



# UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

---

**Trabajo final de grado, correspondiente a la asignatura “Laboratorio  
de procesos biotecnológicos”**

**Clonación de una peptidasa aspártica de flores de *Arctium  
minus* con potencial aplicación biotecnológica en un vector de  
expresión del sistema GRAS *Kluyveromyces lactis*.**

---

**Tesinista: Agustín Bruno Actis Dato**

**Directora: Sandra Vairo Cavalli**

**Lugar de trabajo: Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CIProVe)**



**CIPROVE**

**Año 2018**

---

## Agradecimientos

A mi familia y amigos, que me apoyaron en todo momento; especialmente a mis padres Claudia y Fabio, a mis tíos Gustavo, Mary y Sergio, y a mis amigos Cristian, Damián y Sebastián.

A la Universidad Nacional de La Plata por permitirme estudiar esta hermosa carrera y a sus profesores por instruirme.

A mis compañeros Caro, Coti, Emma, Gero, Higa, Isa, Ivana, Jenni, Lu, Lucre, Meli, Maru, Ro y Shir (y también a los esporádicos) por hacer más amena esta etapa que no siempre fue fácil.

Finalmente, al CiProVe por darme un espacio donde terminar este recorrido, y a mi directora Sandra, a Laura, a Cecilia y a Agustina por enseñarme todo lo que aprendí este último año de carrera y por darme una mano siempre que la necesité.

## Abreviaturas

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**cADN:** Ácido desoxirribonucleico complementario

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**EDTA:** Ácido etilendiamintetraacético

**GRAS:** Generally recognized as safe (reconocido como seguro para la salud)

**HCl:** Ácido clorhídrico

**IPTG:** Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

**mARN:** Ácido ribonucleico mensajero

**MCS:** multiple cloning site (sitio de clonado múltiple)

**Medio LB:** Medio Luria-Bertani

**Medio YCB:** Medio yeast carbon Base (Medio base con carbono para Levaduras)

**Medio YPGlu:** medio peptona- extracto de levadura con agregado de glucosa

**NaCl:** Cloruro de sodio

**ORF:** Open reading frame (marco de lectura abierto)

**PAs:** Proteasas aspárticas

**PCR:** Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)

**PLAC4:** Promotor del locus LAC4

**PSI:** Plant specific insert (inserto específico de plantas)

**Tris:** 2-amino-2-hidroximetilpropan-1,3-diol

**X-Gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

**$\alpha$ -MF:** Alfa mating factor (factor de apareamiento alfa)

# Índice

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Función de las peptidasas .....	2
1.2.	Relevancia .....	2
1.3.	Clasificación de las peptidasas .....	3
1.4.	Peptidasas aspárticas .....	4
1.4.1.	Mecanismo de acción de las peptidasas aspárticas.....	4
1.4.2.	Clasificación de las peptidasas aspárticas vegetales.....	5
1.4.3.	Estructura de las peptidasas aspárticas típicas vegetales.....	6
1.4.4.	Rol biológico de las peptidasas aspárticas.....	6
1.4.5.	Aplicación de las peptidasas aspárticas.....	7
1.5.	Características de <i>Arctium minus</i> .....	9
1.6.	Expresión de proteínas recombinantes en <i>Kluyveromyces lactis</i> . .....	10
2.	OBJETIVOS.....	13
3.	MATERIALES.....	15
3.1.	Antibióticos .....	16
3.2.	Buffers .....	16
3.3.	Cepas .....	16
3.4.	Enzimas .....	17
3.5.	Softwares.....	17
3.6.	Kits comerciales.....	17
3.7.	Medios de cultivo.....	17
3.8.	Primers .....	18
3.9.	Vectores.....	19
3.10.	Otros .....	22
4.	MÉTODOS .....	23
4.1.	Amplificación de ADN .....	24
4.2.	Crecimiento y mantenimiento de cultivos bacterianos .....	25
4.3.	Cuantificación de ADN mediante espectrofotometría .....	25
4.4.	Digestión de ADN .....	25
4.5.	Electroforesis en geles de agarosa.....	27
4.6.	Ligación entre el ADN amplificado y el vector pGEM®-T Easy .....	27
4.7.	Ligación entre el fragmento de ADN de proarctiumsina y el vector pKLAC1 ...	28
4.8.	Obtención de ADN plasmídico .....	28

