilación de la proteína. Es muy posible que el tratamiento previo con TCA no sea suficiente para hidrolizar todos los enlaces glucosídicos. Según estudios, las condiciones óptimas de hidrólisis ácida para los monosacáridos varían sustancialmente debido a diferencias tanto en la estabilidad de sus enlaces glicosídicos y en su susceptibilidad a la destrucción durante la hidrólisis (Spiro, 1966). Asimismo, otras investigaciones que reportan bandas superiores no esperadas en sus SDS-PAGE usan métodos químicos (Fluoruro de hidrógeno anhidro) o enzimáticos (PNGase F, Endo H) para lograr una óptima desglicosilación (Kieliszewski *et al.*, 1990; Jacobs *et al.*, 2009).

Según Iles Ray (2014), hay dos razones por las cuales las proteínas glicosiladas se presentan como una banda o mancha superior en el SDS-PAGE. Por un lado, debido a que las glicosilaciones son heterogéneas y cambian el peso de la proteína. La masa de una proteína puede cambiar drásticamente en varios miles de Dalton por las glicosilaciones agregadas, por tanto, presentarse a diferentes alturas en el gel. Por otro lado, los cambios pueden también ser causados por la interacción de las cadenas de azúcar y el SDS. La carga negativa de las muchas moléculas de SDS unidas cambia la carga intrínseca de una proteína, causando que todas las proteínas presenten una densidad de carga negativa uniforme. Por lo tanto, las proteínas desnaturalizadas con SDS migran como polianiones a través del gel de poliacrilamida separándose por su tamaño en su migración hacia el ánodo (Isbir *et al.*, 2013). Sin embargo, las cadenas laterales de azúcar no interactúan con el SDS de la misma manera que los aminoácidos en una cadena peptídica lo que causa una alteración en la relación fundamental “masa-carga” del SDS-PAGE.

Otro punto que destacar es que se detectaron diferentes bandas de GST de mayor tamaño, dependiendo del tipo de PS usado. Esta secuencia es responsable de dirigir a la proteína a través del tráfico vesicular y a su vez cada PS tiene un diferente rendimiento dependiendo de la proteína que transporta (Liu *et al.*, 2012). Por ello, algunas investigaciones reportan el uso de etiquetas de epítopes en el extremo de un PS para poder luego ver por microscopía de fluorescencia el tráfico que toma junto a la proteína (Huang *et al.*, 2010).

Por último, se procedió a evaluar la expresión y secreción de GST en la cepa tfi^{NEG-SS} . Sin embargo, como se muestra en la Figura 30, no se confirmó presencia de GST. De izquierda a derecha, los carriles 1 y 2 contienen las proteínas intracelulares y extracelulares del control positivo (W303), respectivamente. Los carriles 3, 4 y 6 contienen las proteínas totales (intracelulares y extracelulares), sólo células y sólo medio, respectivamente, obtenidas con el plásmido pAlfaGST. Mientras los carriles 7, 8 y 10 contienen las proteínas totales (intracelulares y extracelulares), sólo células y sólo medio, respectivamente, obtenidas con el plásmido pSintGST. Finalmente, los carriles 12 y 13 fueron cargados con las proteínas extracelulares de la cepa tfi^{NEG} transformada con los plásmidos pSintGST y pAlfaGST, respectivamente.

