

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“CONSTRUCCIÓN DE DOS BIBLIOTECAS DE PLÁSMIDOS
PARA LA SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE OLIGOPÉPTIDOS
ALEATORIOS O SEMIALEATORIOS EN *S. cerevisiae*”**

Presentada por:

DEISY KEVELIN LOBO REYES

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGA

Lima – Perú

2024

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

Tesis Deisy Lobo Abril2024

ORIGINALITY REPORT

13%

SIMILARITY INDEX

13%

INTERNET SOURCES

3%

PUBLICATIONS

2%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	repositorio.lamolina.edu.pe Internet Source	4%
2	hdl.handle.net Internet Source	2%
3	patents.google.com Internet Source	1%
4	vsip.info Internet Source	<1%
5	www.doria.fi Internet Source	<1%
6	revistas.sqperu.org.pe Internet Source	<1%
7	www.jove.com Internet Source	<1%
8	rua.ua.es Internet Source	<1%
9	es.scribd.com Internet Source	<1%

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“CONSTRUCCIÓN DE DOS BIBLIOTECAS DE PLÁSMIDOS
PARA LA SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE OLIGOPÉPTIDOS
ALEATORIOS O SEMIALEATORIOS EN *S. cerevisiae*”**

Presentada por:

DEISY KEVELIN LOBO REYES

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGA

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Mg. Sc. Patricia Angelica Moreno Díaz de Saco
PRESIDENTE

Dr. Ernesto Aldo Ormeño Orrillo
MIEMBRO

Mg. Sc. Yvette Ludeña Hinojosa
MIEMBRO

Ph.D. Ana Akemi Kitazono Sugahara
ASESORA

DEDICATORIA

A mi familia que siempre me apoyó

A mis grandes amigas que me dieron un mensaje de aliento

A mis compañeros del Laboratorio de Química Biológica y Bioanálisis que entre risas y comidas estuvieron apoyándome

AGRADECIMIENTOS

- A la profesora Kitazono, quien me abrió las puertas de su laboratorio para la elaboración de la presente investigación, asimismo por enseñarme sobre maravilloso mundo de la biología molecular.
- A mi jurado calificador, conformado por los profesores Mg. Sc. Patricia Moreno, Dr. Ernesto Ormeño y Mg. Sc. Yvette Ludeña quienes evaluaron y calificaron la presente tesis.
- A mi querida madre Sofía y mi padre Jorge quienes me apoyaron en todos los sentidos durante toda la carrera.
- Al programa nacional de becas y crédito educativo (PRONABEC) que me apoyaron económicamente en la culminación de mi carrera.
- A CONCYTEC-PROCIENCIA en el marco de la convocatoria Proyecto de Investigación Aplicada y Desarrollo Tecnológico 2020-02- Fase II [Contrato N° 146-2020- FONDECYT] que hizo posible el financiamiento de materiales y estipendios para la elaboración de esta tesis.
- A mis queridas tutoras Yohana y María, quienes me tuvieron mucha paciencia en enseñarme sobre los conocimientos básicos de la microbiología.
- A la doctora Zúñiga por permitirme ingresar a su laboratorio, lugar donde comencé el increíble mundo de la investigación.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1. Oligopéptidos y sus potenciales funciones.....	2
2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2.3. Secreción de proteínas.....	4
2.4. Péptido señal del factor de apareamiento alfa	7
2.5 Construcción de bibliotecas de plásmidos.....	8
2.5.1 Clonación <i>in vivo</i>	9
2.5.2 Estrategia para la obtención de oligopéptidos de secuencias aleatorias o semialeatorias.....	10
2.5.3 Selección de transformantes de <i>S. cerevisiae</i> mediante el gen que codifica para la triosa fosfato isomerasa.....	12
2.6. Aplicación de mutantes deficientes en la reparación de ADN dañado como estrategia de búsqueda de oligopéptidos fotoprotectores	14
III. METODOLOGÍA.....	15
3.1. Materiales	15
3.1.1 Cepas, cebadores y plásmidos.....	15
3.1.2. Materiales.....	17
3.1.3. Medios de cultivo	18
3.1.4. Soluciones y reactivos	18
3.1.5. Equipos	19
3.2. Métodos	19
3.2.1. Construcción de la cepa sensible a la radiación UV.	19
3.2.2. Generación de los fragmentos aleatorios y semialeatorios a clonar.....	21
3.2.3. Construcción de dos bibliotecas de plásmidos con insertos aleatorios o semialeatorios mediante clonación <i>in vivo</i>	26

3.2.4. Ensayos preliminares de fotoprotección.....	29
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	31
4.1 Construcción de la cepa mutante <i>rad9</i>	31
4.2 Obtención del plásmido pTPI1 linealizado y productos de PCR para la construcción de las bibliotecas	32
4.3 Determinación de la eficiencia de clonación en las bibliotecas construidas	34
4.4 Verificación de la correcta construcción de los plásmidos y de la diversidad de las secuencias en los fragmentos clonados	36
4.5 Ensayos preliminares de fotoprotección	38
V. CONCLUSIONES	41
VI. RECOMENDACIONES	42
VII. BIBLIOGRAFÍA	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Funciones de algunos oligopéptidos reportados	2
Tabla 2: Aminoácidos con mayor absortividad molar de radiación UV.....	3
Tabla 3: Fundamentos de algunos tipos de clonación.....	9
Tabla 4: Cepas utilizadas.....	15
Tabla 5: Plásmidos utilizados	16
Tabla 6: Cebadores utilizados	17
Tabla 7: Composición de la mezcla usada para la amplificación por PCR del cassette de delección del gen <i>RAD9</i>	20
Tabla 8: Composición de la mezcla usada para la amplificación por PCR de los fragmentos aleatorios y semialeatorios a ser clonados.....	22
Tabla 9: Composición de la mezcla usada para la digestión del plásmido pTPI1.....	26
Tabla 10: Composición de la mezcla usada para la verificación por PCR de la presencia de los fragmentos aleatorios y semialeatorios en los plásmidos purificados.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Translocación de un polipéptido hacia la membrana del retículo endoplasmático para su posterior secreción.	4
Figura 2. Ruta de secreción de los péptidos o proteínas.	5
Figura 3. Representación de las proteínas que median el transporte de las vesículas y la secreción de proteínas codificadas.	7
Figura 4. Características del péptido señal del factor alfa.	8
Figura 5. Representación radial del código genético y los efectos del uso de codones degenerados NNN o NNK.	11
Figura 6. Efectos de la ausencia de la enzima triosa fosfato isomerasa en <i>S. cerevisiae</i>	12
Figura 7. Principales características del plásmido pTPI1.	13
Figura 8. Comparación de las secuencias de aminoácidos de las enzimas triosa fosfato isomerasa de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (<i>Sp</i>) y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>Sc</i>).	13
Figura 9. Asociación de Rad9 permite la activación de los mecanismos de respuesta a la presencia de roturas en las dos hebras del ADN.	14
Figura 10. Representación esquemática de la estrategia seguida para la remoción del gen <i>RAD9</i>	20
Figura 11. Estrategia de PCR aplicada para la amplificación de los fragmentos aleatorios y semialeatorios.	23
Figura 12. Representación del procedimiento seguido para la obtención de los fragmentos aleatorios por PCR.	24
Figura 13. Representación del procedimiento seguido para la obtención de los fragmentos semialeatorios por PCR.	25
Figura 14. Representación del proceso de clonación <i>in vivo</i> en <i>S. cerevisiae</i>	27
Figura 15. Equipo reticulante emisor de radiación UV utilizado para los ensayos de fotoprotección.	30

Figura 16. Construcción de la cepa <i>rad9::loxP-kanMX-loxP tpi1(41-707)::loxP</i> (<i>rad9 tfi^{NEG}</i>).....	32
Figura 17. Obtención del plásmido pTPI1 linealizado y los fragmentos aleatorios y semialeatorios a clonar.....	33
Figura 18. Resultados de los ensayos de PCR implementados para determinar la presencia de plásmidos recombinantes en los transformantes de la biblioteca aleatoria.....	34
Figura 19. Resultados de los ensayos de PCR implementados para determinar la presencia de plásmidos recombinantes en los transformantes de la biblioteca semialeatoria).....	35
Figura 20. Ejemplos de las secuencias de nucleótidos de algunos insertos en cinco plásmidos obtenidos de transformantes de las bibliotecas aleatoria y semialeatoria.....	36
Figura 21. Análisis de la composición de los oligopéptidos codificados por los plásmidos sometidos a secuenciamiento de nucleótidos.	37
Figura 22. Comparación del efecto de la radiación UV en los transformantes de la cepa <i>rad9 tfi^{NEG}</i>	39
Figura 23. Comparación de la respuesta a la radiación UV de transformantes de la cepa <i>rad9 tfi^{NEG}</i> con plásmidos únicos.	40

RESUMEN

A pesar de estar constituidos por unos pocos aminoácidos (2 a 20), los oligopéptidos presentan gran diversidad en su composición y tienen varias importantes aplicaciones. Importantemente, es posible producir una gran variedad de éstos para permitir la investigación de sus propiedades recurriendo a diferentes estrategias, entre las cuales destaca la construcción de bibliotecas de plásmidos. A su vez, los oligopéptidos sintetizados pueden tener diferentes destinos, por ejemplo, el interior celular, algún organelo en particular, o ser secretadas o ancladas en la superficie celular. De esta manera, una vez construidas las bibliotecas usando plásmidos de expresión, se procede a realizar una búsqueda de aquellos oligopéptidos con las características deseadas a través de estrategias de tamizado. En esta tesis se reporta la estrategia seguida para lograr la producción y secreción de una gran variedad de oligopéptidos aleatorios y semialeatorios en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, mediante la construcción de las respectivas bibliotecas de plásmidos. Los fragmentos a clonar fueron obtenidos mediante una estrategia de PCR que fue optimizada para garantizar el máximo rendimiento y reproducibilidad. El ensamblaje de los plásmidos de expresión para formar la biblioteca se realizó mediante clonación *in vivo*, consiguiendo altas eficiencias de clonación (62.5 % a 70 %).

Palabras clave: Clonación *in vivo*, Construcción de plásmidos mediante reparación de brechas, Oligopéptidos aleatorios, Oligopéptidos semialeatorios.

ABSTRACT

Although all oligopeptides are formed by a few amino acids (2 to 20), they are diverse and have many important applications. Importantly, it is possible to produce them to allow investigation of their properties using a variety of techniques, including the construction of plasmid libraries. In turn, the synthesized oligopeptides might have different destinations, for example, inside the cell, to be secreted into the extracellular space or anchored on the cell surface. Thus, once these libraries have been obtained, a search for the desired oligopeptides is carried out through screening strategies. This thesis describes the production and secretion of a great variety of oligopeptides, using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The random and semi-random fragments to be cloned were obtained via an optimized PCR strategy that allowed their efficient and reproducible generation. An *in vivo* cloning strategy was applied for the assembly of the expression plasmids and library construction, achieving high cloning efficiencies (62.5 to 70 %).

Keywords: *In vivo* cloning, Plasmid construction by gap repair, Random oligopeptides, Plasmid library, NNK strategy, secretion, *Saccharomyces cerevisiae*.

I. INTRODUCCIÓN

Los oligopéptidos tienen una gran relevancia debido a su versatilidad y relativa seguridad, a tal grado que se producen masivamente en los sectores de la biocosmética, la farmacéutica, la industrial y el sector agrario. Por ejemplo, se han producido antígenos del anticuerpo monoclonal (Kim *et al.*, 2015), péptidos con resistencia artificial a los solventes orgánicos (Zou *et al.*, 2002), antifúngicos de plantas (López-García *et al.*, 2002) y fotoprotectores (Merino, 2019).

El estudio y búsqueda de los oligopéptidos de interés puede además facilitarse si se limita o regula su localización. Para ello se tienen tres estrategias principales: el anclaje en la superficie, la secreción extracelular, y la producción intracelular. Por ejemplo, de acuerdo con la literatura, se han logrado secretar péptidos como: β -Endorfina (de 31 aminoácidos), calcitonina (de 32 aminoácidos) (Zsebo *et al.*, 1986) y molelina (de 97 aminoácidos) (Chen *et al.*, 2011).

Asimismo, en una tesis previa desarrollada en el Laboratorio de Química Biológica y Bioanálisis, lugar donde se llevó a cabo la presente investigación, se logró la secreción de tres oligopéptidos conocidos en la superficie de *Saccharomyces cerevisiae* (Mansilla, 2021).

Esta levadura es un organismo muy empleado para la producción de proteínas y oligopéptidos y ventajosamente, para la construcción de biblioteca de plásmidos mediante la clonación *in vivo*. Esta estrategia permite la síntesis de una gran diversidad de proteínas u oligopéptidos en corto tiempo y con menor costo.

El presente trabajo tuvo como finalidad construir dos bibliotecas de plásmidos que incluyen fragmentos con secuencias aleatorias o semialeatorias. El plásmido empleado en esta investigación tiene la particularidad de incluir la secuencia codificante para el péptido señal alfa, quien se encargará de dirigir a los oligopéptidos producidos fuera de la levadura. La construcción de estas bibliotecas de plásmidos permitirá su aplicación en la búsqueda de oligopéptidos con funciones particulares, por ejemplo, aquellos que confieren protección contra la radiación UV.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Oligopéptidos y sus potenciales funciones

Los oligopéptidos son péptidos con secuencias cortas, de 2 a 20 aminoácidos (Buxbaum E., 2015). Son muy utilizados debido a su flexibilidad estructural, versatilidad sintética y bioseguridad (Berger et al., 2015), así como por su bajo costo de producción, buena estabilidad y capacidad de síntesis a gran escala. Se han reportado oligopéptidos con diversas funciones, por ejemplo, el oligopéptido LMGQW, aislado a partir de músculo de pejesapo o rape, presenta actividad antioxidante (Chi C., et al., 2014); el oligopéptido conocido como “leufasilo” o “pentapéptido-18”, es un componente de productos de antienvjecimiento (Errante et al., 2020); los oligopéptidos DYDD y DDDY, obtenidos de la planta *Dendrobium aphyllum*, muestran función antimicrobiana (Liu H. et al., 2021). Adicionalmente, se ha encontrado un oligopéptido proveniente de una biblioteca, que tiene la capacidad de unirse a la membrana de células cancerosas de ovario, permitiendo su detección (Wang et al., 2015). Las secuencias de estos oligopéptidos se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1: Funciones de algunos oligopéptidos reportados

Funciones	Secuencias	Referencias
Antioxidante	Leu-Met-Gly-Gln-Trp (LMGQW)	Chi C. <i>et al.</i> , 2014
Disminución de arrugas y cicatrización de heridas	Tyr-Ala-Gly-Phe-Leu (Pentapéptido-18)	Errante <i>et al.</i> , 2020
Antimicrobiano	Asp-Tyr-Asp-Asp (DYDD) Asp-Asp-Asp-Tyr (DDDY)	Liu H. <i>et al.</i> , 2021
Detección de células cancerosas de ovario	Met-Pro-His-Pro-Tyr-Lys-Asn-Phe- Asp-Leu-Tyr-Val	Wang <i>et al.</i> , 2015

Por otro lado, los aminoácidos presentan características estructurales que les confieren propiedades particulares. Por ejemplo, los aminoácidos triptófano y tirosina contienen fluoróforos que permiten la absorción de la radiación UV (Fersht Alan, 1980; Fujisawa &

Masuda, 2018; Kuipers & Gruppen, 2007; Yang *et al.*, 2015) (Tabla 2). Para el caso de la tirosina, tiene absorptividades molares de 341, 960 y 1405 M⁻¹cm⁻¹, para las longitudes de onda de 254, 266 y 275 nm, respectivamente (Fujisawa & Masuda, 2018; Yang *et al.*, 2015). Mientras que, para el caso del triptófano, presenta mayores absorptividades molares a las mismas longitudes de onda siendo éstas 2760, 4777 y 5579 M⁻¹cm⁻¹. Sin embargo, la concentración celular de este aminoácido es comparativamente baja (0.02 mM) y, además, la síntesis de una mol requiere 78 moles de ATP (Braus, 1991). Por otra parte, los enlaces peptídicos también pueden absorber la radiación UV en un rango de 180-220 nm (Cantor C. and Schimmel P, 1980) y presentan una absorptividad de 923 M⁻¹cm⁻¹ (Kuipers & Gruppen, 2007). Estas características deben ser tomadas en cuenta en el diseño de oligopéptidos o proteínas fotoprotectoras.

Tabla 2: Aminoácidos con mayor absorptividad molar de radiación UV

Aminoácido	Longitud de onda óptima (nm)	Absorptividad molar M ⁻¹ cm ⁻¹
Tirosina	254	341
	266	960
	275	1405
Triptófano	254	2760
	266	4777
	279	5579

FUENTE: Fersht Alan, 1980; Fujisawa & Masuda, 2018; Kuipers & Gruppen, 2007; Yang *et al.*, 2015

2.2. *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo eucariota, unicelular, que pertenece al filo *Ascomycota*. Es muy utilizado en la producción industrial de panes, cerveza, etanol, nutraceuticos, químicos y farmacéuticos (Nielsen & Jewett, 2008). Su ADN genómico nuclear tiene 12 068 kilobases (kb) organizados en 16 cromosomas, con cerca de 6 000 genes que codifican para proteínas (Wood *et al.*, 2001). Cuenta con aproximadamente 200 000 ribosomas (Warner, 1999; Firczuk *et al.*, 2013) y aproximadamente entre 15 000 a 60 000 moléculas de ARN mensajero (Warner, 1999), logrando sintetizar grandes cantidades de proteínas. Además, esta levadura es capaz de secretar proteínas al medio extracelular de forma eficiente y es considerado un organismo seguro (GRAS), por lo que es usada

frecuentemente en la producción de proteínas recombinantes por empresas internacionales como Biogen, Bayer, Abbott (Nandy & Srivastava, 2018).

2.3. Secreción de proteínas

Randy Schekman, James Rothman y Thomas Südhof descubrieron los mecanismos que permiten la secreción de proteínas, lo que les hizo merecedores del premio Nobel de Medicina en el año 2013 (Hellvard & Mydel, 2013). La levadura presenta una vía secretora de proteínas con un sistema de plegamiento eficiente, el que, según Nielsen (2013), requiere de la participación de cerca de 550 proteínas y de éstas, 160 se encargan del plegamiento postraduccional.