4.9.	Obtención de <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> competentes mediante el uso de cloruro de rubidio y cloruro de calcio .....	29
4.10.	Obtención de levaduras <i>K. lactis</i> GG977 electrocompetentes .....	29
4.11.	Purificación de ADN a partir de gel de agarosa .....	30
4.12.	Transformación de <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ por shock térmico .....	31
4.13.	Transformación de <i>Kluyveromyces lactis</i> GG977 por electroporación .....	31
5.	DISEÑO EXPERIMENTAL .....	33
6.	RESULTADOS.....	38
7.	DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS .....	48
8.	CONCLUSIONES.....	54
9.	MATERIAL COMPLEMENTARIO .....	56
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	72



# 1. INTRODUCCIÓN

CEPROVE

## 1.1. Función de las peptidasas

Se conoce como peptidasas a las enzimas que catalizan la degradación de las proteínas (proteólisis). Estas llevan a cabo numerosos procesos en los organismos vivos. Inicialmente fueron reconocidas como enzimas del jugo gástrico involucradas en la degradación inespecífica de las proteínas de la dieta. Sin embargo, avances posteriores han provisto una nueva visión del mundo proteolítico. Además de la hidrólisis proteica inespecífica, las peptidasas también actúan como enzimas de procesamiento que realizan clivajes selectivos de sustratos específicos, produciendo cambios irreversibles a nivel post-traducciona que influyen en muchos procesos biológicos. A modo de ejemplo, los eventos de procesamiento proteolítico son fundamentales en ovulación, fertilización, desarrollo embrionario, formación ósea, control de la homeostasis, remodelado tisular, extensión neuronal, presentación antigénica, regulación del ciclo celular, activación y migración celular, cicatrización de heridas, angiogénesis y apoptosis (Puente et al., 2003; Barrett & Rawlings, 2004; Muñoz-Pinedo, 2012).

Al igual que en el resto de los organismos, las plantas cuentan con un elevado número de peptidasas; en el genoma de *Arabidopsis thaliana* se codifican más de 800. Las peptidasas vegetales están involucradas en todos los aspectos del ciclo de vida de las plantas, desde la movilización de proteínas de reserva durante la germinación hasta el inicio de la muerte celular y senescencia programadas (Schaller, 2004; van Der Hoorn, 2008; Pesquet, 2012). Se ha demostrado, por ejemplo, que participan en la formación de la cubierta de semillas y maduración de las mismas, formación del xilema, desarrollo del estoma, biogénesis de cloroplastos, movilización de nutrientes, entre otros (van Der Hoorn, 2008; Tsiatsiani et al., 2011).

## 1.2. Relevancia

Las peptidasas constituyen el grupo de enzimas con mayor relevancia en el mercado mundial, representando cerca del 60% del total de las enzimas comercializadas. Debido a que la proteólisis cambia las propiedades químicas, físicas, biológicas e inmunológicas de las proteínas, las enzimas proteolíticas cumplen un rol muy importante en la biotecnología (González-Rábade et al., 2011), siendo muy diversos los campos de aplicación: tecnología alimentaria, industrias farmacéuticas y manufacturas de detergente, entre otras (Feijoo-Siota & Villa, 2011).

### 1.3. Clasificación de las peptidasas

Antes del establecimiento de un organismo reconocido internacionalmente que fijara pautas de clasificación y nomenclatura para las enzimas, Hartley (1960) propuso clasificar las peptidasas teniendo en cuenta su mecanismo catalítico. Este criterio dio lugar a cuatro clases o tipos catalíticos de peptidasas: serínicas, cisteínicas, aspárticas y metalopeptidasas. La denominación hace referencia al grupo químico del sitio catalítico responsable de la actividad enzimática. Más recientemente fueron incorporados otros tres tipos: las peptidasas glutámicas (Kakudo et al., 1992), treonínicas (Barrett et al., 1998) y asparagínicas (Barrett et al., 2011). No obstante estas diferencias, los seis tipos catalíticos se pueden agrupar en dos categorías: las que forman complejos covalentes entre la enzima y el sustrato (peptidasas serínicas, cisteínicas y treonínicas), donde el nucleófilo del sitio catalítico es parte de un aminoácido (serina, cisteína o treonina, respectivamente) y las que no forman complejos enzima-sustrato covalentes (peptidasas aspárticas, glutámicas y metalopeptidasas), siendo responsable del ataque nucleofílico una molécula de agua activada.

En la Tabla 1.1 se muestra la distribución de los tipos de peptidasas en los distintos reinos. Dentro del reino vegetal, la mayoría son del tipo cisteínicas (29,7%), aspárticas (25,17%) y metalopeptidasas (24,3%).