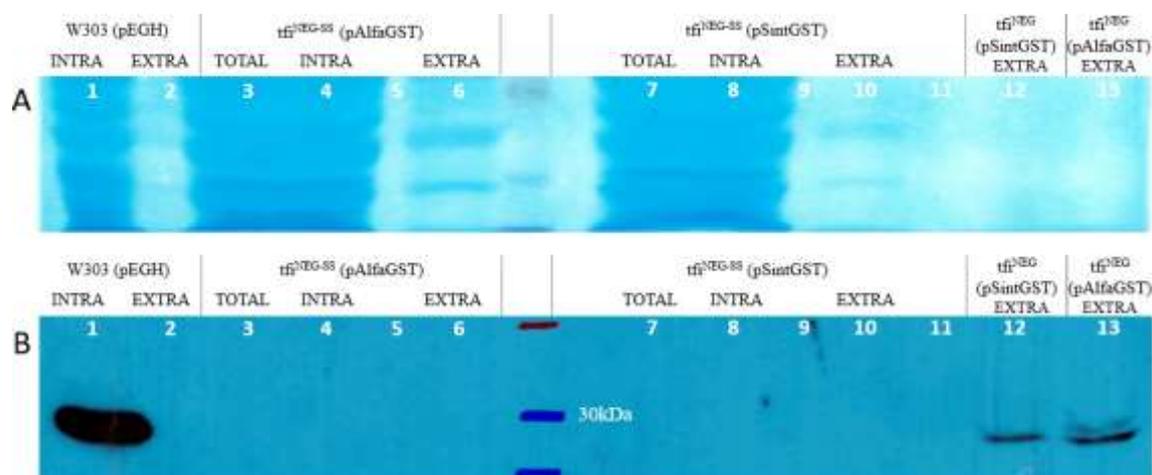


Figura 30: Resultados del Western blot para el análisis de producción y secreción de GST usando el líder sintético y líder alfa en la cepa tfi^{NEG-SS} . Marcador Novex Sharp Pre-Stained Protein Standards (Invitrogen). **A.** Proteínas totales teñidas en membrana de nitrocelulosa. **B.** Resultados del Western blot con el anticuerpo Anti-GST tag.

Como se presentó antes, las células tfi^{NEG-SS} presentan una morfología anormal y un crecimiento lento, por lo que se podría sospechar que esto influyó en su incapacidad de producir GST en cantidades detectables mediante Western Blot.

4.4. Análisis de la actividad fotoprotectora de los oligopéptidos sintetizados

Estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio permitieron la identificación de oligopéptidos con posible actividad fotoprotectora. El diseño de este proyecto se basó en el tamizado de una biblioteca de plásmidos que expresaban péptidos semialeatorios. En resumen, los fragmentos codificantes de péptidos fueron obtenidos amplificando por PCR una plantilla semialeatoria y luego estos fueron utilizados para la construcción de la biblioteca de plásmidos en *S. cerevisiae* (Merino, 2019).

Los fragmentos codificantes de tres péptidos unidos al PS-Alfa fueron clonados en el plásmido pJN1 para poner a prueba su capacidad fotoprotectora, esta vez agregando la característica de haber sido secretados.