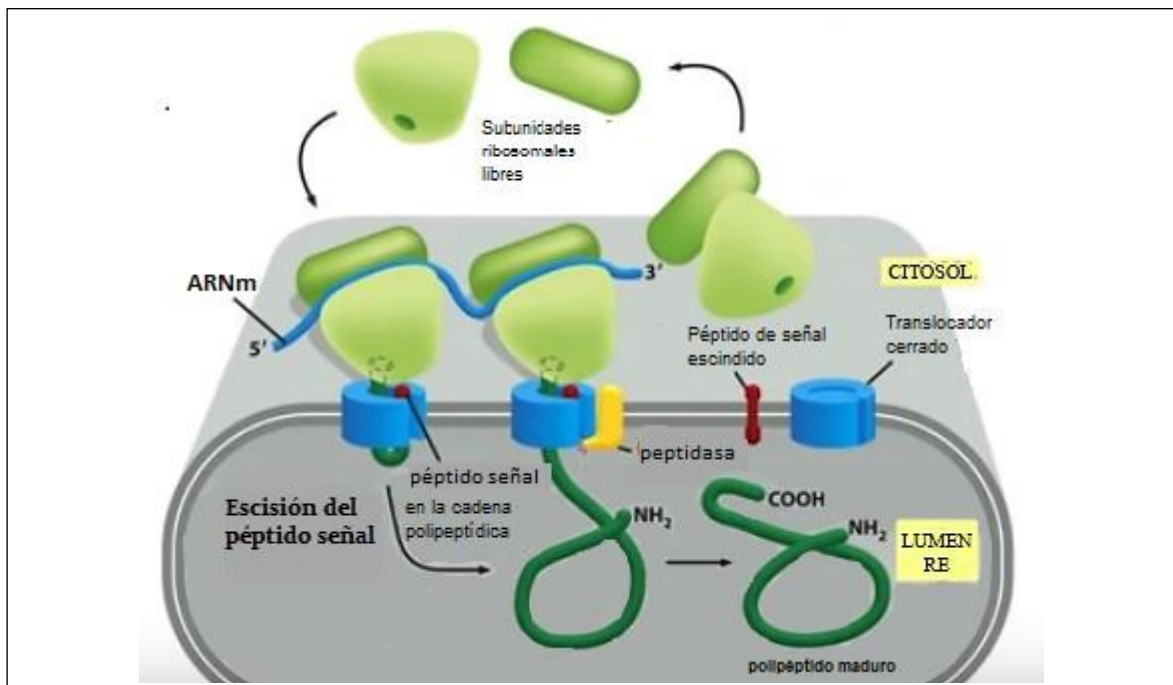


Figura 1. Translocación de un polipéptido hacia la membrana del retículo endoplasmático para su posterior secreción. La co-traducción del polipéptido se realiza por intermedio del péptido señal (en rojo), que se encarga de dirigir al polipéptido sintetizado al interior del retículo endoplasmático por intermedio del translocón (celestes). Al cumplir su función se escinde por intermedio de una peptidasa.

FUENTE: Schekman R. (2016, diciembre).

Como se muestra en la figura 1, la síntesis de proteínas comienza en el citosol cuando el ARN mensajero se une a las subunidades ribosomales 40S y 60S dando lugar a un ribosoma funcional, que inicia la búsqueda del codón de iniciación (Hinnebusch, 2011). Si emerge un péptido señal, éste promueve su translocación hacia la membrana del retículo endoplasmático rugoso (RER), mediante el complejo proteico translocón que incluye a la proteína Sec61. Este complejo está a su vez asociado a la partícula de reconocimiento de señal (SRP) y a una peptidasa, la que escinde al péptido señal. La síntesis completa de las proteínas o péptidos a

ser secretados puede realizarse de dos maneras: la pos-traduccional, donde primero ocurre la síntesis y después el transporte al RER y la co-traduccional, donde la síntesis y el transporte al RER ocurren de forma simultánea. Las proteínas plegadas correctamente en el lumen del RER son secretadas mediante el ensamblaje de vesículas de secreción, las cuales son transportadas hacia y desde el RER y el aparato de Golgi mediante los llamados transportes anterógrado y retrógrado, como se muestra en la figura 2 (Bao *et al.*, 2018).

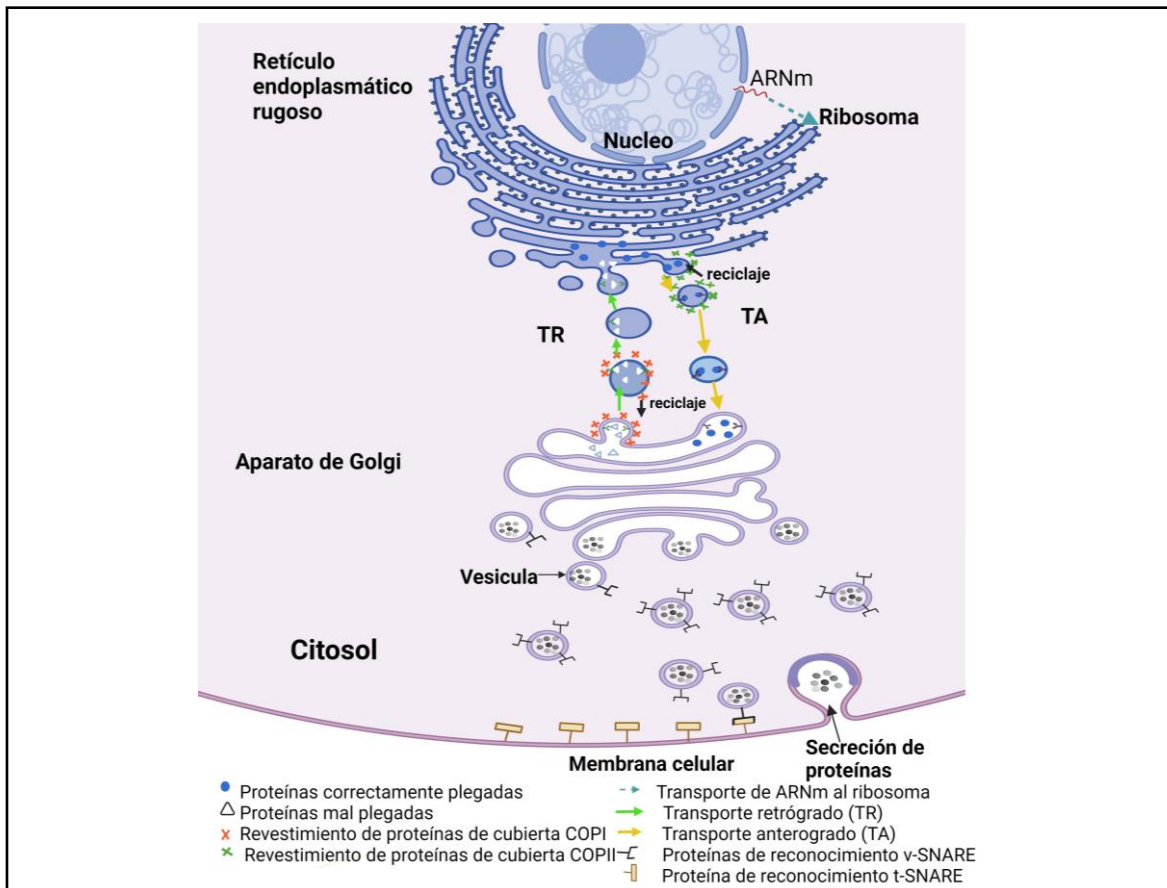


Figura 2. Ruta de secreción de los péptidos o proteínas. El ARN mensajero (ARNm) que codifica para el péptido o proteína se dirige desde el núcleo hacia el citoplasma (flecha punteada turquesa) para asociarse con las subunidades ribosomales. La síntesis del polipéptido se inicia y la emergencia del péptido señal permite su reconocimiento por la partícula de reconocimiento de señal, que la transloca hacia el retículo endoplásmico (RE) para que se complete allí su síntesis y transporte hacia la membrana celular mediante vesículas. Las proteínas de cubierta COP II (aspas de color verde) revisten las vesículas que contienen a las proteínas correctamente plegadas (círculos azules) para su transporte anterógrado (TA) al aparato de Golgi. Por otro lado, las proteínas mal plegadas contenidas en las vesículas revestidas con las proteínas de cubierta COPI (aspa de color rojo) son regresadas al RER (transporte retrógrado, TR). Para su procesamiento final, las proteínas pasan por el aparato de Golgi, donde se glicosilan y se empaquetan en vesículas recubiertas con proteínas SNARE que permiten el reconocimiento entre las membranas celular y vesicular para lograr su fusión y completar la secreción.

Las vesículas cubiertas con COPII, encargadas del transporte anterógrado de las proteínas plegadas, constan de dos componentes: la cubierta interna (formada por las subunidades Sec23 y Sec24, ensambladas por Sar1 GTPasa y Sec12) y la externa (conformada por las tétradas Sec13 y Sec31). Las proteínas correctamente plegadas se segregan y clasifican de

acuerdo a las proteínas de carga, ubicadas en la membrana del sitio de salida del RER. La formación de las vesículas implica una remodelación de fosfolípidos con un intercambio de diacilglicerol de las ceramidas (ubicada en la membrana del RER) por proteínas (Aguilera *et al*, 2023). Las vesículas resultantes se dirigen al aparato de Golgi, donde las proteínas son modificadas mediante glicosilaciones y son dirigidas a la red trans-Golgi (TGN) para clasificarlas y transportarlas a la membrana plasmática (Aguilera *et al*, 2023). La fusión de las membranas, de la vesícula secretora y la plasmática, comienza con la formación del complejo exocisto por los componentes Sec3, Sec5, Sec 10, Sec6, Sec 8, Sec15, Exo70 y Exo 84 (unidos a la membrana de la vesícula), y el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato PI(4,5)P2 ubicado en la membrana plasmática (He B. y Guo W., 2009) (figura 3). Los esfingolípidos desempeñan un papel importante en este proceso, porque regulan la localización subcelular de Sec3 y Exo70, para la posterior formación del exocisto (He & Guo, 2009). La liberación de las proteínas al medio extracelular es mediada por el complejo multimérico TRAPP y el complejo SNARE específico (t-SNARE y v-SNARE), para la formación de dominios helicoidales con un sitio de asociación de la α -SNAP, mediante la acción coordinada de la Rab- GTPasa, Sec1 y Sec17. En el sitio se formará el poro de fusión cooperativo para la secreción de proteínas.

Por otro lado, el sistema de reciclaje de materiales se realiza mediante el transporte retrógrado de las vesículas COPI, donde intervienen la señal K/HDEL, un motivo unido al extremo c-terminal de proteínas de la vesícula, y la proteína receptora ERD2 del RE, es transportada por la vesícula COPII al aparato de Golgi y de vuelta por este sistema de recuperación. Estas vesículas de reciclaje están compuestas por las subunidades Ret1-3, Sec27, Sec28, Sec26, Sec21 y son cubiertas por subunidades COPI por la acción reclutadora de la GTPasa Arf1.

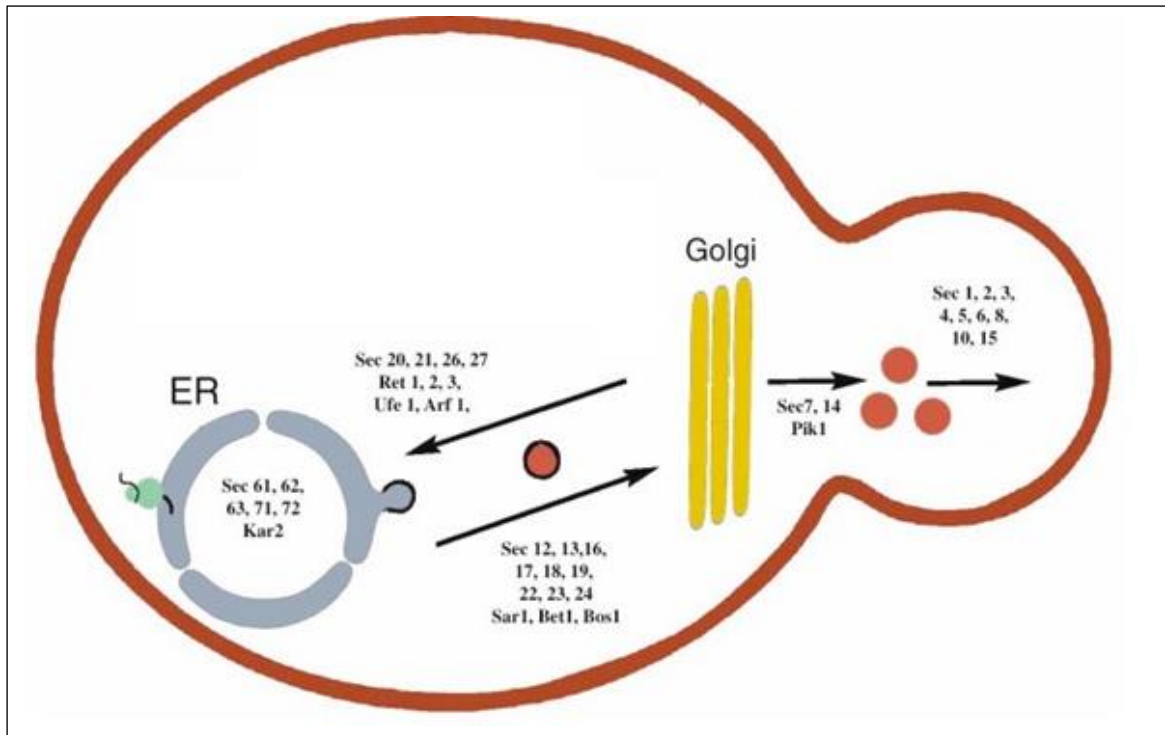


Figura 3. Representación de las proteínas que median el transporte de las vesículas y la secreción de proteínas codificadas. Los organelos como el retículo endoplasmático y aparato de Golgi participan en la ruta de secreción de las proteínas, donde el transporte de las proteínas de un organelo a otro es realizado por las vesículas. La formación de las vesículas recubiertas con COPII requiere la participación de las proteínas Sec12-19, Sec 22-24, Sar1, Bet1 y Bos1. Estas vesículas transportan a las proteínas correctamente plegadas y siguen un transporte anterógrado desde el retículo endoplasmático hasta el aparato de Golgi. En este organelo las proteínas son modificadas, clasificadas y exportadas a diferentes lugares de la célula. Las proteínas a ser secretadas son dirigidas a la membrana plasmática mediante vesículas secretoras, en cuya formación participan Sec7, Sec14 y Pik1. La interacción de las membranas de las vesículas y la plasmática es mediada por Sec1-10 y Sec15, un paso importante para su posterior fusión, lo que finalmente permite la secreción de las proteínas. El reciclaje de las proteínas mal plegadas es realizado por vesículas cubiertas con COPI, siendo Sec20-27, Ret1-3, Ufe1, Arf1 los componentes que intervienen en su formación.

FUENTE: Schekman R. y Rothman James, 2002

2.4. Péptido señal del factor de apareamiento alfa

Los péptidos señal presentan entre 25 a 30 aminoácidos y se encargan de dirigir a las proteínas hacia localizaciones particulares como los organelos o a la membrana plasmática. En *S. cerevisiae*, un péptido secretado de amplio estudio y aplicación es el factor de apareamiento alfa (“factor alfa”) que consta de 13 aminoácidos en su forma final procesada (WHWLQLKPGQPMY), y es codificado por los genes MF α 1 y MF α 2 (Herskowitz, 1988). Ambos codifican para el precursor que incluye al péptido señal o secuencia líder pre-pro, y repeticiones tándem del factor alfa, cuyo número depende del tipo de gen MF α .

La pre-región del péptido señal del factor alfa tiene 19 residuos y es escindida por la peptidasa en la región ALA (letras de color celeste, figura 4), después de su reconocimiento por SRP del retículo endoplasmático (figura 1). La pro-región de 64 residuos presenta tres

sitios de glicosilación en el sitio NXT (donde: N corresponde a asparagina, X a cualquier aminoácido, y T a treonina), que parecen facilitar el transporte desde el RE al aparato de Golgi (Rakestraw *et al.*, 2009; Caplan *et al.*, 1991). Esta región y el espaciador de seis aminoácidos promueven el procesamiento final mediado por las enzimas Kex2 y Kex1 para liberar al factor alfa al medio extracelular, (Kurjan y Herskowitz, 1982). En diversas aplicaciones, como es el caso de esta investigación, se introducen modificaciones en la secuencia del espaciador para evitar el procesamiento prematuro de la proteína a secretar (Kjeldsen *et al.*, 1996).

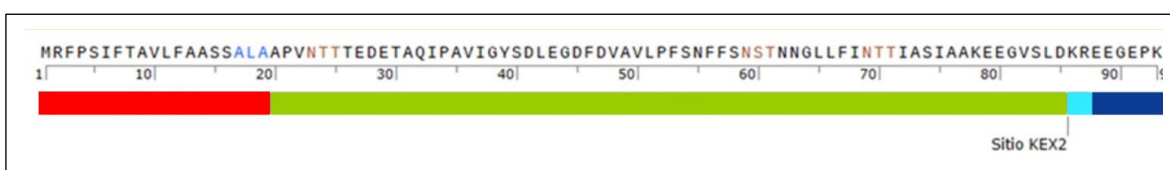


Figura 4. Características del péptido señal del factor alfa. La pre-región, representada por el cuadro rojo, incluye al péptido señal que es luego escindido en la secuencia Ala- Leu- Ala coloreada en azul. La pro-región, representada por el cuadro verde, incluye tres sitios de glicosilación Asn-X-Thr, coloreados en marrón (donde X corresponde a cualquier aminoácido), y un sitio de reconocimiento por la proteasa Kex2, (cuadro de color celeste). El cuadro de color azul oscuro representa a la secuencia que cumple el rol de espaciador.

2.5 Construcción de bibliotecas de plásmidos

Una biblioteca de plásmidos es una colección de fragmentos de ADN que se encuentran insertados en un vector (plásmido), los cuales permiten la síntesis de una gran diversidad de péptidos o proteínas. Las bibliotecas de plásmidos pueden cumplir varias funciones, desde permitir el análisis de secuencias genómicas, de ADN complementario, metagenómicas, de secuencias sintéticas y otros, hasta la expresión regulada (inducible) o no regulada (constitutiva) de los genes clonados. La colección de secuencias clonadas puede ser por tanto variable también, dependiendo del propósito y la razón de su construcción, desde unas cuantas secuencias hasta millones de millones de ellas. Entre las importantes aplicaciones de las bibliotecas de plásmidos está la identificación de genes que confieren una función particular, por ejemplo, supresión de la sensibilidad a altas temperaturas o algún otro agente citotóxico, aumento en la resistencia a algún compuesto químico o tratamiento como la radiación UV, etc. (Schatz, 1994; Baxter *et al.*, 2014; Bozovičar y Bratkovič, 2020). Para construir las bibliotecas, se recurre a diferentes métodos de clonación, algunos de los cuales están resumidos en la Tabla 3.

Tabla 3: Fundamentos de algunos tipos de clonación.

Tipo de clonación	Fundamento	Fuente
Convencional	Uso de enzimas de restricción y de ligación mediante reacciones <i>in vitro</i> .	
Gateway	Requiere enzimas BP clonasa y LR clonasa, la recombinación se da entre los sitios attB y attP.	Ashwini <i>et al.</i> , 2016
Golden Gate	Es una clonación sin cicatrices, usan enzimas de restricción tipo IIS.	Ashwini <i>et al.</i> , 2016
Reparación de brechas o <i>in vivo</i>	Sistema celular endógeno permite la recombinación homóloga del fragmento a clonar y el vector de clonación.	Kitazono, 2011

2.5.1 Clonación *in vivo*

Conocido también como “clonación por reparación de brechas (*gap repair*)”, es una técnica que tiene la particularidad de unir fragmentos de ADN en el interior de la levadura mediante recombinación homóloga (Gibson, 2009). La clonación ocurre mediante las secuencias homólogas de los extremos libres de un plásmido y del o los fragmentos a ser clonados, resultando en un plásmido circular (Ma *et al.*, 1987; Orr-Weaver *et al.*, 1983).