Tipo de peptidasas	Reino						
	Bacteria	Archaea	Protozoa	Fungi	Planta	Animalia	Virus
<b>Aspárticas</b>	15674 (4,81%)	445 (3,73%)	1060 (8,10%)	6410 (14,6%)	10647 (25,17%)	10086 (4,95%)	210 (4,3%)
<b>Cisteínicas</b>	37639 (11,55%)	284 (2,38%)	5537 (42,27%)	11422 (26,02%)	12564 (29,7%)	51323 (25,16%)	1098 (22,43%)
<b>Glutámicas</b>	117 (0,04%)	2 (0,02%)	-	236 (0,54%)	-	2 (0,001%)	39 (0,8%)
<b>Metalopeptidasas</b>	177442 (54,46%)	6688 (56,01%)	4154 (31,71%)	16679 (38%)	10277 (24,3%)	72142 (35,37%)	392 (8%)
<b>Serínicas</b>	76791 (23,57%)	3488 (29,21%)	2256 (17,22%)	8576 (19,54%)	6125 (14,48%)	65942 (32,33%)	2081 (42,51%)
<b>Treonínicas</b>	377 (0,12%)	-	-	-	-	-	-
<b>Asparagínicas</b>	2340 (0,72%)	-	-	-	3 (0,007%)	10 (0,005%)	906 (18,51%)
<b>Mecanismo desconocido</b>	15413 (4,73%)	1034 (8,65%)	91 (0,7%)	567 (1,3%)	2682 (6,34%)	4458 (2,19%)	169 (3,45%)
<b>Totales</b>	325793	11941	13098	43890	42298	203963	4895

**Tabla 1.1. Número de peptidasas descritas hasta el momento, clasificadas por tipo de mecanismo catalítico y reino.** Entre paréntesis se indica el porcentaje de peptidasas de un tipo dado respecto al total de peptidasas del reino en cuestión. Tomado de <http://merops.sanger.ac.uk>. Fecha de acceso: 15/05/2018.

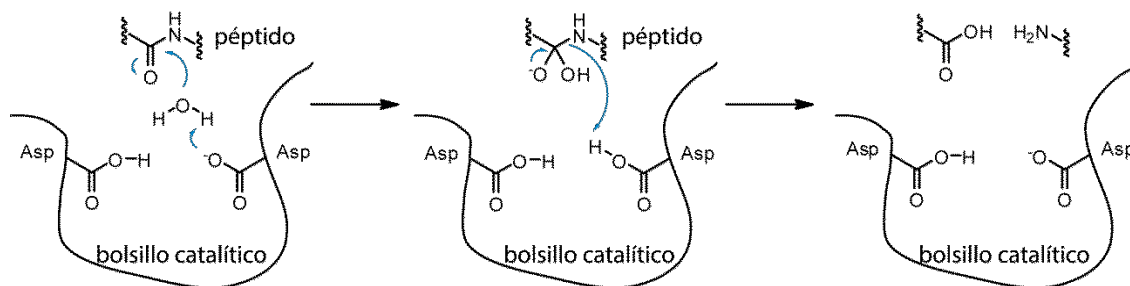


## 1.4. Peptidasas aspárticas

La primera peptidasa aspártica (PA) estudiada en los inicios del siglo XIX fue la pepsina del estómago de animales. Durante el último siglo el número de PAs encontradas se incrementó significativamente; en la actualidad hay cerca de 44.000 descriptas. A lo largo de este tiempo, las PAs fueron encontradas en todo tipo de organismos: virus, bacterias, arqueobacterias, protozoos, plantas y animales.

### 1.4.1. Mecanismo de acción de las peptidasas aspárticas

Las PAs se caracterizan por ser activas en el rango de pH ácido y ser inhibidas por pepstatina A (un hexapéptido producido por *Streptomyces spp.*). Suelen interactuar con secuencias de 6 a 10 aminoácidos y la ruptura del enlace peptídico ocurre a través de una hidrólisis, catalizada por dos residuos de ácido aspártico ubicados en el sitio activo de la enzima (Figura 1.1).



**Figura 1.1. Mecanismo de acción propuesto para las peptidasas aspárticas.** Fuente: "Binding of a reduced peptide inhibitor to the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis*: implications for a mechanism of action"; Suguna, Padlan, Smith, Carlson & Davies (1987).