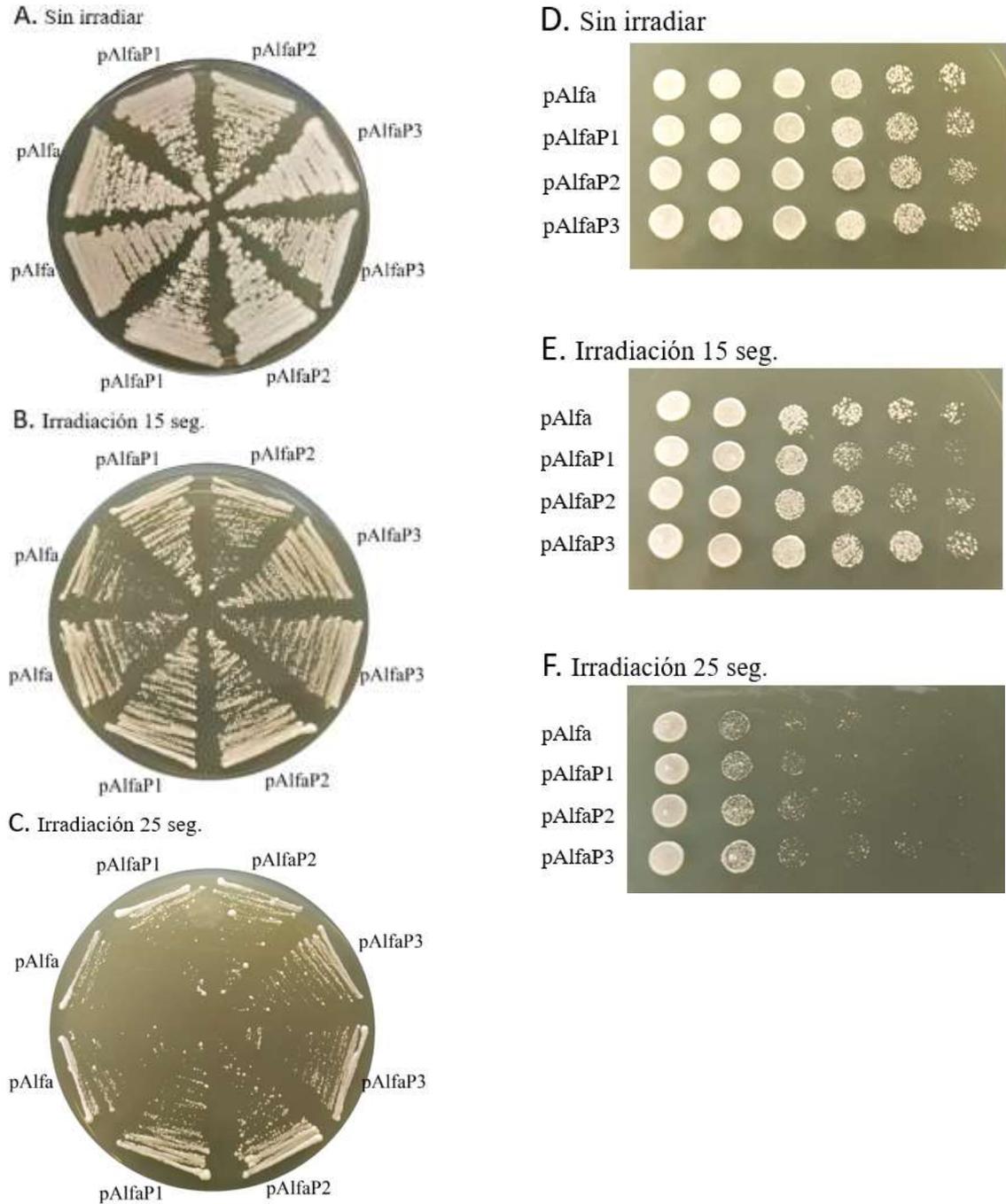


Figura 31: Cepa tfi^{NEG} transformada con los plásmidos pAlfa, pAlfaP1, pAlfaP2 o pAlfaP3. **A.** Placa control con los cuatro transformantes con una repetición que no recibieron tratamiento **B.** Los cuatro transformantes con una repetición recibieron tratamiento con UVB por 15 s. **C.** Los cuatro transformantes con una repetición recibieron tratamiento con UVB por 25 s. **D.** Placa control con diluciones seriadas de los cuatro transformantes que no recibieron tratamiento **E.** Diluciones seriadas de los cuatro transformantes recibieron tratamiento con UVB por 15 s. **F.** Diluciones seriadas de los cuatro transformantes recibieron tratamiento con UVB por 25 s.

Para realizar los ensayos de fotoprotección, se dispuso a las células tanto en parches (Figura 31-A, B y C) como por diluciones seriadas (Figura 31-D, E y F). En todos los casos, se evidenció una ligera actividad fotoprotectora pero los resultados no son concluyentes. Es posible que los niveles de secreción de los oligopéptidos no son los óptimos y esto deberá ser materia de futuros estudios.

V. CONCLUSIONES

- La maquinaria de recombinación homóloga de *S. cerevisiae* permite la inserción óptima de genes en plásmidos; de forma rápida, económica y eficiente.
- Es posible lograr la secreción de GST usando tanto el PS-Alfa (derivado del factor de apareamiento alfa) como el PS-Sintético (Yps1/Yap3/TA57). Ambos PS muestran eficiencias de secreción similares.
- Los PS-Alfa y PS-Sintético influyeron de forma distinta en las proteínas GST durante su tráfico a través de la vía secretora, causando en ella distintas modificaciones.
- La mayor cantidad de GST encontrado en el sobrenadante de tfi^{NEG} (pAlfaGST y pSintGST) se da entre las 24 y 48 horas de crecimiento de un inóculo que partió de una densidad óptica (DO_{600nm}) de 0.04.