Respecto a los vectores usados en la clonación *in vivo* en *S. cerevisiae*, pueden ser plásmidos centroméricos (de bajo número de copias, incluye la secuencia de replicación autónoma ARS) o plásmidos episomales (de alto número de copias, incluye al origen de replicación denotado como “2 μ ”) (Rizvi *et al.*, 2018). Como se mencionó, en los extremos deben estar ubicadas las secuencias que permitirán la recombinación homóloga, las cuales deben tener una longitud mínima de 30 pb en ambos extremos, aunque uno de ellos puede ser reducido a 20 pb solo sí el otro es lo suficientemente extenso (Hua *et al.*, 1997; Lorenz *et al.*, 1995; Manivasakam P. *et al.*, 1995). Los plásmidos son generalmente linealizados para facilitar la inserción del fragmento de interés; no obstante, existe la posibilidad de que los extremos se vuelvan a unir antes que se logre la inserción, por lo que se recomienda desfosforilarlos previamente (Hu, 1993).

Por otro lado, con relación a los fragmentos a ser clonados, se ha demostrado que la recombinación homóloga puede realizarse con productos de PCR de diversos tamaños (Kitazono, 2011) o fragmentos fusionados (Lizasa & Nagano, 2006; Swers *et al.*, 2004).

Entre las ventajas que se encuentran al usar la clonación *in vivo* están la posibilidad de realizar esta técnica en cualquier laboratorio de biología molecular por personas con conocimientos básicos en el tema, el bajo presupuesto que se requiere y, a comparación de otras técnicas de clonación, el proceso no es complejo. Adicionalmente, completada la clonación puede darse inmediatamente la expresión del gen clonado en la levadura transformada, facilitando así la búsqueda de los productos de interés.

2.5.2 Estrategia para la obtención de oligopéptidos de secuencias aleatorias o semialeatorias

La generación de oligopéptidos con secuencias aleatorias o semialeatorias es, por lo general, más eficiente si se realiza mediante la construcción de bibliotecas de plásmidos que incluyen los respectivos fragmentos codificantes. Durante muchos años, se han empleado bibliotecas plasmídicas para la búsqueda de péptidos de interés mediante diferentes estrategias, usándose, por ejemplo, en la identificación de proteínas TALEs (efectores de tipo activador de la transcripción), una serie de proteínas de unión al ADN con 33-35 aminoácidos, lográndose 64 % de clones positivos (Zhang *et al.*, 2013), y de aptámeros peptídicos, proteínas que se unen específicamente a moléculas diana como ATP, proteínas, ácidos nucleicos y complejas estructuras multiméricas para modular su función (Bickle *et al.*, 2006; Miller, 2009).

La obtención de los fragmentos que incluyen a las secuencias codificantes es un paso clave ya que de su éxito dependerá de la posibilidad de lograr la síntesis de una máxima diversidad de oligopéptidos de secuencias aleatorias. Los fragmentos codificantes aleatorios pueden ser fácilmente obtenidos mediante PCR (Li *et al.*, 2018), pero se requiere un cuidadoso diseño para asegurar un buen rendimiento y la generación de productos con la máxima posible diversidad de secuencias. Así, es posible sintetizar primers o cebadores que incluyen secuencias completamente aleatorias que permiten la inclusión de cualquiera de las cuatro bases en cualquier posición durante su síntesis (guanina, G; adenina, A; timina, T; o citosina, C), para generar los 64 tipos de codones “NNN” (4x4x4 posibles combinaciones). Éstos, al poder codificar para cualquiera de los 20 aminoácidos son denotados como “codones degenerados”. Sin embargo, como esta estrategia conduce a la generación redundante de codones, ya que se encontraría, por ejemplo, seis tipos de codones para arginina, serina o leucina; cuatro tipos de codones para glicina, valina, prolina y otros; o tres tipos de codones de terminación (TAA, TGA, TAG). Mientras que habría aminoácidos codificados por solo

un codón (metionina, triptófano), o dos (fenilalanina, tirosina, cisteína, histidina, glutamato, entre otros).

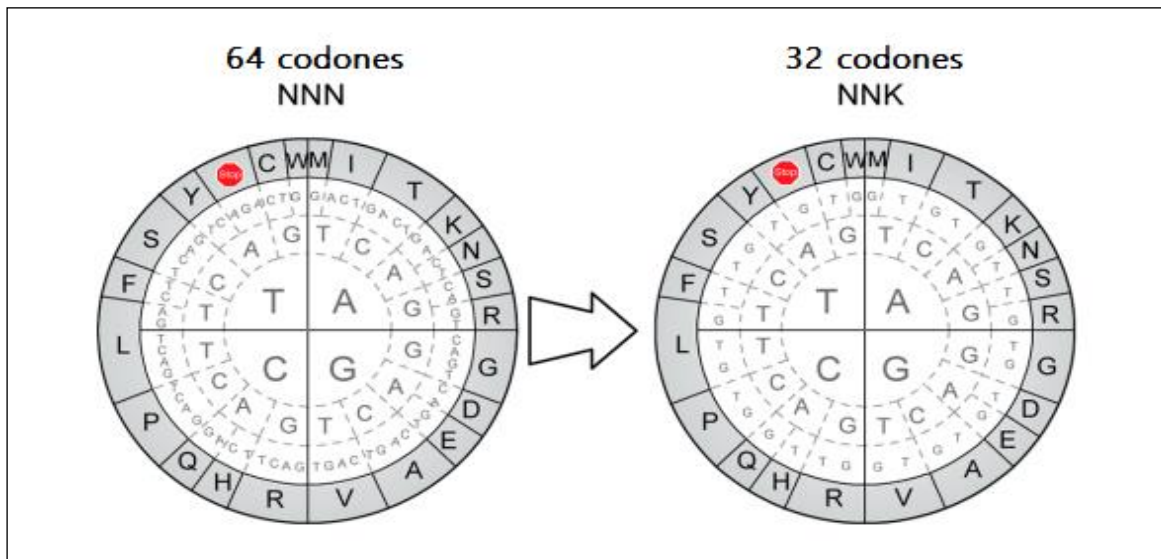


Figura 5. Representación radial del código genético y los efectos del uso de codones degenerados NNN o NNK. La correspondencia entre cada codón y el aminoácido codificado se define leyendo desde el círculo más interno hacia el externo, para obtener un codón (por ejemplo, TGG). La parte sombreada representa los aminoácidos codificados por cada codón (por ejemplo, W, triptófano, para el codón TGG). En la representación de la izquierda se encuentran los 64 posibles codones que se generarían si se permitiese la introducción en cada posición de cualquiera de los cuatro nucleótidos (T, A, G, o C, por consenso denotado como “N”). Sin embargo, si solo se permitiese la introducción de T o G (por consenso denotado como “K”) en la tercera posición de cada codón, el código genético se reduce a 32 codones.

FUENTE: Adaptado de Kille *et al.* (2013).

Varias estrategias pueden ser implementadas para reducir la redundancia de codones generada al usar codones “NNN”. Una de las más usadas implica el uso de codones degenerados “NNK” que permite una reducción de la redundancia en un 50% (Figura 5) (Kille *et al.*, 2013). En ésta, durante la síntesis del cebador aleatorio a emplear se restringe la inclusión de bases en cada tercera posición a solo “G” o “T”, logrando formar solo 32 codones (4x4x2 combinaciones). El uso de los codones degenerados NNK aumenta la representatividad de los aminoácidos que son codificados por uno o dos codones. Por ejemplo, el uso de codones NNN resulta en seis codones para arginina y uno para triptófano, mientras que, el uso de codones NNK cambia la proporción a tres a uno. Es importante destacar además que, entre los 32 codones formados, solo uno sería de terminación (TAG), disminuyendo así la probabilidad de términos prematuros en la síntesis de los oligopéptidos.

2.5.3 Selección de transformantes de *S. cerevisiae* mediante el gen que codifica para la triosa fosfato isomerasa

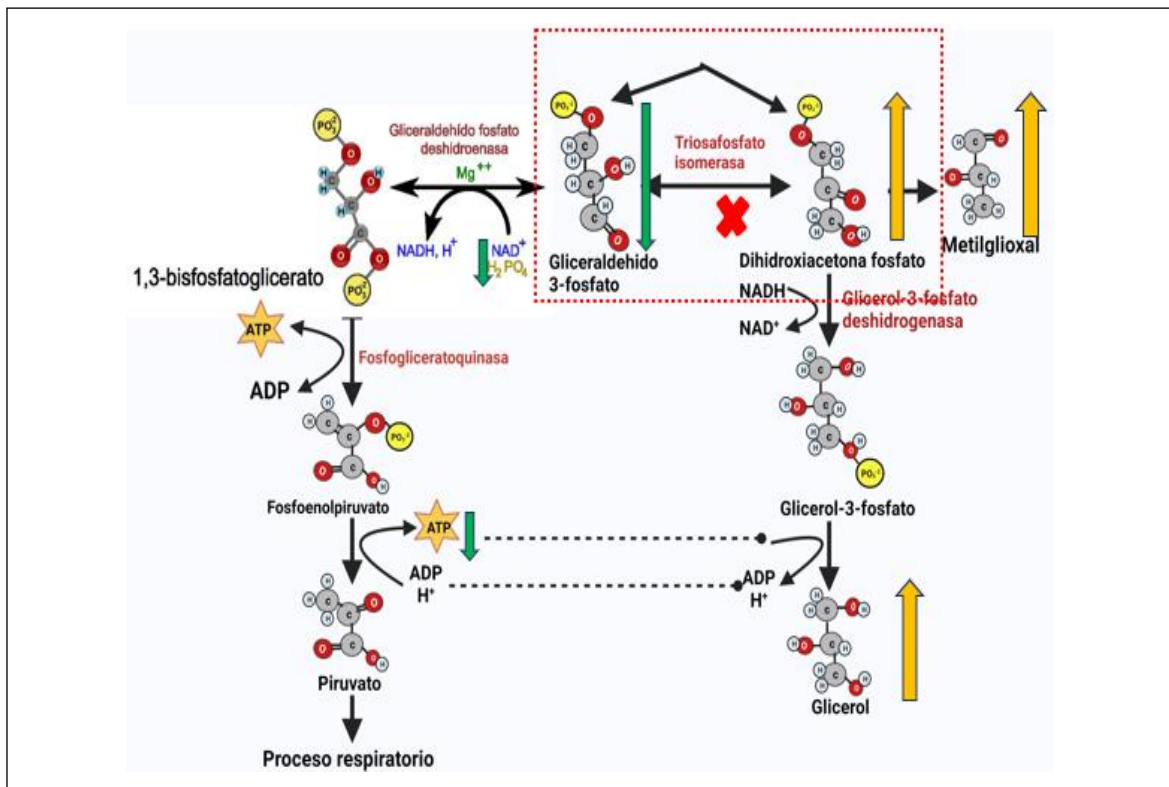


Figura 6. Efectos de la ausencia de la enzima triosa fosfato isomerasa en *S. cerevisiae*. El incremento de dihidroxiacetona fosfato (flecha amarilla arriba) y la falta de NADH (flecha verde abajo) causa la producción del metilglixal, compuesto que tiene efecto citotóxico porque puede reaccionar con proteínas, ADN y ARN afectando sus estructuras.

FUENTE: Modificado de UdeSantiagoVirtual, 2015.

La triosa fosfato isomerasa cataliza la interconversión de dihidroxiacetona fosfato a D-gliceraldehído-3-fosfato (Alber, 1981). Estructuralmente, es un dímero de dos subunidades idénticas de 27 000 dalton, que no utiliza cofactores ni iones metálicos. Los mutantes de *S. cerevisiae* que carecen de esta enzima (tfl^{NEG}) no proliferan en medio conteniendo glucosa, y han sido construidos para facilitar la sobreproducción de glicerol, pues permite la acumulación de dihidroxiacetona fosfato, que es su precursor (Figura 6). Esta sensibilidad se debe a que la ausencia del gen *TPII* causa la acumulación de dihidroxiacetona fosfato y una menor síntesis de gliceraldehído-3-fosfato, causando el agotamiento del ATP intracelular (Ciriacy & Breitenbach, 1979) y la producción del compuesto citotóxico metilglixal (Figura 5). Estos mutantes crecen en medios con sustratos mixtos de diferentes fuentes de carbono (Kawasaki G., 1982) como glicerol o etanol y concentraciones de glucosa menores a 0.05 % (Mansilla, 2021).

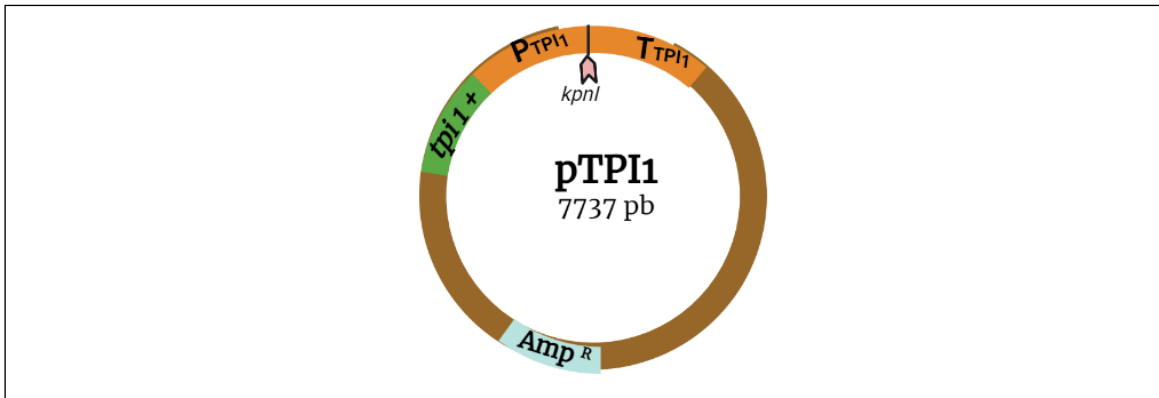


Figura 7. Principales características del plásmido pTPI1. Este plásmido de 7.7 kb puede ser mantenido tanto en células de la levadura *S. cerevisiae* (expresión de genes) como de *E. coli* (amplificación de plásmidos para permitir su eficiente purificación). Para la selección de los transformantes de levadura (crecimiento en glucosa) presenta al gen *tpi*⁺ de *Schizosaccharomyces pombe*, que codifica para la enzima triosa fosfato isomerasa. Para la selección de los transformantes de *E. coli*, presenta al gen que codifica para la betalactamasa (*Amp*^R) que confiere resistencia a la ampicilina. Se muestran además las representaciones del promotor y terminador del gen *TPI1* (*P_{TPI1}* y *T_{TPI1}*) y el sitio de restricción *KpnI* que puede ser usado para su linealización.

Un plásmido basado en la enzima triosa fosfato isomerasa es pTPI1, construido por el laboratorio del Dr. Jens Nielsen en la Universidad Tecnológica de Chalmers de Suecia (Liu *et al.*, 2012). El plásmido (Figura 7) incluye como marcador selectivo al gen *tpi*⁺ de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*, que es homólogo al gen *TPI1* de *S. cerevisiae* (Figura 8). Los mutantes *tfi*^{NEG} que contienen el plásmido pTPI1 tienen una alta estabilidad, alto número de copias y una expresión estable al crecer en medios con concentraciones altas de glucosa (Kawasaki G., 1982).

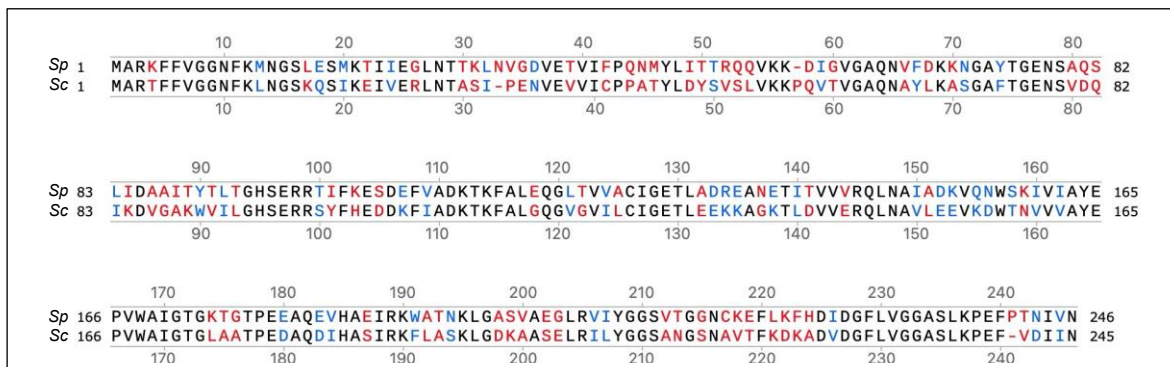


Figura 8. Comparación de las secuencias de aminoácidos de las enzimas triosa fosfato isomerasa de *Schizosaccharomyces pombe* (*Sp*) y *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*). El alineamiento se realizó usando el software SnapGene, con porcentajes de identidad y similitud de 56% y 59%, respectivamente. Se destacan en negro a los aminoácidos idénticos, en azul a los similares y en rojo, a los no similares.

2.6. Aplicación de mutantes deficientes en la reparación de ADN dañado como estrategia de búsqueda de oligopéptidos fotoprotectores

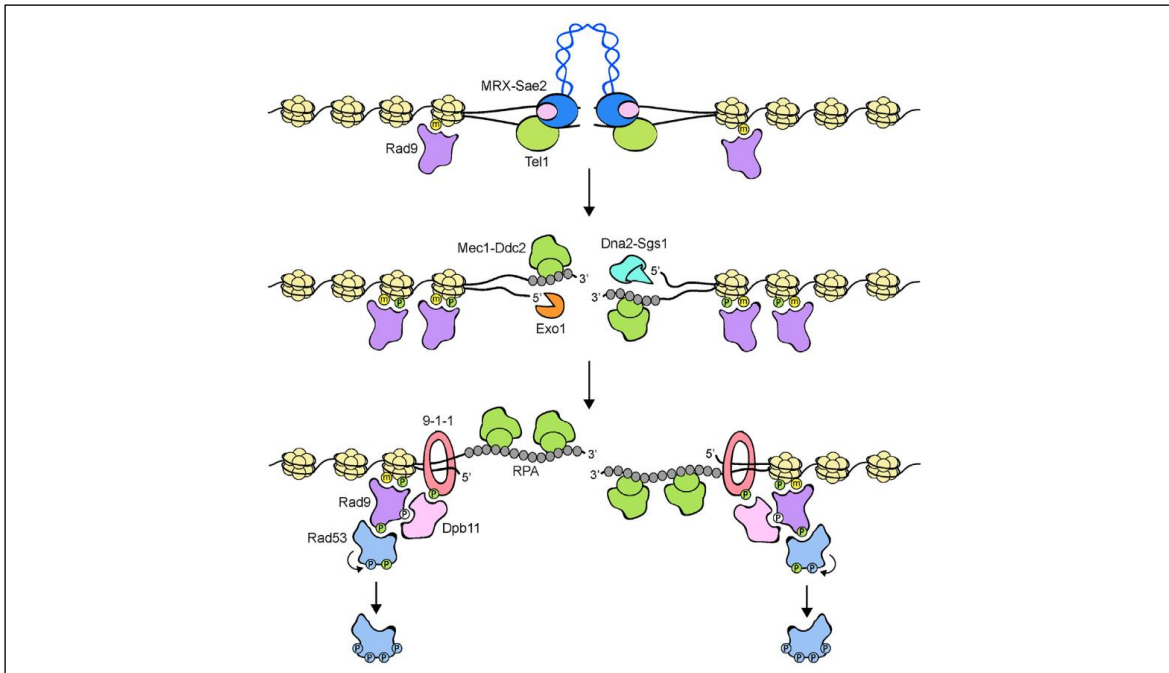


Figura 9. Asociación de Rad9 permite la activación de los mecanismos de respuesta a la presencia de roturas en las dos hebras del ADN. El complejo MRX-Sae2 se recluta rápidamente en los extremos del ADN en los que Rad9 ya está unido a la cromatina mediante la interacción con una histona metilada (puntos amarillos). A su vez, MRX unido recluta y activa Tel1, que a su vez fosforila a otra histona (puntos verdes), causando un mayor enriquecimiento de Rad9. El procesamiento por las nucleasas Exo1 y Dna2-Sgs1 genera ADN de monohebra (ssADN) que está recubierto por RPA. El ssADN recubierto con RPA permite el reclutamiento de Mec1-Ddc2 y un cambio de la señalización Tel1 a Mec1. El cargador de abrazadera 9-1-1 recluta el complejo 9-1-1 en el extremo empotrado 5' de la unión entre el ADN monohebra y de doble hebra. Mec1, a su vez, fosforila la subunidad Ddc1 del complejo 9-1-1 (puntos verdes), creando así un sitio de acoplamiento para la unión de Dpb11. Rad9, una vez fosforilado (puntos blancos), también puede unirse a Dpb11, que actúa como andamio para promover la interacción Rad9-Mec1 y, por lo tanto, la fosforilación de Rad9 por Mec1. Rad9 fosforilado actúa primero como un adaptador para acercar Rad53 a Mec1 para permitir la fosforilación de Rad53 dependiente de Mec1. Luego, Rad9 promueve la transautofosforilación de Rad53 (puntos de color azul claro) al aumentar la concentración local de moléculas de Rad53. Luego, las moléculas Rad53 completamente activadas se liberan del complejo Rad9.