La especificidad usualmente es descrita mediante el modelo propuesto por Schechter y Berger, en el que cada subsitio específico es capaz de acomodar la cadena lateral de un solo residuo de aminoácido. Por convención, los residuos de aminoácidos de sustrato se denominan P (por péptido) y los subsitios en la peptidasa que interactúan con el sustrato se denominan S (por subsitio). Los sitios se numeran desde el sitio catalítico, S1, S2 y así sucesivamente hacia el extremo N-terminal del sustrato y S1', S2' y así sucesivamente hacia el C-terminal (Figura 1.2). Los aminoácidos del sustrato que se acomodan en estos subsitios se numeran P1, P2, etc. y P1', P2', etc., respectivamente (Schechter & Berger,

1967). Las PAs muestran especificidad por secuencias con aminoácidos de cadenas laterales hidrofóbicas (como fenilalanina, valina, isoleucina y leucina) en los sitios P1 y P1' (Dunn & Hung, 2000; Rawlings *et al.*, 2012).

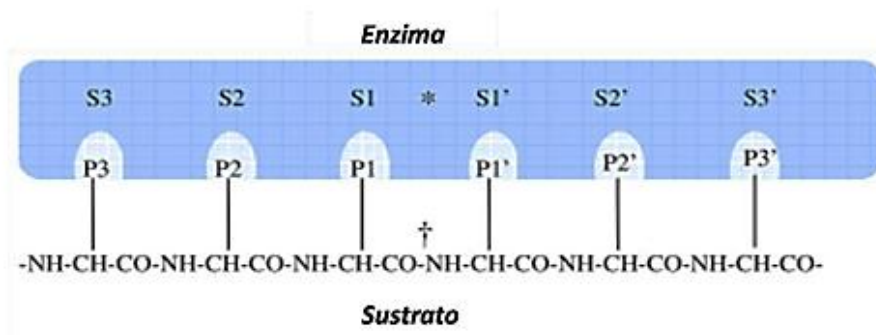


Figura 1.2. Nomenclatura propuesta por Schechter y Berger para la unión de un sustrato peptídico a una peptidasa. El área sombreada de azul representa la peptidasa. P1, P1', etc. son las cadenas laterales de los seis aminoácidos que rodean el enlace peptídico escindible (†) en el sustrato. S1, S1', etc., son los subsitios correspondientes de la peptidasa.

#### 1.4.2. Clasificación de las peptidasas aspárticas vegetales

Debido a la diversidad de PAs vegetales, estas han sido agrupadas en 3 clases; PAs vegetales típicas, atípicas y de tipo nucelina (Figura 1.3), dependiendo de la organización de sus dominios y de la secuencia de sus sitios activos (Faro & Gal, 2005).

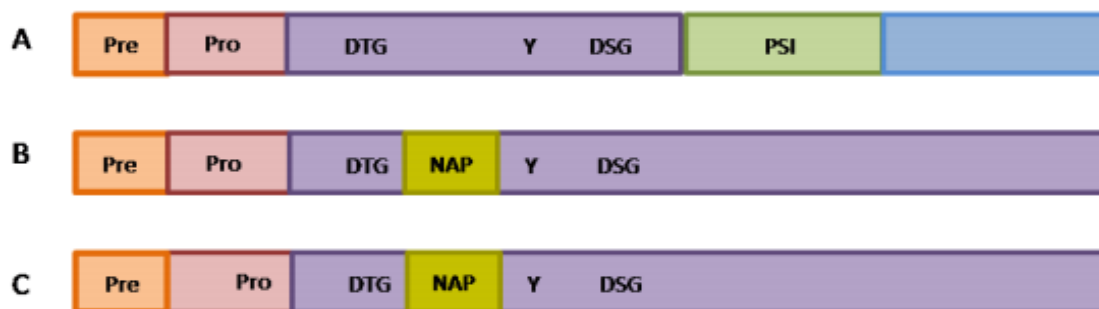


Figura 1.3. Organización de los dominios de PAs típicas (A), atípicas (B) y de tipo nucelina (C). Pre: péptido señal; Pro: prosegmento; DTG: primera triada catalítica; Y: tirosina conservada; DSG: segunda triada catalítica; NAP: inserto específico tipo nepentesina; PSI: inserto específico de planta. Cabe destacar que las peptidasas atípicas y de tipo nucelina comparten la misma organización de dominios, pero poseen diferentes secuencias rodeando a los sitios activos y diferentes posiciones de las Cys que forman los puentes disulfuro.