VI. RECOMENDACIONES

- Para comprobar si las bandas de mayor tamaño observadas para GST son causadas por glicosilaciones, usar métodos químicos o enzimáticos desglicosilantes como tratamiento previo al análisis de Western blot.
- Verificar los niveles de secreción de los oligopéptidos P1, P2 y P3 para proceder a la optimización de los ensayos de fotoprotección.
- Ampliar los estudios de secreción para poder realizar búsquedas de oligopéptidos o proteínas secretadas con funciones particulares.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science.
- Alcalde, M. (2010). Mutagenesis Protocols in *Saccharomyces cerevisiae* by in vivo Overlap Extension. *Methods in Molecular Biology*, 634:1-13
- Bao, J.; Huang, M.; Petranovic, D. & Nielsen, J. (2018). Balanced trafficking between the ER and the Golgi apparatus increases protein secretion in yeast. *AMB Express*, 8(37). Recuperado el 27 de febrero de 2019 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29532188>
- Carlson, M.; Taussig, R.; Kustu, S. & Botstein, D. (1983). The secreted form of invertase in *Saccharomyces cerevisiae* is synthesized from mRNA encoding a signal sequence. *Molecular and Cellular Biology*, 3:439-47
- Casalone, E.; Barberio, C.; Cappellini, L. & Polsinelli, M. (2005). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* natural populations for pseudohyphal growth and colony morphology. *Research in Microbiology*, 156(2), 191–200
- Cherry, J.; Lamsa, M.; Schneider, P.; Vind, J.; Svendsen, A.; Jones, A. & Pedersen, A. (1999). Directed evolution of a fungal peroxidase. *Nature Biotechnology*, 17: 379-84.
- Chigira., Y.; Oka, T.; Okajima, T. & Jigami, Y. (2008) Engineering of a mammalian O-glycosylation pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: production of O-fucosylated epidermal growth factor domains. *Glycobiology*, 18(4):303–314.
- Chow, J.; Dionne H.; Prabhakar A.; Mehrotra A.; Somboonthum, J.; Gonzalez B.; Edgerton, M. & Cullena. P.J. (2019). Aggregate Filamentous Growth Responses in Yeast. *mSphere*, 4(2), 702-18.

- David, F. & Siewers, V. (2015). Advances in yeast genome engineering. *FEMS Yeast Research*, 15(1): 1-14.
- Feizi, A.; Österlund, T.; Petranovic, D.; Bordel, S. & Nielsen, J. (2013). Genomescale modeling of the protein secretory machinery in yeast. *PLoS ONE*, 8(5):e63284
- Ferreira, R; Limeta, A. & Nielsen, J. (2018). Tackling Cancer with Yeast-Based Technologies. *Trends in biotechnology*. 37(6):592-603
- Frangioni, J. & Neel, B. (1993). Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Analytical Biochemistry*, 210(1):179-87.
- Gagliano, M.; Bauer, F. & Pretorius, I. (2002). The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 2(4), 433-70.
- Gardner, B.; Pincus, D.; Gotthardt, K.; Gallagher, C. & Walter, P. (2013). Endoplasmic Reticulum Stress Sensing in the Unfolded Protein Response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(1), 131-69.
- Goldstein, A. & Mcusker, J. (1999). Three New Dominant Drug Resistance Cassettes for Gene Disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Functional Analysis Report*, 15: 1541–53.
- Guthrie, C. & Fink, G. (1991). *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*. *Methods in Enzymology*, 194:3-933.
- Gutiérrez, L.; Romero, A.; Chavez, G.; Palomino, L.; Moromisato, L. & Kitazono, A. (2017). Comparison of the photoprotective effects of sunscreens using spectrophotometric measurements or the survivability of yeast cells exposed to UV radiation. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 83(3): 294-307.
- Harper, S. & Speicher, D.W. (2011). Purification of Proteins Fused to Glutathione S-Transferase. *Protein Chromatography*, 681:259-80
- Hengke, G.; Siyu, G. & Hongmei, Liu. (2020). Antioxidant activity and inhibition of ultraviolet radiation-induced skin damage of Selenium-rich peptide fraction from selenium-rich yeast protein hydrolysate. *Bioorganic Chemistry*, 105, 1-33.