FUENTE: Pizzul *et al.*, 2022

Los mecanismos de reparación del ADN dañado por agentes genotóxicos se encuentran mediados por los puntos de control (*checkpoints*) y una serie de cascadas de señalizaciones (Sancar *et al.*, 2004). Las proteínas Rad9 y Mec1 son puntos de control que se activan cuando el ADN es dañado para dar lugar a la fosforilación de múltiples componentes, como Rad53 y Chk1, para detener el ciclo celular antes de la fase de mitosis (Gilbert *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 2002). Adicionalmente, las nucleasas como Dna2 se encargan del procesamiento de roturas de doble cadena de ADN (DSB) (Pizzul *et al.*, 2022) (Figura 9). Los mutantes *rad9*, al contrario de las colonias nativas, son sensibles a la radiación UV, pues no ralentizan la replicación del ADN, por lo tanto, son defectuosas en la detención de la división.

III. METODOLOGÍA

Todos los experimentos fueron realizados en el Laboratorio de Química Biológica y Bioanálisis del Departamento Académico de Química, Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Esta tesis fue parte del proyecto financiado por el CONCYTEC-PROCIENCIA en el marco de la convocatoria Proyectos de Investigación Aplicada y Desarrollo Tecnológico 2020-02 – Fase II [Contrato N° 146-2020-FONDECYT]

3.1. Materiales

3.1.1 Cepas, cebadores y plásmidos

Se usaron dos cepas de la levadura *S. cerevisiae* (clonación, ensayos preliminares de efectos de la radiación UV) y una de *E. coli* (recuperación y amplificación de los plásmidos construidos), cuyas descripciones están resumidas en la Tabla 4.

Tabla 4: Cepas utilizadas

Cepa	Genotipo y características	Referencia
<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK (mutante <i>tfi</i> ^{NEG})	<i>MATa MAL2-8c tpi1(41-707)::loxP</i> Crecimiento deficiente en medio con concentraciones de glucosa ≥ 2 % Proveída por el Laboratorio del Dr. J. Nielsen	Liu <i>et al.</i> , 2012
<i>S. cerevisiae</i> W303	<i>MATa leu2-3, 112 his3-11,15 ura3-1 ade2-1 can1-100 trp 1-1 rad9::loxP-kanMX-loxP</i> Sensible a la radiación UV	Gutiérrez, 2021
<i>E. coli</i> Omnimax	(<i>F</i> - <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) <i>proAB</i> + <i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> Δ <i>M15Tn10</i> Δ (<i>ccdAB</i>) Adquirida de la compañía Invitrogen, presenta alta eficiencia de transformación	

En la Tabla 5 se describen a los plásmidos usados en esta investigación, indicando sus características más relevantes y su origen. Todos éstos son derivados del plásmido pTPI1 (Figura 7) que presenta al gen *tpi1*⁺ como marcador de selección y fue gentilmente cedido por el Laboratorio del Dr. Jens Nielsen.

Tabla 5: Plásmidos utilizados

Características		Origen
pTPI1	Plásmido de clonación, incluye a las secuencias del promotor y terminador del gen <i>TPI1</i> y como marcador de selección, al gen <i>tpi1</i> ⁺ de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Proveídos por el laboratorio del Dr. J. Nielsen
pTPI1-α	Plásmido control, derivado de pTPI1 que incluye a la secuencia codificante para el péptido señal del factor alfa	
pTPI1-α-amilasa	Plásmido usado como plantilla para la amplificación de los fragmentos aleatorios y semialeatorios, derivado de pTPI1- α e incluye al gen que codifica para una α -amilasa (1437 pb)	
pMR2	Plásmido usado como control de fotoprotección, derivado de pTPI1- α que incluye la secuencia codificante para un oligopéptido de dieciocho aminoácidos previamente identificado.	Secuencia identificada por R. Merino (tesis por publicar), plásmido construido por Mansilla, 2020.
pMR3	Plásmido usado como control de fotoprotección, derivado de pTPI1- α que incluye la secuencia codificante para un oligopéptido de dieciocho aminoácidos previamente identificado.	Secuencia identificada por R. Merino (tesis por publicar), plásmido construido por Mansilla, 2020.

En la tabla 6 se listan los cebadores que se usaron para la amplificación de los fragmentos aleatorios y semialeatorios, del cassette de delección *rad9::loxP-kanMX-loxP* y la verificación de la presencia de los fragmentos clonados mediante PCR.

Tabla 6: Cebadores utilizados

Cebadores		Aplicación
DLnnkRV2	TTTTATATAATTATATTAATCTTAGTTTCTAG ACTCGAGGCTAGCTTAMNNMNNMNNMNNM NNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNM NNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNM TCTCTTTTATCC	Generación de los fragmentos aleatorios
DLsemiNNKRV2	TTTTATATAATTATATTAATCTTAGTTTCTAG ACTCGAGGCTAGCTTAMNNMNNMNNMNNM NNATAMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNM NMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNM TTTTATCC	Generación de los fragmentos semialeatorios
DL02FW	TAAATCTATAACTACAAAAACACATACAT AAACTAAAAGGTACC	Generación de los fragmentos aleatorios y semialeatorios
DL02RV25	ATATTAATCTTAGTTTCTAGACTCG	Generación de los fragmentos aleatorios y semialeatorios
FW01	AGGAGTTTAGTGAACCTGCAAC	Amplificación de los fragmentos aleatorios y semialeatorios
RV01	CGTCCCTTACAAGAACATTCAC	Amplificación de los fragmentos aleatorios y semialeatorios
R9chk424UP	TATCGACGAAACCTCAAGGG	Generación del cassette de delección del gen <i>RAD9</i>
R9chk462DW	CATCAAACAGCCATGCCATGCATGC	Generación del cassette de delección del gen <i>RAD9</i>

3.1.2. Materiales

- Matraces
- Palitos de dientes estériles
- Micropipetas y puntas de 1 mL, 200 µL, 20 µL, 10 µL
- Microtubos de PCR
- Microtubos de 1.5 mL y 0.6 mL
- Pipetas estériles de 10 mL y 25 mL
- Placas Petri de 90 mm y 150 mm
- Bandejas

- Papel toalla
- Placas de 96 pocillos
- Propipeta

3.1.3. Medios de cultivo

- Medio selectivo para las cepas de levadura tfi^{NEG} (YPD, contiene extracto de levadura 1 %, peptona 2 %, glucosa 2%).
- Medio no selectivo para las cepas de levadura tfi^{NEG} (extracto de levadura 1 %, peptona 2 %, glucosa 0.05 %, etanol 1 % (v/v), glicerol 3 % (v/v)).
- Medio no selectivo para levaduras con antibiótico (contiene 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del antibiótico G418).
- Medio Luria Bertani con ampicilina para la selección de transformantes de *E. coli* (LB-Amp, contiene 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del antibiótico).

3.1.4. Soluciones y reactivos

- Alcohol etílico
- Buffer TE (Tris 10 mM pH 8.0 conteniendo 1mM EDTA)
- Isopropanol
- Enzima de lisis zymolyase T100®
- SDS 10 %
- Mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1 (v/v)
- Acetato de amonio
- Buffer TE conteniendo acetato de litio 0.1M
- Polietilenglicol (PEG) 3350 50% en buffer TE conteniendo acetato de litio 0.1M
- Agarosa
- Azul de bromofenol
- Bromuro de etidio
- Desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs)
- Enzima de restricción KpnI
- Fosfatasa antártica®
- ADN de esperma de salmón
- Marcadores de ADN de 100 pb y 1 kb
- Taq ADN polimerasa

3.1.5. Equipos

- Agitador magnético
- Balanza analítica
- Cámaras de electroforesis y fuente de poder
- Cabina de flujo laminar
- Congeladora
- Electroporador
- Baño María
- Incubadora
- Refrigeradora
- Mezclador de vórtice
- Sonicador
- Termociclador
- Transiluminador
- Ultracongeladora -80 °C
- Equipo emisor de radiación ultravioleta (equipo reticulante de UV)

3.2. Métodos

3.2.1. Construcción de la cepa sensible a la radiación UV.

La Figura 10 muestra una representación de los procedimientos seguidos para la delección del gen *RAD9* en la cepa tfi^{NEG} (*tpi1(41-707)::loxP*), esto con la finalidad de aumentar su sensibilidad a la radiación UV. Se transformó la cepa mutante tfi^{NEG} con el cassette *rad9::loxP-KanMX-loxP* siguiendo la metodología de Gutiérrez (2021). Al ingresar éste dentro de la levadura se produce la integración del cassette en las regiones flanqueantes al gen *RAD9* (representadas por los cuadros rosados), logrando el reemplazo de la secuencia *RAD9* por el cassette, para generar el mutante *rad9 tfi^{NEG}*.

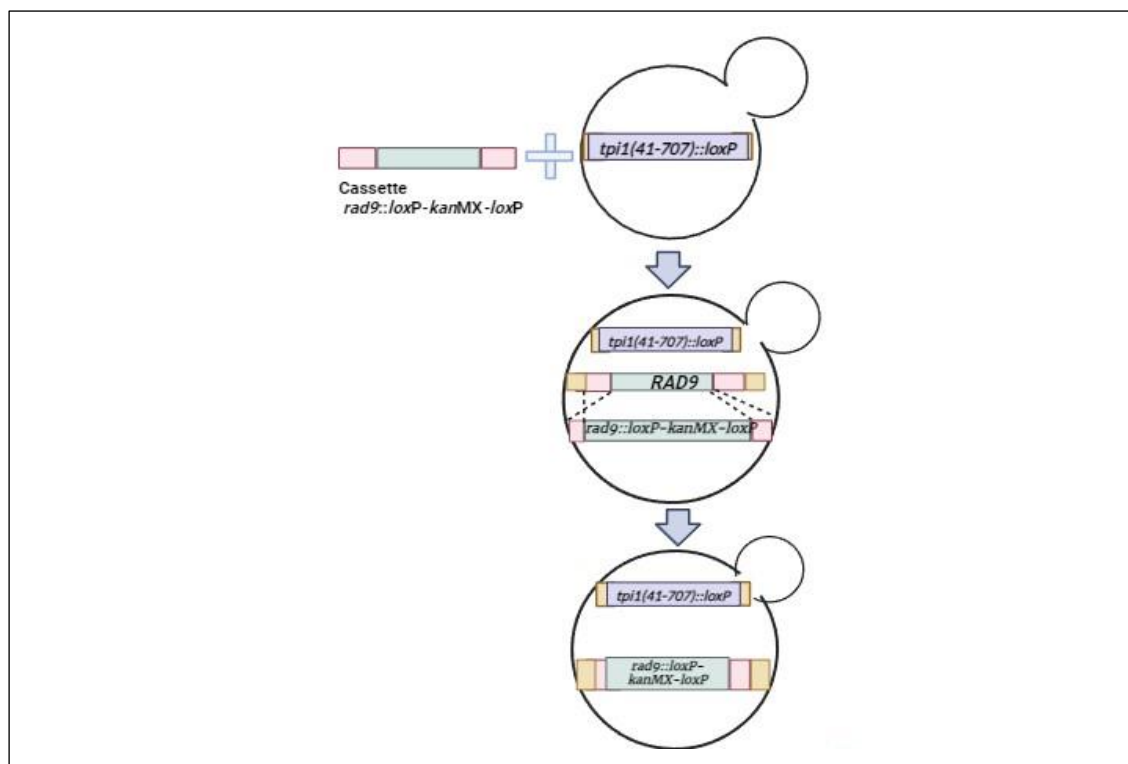


Figura 10. Representación esquemática de la estrategia seguida para la remoción del gen *RAD9*. El cassette *rad9::loxP-kanMX-loxP* fue amplificado a partir del ADN genómico de un mutante anteriormente construido y, posteriormente, fue usado para transformar la cepa *tfi^{NEG}*. Este cassette reemplaza al gen *RAD9* y genera resistencia al antibiótico G418, un antibiótico aminoglucósido similar a la kanamicina.

La amplificación del cassette fue realizada por PCR, con las características indicadas en la Tabla 7.

Tabla 7: Composición de la mezcla usada para la amplificación por PCR del cassette de delección del gen *RAD9*

Componentes	Volúmenes (µL)
ADN total de la cepa <i>rad9</i> (W303, plantilla)	1.0
Buffer Taq ABM 10X	5.0
Cloruro de magnesio (50 mM)	3.1
Taq polimerasa ABM (5 U/µL)	0.5
dNTPs (25 mM)	0.5
Cebador R9chk424UP (50 µM)	1.0
Cebador R9chk462DW (50 µM)	1.0
Agua	37.9

Una vez preparada la mezcla, se procedió a llevar a cabo la amplificación por PCR. Inicialmente se realizó una desnaturalización a 95 °C por 90 segundos y luego se procedió con los ciclos, que incluyó la etapa de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, la etapa de hibridación a 53 °C por 30 segundos y la etapa de extensión a 72 °C por 30 segundos, repitiendo el proceso en un total de 25 ciclos, para finalizar con una extensión a 72 °C por 180 segundos.

Con el cassette amplificado, se hizo la transformación de la cepa *tfi*^{NEG} por choque térmico. La presencia de regiones homólogas en el cassette y en las regiones flanqueantes del gen *RAD9* permiten la recombinación y con ello la delección del gen *RAD9*. Los transformantes se seleccionaron en el medio no selectivo para la cepa *tfi*^{NEG} que incluía el antibiótico G418 (50 µg/mL). Para verificar la presencia del cassette (obtención del doble mutante *rad9::loxP-kanMX-loxP tpi1(41-707)::loxP*, denotado como *rad9 tfi*^{NEG}) se realizó el ensayo de sensibilidad a la radiación UV.

3.2.2. Generación de los fragmentos aleatorios y semialeatorios a clonar

El diseño de los cebadores se realizó usando como guía al plásmido pTPI1- α -amilasa, de tal forma que los fragmentos amplificados incluyan las secuencias homólogas al plásmido pTPI1, y las secuencias codificantes para el péptido señal del factor alfa y los oligopéptidos aleatorios o semialeatorios. La secuencia codificante para los oligopéptidos aleatorios incluyó dieciocho tripletes degenerados NNK. En éstos, **N**= guanina (G), timina (T), citocina (C) o adenina (A); y **K**= G o T. Los oligopéptidos semialeatorios se generaron a partir de fragmentos que incluían quince tripletes NNK y tres codones TAT, codificantes para tirosina, ubicadas cada cinco tripletes NNK. La composición de la mezcla para la amplificación de los fragmentos por PCR se detalla en la tabla 8.

Tabla 8: Composición de la mezcla usada para la amplificación por PCR de los fragmentos aleatorios y semialeatorios a ser clonados.

Componentes	Volúmenes (μL)
pTPI1- α -amilasa (31 ng/ μL)	1.0
Buffer Taq ABM (10X)	5.0
Cloruro de magnesio (50 mM)	3.1
Taq polimerasa ABM (5 U/ μL)	0.5
dNTPs (25 mM)	0.5
Cebador DLnnkRv2 o DLseminnkRv2 (50 μM)	2.0
Cebador DLfw02 (50 μM)	4.0
Cebador DL02Rv25 (50 μM)	4.0
Agua	29.9

La estrategia de amplificación por PCR comprendió dos rondas. En la primera, se agregaron todos los componentes de la mezcla maestra excepto por los cebadores, dentro de los cuales solo se incluyó uno, el cebador DLnnkRv2 o DLseminnkRv2, de tal forma que se generen solo las cadenas monocatenarias correspondientes. El protocolo de PCR al que se sometió esta mezcla consistió en una previa desnaturalización a 95 °C por 90 segundos, seguida de treinta ciclos de: desnaturalización a la misma temperatura por 30 segundos, luego una hibridación a 50 °C por 30 segundos y después una extensión a 72 °C por 45 segundos. Inmediatamente después, se agregó el cebador DLfw02 y se realizaron tres ciclos: desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, hibridación a 50 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 45 segundos. Finalmente, se adicionó el cebador DL02Rv25 y se amplificó por tres ciclos, con las mismas condiciones descritas en líneas anteriores. Los ciclos de PCR se encuentran representados en las figuras 11, 12 y 13.

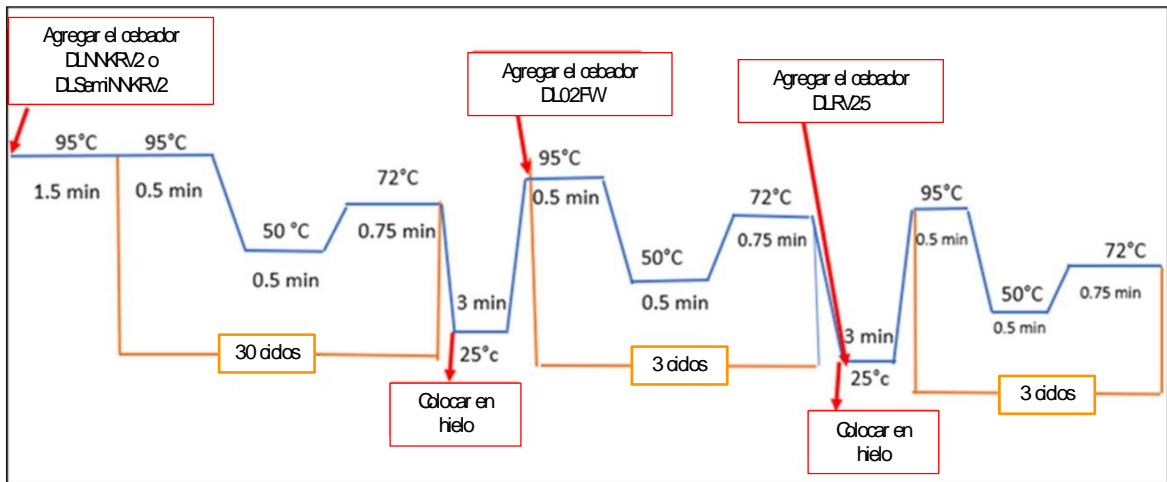


Figura 11. Estrategia de PCR aplicada para la amplificación de los fragmentos aleatorios y semialeatorios. Inicialmente se agrega el cebador reverse DLNNKR/2 o DLsemiNNKR/2, dependiendo de la biblioteca, a la mezcla maestra de PCR, luego se realiza una desnaturalización previa a 95 °C por 1.5 minutos y luego se inician los treinta ciclos comprendidos por desnaturalización a 95 °C, hibridación a 50 °C y extensión a 72 °C. Se colocan los tubos inmediatamente a temperatura ambiente para adicionar el cebador directo DL02FW. La mezcla es sometida a una segunda ronda de PCR, con tres ciclos para generar los fragmentos bicatenarios, y tres ciclos adicionales después de agregar el cebador reverse DLR/25, para permitir su amplificación.