### 1.4.3. Estructura de las peptidasas aspárticas típicas vegetales

Las PAs típicas vegetales son sintetizadas como zimógenos (precursores enzimáticos inactivos) que contienen un péptido señal seguido por un prosegmento de aproximadamente 40 aminoácidos, el par DTG/DSG como regiones catalíticas y el dominio PSI (inserto específico de planta). Si bien la naturaleza del prosegmento aún no está totalmente esclarecida, esta región podría ser importante en procesos tales como el inicio del correcto plegamiento, estabilidad proteica, bloqueo del sitio catalítico, activación dependiente del pH, y direccionamiento intracelular del zimógeno. Por otro lado, se ha demostrado que el dominio PSI, compuesto por 4 alfa hélices y un “loop” (Bryksa *et al.* 2011), interacciona con las membranas fosfolipídicas y, en la mayoría de los casos, actúa como una señal de direccionamiento a vacuolas (Egas *et al.* 2000; Muñoz *et al.* 2014; Pereira *et al.* 2013; Bryksa & Yada. 2017). El prosegmento es eliminado durante la maduración de la proteína; en muchos casos también es eliminado el PSI.

Se ha observado que las PAs típicas maduras presentes en flores de cardo poseen dos cadenas peptídicas glicosiladas: una pesada de aproximadamente 30 kDa, proveniente de la región N-terminal de la secuencia primaria, y una liviana de aproximadamente 15 kDa, proveniente de la región C-terminal (Cordeiro *et al.*, 1994; Domingos *et al.*, 2000; Vieira *et al.*, 2001). Las dos cadenas peptídicas actúan como subunidades independientes que interactúan a través de fuerzas débiles (puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, etc.). Si bien los dos aspartatos catalíticos se encuentran dentro de la subunidad mayor, es necesario que esta interactúe con la subunidad menor para que la enzima sea funcional (Frazão *et al.*, 1999).

### 1.4.4. Rol biológico de las peptidasas aspárticas

Estudios de localización *in-situ* demostraron que las PAs no están distribuidas al azar en las plantas, por el contrario, están localizadas en diferentes tejidos específicos dependiendo de la especie (Simões & Faro, 2004). La gran diversidad de PAs dentro de una misma planta sugiere la existencia de diferentes roles para cada PA, probablemente basados en la diferencia de especificidad, eficiencia catalítica o localización subcelular (Mazorra-Manzano *et al.*, 2010). A modo de ejemplo, se ha propuesto que las cyprosinas presentes en cardos cumplen funciones relacionadas con la senescencia, ya que se

acumulan y alcanzan su máxima actividad en órganos maduros (Cordeiro *et al.*, 1994). Por otro lado, la localización específica de cardosina B en las paredes celulares y la matriz extracelular del tejido del estilo condujo a la hipótesis de que esta enzima podría estar implicada en aumentar la laxitud de dicha matriz para permitir la elongación del tubo polínico (Vieira *et al.*, 2001).

#### 1.4.5. Aplicación de las peptidasas aspárticas

##### Producción de quesos

Dentro de las aplicaciones biotecnológicas de las PAs provenientes de flores de cardos está la utilización de estas como sustituto de cuajo en la producción de quesos. Generalmente, la coagulación enzimática de la leche es un proceso de dos pasos. El primero es la proteólisis de la  $\kappa$ -caseína, que da lugar a dos nuevas moléculas: la para- $\kappa$ -caseína (hidrofóbica) y el caseinmacropéptido (hidrofilico). El segundo paso es el agregado de las micelas de caseína que fueron desestabilizadas por la proteólisis antes mencionada (Dalglish, 1980; Silva & Malcata, 2005a).

El cuajo que se utiliza más habitualmente es la quimosina, proveniente del sistema digestivo de terneros sus formas recombinantes. Los cuajos vegetales, a diferencia de la quimosina, poseen una fuerte actividad proteolítica que ocasionalmente provoca una ruptura mayor de las caseínas, lo cual contribuye a la aparición de características especiales en el producto final (Macedo & Malcata, 1997). Extractos acuosos de flores de *Cynara cardunculus* son usados en la región mediterránea para la producción de quesos de cabra y oveja a pequeña escala. Algunos ejemplos son los quesos portugueses “Serra da Estrela”, “Azeitão” y “Serpa”. También los quesos españoles “La serena” y “Torta del Casar” (Macedo *et al.* 1993; Roseiro *et al.* 2003; Ordiales *et al.*, 2013). De dichos extractos se han logrado purificar nueve PAs con actividad coagulante de leche: las cyprosinas A, B, y C, y las cardosinas A, B, E, F, G, y H (Sarmiento *et al.*, 2009). También se ha hallado actividad coagulante de leche en extractos de flores provenientes de otras especies de cardos, como *Arctium minus*, *Carduus acanthoides*, *C. thoermeri*, *Cynara scolymus*, *Onopordum acanthium* y *O. turcicum* (Brutti *et al.*, 2012; Cimino *et al.*, 2010; Tamer, 1993).