- Hou, J.; Tyol, K.; Liu, Z.; Petranovic, D. & Nielsen, J. (2012). Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research, 12(5): 491-510. Recuperado el 27 de febrero de 2019 de <https://academic.oup.com/femsyr/article/12/5/491/495266>
- Huang, Y.; Wilkinson, G. & Willars, G. (2010) Role of the signal peptide in the synthesis and processing of the glucagon-like peptide-1 receptor. British Journal of Pharmacology, 159(1), 237-51.
- Iles, R. (2014). Re: Why do glycosylated proteins appear as a smear on SDS-PAGE?. Recuperado el 26 de octubre de 2020 de: <https://www.researchgate.net/post/Why-do-glycosylated-proteins-appear-as-a-smear-on-SDS-PAGE/53ec84dcd039b1da0c8b46ff/citation/download>.
- Inoue, Y.; Tsujimoto, Y. & Kimura, A. (1998). Expression of the glyoxalase I gene of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by high osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway in osmotic stress response. The Journal of Biological Chemistry, 273:2977–83.
- Isbir, T.; Kirac, D.; Demircan, B. & Dalan, B. (2013). Gel Electrophoresis. Maloy, S. & Hughes. K. (Ed.), Brenner's Encyclopedia of Genetics. Amsterdam, Paises Bajos: Elsevier/Academic Press.
- Jacobs, P.; Geysens, S.; Vervecken, W.; Contreras, R. & Callewaert, N. (2009). Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology. Nature Protocols, 4(1), 58-70.
- Mancuso, J.; Maruthi, R.; Wang, S. & Lim, H. (2017) Sunscreens: An Update. American Journal of Clinical Dermatology 18(1), 643-50.
- Khurana, V. & Lindquist, S. (2010). Modelling neurodegeneration in *Saccharomyces cerevisiae*: why cook with baker's yeast? Nature Reviews Neuroscience, 11(6):436-49.
- Kieliszewski, M.; Leykam, J. & Lamport, D. (1990). Structure of the Threonine-Rich Extensin from *Zea mays*. Plant Physiology, 92(2), 316-26.
- Kitazono, A. (2009). Improved gap-repair cloning method that uses oligonucleotides to target cognate sequences. Yeast 26(9):497-505.

- Kitts, D. & Weiler, K. (2003) Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery. *Current Pharmaceutical Design*. 9(16), 1309-23.
- Kjeldsen, T.; Pettersson, A. & Hach, M. (1999). The role of leaders in intracellular transport and secretion of the insulin precursor in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 75(2-3):195–208.
- Koontz, L. (2014). Chapter One - TCA Precipitation. *Methods in Enzymology*. Academic Press, 541(1), 3–10.
- Lampel A.; Mcphee, S.; Park, H.; Scott, G.; Humagain, S. & Ulijn, R. (2017). Polymeric peptide pigments with sequence-encoded properties. *Science*, 356(6342), 1064-1068.
- Lee, S.; Ramesh R.; de Boor, V.; Gebler, J.; Silva, R. & Sattlegger, E. (2017). Cost-effective and rapid lysis of *Saccharomyces cerevisiae* cells for quantitative western blot analysis of proteins, including phosphorylated eIF2 α . *Yeast*, 34(9), 371-82.
- Lee, S.; Saravanan, R.; Damasceno, C.; Yamane, H.; Kim, B. & Rose, J. (2004). Digging deeper into the plant cell wall proteome. *Plant Physiology-Biochemistry*, 42:979-88.
- Liu, Z.; Tyo, K.; Martínez, J.; Petranovic, D. & Nielsen, J. (2012). Different expression systems for production of recombinant proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(5): 1259–68.
- Martins, A.; Cordeiro C. & Ponces, F. (2001). In situ analysis of methylglyoxal metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 499:41–44.
- Marx, V. (2016). PCR: the price of infidelity. *Nature Methods*, 13(6), 475-79.
- Mateljak, I.; Tron; T. & Alcalde, M. (2017). Evolved a-factor prepro-leaders for directed laccase evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Biotechnology*, 10(6).
- Matsuo, Y.; Asakawa K.; Toda T. & Katayama S. (2006). A Rapid Method for Protein Extraction from Fission Yeast. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(8), 1992-94.