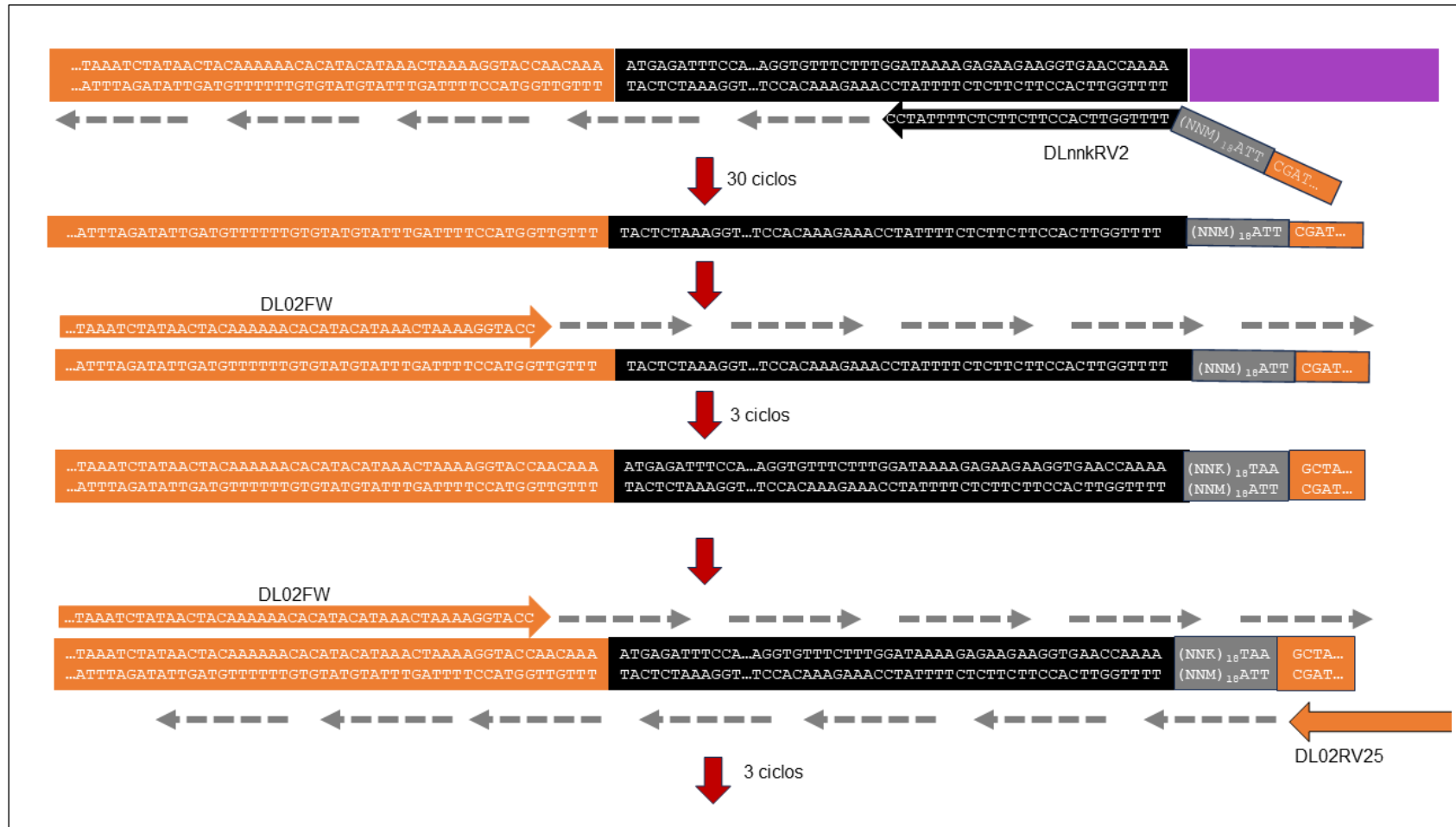


Figura 12. Representación del procedimiento seguido para la obtención de los fragmentos aleatorios por PCR. En los primeros 30 ciclos, el cebador DLnnkRV2 es extendido incorporándose la secuencia codificante para el péptido señal alfa, usando el plásmido pTPI1- α -amilasa como plantilla. Como resultado se obtienen cadenas monocaterianas de diversa longitud. Después de completar los treinta ciclos se adiciona el cebador DL02FW, para que mediante tres ciclos se formen los fragmentos aleatorios de la longitud requerida. Seguidamente, se agrega el cebador DL02RV25 para permitir otros tres ciclos de amplificación.

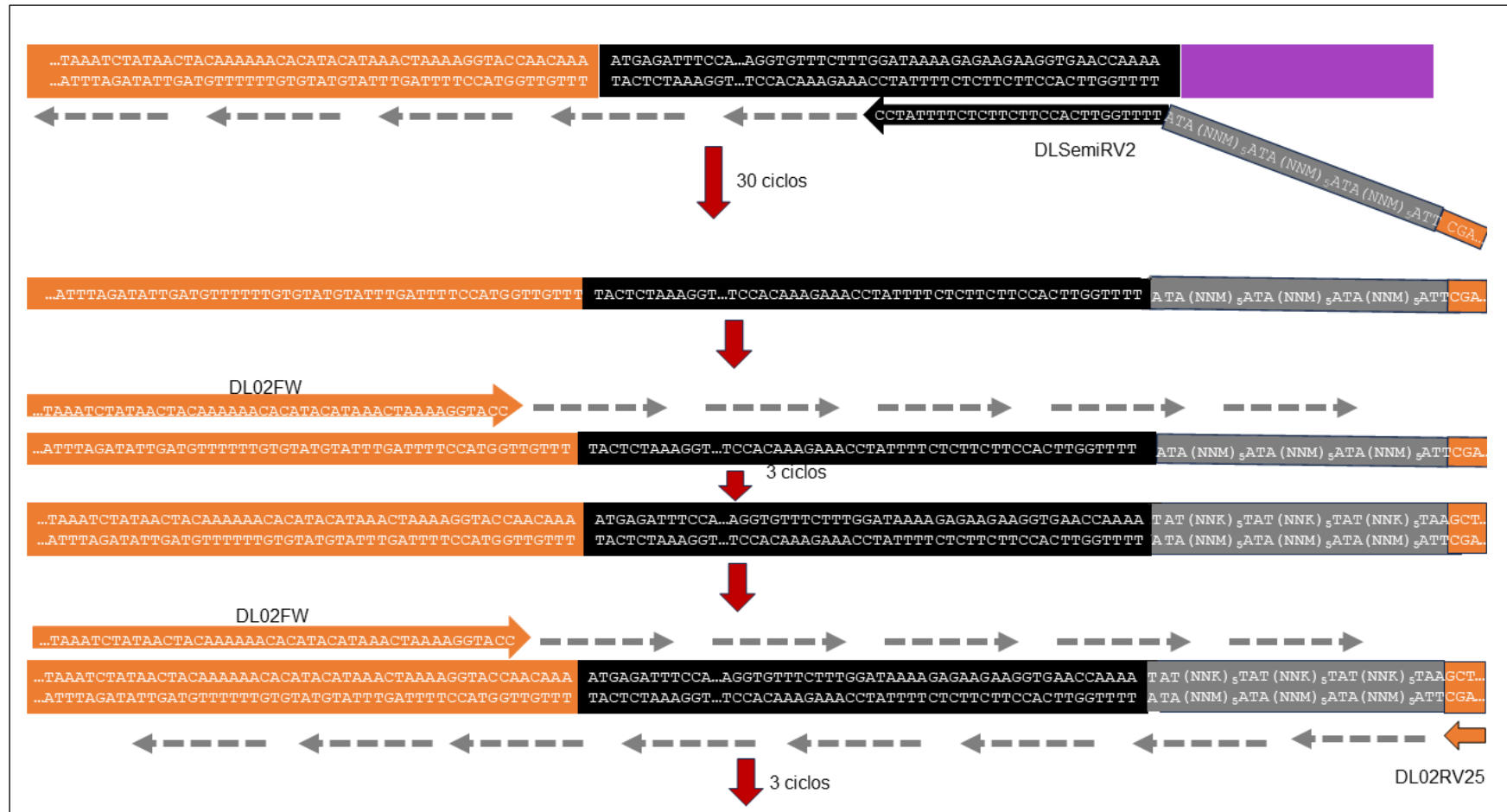


Figura 13. Representación del procedimiento seguido para la obtención de los fragmentos semialeatorios por PCR. En los primeros 30 ciclos, el cebador DLseminnkRV2 es extendido incorporándose la secuencia codificante para el péptido señal alfa, usando el plásmido pTPI1- α -amilasa como plantilla. Como resultado se obtienen cadenas monocaterianas de diversa longitud. Después de completar los treinta ciclos se adiciona el cebador DL02FW, para que mediante tres ciclos se formen los fragmentos semialeatorios de la longitud requerida. Seguidamente, se agrega el cebador DL02RV25 para permitir otros tres ciclos de amplificación.

3.2.3. Construcción de dos bibliotecas de plásmidos con insertos aleatorios o semialeatorios mediante clonación *in vivo*

El plásmido pTPI1 se linealizó mediante la enzima de restricción *KpnI*, que corta “*aguas arriba*” de la secuencia del promotor *TPII* (Figura 7). La mezcla para la digestión se realizó como está señalado en la tabla 9. Después de incubar la mezcla a 37 °C por tres horas, se trató al plásmido con una fosfatasa (Antarctic Phosphatase®, NEB #M289S). El procedimiento de desfosforilación se realizó agitando vigorosamente primero al plásmido digerido con la mezcla fenol-cloroformo-álcool isoamílico en una proporción 25:24:1, recuperando el sobrenadante acuoso por centrifugación y luego añadiendo buffer acetato 7.5M y etanol al 96 %. Después de centrifugar a 12000 rpm por 15 minutos, el sedimento fue lavado con etanol al 90 % y luego de ser secado, se resuspendió en una mezcla de 10 µL de buffer fosfatasa NEB (10X), 2 µL de fosfatasa antártica NEB (5U/µL) y un volumen suficiente de agua para un volumen final de 100 µL. La mezcla se incubó a 37 °C por 30 minutos para la reacción de desfosforilación y luego a 65 °C por 20 minutos para inactivar a la enzima. En cada caso, la adecuada digestión e integridad del ADN plasmídico se verificó mediante análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8 %.

Tabla 9: Composición de la mezcla usada para la digestión del plásmido pTPI1

Reactivos	Volumen
Buffer NEB 10X	10 µL
Albúmina de suero bovino (10 mg/mL)	1 µL
Plásmido pTPI1 (2 µg/µL)	5 µL
Enzima <i>KpnI</i> NEB (10 U/µL)	4 µL
Agua	80 µL

Para la transformación (clonación *in vivo* y construcción de las bibliotecas, Figura 14), se cultivó la cepa *rad9 tfi^{NEG}* en caldo no selectivo hasta que alcance una densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) de 1.0. Luego, se colectaron las células mediante centrifugación y éstas fueron resuspendidas en medio no selectivo, que incluye HEPES 10mM y 2-mercaptoetanol 10mM. Los cultivos fueron incubados a 30 °C a una agitación de 90 RPM por 20 minutos. Culminado el tiempo, se lavaron las células primero con agua helada, luego con sorbitol 1M y finalmente se resuspendieron en suficiente volumen de sorbitol 1M hasta obtener una

densidad aproximada de 10^{10} células/mL. La transformación se realizó mezclando 40 μ L de la suspensión celular, 42 ng del fragmento a clonar y 120 ng del plásmido digerido y desfosforilado. Luego, se trasvasó la mezcla a una cubeta de 2 mm para proceder a la electroporación con un pulso de 1500 V, e inmediatamente después, se añadió 960 μ L de sorbitol 1M. Las células fueron colectadas mediante centrifugación, resuspendidas en caldo no selectivo e incubadas a 30 °C por 60 minutos. Finalmente, se plaquearon 150 μ L de la mezcla de los transformantes en placas de 150 mm en medio selectivo (YPD). Las placas fueron nuevamente incubadas a 30 °C por 15 horas.

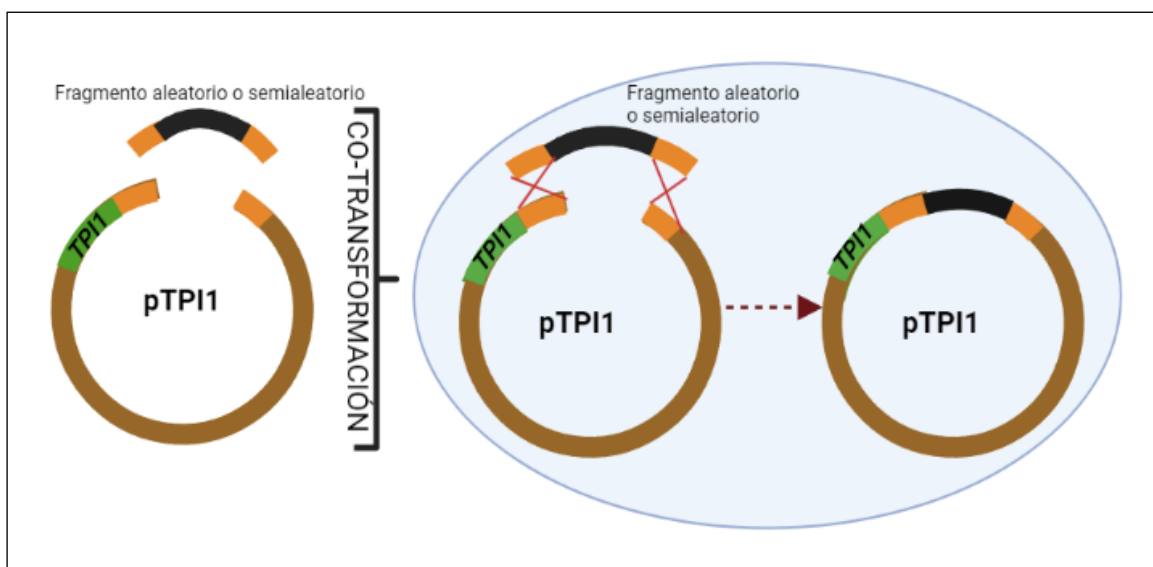


Figura 14. Representación del proceso de clonación *in vivo* en *S. cerevisiae*. El fragmento aleatorio o semialeatorio y el plásmido pTPI1 linealizado fueron usados para transformar a las células de levadura. En cada transformante se realizó la recombinación homóloga para completar la clonación. Los cuadros de color naranja representan a las regiones flanqueadas homólogas y el cuadro negro a las secuencias que codifican para el péptido señal alfa y los oligopéptidos aleatorios o semialeatorios.

FUENTE: Modificado de Merino (2019)

Para las transformaciones a menor escala, se usó un protocolo basado en la aplicación de choque térmico. La transformación se inició con el cultivo de la cepa *rad9 tfi^{NEG}* en caldo no selectivo y se dejó crecer a 30 °C hasta obtener una DO_{600nm} de 0.6. Para colectar a las células se centrifugó el cultivo obtenido a 4500 rpm por 1 minuto, el sedimento fue lavado con buffer TE conteniendo acetato de litio 0.1M y resuspendido con 350 μ L del mismo buffer. Cada transformación se realizó con 70 μ L de la suspensión, con 42 ng del fragmento aleatorio o semialeatorio, 120 ng de plásmido pTPI1 linealizado, 10 μ L de ADN de esperma de salmón (10 mg/mL), 1 mL de mezcla de PEG 3350 50% en buffer TE con acetato de litio 0.1M. Luego, la mezcla se incubó a temperatura ambiente en un rotador por 1 hora, para proceder luego al tratamiento a 42 °C por 20 minutos. Los transformantes fueron recuperados en caldo no selectivo por 1 hora y seleccionados en placas YPD.

Para el análisis de los transformantes y la verificación de los plásmidos generados, se seleccionaron al azar 18 transformantes de cada biblioteca, para la extracción del ADN total (ADN genómico + plásmido). Para este procedimiento, se dejó crecer los transformantes en 3 mL de medio selectivo, se colectó el sedimento para realizar lavados con 1 mL de agua, luego se resuspendió con 1 mL de buffer de ruptura (50 mM buffer Tris pH 7.5, 10mM EDTA, 0.3 % beta mercaptoetanol) y finalmente se agregó 60 μ L de la solución de la enzima zymolyase 100T (5mg/mL). La reacción enzimática se realizó a 30 °C por 60 minutos. Después del tiempo cumplido, se agregó 37 μ L de SDS 10 %, se dejó reposar unos minutos hasta que la mezcla sea transparente, inmediatamente se adicionó 150 μ L de acetato de amonio 7.5 M . La mezcla se dejó reposar a -20 °C por 15 minutos, se centrifugó a 13000 RPM por 15 minutos para finalmente separar el sobrenadante a un nuevo microtubo. Para la precipitación del ADN total, se agregó el mismo volumen de alcohol isopropílico que el volumen recuperado del sobrenadante, luego se reposó por 15 minutos a temperatura ambiente para permitir su precipitación. El plásmido precipitado se recuperó mediante centrifugación a 13000 RPM por 15 minutos. El precipitado fue lavado con etanol al 70 % (p/p), por tres veces, y luego de remover el sobrenadante, se dejó secar por aproximadamente 30 minutos y una vez seco se disolvió con 100 μ L de buffer TE 0.5X.

La verificación de la presencia de los fragmentos aleatorios y semialeatorios se llevó a cabo mediante ensayos de PCR como se indica en la tabla 10. El protocolo seguido incluyó una desnaturalización inicial a 95 °C por 120 segundos, seguido de 25 ciclos que incluye: etapa de hibridación a 53.5 °C por 30 segundos, etapa de extensión a 72 °C por 60 segundos y etapa de desnaturalización a 95 °C por 60 segundos. Al finalizar, se incluyó una extensión a 72 °C por 30 segundos.

Los fragmentos amplificados pueden ser de tres tipos: el que corresponde a la secuencia aleatoria o semialeatoria clonada en el plásmido (663 pb), el formado a partir del plásmido recircularizado que por tanto carece del inserto (327 pb); y por último, el que proviene del ADN genómico y contiene secuencias del gen *TP11* modificado (412 pb, *tpi1(41-707)::loxP*).

Tabla 10: Composición de la mezcla usada para la verificación por PCR de la presencia de los fragmentos aleatorios y semialeatorios en los plásmidos purificados.