## **Producción de péptidos bioactivos**

Los péptidos bioactivos se definen como cadenas de aminoácidos inactivos en el interior de la proteína precursora, que ejercen determinadas actividades biológicas tras su liberación mediante hidrólisis química o enzimática. Generalmente, son péptidos de pequeño tamaño, de 3 a 20 aminoácidos, que son liberados durante el procesado industrial de los alimentos, o bien durante la digestión gastrointestinal (Meisel & Gerald, 2003).

Estos péptidos pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos vía circulación sistémica, pudiendo ejercer funciones específicas a nivel local, en el tracto gastrointestinal y a nivel sistémico. Dentro de estas actividades, los péptidos bioactivos podrían influir en el metabolismo celular y actuar como vasorreguladores, factores de crecimiento, inductores hormonales y neurotransmisores (Roberts & Zaloga, 1994).

Proteínas de distinta procedencia (animal y vegetal) han sido utilizadas para el aislamiento de péptidos a partir de hidrolizados enzimáticos (Korhonen & Pihlanto, 2003; A. Pihlanto & H. Korhonen, 2003), siendo interesante destacar que, dependiendo de la fuente proteica, del tipo de enzima usado y de las condiciones de procesado, la actividad biológica y los péptidos obtenidos son diferentes (Wang & Gonzalez, 2005).

Se han detectado péptidos bioactivos con propiedades antioxidantes e inhibitorias de la enzima convertidora de angiotensina en leche de cabra y oveja tratada con PAs de *C. cardunculus*. Por tanto, la generación de estos péptidos y la búsqueda de otros nuevos a través de la utilización de PAs vegetales es un área de interés biotecnológico (Meisel, 1997; Silva & Malcata, 2005b; Tavano, 2018).

## **Aplicaciones de interés médico**

Se ha visto que la PA cardosina A, proveniente de *C. cardunculus*, actúa sobre el colágeno, por lo que se ha propuesto el uso de esta enzima en procedimientos médicos donde se requiera remodelar la matriz extracelular. También se observó que es útil a la hora de disociar neuronas de la corteza cerebral a fin de crear cultivos neuronales (Duarte *et al.*, 2005). Una mayor proporción de neuronas presentaron morfología y función normal cuando fueron expuestas a cardosina A en comparación a cuando fueron disociadas con el método basado en la utilización de tripsina (Duarte *et al.*, 2007).

### 1.5. Características de *Arctium minus*

*Arctium minus* es una planta angiosperma perteneciente a la familia Asteraceae. Comúnmente se la conoce como “lapazo menor”. “*Arctium*” deriva del griego *arctos* (oso); probablemente se refiere a la vellosidad y la apariencia lanuda de la planta. “*minus*” surge en relación a la especie *Arctium lappa L.*, de mayor tamaño. Ambas plantas poseen una carga cromosómica de  $2n = 36$ .

Siendo nativa en la mayoría del continente europeo (exceptuando el sur de Italia) y en los alrededores del mar Caspio, fue introducida en el continente americano por los colonos franceses e ingleses que visitaban nueva Inglaterra en la década de 1670. Actualmente puede ser encontrada en Argentina, en las provincias de Buenos Aires, Catamarca, Chubut, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, La Pampa, La Rioja, Mendoza, Santa Fe y San Juan.

Crece en zonas húmedas con semisombra y suelo nitrificado. Llega a medir entre 0.5 y 1,5 metros y es de ciclo bienal; durante el primer año de la planta sólo aparecen las hojas basales y la raíz, y su crecimiento y floración ocurren en el segundo año.

Las hojas basales son grandes, acorazonadas y ásperas. Tienen un pecíolo largo y hueco. Las hojas a lo largo del tallo, con el pecíolo más corto, son alternas, con el borde de la hoja dentado irregularmente y un poco ondulado.

Las raíces y los tallos de esta especie han sido utilizados como diuréticos, como laxantes y para el tratamiento del asma, el reumatismo, la gota, y el resfrío (Gross *et al.*, 1980).

Las inflorescencias (Figura 1.4) se presentan en racimos terminales (capítulos) a lo largo de las ramas. Tienen un pedúnculo pequeño, del mismo tamaño (unos 2 cm.) que el involucre. Las flores son pentámeras, púrpuras, hermafroditas, pequeñas, tubulosas y actinomorfas (de simetría radial). La floración ocurre durante el verano. Los extractos de estas flores poseen actividad proteolítica y actividad coagulante de leche. En el suero obtenido durante el proceso de coagulación se detectaron péptidos bioactivos con actividades antioxidante e inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (Cimino *et al.*, 2015).



Figura 1.4. Inflorescencia de *Arctium minus*.