- Merino, R. (2019) Identificación de oligopéptidos con actividad fotoprotectora mediante un tamizado genético en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.
- Merino, R.; Mansilla, S.; Gutiérrez, L. & Kitazono, A. (2018). Comprobación de los efectos de bloqueadores solares comerciales usando ensayos basados en la sobrevivencia de células de levadura a irradiación UV. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 84(3): 386-97.
- Mori, A.; Hara, S.; Sugahara, T.; Kojima, T.; Iwasaki, Y.; Kawarasaki, Y.; Sahara, T.; Ohgiya, S. & Nakano, H. (2015) Signal peptide optimization tool for the secretion of recombinant protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120(5):518-25.
- Ostergard, S.; Olsson, L. & Nielsen, J. (2000). Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1):34-50.
- Overkamp, K.; Bakker B.; Kötter, P.; Luttik A.; Van Dijken, J. & Pronk, T. (2002). Metabolic Engineering of Glycerol Production in *Saccharomyces cerevisiae*. *American Society for Microbiology*, 68:2814–21.
- Pai, V.; Bhandari, P. & Shukla, P. (2017) Topical peptides as cosmeceuticals. *Indian J Dermatology, Venereology and Leprology*, 83(1), 9-18.
- Paiva, J.; Santos, B.; Kibwila, D.; Gonçalves, T.; Pinto, A.; Rodrigues, C.; Leitão, A.; Cabral, L. & De Pádula, M. (2014). Titanium Dioxide–Montmorillonite Nanocomposite as Photoprotective Agent Against Ultraviolet B Radiation-Induced Mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: A Potential Candidate for Safer Sunscreens. *Journal of pharmaceutical sciences*, 103(8): 2539-45.
- Pérez, A. (2016). Papel de los receptores de carga en la organización funcional de la ruta secretora temprana (Tesis doctoral). Sevilla, España: Universidad de Sevilla.
- Robinson, A.; Hines, V. & Wittrup K. (1994). Protein disulfide isomerase overexpression increases secretion of foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology (NY)*, 12(4):381–84.
- Schäfer, F.; Seip N.; Maertens, B.; Block, H. & Kubicek, J. (2015). Chapter Nine - Purification of GST-Tagged Proteins. *Methods in Enzymology* 559:127-39

- Stanfield, C. (2013) Principles of Human Physiology. En Churchman, K. (Ed.), Peptide synthesis and release (p. 131). Alabama, US: University of South Alabama.
- Feyder, S.; De Craene, J.; Bär, S.; Bertazzi, D. & Friant, S. (2015). Membrane Trafficking in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Model. The International Journal of Molecular Sciences, 16(1), 1509-25.
- Shao, Z.; Zhao, H. & Zhao, H. (2008). DNA assembler, an *in vivo* genetic method for rapid construction of biochemical pathways. Nucleic Acids Research, 37(2). Recuperado el 26 de agosto de 2019 de <https://academic.oup.com/nar/article/37/2/e16/2410275>
- Simon, J. & Bedalov, A. (2004). Yeast as a model system for anticancer drug discovery. Nature Reviews Cancer, 4(6): 481.
- Sleep, D.; Belfield, G. & Goodey, A. (1990). The secretion of human serum albumin from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* using five different leader sequences. Nature Biotechnology, 8(1): 42-46.
- Smith, R. & Lupashin, V. (2008). Role of the conserved oligomeric Golgi (COG) complex in protein glycosylation. Carbohydrate Research, 343(1), 2024–31.
- Spiro, R. (1966). Analysis of sugars found in glycoproteins. Methods Enzymol, 8, 3-26.
- Wang, T.; Li, L. & Hong, W. (2017). SNARE proteins in membrane trafficking. Traffic, 18(12), 767-75.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: ELIMINACIÓN DE PLÁSMIDO DE UNA CEPA TRANSFORMADA MEDIANTE CRECIMIENTO EN MEDIO NO SELECTIVO

La cepa *S. cerevisiae* tfi^{NEG} (*tpi1Δ*) fue usada como cepa control, mientras que la cepa tfi^{NEG-SS} (*tpi1Δ P_{GPD}-SEC16 P_{TEF}-GLO3*) fue utilizada para comprobar el incremento de la eficiencia de secreción mediante la sobreproducción de las proteínas Sec16 y Glo3. Ambas cepas fueron generosamente proveídas por Jens Nielsen, Universidad Tecnológica de Chalmers, Suecia).