Componentes	Volumen
Plantilla: ADN total de colonias de los transformantes seleccionados y como controles, los plásmidos pTPI1 (60 ng/ μ L) y pMR3 (60 ng/ μ L).	1 μ L
Buffer Taq ABM 10X	1 μ L
Cloruro de magnesio 50mM	0.25 μ L
Taq polimerasa ABM 5 U/ μ L	0.25 μ L
dNTP 25 mM	0.20 μ L
Cebador directo FW01 50 μ M	0.25 μ L
Cebador reverso RV01 50 μ M	0.25 μ L
Agua	21.8 μ L

Para verificar la diversidad de secuencias en los fragmentos clonados, los plásmidos seleccionados de algunas colonias de las bibliotecas fueron sometidos a análisis de secuenciamiento de nucleótidos. Para ello, se usó el ADN total de colonias de transformantes seleccionados al azar de cada biblioteca, para que las células de *E. coli* sean transformadas y se logre recuperar a cada uno de los plásmidos. La purificación de estos plásmidos se realizó mediante el kit Zyppy Plasmid Miniprep de ZYMO RESEARCH. El secuenciamiento fue solicitado a la compañía Macrogen (Seúl – Corea).

3.2.4. Ensayos preliminares de fotoprotección

Se realizó la transformación de la cepa *rad9* tif^{NEG} con los plásmidos pMR2 y pMR3 que incluyen secuencias codificantes de oligopéptidos obtenidos en un anterior estudio (Merino, 2019), denominados P2 y P3. También se usó un plásmido obtenido a partir de las bibliotecas construidas y, como control, al plásmido sin ningún inserto, pTPI1- α . La transformación se realizó por choque térmico, siguiendo los pasos descritos en la sección anterior. Para seleccionar a los transformantes, se dejaron crecer en medio selectivo a 30 °C por 48 horas.

Los transformantes a ensayar fueron cultivados en 2 mL de caldo selectivo y posteriormente, se cuantificó la densidad celular usando una cámara Neubauer y según estos resultados, se determinaron las diluciones y volúmenes requeridos para obtener un aproximado de 300 colonias por cada placa. Después de esparcir las respectivas alícuotas en placas con medio

selectivo, se dejó en incubación a 30 °C por 20 horas. Para el tratamiento con radiación UV, se cubrieron la mitad de las placas con papel de aluminio (control sin irradiar), para luego exponerlas a una potencia de 0,09 J/cm² con el equipo reticulante de UV (figura 15). Para evidenciar el daño del ADN, se dejó a incubar las placas a 30 °C en oscuridad por 48 horas.



Figura 15. Equipo reticulante emisor de radiación UV utilizado para los ensayos de fotoprotección. Este tipo de equipos, es generalmente usado para la reticulación de ADN o ARN inmovilizado en membranas de nylon y otros. Sin embargo, debido a que provee dosis precisas de radiación UV, es también utilizado para los ensayos de resistencia o sensibilidad. En este caso, el equipo es del modelo 23410 de la marca Boekel Scientific y utiliza una lámpara UV de 306 nm (UVB).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Construcción de la cepa mutante *rad9*

Las bibliotecas de plásmidos aleatorias y semialeatorias construidas como parte de esta investigación pueden ser aplicadas para diferentes propósitos, dependiendo del tipo de oligopéptido que se requiere identificar. Una aplicación programada en el Laboratorio de Química Biológica y Bioanálisis, en estudios posteriores, será la búsqueda de oligopéptidos con capacidad fotoprotectora. Por esta razón, se optimizaron los protocolos para construir las bibliotecas de plásmidos en una cepa de levadura que sea sensible a la radiación UV, para facilitar esa búsqueda: Primero se realizó la delección del gen *RAD9* en la cepa *tpi1(41-707)::loxP*, siguiendo la estrategia descrita en la figura 9. La proteína Rad9 funciona como un punto de control (*checkpoint*) de la reparación del ADN dañado por agentes genotóxicos, por ello, su ausencia conduce a una mayor sensibilidad a la radiación UV. Para la delección, se tomó ventaja de la disponibilidad de un mutante *rad9::loxP-kanMX-loxP* (gen *RAD9* completamente reemplazado por el cassette *loxP-kanMX-loxP*) en una cepa de levadura de tipo W303. Se procedió a amplificar el cassette de delección *rad9::loxP-kanMX-loxP* mediante PCR, usando como plantilla el ADN total de esta cepa (tabla 7), para después introducirlo en la cepa *tpi1(41-707)::loxP*. El doble mutante será denotado de aquí en adelante como la cepa *rad9 tfi^{NEG}*.

El cassette de delección fue obtenido por PCR y la verificación de la cantidad y tamaño del producto generado (1.7 kb) se realizó mediante corrida electroforética en gel de agarosa al 1.2 % (figura 16a). Este producto de PCR fue usado para transformar a la cepa *tpi1(41-707)::loxP*, cultivando las suspensiones resultantes en el medio no selectivo, con bajas concentraciones de glucosa, que incluía al antibiótico de G418 con la finalidad de seleccionar colonias resistentes (por la integración del gen que confiere resistencia a la kanamicina y derivados, incluido en el cassette). Varios de estos transformantes fueron cultivados y para verificar su nivel de sensibilidad a la radiación UV. Los resultados son mostrados en la figura 16b, donde se comparan cultivos de los posibles mutantes *rad9 tfi^{NEG}* y cepas no delecionadas que incluyen todavía el gen *RAD9* (*tfi^{NEG}*). Cuando se comparan la

placa irradiada y la no irradiada podemos evidenciar el daño que produce la radiación a las células. En todos los casos, cuando comparamos los niveles de proliferación en la placa irradiada, observamos que los mutantes *rad9 tfi^{NEG}* muestran mayor sensibilidad a esta radiación, verificando así, la delección del gen *RAD9*.

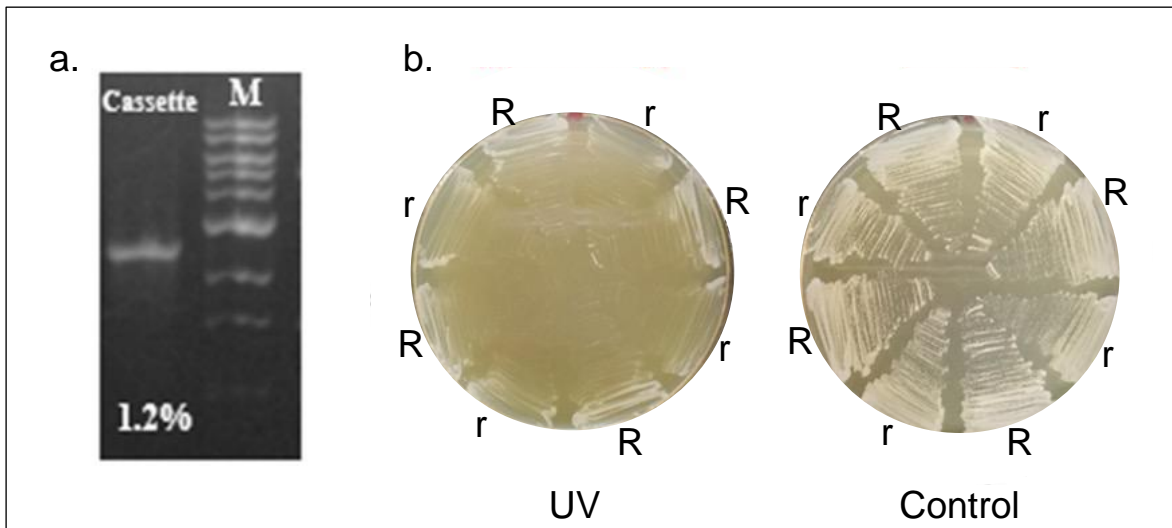


Figura 16. Construcción de la cepa *rad9::loxP-kanMX-loxP tpi1(41-707)::loxP (rad9 tfi^{NEG})*. a. Verificación de la obtención mediante PCR del cassette de delección *rad9::loxP-kanMX-loxP*, del tamaño esperado de 1,7 kb (gel de agarosa 1.2 %, M = marcador de tamaño). b. Comparación de la sensibilidad de la cepa *rad9 tfi^{NEG}* a la radiación UV. Cultivos de diferentes clones que incluyen el gen *RAD9* (“R”) o las que tienen el gen delecionado (“r”) fueron irradiados con una dosis de UV 0,045 J/cm² (placa “UV”) o incubados sin irradiar (placa “Control”).

4.2 Obtención del plásmido pTPI1 linealizado y productos de PCR para la construcción de las bibliotecas

La construcción de la biblioteca se inició con la linealización del plásmido pTPI1, usando la enzima de restricción *KpnI*, y su desfosforilación para evitar la recirculación. La eficiente digestión y la cantidad de plásmido presente fueron confirmados mediante análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8 % (figura 17a).

El éxito de la construcción de una biblioteca de plásmidos aleatorios o semialeatorios depende directamente de la diversidad de las respectivas secuencias en los fragmentos clonados. Por esta razón, era importante implementar la estrategia adecuada para la construcción y por esta razón, se optó por incluir los codones degenerados NNK. Esta metodología es una alternativa de aleatorización de fragmentos que reducen los esfuerzos de búsqueda de oligopéptidos de interés, pues solo tienen una sola secuencia stop, se reduce la redundancia al 50 % y se distribuyen los codones residuales (Kille *et al.*, 2013).

Los oligonucleótidos usados para la generación de los fragmentos fueron diseñados de manera tal que incluyan los codones degenerados NNK, considerando 18 de éstos para la biblioteca aleatoria y 15 para la semialeatoria (que incluye además tres codones TAT codificantes para tirosina). Una vez establecida la estrategia, era de suma importancia también el implementar un protocolo que permita generar los fragmentos a clonar, aleatorios o semialeatorios, con alto rendimiento, pero sobre todo, de manera tal que se preserve los niveles de diversidad obtenidos durante la síntesis de los oligonucleótidos. Los detalles de la metodología han sido descritos en la sección 3.2.3, las figuras 11 a 13 y la tabla 8.

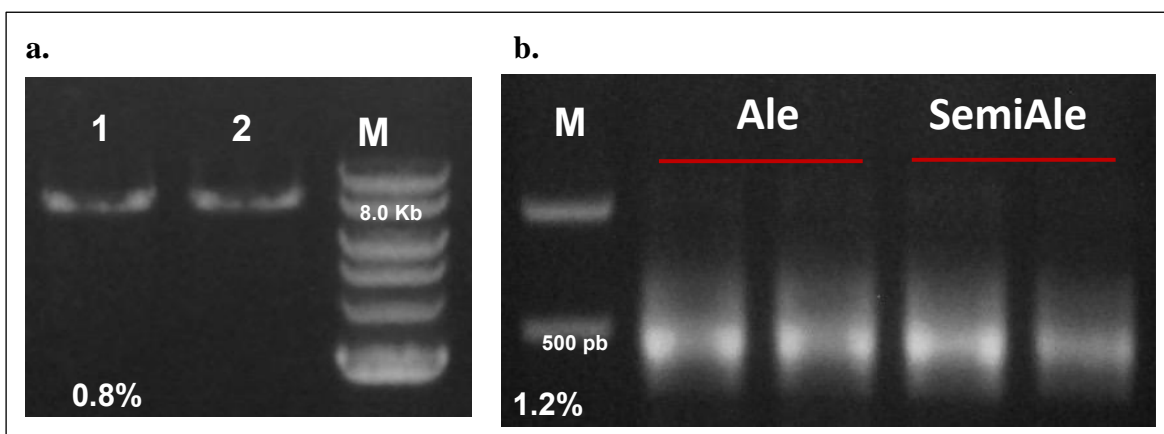


Figura 17. Obtención del plásmido pTPI1 linealizado y los fragmentos aleatorios y semialeatorios a clonar. **a)** Análisis electroforético del plásmido pTPI1 digerido con la enzima *KpnI* y con extremos desfosforilados. Dos muestras fueron procesadas independientemente y analizadas en los carriles 1 y 2. Después de verificada la calidad de las mismas, las soluciones fueron mezcladas y mantenidas a -20°C hasta su uso. **b)** Corrida de electroforesis en gel de agarosa (1.2 %) de los productos de PCR de los fragmentos aleatorios (Ale) y semialeatorios (SAle). El marcador M que se usó en la corrida del plásmido linealizado es de 1000 pb y el marcador M para la corrida de productos de PCR de fragmentos es de 100 pb.

Como se puede apreciar en la figura 17, se generaron cantidades adecuadas tanto del plásmido pTPI1 linealizado y desfosforilado, como de los fragmentos aleatorios y semialeatorios a clonar. Para estos últimos, es necesario destacar que el protocolo de PCR desarrollado para su generación fue muy particular, y consistió en un total de 36 ciclos, usando el plásmido pTPI1- α -amilasa como plantilla. Importantemente, los 30 primeros ciclos tenían como propósito lograr la eficiente elongación o extensión de los respectivos oligonucleótidos aleatorios o semialeatorios que incluyen los codones degenerados (DLNNKRV2 o DLSEMINNKRV2). Los tres ciclos siguientes se dieron después de la adición del cebador DL02FW para generar los respectivos fragmentos bicatenarios. Finalmente, después de la adición del cebador DLRV25 se permitió la amplificación de los fragmentos generados (415 pb), limitando el número de ciclos a solo tres, en un intento de preservar la diversidad de las secuencias. De esta manera, en los fragmentos aleatorios o semialeatorios generados se incluyen además de los codones degenerados, las secuencias

codificantes para el péptido señal del factor alfa y de las flanqueantes homólogas al plásmido para permitir la clonación *in vivo*. Estos fragmentos y el plásmido linealizado fueron usados para transformar la cepa *rad9 tfi^{NEG}*, usando el medio selectivo con alto contenido de glucosa para el crecimiento de las colonias de transformantes.

4.3 Determinación de la eficiencia de clonación en las bibliotecas construidas

Debido a que las colonias obtenidas en el medio selectivo después de la transformación podían incluir plásmidos recircularizados (sin inserto) o recombinantes (aleatorios o semialeatorios), era importante determinar la eficiencia de clonación. Para este ensayo se seleccionaron 18 colonias de cada una de las bibliotecas, para determinar mediante PCR si los respectivos plásmidos contenían o no un inserto. La amplificación de los fragmentos se realizó usando ADN total (genómico + plasmídico) purificado de cada uno de los transformantes, y los cebadores RV01 y FW01.

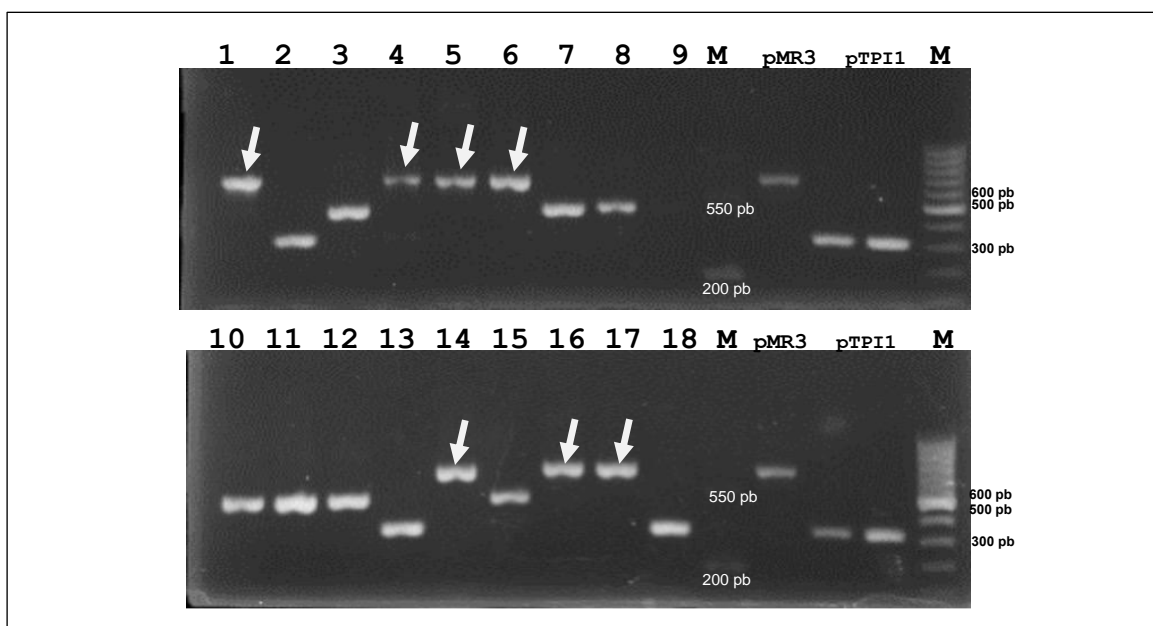


Figura 18. Resultados de los ensayos de PCR implementados para determinar la presencia de plásmidos recombinantes en los transformantes de la biblioteca aleatoria. Se usó ADN total recuperado de 18 transformantes para realizar la amplificación, utilizando los plásmidos pMR3 y pTPI1 como controles. El análisis electroforético se hizo en gel de agarosa al 1,2%. Uno de los marcadores de tamaño usados fue preparado en el laboratorio y presenta bandas de 550 pb y 200 pb y el otro es comercial, de 100 pb (Fermentas). El producto formado a partir de un plásmido recircularizado (pTPI1) sería de 327 pb (carriles 2, 13, 18), mientras que un plásmido recombinante daría lugar a uno de 663 pb (carriles 1, 4, 5, 6, 14, 16, 17 señalados con las flechas blancas, y el plásmido control pMR3). Los carriles 3, 7, 8, 10, 11, 12, y 15 presentan bandas de aproximadamente 412 pb, por lo que se puede inferir que provienen de la amplificación del respectivo fragmento genómico.

Bajo las condiciones del protocolo de PCR aplicadas, considerando que las muestras de ADN total incluyen ADN genómico y plasmídico, se esperaba obtener productos de 663 pb si el plásmido contenía un inserto aleatorio o semialeatorio, de 327 pb para el plásmido pTPI1 sin inserto; y además, de 412 pb si se amplificaba el fragmento genómico correspondiente al gen *TPI1* mutado, *tpi1(41-707)*. En la figura 18, se muestran los resultados de los ensayos de los transformantes de la biblioteca aleatoria. Como control positivo se incluyó en el ensayo a una solución del plásmido purificado, pMR3, construido en el trabajo de una tesis anterior (Mansilla, 2021). Adicionalmente se incluyeron dos reacciones con diferentes preparaciones del plásmido vacío pTPI1. Las bandas en los carriles 1, 4, 5, 6, 14, 16 y 17; y la presente en la reacción con el plásmido pMR3 corresponden a los productos de alrededor de 663 pb, esperados si el plásmido presenta un inserto. Así mismo, se observan tres bandas ubicadas en el carril 3, 13 y 18 que corresponden al plásmido recircularizado y están también presentes en las reacciones con el plásmido pTPI1. Las otras reacciones solo muestran bandas que corresponden al fragmento genómico. Por lo tanto, si se comparan los números de plásmidos con inserto (siete) y los recircularizados (tres), se puede asignar una eficiencia de clonación de 70 % para la biblioteca aleatoria.