### 1.6. Expresión de proteínas recombinantes en *Kluyveromyces lactis*.

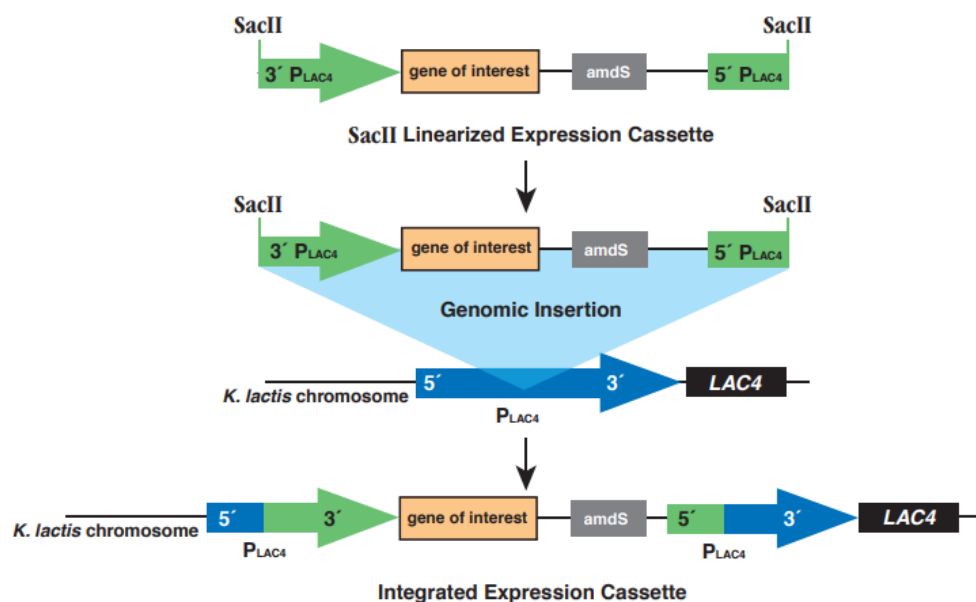
La levadura *Kluyveromyces lactis* ha sido utilizada para la expresión de proteínas heterólogas recombinantes a lo largo de las últimas tres décadas. Hasta la fecha, ha permitido la expresión de proteínas provenientes de un gran rango de especies. Por ejemplo, ha sido utilizada en fermentadores de 100 m<sup>3</sup> para la generación de proquimosina bovina recombinante (Van Den Berg, *et al.*, 1990).

*K. lactis* es un microorganismo GRAS (“generally recognized as safe”), es decir, reconocido como seguro para la salud (Bonekamp & Oosterom, 1994). Es fácil de manipular genéticamente, su genoma está completamente secuenciado (Dujon *et al.*, 2004) y es capaz de producir proteínas heterólogas en gran concentración (Van Ooyen, *et al.*, 2006). Además, puede generar proteínas recombinantes en medios de cultivos simples, por lo que puede ser utilizada en producciones de escala industrial, y no requiere la adición de etanol (lo cual es frecuente con levaduras metilotróficas como *Pichia pastoris*).

La expresión de proteínas recombinantes en este organismo requiere de la construcción de un vector de expresión que contenga el gen de interés río abajo de un promotor fuerte de levadura, y la introducción de esta construcción en una cepa adecuada (normalmente se utiliza la cepa GG799). El vector se introduce linealizado, para favorecer la integración de este en el genoma a través de recombinación homóloga. Una estrategia de expresión



común se basa en introducir el gen de interés en la región promotora del locus LAC4, como se muestra en la Figura 1.5 (Swinkels *et al.*, 1993).

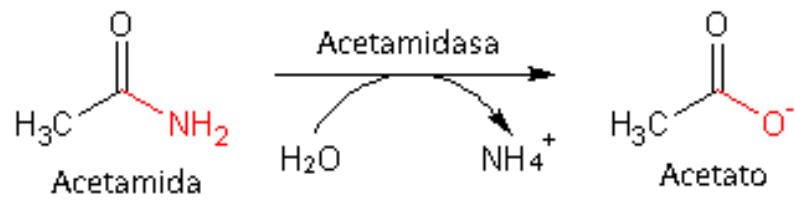


**Figura 1.5.** Integración del vector de expresión linealizado en el genoma de *K. lactis* a través de recombinação homóloga en la región promotora del locus LAC4. En verde se muestran las regiones de homología con el promotor de LAC4 ( $P_{LAC4}$ ) presentes en el vector; en naranja se muestra el gen que se desea introducir en el cromosoma (gen de interés); en gris se muestra el gen (*amdS*) codificante de acetamidasa; en azul se muestra el promotor del gen LAC4 presente en el cromosoma; en negro se muestra el gen LAC4.