La cepa tfi^{NEG-SS} recibida del laboratorio Nielsen contenía un plásmido con el gen *tpi1+* y para poder utilizarla, fue necesario provocar la pérdida de ese plásmido convirtiendo nuevamente a las células en sensibles a glucosa, mediante diluciones sucesivas cada 3 días en medio pobre en glucosa. El medio no selectivo empleado fue YPE (extracto de levadura, peptona, 1% etanol, 0.05% glucosa) que permite el óptimo crecimiento de las células sin requerir el plásmido pJN1. Después de cuatro pases, las suspensiones de levadura se sonicaron y plaquearon en medio sólido YPE. Finalmente, se realizó el pase de algunas colonias crecidas en la placa anterior en medio YPD (extracto de levaduras, peptona y glucosa). Las células que perdieron el plásmido pJN1 presentaron un crecimiento considerablemente más lento y fueron seleccionadas. Se realizó un ensayo de PCR para verificar que no era posible amplificar un fragmento del plásmido, confirmando así su eliminación.

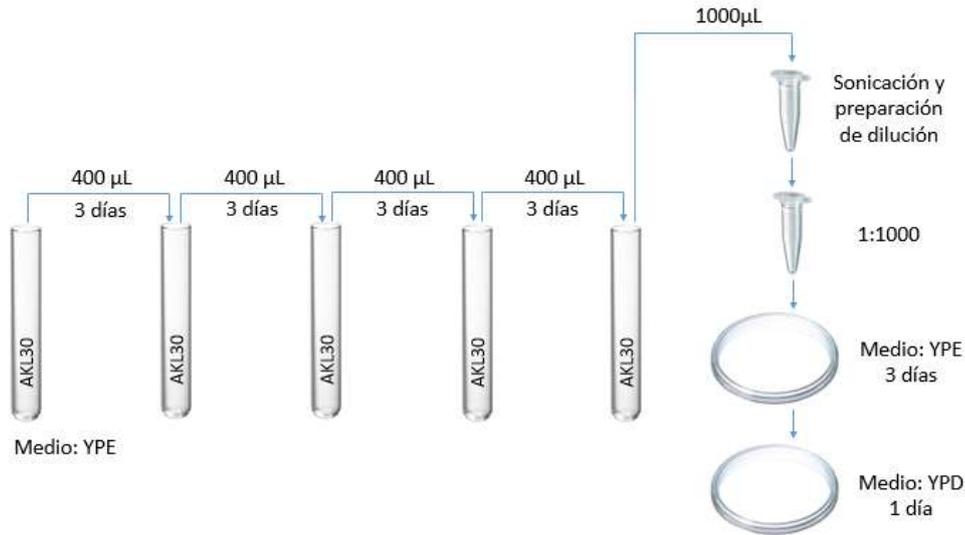


Figura A1: Protocolo seguido para promover la pérdida de plásmidos en la cepa *tff1^{NEG-SS}*.

FUENTE: Edición propia

Cinco colonias fueron seleccionadas y evaluadas para comprobar su crecimiento en los dos medios: YPE, pobre en glucosa y YPD, rico en glucosa. Mediante un ensayo de crecimiento con diluciones seriadas se observó que las colonias C1 y C5 habían perdido su capacidad óptima de crecimiento en medio rico en glucosa, por tanto, se asume que habían perdido el plásmido (Figura A2-A). Para confirmar la pérdida, se extrajo el ADN total de los cinco candidatos y se amplificó por PCR un fragmento perteneciente al plásmido. Como se esperaba, los candidatos C1 y C5 presentaron un resultado negativo debido a que no poseían el plásmido (Figura A2-B).