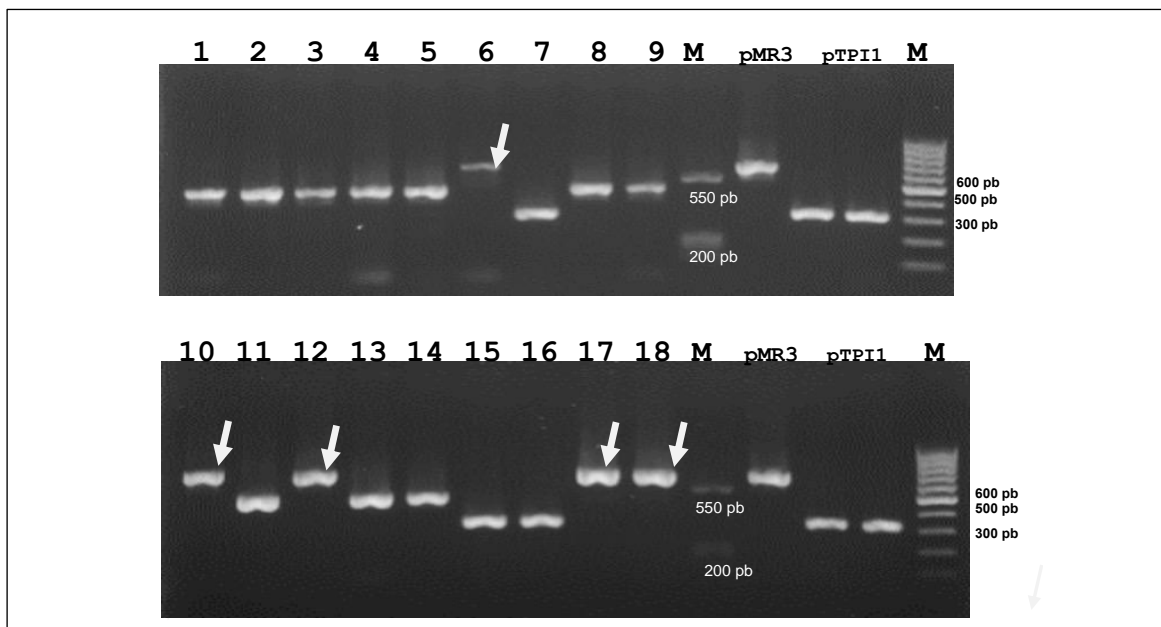


Figura 19. Resultados de los ensayos de PCR implementados para determinar la presencia de plásmidos recombinantes en los transformantes de la biblioteca semialeatoria. Se analizaron el ADN total purificado de 18 colonias transformantes, siguiendo el mismo procedimiento descrito en la figura 17. En este caso, los carriles 6, 10, 12, 17 y 18 presentan bandas del tamaño esperado para un plásmido recombinante (663 pb), mientras que las muestras 7, 15 y 16 corresponden a plásmidos recircularizados (327 pb). Las demás muestras presentan productos que probablemente provienen de la amplificación del fragmento genómico del gen mutado (*tpi1(41-707)*).

Los resultados del análisis de los transformantes de la biblioteca semialeatoria se muestran en la figura 19. En éstos, los carriles 6, 10, 12, 17 y 18 presentan bandas del tamaño esperado ante la presencia de un plásmido recombinante (663 pb), mientras que en los carriles 7, 15 y 16 corresponden al plásmido recircularizado (327 pb). Por lo tanto, en este caso se puede estimar una eficiencia de clonación de 62.5 %.

4.4 Verificación de la correcta construcción de los plásmidos y de la diversidad de las secuencias en los fragmentos clonados

Los transformantes SAle12, SAle17, Ale5, Ale4 y Ale16 fueron seleccionados para proceder con los ensayos de verificación. Primero, para recuperar a los respectivos plásmidos se extrajo el ADN total de cada transformante. Estas soluciones fueron usadas para a su vez, transformar la cepa *E. coli* Omnimax para permitir la amplificación de los plásmidos. Luego, se cultivaron los transformantes de *E. coli* en caldo LB conteniendo ampicilina y se procedió a la purificación de los respectivos plásmidos y su envío para el análisis de secuenciamento de nucleótidos.

SAle12	TAT	CAG	CCG	GTG	CCG	ACG	TAT	CAT	CCG	GAG	AAT	TCG	TAT	GCT	TGT	ACG	GCG	AGG	TAA
	Y	Q	P	V	P	T	Y	H	P	E	N	S	Y	A	C	T	A	R	*
SAle17	TAT	GTT	ACG	CCG	AAG	TGG	TAT	TGG	GAG	AAT	CCG	GCG	TAT	CGT	GTG	CAG	CAG	AAG	TAA
	Y	G	T	P	K	W	Y	W	E	N	P	A	Y	R	V	Q	Q	K	*
Ale5	GTT	TTG	TTT	TGT	CGG	TTT	GCT	ATT	ATT	CCT	ACG	TGG	CCT	GGT	GTG	CCG	TTG	GCT	TAA
	V	L	F	C	R	F	A	I	I	P	T	W	P	G	V	P	L	A	*
Ale4	CCT	TGG	AGG	TAG	ACG	GAT	AAG	ACG	CCG	CAG	CCG	CCG	TGG	CCG	AAT	ACT	GAG	TGT	TAA
	P	W	R	*	T	D	K	T	P	Q	P	P	W	P	N	T	E	C	*
Ale16	CAG	GAT	ACT	AAG	GTG	ACT	TTG	CCT	CCT	CCT	AAT	TCG	GAG	TCG	AAG	CAT	AAG	AAG	TAA
	Q	D	T	K	V	T	L	P	P	P	N	S	E	S	K	H	K	K	*

Figura 20. Ejemplos de las secuencias de nucleótidos de algunos insertos en cinco plásmidos obtenidos de transformantes de las bibliotecas aleatoria y semialeatoria. Dos colonias de transformantes de la biblioteca semialeatoria (SAle12 y Sale17) y tres de la aleatoria (Ale5, Ale4 y Al0) fueron seleccionados al azar para su análisis. Los respectivos plásmidos fueron recuperados mediante transformación de células competentes de *E. coli* para su posterior amplificación y purificación. Los plásmidos purificados fueron sometidos a análisis de secuenciamento de nucleótidos y los resultados permitieron inferir las respectivas secuencias de aminoácidos. Se puede apreciar que solo uno de los codones degenerados dio lugar a la inclusión del codón de terminación TAG en la secuencia Ale4. Para evidenciar la representación de los veinte posibles aminoácidos en estas secuencias, se ha destacado cada uno con un color particular.

En la figura 20 se muestran los resultados obtenidos del secuenciamiento de nucleótidos, con las respectivas secuencias de aminoácidos inferidas para los fragmentos clonados en cada plásmido analizado. En el caso de los plásmidos pSAle12 y pSAle17, los fragmentos clonados muestran las secuencias esperadas, con los tres codones TAT codificantes para tirosina ubicados cada cinco codones aleatorios NNK. De manera similar, las secuencias obtenidas para los plásmidos obtenidos de la biblioteca aleatoria, pAle5, pAle4 y pAle16, muestran el número esperado de codones. Importante en todos los plásmidos se pudo confirmar la adecuada inserción de los fragmentos y por tanto, se puede anticipar que la síntesis de los oligopéptidos estaría ocurriendo óptimamente.

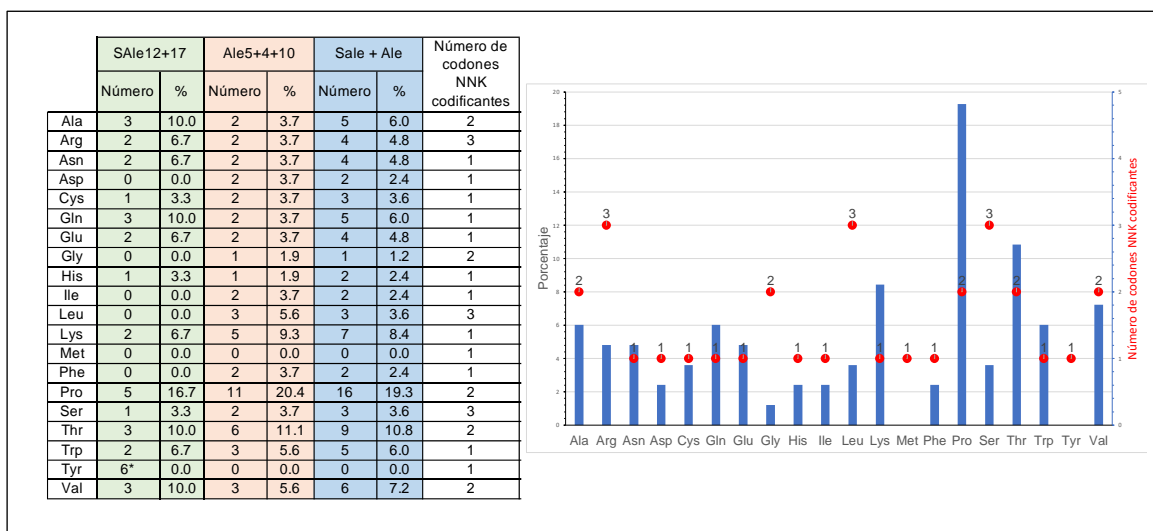


Figura 21. Análisis de la composición de los oligopéptidos codificados por los plásmidos sometidos a secuenciamiento de nucleótidos. Se determinó la frecuencia de cada aminoácido en todas las secuencias reportadas en la figura 20. La tabla de la izquierda muestra las frecuencias encontradas para los dos oligopéptidos semialeatorios SAle12 y SAle17 (en verde), los tres aleatorios (Ale5, Ale4 y Ale10, en rosado) y las sumas correspondientes (celeste). En cada caso, se calculó el porcentaje respectivo, considerando el número total de codones NNK involucrados. Por este motivo, no se consideró los seis residuos de tirosina presentes en los oligopéptidos semialeatorios. La tabla también incluye los respectivos codones degenerados NNK que codifican para cada aminoácido (por ejemplo, tres para leucina, dos para prolina, uno para tirosina). La gráfica de la derecha representa los porcentajes encontrados para cada aminoácido (columnas celestes) y los respectivos números de codones NNK codificantes (círculos rojos).

Para determinar la diversidad de las secuencias codificantes en estos plásmidos, se realizó un conteo de la frecuencia en el que se presentaban cada uno de los veinte aminoácidos. La estimación se realizó sobre las secuencias inferidas de los cinco oligopéptidos, considerando los 83 aminoácidos que fueron codificados por los codones NNK (Figura 21). El número de codones NNK codificante para cada aminoácido está también indicado en la tabla incluida en la figura. Para el caso de tirosina, solo se puede observar seis codones TAT que correspondían a los de la biblioteca semialeatoria, pero ninguno producto de los codones degenerados NNK. Asimismo, no se encontró ningún codón ATG codificante para la

metionina pero, sorpresivamente, una alta frecuencia de residuos de prolina (19.3%) y treonina (10.8%). Estos resultados son inesperados ya que, al usar la estrategia NNK se producen, en cada caso, dos codones codificantes para prolina y treonina. Por otro lado, los aminoácidos leucina, serina y arginina están codificados, cada uno, por tres diferentes codones NNK. Para representar mejor la falta de correlación entre estos números y la frecuencia de aminoácidos encontrados, se realizó la gráfica mostrada en la misma figura. Las columnas celestes muestran la distribución porcentual de todos los aminoácidos encontrados en los cinco péptidos, que han sido codificados por codones NNK. Los círculos rojos corresponden al número de codones NNK que codifica para cada uno de los aminoácidos. Esta falta de correlación puede explicarse, en primer lugar, por los diferentes niveles de eficiencia en la síntesis de los oligonucleótidos utilizados para la construcción de las bibliotecas. Asimismo, es posible que la representatividad de las secuencias se pierda durante la generación de los fragmentos a clonar o también, por posibles efectos ventajosos o desventajosos de los oligopéptidos generados en la célula de levadura que los sintetiza.

4.5 Ensayos preliminares de fotoprotección

Como se indicó anteriormente, una futura aplicación de las bibliotecas de plásmidos construidas será la búsqueda de oligopéptidos con capacidad fotoprotectora. Por esta razón, se consideró importante investigar el comportamiento de las bibliotecas de transformantes frente a la radiación UV. Para estos ensayos, se realizó la co-transformación del mutante *rad9* *tfr*^{NEG} con los fragmentos aleatorios o semialeatorios, y el plásmido pTPI1 linealizado. Como controles, se transformó con la misma cantidad de plásmido linealizado (sin fragmento a clonar) o con plásmido sin digerir (intacto). En este caso, el método de transformación aplicado fue la electroporación, a fin de aumentar el número de transformantes obtenidos. Así, para la biblioteca aleatoria se obtuvo un número mayor de colonias transformantes (50 % mayor) que, en el control, mientras que para la biblioteca semialeatoria se obtuvo 25 % más colonias transformantes.

Las placas que contienen a los transformantes fueron primero incubadas a 30 °C por 20 horas. Para poder demostrar los efectos de la irradiación, se cubrió la mitad de la placa con una lámina de aluminio, dejando la otra mitad expuesta. Las placas así preparadas fueron irradiadas con una dosis de 0.13 J/cm². Los transformantes obtenidos con el plásmido linealizado o sin digerir fueron procesados similarmente, como controles. Después de las irradiaciones las placas fueron incubadas por dos días a 30 °C.

Los resultados se muestran en la figura 22, donde al comparar las zonas irradiadas de las placas, se observa mayor presencia de colonias en la biblioteca semialeatoria en comparación con las otras placas, incluso la correspondiente a la biblioteca aleatoria. Por tanto, se puede concluir que los oligopéptidos semialeatorios, debido a la presencia de los residuos de tirosina, pueden presentar una sustancial capacidad fotoprotectora.

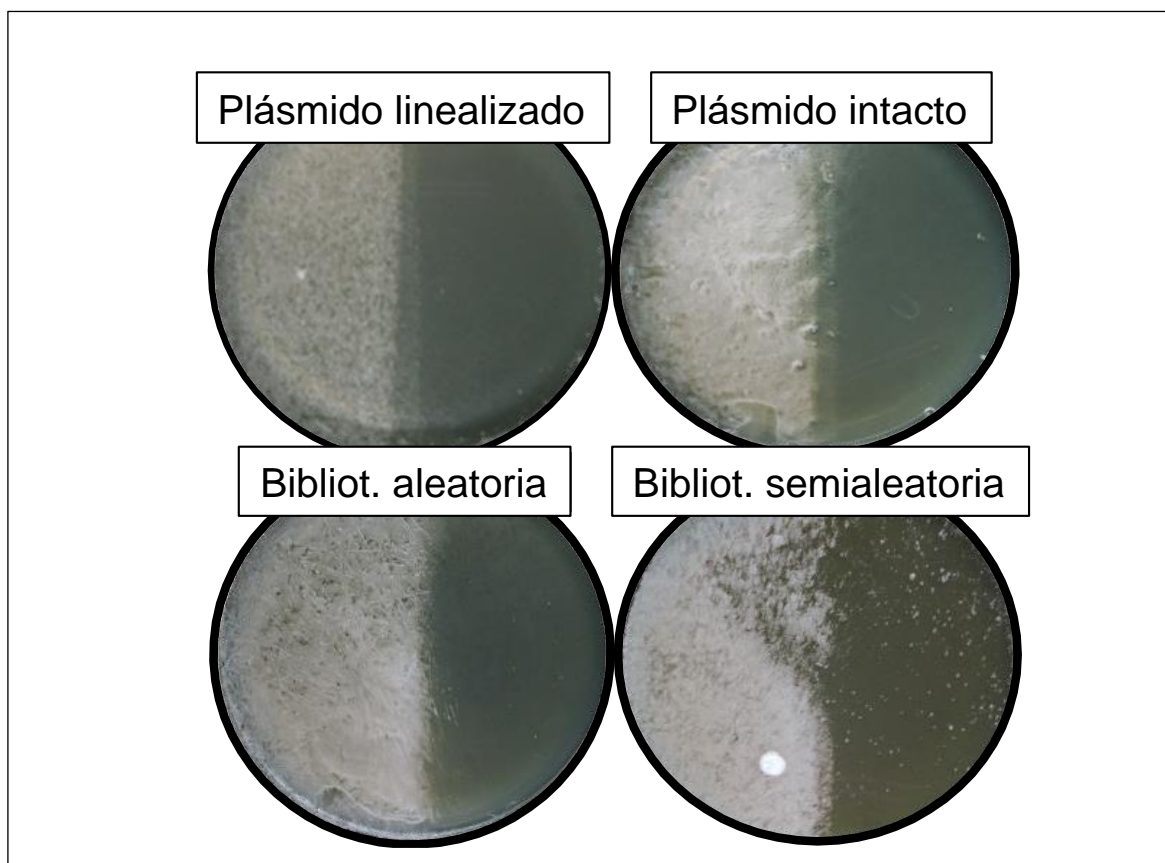


Figura 22. Comparación del efecto de la radiación UV en los transformantes de la cepa *rad9 tff1^{NEG}*. Se muestran resultados representativos de cuatro transformaciones de la cepa con cantidades similares de plásmido linealizado, plásmido intacto (sin digerir), y las bibliotecas aleatoria y semialeatoria. Se esparcieron cantidades similares de las respectivas mezclas de transformación en cada placa y se dejaron incubar por 20 h a 30 °C. Posteriormente, se cubrió la mitad de cada placa con papel de aluminio y se procedió a la irradiación de todas las placas, que fueron luego incubadas por 2 días. Este ensayo permitió evidenciar, primero, las diferentes eficiencias de transformación, al comparar el nivel de crecimiento en el lado de la placa que no fue irradiado al estar protegido por el papel de aluminio. Se observa el menor crecimiento en los transformantes que recibieron el plásmido linealizado, ya que se espera para éste, la menor eficiencia de transformación. Opuestamente, se observan mayor crecimiento en los otros tres casos. Por el otro lado, al comparar los niveles de crecimiento en las células irradiadas, es obvio el mayor crecimiento de colonias en los transformantes con la biblioteca semialeatoria.

Posteriormente, para poder evidenciar las capacidades fotoprotectoras con transformantes que incluyen un plásmido único, se seleccionó al azar uno de la biblioteca semialeatoria, denominado “SAle6”. Para el experimento, se incluyó también a transformantes con los plásmidos pMR2 y pMR3, que incluyen secuencias codificantes para oligopéptidos que habían sido anteriormente identificados como potencialmente fotoprotectores (Merino,

2019; Mansilla, 2021). Los ensayos se realizaron como se describió en la figura 22, excepto que la dosis de radiación UV fue de $0,09 \text{ J/cm}^2$. En la figura 23 se muestran resultados representativos, que muestran un mayor número de colonias en las partes irradiadas, para los transformantes con los plásmidos pMR3, pSAle6 y pMR2 en comparación con el control, pTPI1- α . Entre éstos, destacan los plásmidos pSAle6 y pMR3 debido a que confieren mayores niveles de fotoprotección, presentando un aumento de 60 % de sobrevivientes comparado con el plásmido control.