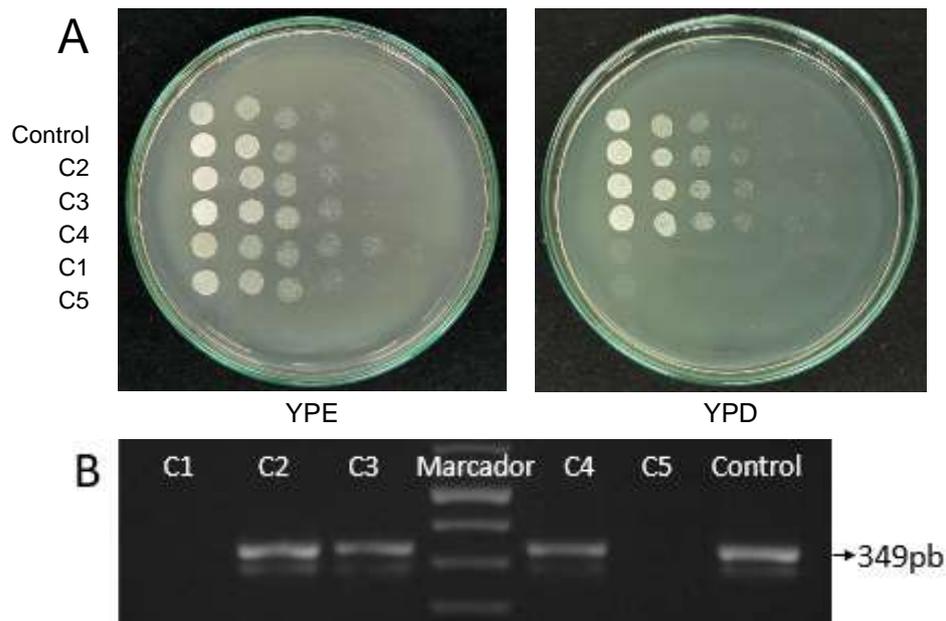


Figura A2: Análisis de las colonias tfi^{NEG-SS} obtenidas mediante crecimiento en medio no selectivo. Después de 4 pases en medio YPE líquido, parte de la suspensión de células fue sonicada y plaqueada en YPE sólido. Se seleccionaron 5 candidatos (C1, C2, C3, C4 y C5). **A.** Se evaluó el crecimiento comparando el crecimiento de las cepas usando diluciones seriadas inoculadas en medio YPE (glucosa 0.5%) o YPD (glucosa 2%). **B.** Detección de la presencia del plásmido mediante un ensayo por PCR. Aquellas que no presentan dicha amplificación confirman la pérdida del plásmido (C1 y C5). Marcador de 100 pb, New England BioLabs.

Anexo 2: FOTOGRAFÍAS DEL DESARROLLO EXPERIMENTAL

I. Cultivo en medio líquido a 0h y 30h



Fotografía de algunas cepas secretoras ya transformadas.

Se observa visualmente la diferencia de la densidad de la muestra a 0h,

DO_{600nm} de 0.05, y a 30h, DO_{600nm}

de 1 aprox.



II. Crecimiento de cepas en agitador rotatorio a 30°C



Fotografía de los candidatos secretores ya transformados en el agitador

rotatorio. Los matraces fueron rotulados, colocados cuidadosamente

y asegurados para evitar

contaminación. La agitación se dio a

30°C y a 400RPM.

Anexo 3: ESPECIFICACIONES DE EQUIPOS Y KITS USADOS PARA WESTERN BLOT

I. Cámara de electroforesis vertical

Cámara vertical compacta para corridas en gel de 10x14cm, en ambos lados. Incluye dos peines y juego de espaciadores de 0.8mm de grosor. Los peines espaciadores son de 15 pocillos y 0.5mm de grosor.



III. Kit Pierce ECL Western Blot

Ofrece un sustrato de peroxidasa de rábano picante (HRP) de nivel básico y económico para mejorar la quimioluminiscencia (ECL).



II. Sistema de transferencia de membrana

Sistema vertical de transferencia donde pueden correrse dos geles al mismo tiempo bajo las mismas condiciones. Alta resolución de separación con una operación simple. Incluye dos cassettes que señalizan su orientación por medio de colores y cuatro esponjas.



IV. Kit de tinción de proteínas reversible para membranas de nitrocelulosa