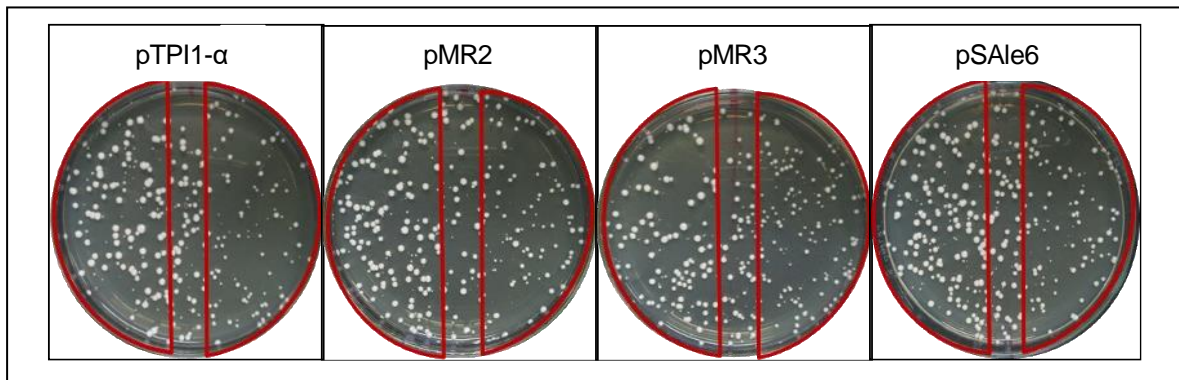


Figura 23. Comparación de la respuesta a la radiación UV de transformantes de la cepa *rad9* tfl^{NEG} con plásmidos únicos. Las placas con medio selectivo contienen similar cantidad de colonias transformadas con los plásmidos indicados. Antes de irradiar se cubrió la mitad izquierda de cada placa con papel de aluminio y las placas fueron expuestas a una dosis de $0,09 \text{ J/cm}^2$ de UV. Las áreas delimitadas por las líneas rojas son de similar tamaño en ambos lados de las placas, y fueron usadas para realizar el conteo de colonias.

V. CONCLUSIONES

- Se logró la construcción de las dos bibliotecas aleatoria y semialeatoria en el plásmido pTPI1- α que permiten la producción y secreción de los correspondientes oligopéptidos en *Saccharomyces cerevisiae*.
- Se determinó que la eficiencia de clonación fue de 70 % para la biblioteca aleatoria y de 62.5 % para la semialeatoria.
- Se completaron los ensayos preliminares que permitirán aplicar las bibliotecas construidas en la búsqueda de oligopéptidos con capacidad fotoprotectora.

VI. RECOMENDACIONES

- Aplicar preferentemente la biblioteca semialeatoria para la búsqueda de oligopéptidos fotoprotectores, sobre la base de los resultados que demuestran la presencia de transformantes con mayor resistencia a la radiación UV.
- Investigar las estrategias que podrían aplicarse para mejorar la representatividad de los codones degenerados que codifican, por ejemplo, a metionina y tirosina.
- Emplear ambas bibliotecas en posteriores investigaciones de estudio y búsqueda de diferentes oligopéptidos con propiedades de interés, por ejemplo, antioxidantes, quelantes de hierro u otros metales, y otros.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Alber, T., Banner, D., Bloomer, A., Phillips, D., Rivers, P. & Wilson I. B. (1981). On the three-dimensional structure and catalytic mechanism of triose phosphate isomerase. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 293(1063), 159–171. <https://doi.org/10.1098/rstb.1981.0069>
- Aguilera-Romero, A., Lucena, R., Sabido-Bozo, S., & Muñiz, M. (2023). Impact of sphingolipids on protein membrane trafficking. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell Molecular and cell biology of lipids*, 1868(8), 159334. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2023.15933>
- Ashwini, M., Murugan, S. B., Balamurugan, S., & Sathishkumar, R. (2016). Advances in molecular cloning. *Molecular Biology*, 50(1), 1–6. <https://doi.org/10.1134/S0026893316010131>
- 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(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0571-x>
- Baxter, D., Ullman, C. G., & Mason, J. M. (2014). Library construction, selection and modification strategies to generate therapeutic peptide-based modulators of protein–protein interactions. *Future Medicinal Chemistry*, 6(18), 2073–2092.
- Berger, O., Adler-Abramovich, L., Levy-Sakin, M., Grunwald, A., Liebes-Peer, Y., Bachar, M., Buzhansky, L., Mossou, E., Forsyth, V. T., Schwartz, T., Ebenstein, Y., Frolow, F., Shimon, L. J. W., Patolsky, F., & Gazit, E. (2015). Light-emitting self-assembled peptide nucleic acids exhibit both stacking interactions and Watson–Crick base pairing. *Nature Nanotechnology*, 10(4), 353–360. <https://doi.org/10.1038/nnano.2015.27>
- Bickle, M. B. T., Dusserre, E., Moncorgé, O., Bottin, H., & Colas, P. (2006). Selection and characterization of large collections of peptide aptamers through optimized yeast two-hybrid procedures. *Nature Protocols*, 1(3), 1066–1091.

<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.32>

- Bozovičar, K., & Bratkovič, T. (2019). Evolving a peptide: library platforms and diversification strategies. *International journal of molecular sciences*, 21(1), 215. <https://doi.org/10.3390/ijms21010215>
- Braus, G. H. (1991). Aromatic amino acid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a model system for the regulation of a eukaryotic biosynthetic pathway. *Microbiological Reviews*, 55(3), 349–370. <https://doi.org/10.1128/mr.55.3.349-370.1991>
- Buxbaum, E. (2015). *Fundamentals of protein structure and function* (Springer International Publishing, Ed.).
- Cantor, C. & Schimmel, P. (1980). *Biophysical Chemistry: Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function*. W.H. Freeman and Co: New York.
- Caplan, S., Green, R., Rocco, J. & Kurjan, J. (1991). Glycosylation and structure of the yeast MF alpha 1 alpha-factor precursor is important for efficient transport through the secretory pathway. *Jornal of Bacteriology* 173 (2), 627 - 635.
- Chen, Z., Li, Z., Yu, N., & Yan, L. (2011). Expression and secretion of a single-chain sweet protein, monellin, in *Saccharomyces cerevisiae* by an α -factor signal peptide. *Biotechnology Letters*, 33(4),721–725. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0479-2>
- Chi, C., Wang, B., Deng, Y., Wang, Y., Deng, S., & Ma, J. (2014). Isolation and characterization of three antioxidant pentapeptides from protein hydrolysate of monkfish (*Lophius litulon*) muscle. *Food Research International*. (55): 222 – 228. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.018>.
- Ciriacy, M., & Breitenbach, I. (1979). Physiological effects of seven different blocks in glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 139(1), 152–160. <https://doi.org/10.1128/jb.139.1.152-160.1979>
- Errante, F., Ledwoń, P., Latajka, R., Rovero, P., & Papini, A. M. (2020). Cosmeceutical peptides in the framework of sustainable wellness economy. *Frontiers in Chemistry*, 8. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.572923>
- Fersht, A. R. (1980). *Structure and mechanism of the enzymes* (C. R. MRC Laboratory of Molecular Biology, Ed.; 1st ed., Vol. 84).

- Fujisawa, T., & Masuda, S. (2018). Light-induced chromophore and protein responses and mechanical signal transduction of BLUF proteins. *Biophysical Reviews*, 10(2), 327–337. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0355-6>
- Gibson, D. G. (2009). Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*, 37(20, 1 November), 6984–6990. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/nar/gkp687>
- Gilbert, C. S., Green, C. M., & Lowndes, N. F. (2001). Budding yeast Rad9 is an ATP-dependent Rad53 activating machine. *Molecular Cell*, 8(1), 129–136. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00267-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00267-2)
- Greenstein, J., & Winitz, M. (1961). Tyrosine. In: *Chemistry of the amino acids*. Jhon Wiley and Sons Inc., 2348–2367.
- He, B., & Guo, W. (2009). The exocyst complex in polarized exocytosis. *Current opinion in cell biology*, 21 (4), 537-542.
- Gutiérrez, L. (2021). Diseño de tamizados genéticos en *Saccharomyces cerevisiae* usando una biblioteca genómica de plásmidos multicopia. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Hengke, G., Siyu, G. & Hongmei, L. (2020). Antioxidant activity and inhibition of ultraviolet radiation-induced skin damage of Selenium-rich peptide fraction from selenium-rich yeast protein hydrolysate. *Bioorganic Chemistry*; vol. 105, 104431.
- Hellvard, A., & Mydel, P. (2013). The 2013 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Scandinavian Journal of Immunology*, 78(6), 485. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/sji.12124>
- Herskowitz, I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 52(4), 536–553. <https://doi.org/10.1128/mr.52.4.536-553.1988>
- Hinnebusch, A. G. (2011). Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(3), 434–467. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00008-11>
- Hu, G. (1993). DNA Polymerase-catalyzed addition of non-templated extra nucleotides to the 3' of a DNA fragment. *DNA and Cell Biology*, 12(8), 763–770.

<https://doi.org/10.1089/dna.1993.12.763>

- Hua, S., Qiu, M., Chan, E., Zhu, L., & Luo, Y. (1997). Minimum length of sequence homology required for in vivo cloning by homologous recombination in yeast. *Plasmid*, 38(2), 91–96. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/plas.1997.1305>
- Kawasaki, G. (1982). US Patent for Glycolytic promoters for regulated protein expression: protease inhibitor (Patent # 4,599,311).
- Kille, S., Acevedo-Rocha, C. G., Parra, L. P., Zhang, Z.-G., Opperman, D. J., Reetz, M. T., & Acevedo, J. P. (2013). Reducing codon redundancy and screening effort of combinatorial protein libraries created by saturation mutagenesis. *ACS Synthetic Biology*, 2(2), 83–92. <https://doi.org/10.1021/sb300037w>
- Kim, J., Kim, H. K., Jang, H. J., Kim, E., & Kim, M. K. (2015). Optimization of yeast surface-displayed cDNA library screening for low abundance targets. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(4), 547–553. <https://doi.org/10.4014/jmb.1409.09079>
- Kitazono, A. A. (2011). Optimized protocols and plasmids for in vivo cloning in yeast. *Gene*, 484(1–2), 86–89. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.06.006>
- Kjeldsen, T., Brandt, J., Andersen, A. S., Egel-Mitani, M., Hach, M., Pettersson, A. F., & Vad, K. (1996). A removable spacer peptide in an α -factor-leader/insulin precursor fusion protein improves processing and concomitant yield of the insulin precursor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 170(1), 107–112. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00822-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00822-5)
- Kjeldsen, T., Ludvigsen, S., Diers, I., Balschmidt, P., Sørensen, A. R., & Kaarsholm, N. C. (2002). Engineering-enhanced protein secretory expression in yeast with application to insulin. *Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 18245–18248. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200137200>
- Kuipers, B. J. H., & Gruppen, H. (2007). Prediction of molar extinction coefficients of proteins and peptides using UV absorption of the constituent amino acids at 214 nm to enable quantitative reverse phase High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5445–5451. <https://doi.org/10.1021/jf0703371>

- Kurjan, J., & Herskowitz, I. (1982). Structure of a yeast pheromone gene (MF α): a putative α -factor precursor contains four tandem copies of mature α -factor. *Cell*, 30(3), 933-943.
- Li, A., Acevedo-Rocha, C. G., & Reetz, M. T. (2018). Boosting the efficiency of site - saturation mutagenesis for a difficult to randomize gene by a two - step PCR strategy. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102 (14), 6095-6103.
- Liu, Z., Tyo, K. E. J., Martínez, J. L., Petranovic, D., & Nielsen, J. (2012). Different expression systems for production of recombinant proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(5), 1259–1268. <https://doi.org/10.1002/bit.24409>
- Liu, H., Zhang, H., Wang, Q., Li S., Liu, Y., Ma, L., Huang, Y., Stephen Brennan, C. & Sun, L. (2021). Mechanisms underlying the antimicrobial actions of the antimicrobial peptides Asp – Tyr – Asp – Asp and Asp- Asp- Asp- Tyr. *Food research international* (Ottawa, Ont.), 139, 109848. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109848>.
- Lizasa, E., & Nagano, Y. (2006). Highly efficient yeast-based in vivo DNA cloning of multiple DNA fragments and the simultaneous construction of yeast/*Escherichia coli* shuttle vectors. *BioTechniques*, 40(1), 79–83. <https://doi.org/10.2144/000112041>
- López-García, B., Pérez-Payá, E., & Marcos, J. F. (2002). Identification of Novel Hexapeptides Bioactive against Phytopathogenic Fungi through Screening of a Synthetic Peptide Combinatorial Library. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2453–2460. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2453-2460.2002>
- Lorenz, M. C., Muir, R. S., Lim, E., McElver, J., Weber, S. C., & Heitman, J. (1995). Gene disruption with PCR products in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 158(1), 113–117. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00144-U](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00144-U)
- Ma, H., Kunes, S., Schatz, P. J., & Botstein, D. (1987). Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene*, 58(2), 201–216. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90376-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90376-3)

- Manivasakam, P., Weber, S., McElver, J., & Schiestl, R. (1995). Micro-homology mediated PCR targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.*, 14 (23), 2780–2799. <https://doi.org/10.1093/nar/23.14.2799>
- Mansilla, S. (2021). Clonación en plásmidos para la producción y secreción de péptidos o proteínas en *Sacharomyces cerevisiae*. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Martínez-Navarro, A. C., Chamorro-Flores, A., Vázquez-Bustos, G., Ríos-Meléndez, S., Villalobos-López, M. Á., Pantoja, O., & Arroyo-Becerra, A. (2022). Tráfico vesicular, un viaje épico de las proteínas hacia la membrana. *Alianzas Y Tendencias BUAP*, 7(28), 1–38. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.7238038>
- Merino, R. (2019, Tesis sustentada en preparación). Identificación de oligopéptidos con actividad fotoprotectora mediante un tamizado genético en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
- Miller, R. A. (2009). Ligand-Regulated Peptide Aptamers (pp. 315–331). https://doi.org/10.1007/978-1-59745-557-2_18
- Nandy, S. K., & Srivastava, R. K. (2018). A review on sustainable yeast biotechnological processes and applications. *Microbiological Research*, 207, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.11.013>
- Nielsen, J. (2013). Production of biopharmaceutical proteins by yeast. *Bioengineered*, 4(4), 207–211. <https://doi.org/10.4161/bioe.22856>
- Nielsen, J., & Jewett, M. C. (2008). Impact of systems biology on metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 8(1), 122–131. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00302.x>
- Nishiyama, E., Higashi, K., Mori, H., Suda, K., Nakamura, H., Omori, S., Maruyama, S., Hongoh, Y., & Kurokawa, K. (2018). The relationship between microbial community structures and environmental parameters revealed by metagenomic analysis of hot spring water in the Kirishima area, Japan. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00202>
- Orr-Weaver, T. L., Szostak, J. W., & Rothstein, R. J. (1983). Genetic applications of yeast transformation with linear and gapped plasmids. *Methods in Enzymology*, 101, 228–245. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(83\)01017-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(83)01017-4)

- Pines, G., Pines, A., Garst, A. D., Zeitoun, R. I., Lynch, S. A., & Gill, R. T. (2015). Codon Compression Algorithms for Saturation Mutagenesis. *ACS Synthetic Biology*, 4(5), 604–614. <https://doi.org/10.1021/sb500282v>
- Pizzul, P., Casari, E., Gnugnoli, M., Rinaldi, C., Corallo, F. & Longhese, M.P. (2022). The DNA damage checkpoint: A tale from budding yeast. *Front. Genet.* 13:995163. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.995163>
- Rizvi, S. M. A., Prajapati, H. K., & Ghosh, S. K. (2018). The 2 micron plasmid: a selfish genetic element with an optimized survival strategy within *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 64(1), 25–42. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0719-2>.
- Rakestraw, J. A., Sazinsky, S. L., Piatasi, A., Antipov, E., & Wittrup, K. D. (2009). Directed evolution of a secretory leader for the improved expression of heterologous proteins and full-length antibodies in *S. cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* 103(6): 1192 - 1201.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K., & Linn, S. (2004). Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1), 39–85. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723>
- Schatz, P. J. (1994). Construction and screening of biological peptide libraries. *Current Opinion in Biotechnology*, 5(5), 487-494.
- Scheckman, R. (2016, diciembre). Protein Secretion and Vesicle Trafficking. Part 1: The Secretory Pathway: How Cells Package and Traffic Proteins for Export.[Archivo de video]. Recuperado de https://www.ibiology.org/ibiology_podcasts/andy-scheckman-part-1-the-secretory-pathway-how-cells-package-and-traffic-proteins-for-export/
- Scheckman, R. & Rothman, J. (2002). Dissecting the membrane trafficking system. *Nature Medicine*, 8 (10), 1055-1058. doi:10.1038/nm769.
- Schenck, C. A., & Maeda, H. A. (2018). Tyrosine biosynthesis, metabolism, and catabolism in plants. *Phytochemistry*, 149, 82–102. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.02.003>

- Schwartz, M. F., Duong, J. K., Sun, Z., Morrow, J. S., Pradhan, D., & Stern, D. F. (2002). Rad9 Phosphorylation Sites Couple Rad53 to the *Saccharomyces cerevisiae* DNA Damage Checkpoint. *Molecular Cell*, 9(5), 1055–1065.
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00532-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00532-4)
- Swers, J. S., Kellogg, B. A., & Wittrup, K. D. (2004). Shuffled antibody libraries created by *in vivo* homologous recombination and yeast surface display. *Nucleic Acids Research*, 32(3), e36–e36. <https://doi.org/10.1093/nar/gnh030>
- UdeSantiagoVirtual. (2015). Módulo Bioquímica. Recuperado en agosto del 2023:
<http://www.udesantiagovirtual.cl/moodle2/mod/page/view.php?id=34060>
- Vickery, H. B., & Schmidt, C. L. A. (1931). The History of the Discovery of the Amino Acids. *Chemical Reviews*, 9(2), 169–318. <https://doi.org/10.1021/cr60033a001>
- Wang, C., Weng, C., Che, Y., Wang, K., & Lee, G. (2015). Cancer Cell-Specific Oligopeptides Selected by an Integrated Microfluidic System from a Phage Display Library for Ovarian Cancer Diagnosis. *Theranostics*, 5(4), 431–442.
<https://doi.org/10.7150/thno.10891>
- Wang, G., Huang, M., & Nielsen, J. (2017). Exploring the potential of *Saccharomyces cerevisiae* for biopharmaceutical protein production. *Current Opinion in Biotechnology*, 48, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.03.017>
- Warner, J. R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(11), 437–440.
[https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01460-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01460-7)
- Wood, V., Rutherford, K. M., Ivens, A., Rajandream, M.-A., & Barrell, B. (2001). A Re-Annotation of the *Saccharomyces cerevisiae* Genome. *Comparative and Functional Genomics*, 2(3), 143–154. <https://doi.org/10.1002/cfg.86>
- Yang, H., Xiao, X., Zhao, X., & Wu, Y. (2015). Intrinsic Fluorescence Spectra of Tryptophan, Tyrosine and Phenylalanine. *Proceedings of the 5th International Conference on Advanced Design and Manufacturing Engineering*.
<https://doi.org/10.2991/icadme-15.2015.46>
- Zenklusen, D., Larson, D. & Singer, R. (2008). Single-RNA counting reveals alternative modes of gene expression in yeast. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15: 1263-1271.

- Zhang, Z., Li, D., Xu, H., Xin, Y., Zhang, T., Ma, L., Wang, X., Chen, Z., & Zhang, Z. (2013). A Simple and Efficient Method for Assembling TALE Protein Based on Plasmid Library. *PLoS ONE*, 8(6), e66459.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066459>
- Zou, W., Ueda, M., & Tanaka, A. (2002). Screening of a molecule endowing *Saccharomyces cerevisiae* with n-nonane-tolerance from a combinatorial random protein library. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(6), 806–812.
<https://doi.org/10.1007/s00253-002-0961-4>
- Zsebo, K. M., Lu, H. S., Fieschko, J. C., Goldstein, L., Davis, J., Duker, K., Suggs, S. V, Lai, P. H., & Bitter, G. A. (1986). Protein secretion from *Saccharomyces cerevisiae* directed by the prepro-alpha-factor leader region. *Journal of Biological Chemistry*, 261(13), 5858–5865.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)38462-](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38462-)