Fuente: <https://www.neb.com/-/media/catalog/datacards-or-manuals/manuale1000.pdf>

Los marcadores de selección comúnmente utilizados en los vectores de expresión para *K. lactis* son genes de resistencia a antibióticos como neomicina e higromicina B, o genes que complementan auxotrofías. Una estrategia alternativa de selección involucra el uso de acetamida en un medio sin otras fuentes de nitrógeno. En este método, un gen codificante de una acetamidasa (*amdS*) de *Aspergillus* presente en el vector de expresión, confiere a la célula la capacidad de transformar acetamida en amonio (Figura 1.6) para utilizarlo como fuente de nitrógeno (Colussi & Taron. 2005).





**Figura 1.6.** Reacción catalizada por la acetamidasa amdS.



A partir de extractos acuosos, en el CiProVe ha sido demostrada la presencia de proteasas aspárticas en varias especies de flores de cardos que crecen en la Provincia de Buenos Aires. El precursor de una de estas proteasas, *preproarctiumsina*, ha sido clonado a partir de mRNA de pimpollos de *Arctium minus* L. (Asteraceae). En este trabajo se planteó la clonación del zimógeno (*proarctiumsina*) y la obtención de una construcción que posteriormente permita su expresión en un sistema eucariótico (*K. lactis*), con el fin de estudiar su aplicación en procesos biotecnológicos tales como la fabricación de quesos o la obtención de péptidos bioactivos.

### **Objetivos generales**

- 1) Llevar a cabo una búsqueda bibliográfica profunda sobre un tema específico de investigación.
- 2) Obtener adiestramiento en distintas técnicas de laboratorio como son:
  - la preparación de soluciones buffer y otros reactivos de uso frecuente;
  - el manejo de técnicas de biología molecular, reacciones de PCR y de digestión enzimática, preparación de células competentes químicas, transformación de ADN, etc.
  - el manejo de técnicas de microbiología;
  - la utilización de herramientas bioinformáticas.
- 3) Lograr la integración y adaptación a un grupo de trabajo de investigación.
- 4) Adquirir criterio experimental que permita optimizar distintos tipos de ensayos.
- 5) Resolver los problemas teóricos o experimentales que se presenten durante el desarrollo de la investigación.

### **Objetivos específicos**

- 1) Clonar el zimógeno de la proteasa a partir de construcciones disponibles en el laboratorio (*pGEM®-T Easy-preproarctiumsina*).
- 2) Obtener una construcción que permita la posterior expresión de la proteasa en un sistema eucariótico.



### 3.1. Antibióticos

Nombre	Stock (mg/ml)	Concentración final en medio (µg/ml)
Ampicilina (Bagó)	200	100
Kanamicina (Sigma)	100	50
Estreptomicina (Sigma)	100	100
Cloranfenicol (Sigma)	100	30

### 3.2. Buffers

- 10X Buffer KpnI (Thermo Fisher Scientific). Utilizado en las digestiones enzimáticas donde actuó la enzima KpnI.
- 10X CutSmart Buffer (New England BioLabs). Utilizado en las digestiones enzimáticas donde actuó la enzima SacII.
- 2X Rapid Ligation Buffer (Promega Corporation). Utilizado en las reacciones de ligación de ADN.
- Anza™ Red Buffer (Thermo Fisher Scientific). Utilizado en las digestiones enzimáticas donde actuaron las enzimas NotI y XhoI.
- Buffer TAE (pH 7,6): Tris (Biopack) 40 mM; Ácido acético (Cicarelli) 20 mM; EDTA (Invitrogen) 1mM. Utilizado para preparar geles de agarosa y como buffer de corrida en las electroforesis de ADN.
- Buffer TBFI (pH 5,8): Cloruro de Rubidio (Sigma) 100 mM; Cloruro de Manganeso (Sigma) 50 mM; Acetato de Potasio (Sigma) 30 mM; Cloruro de Calcio (Cicarelli) 10 mM; Glicerol (Biopack) 15%. Utilizado en la preparación de células competentes químicas.
- Buffer TBFII (pH 6,5): MOPS (Sigma) 10 mM; Cloruro de Rubidio (Sigma) 10 mM; Cloruro de Calcio (Cicarelli) 75 mM; Glicerol (Biopack) 15%. Utilizado en la preparación de células competentes químicas.
- GoTaq® Reaction Buffer. Utilizado en las reacciones de PCR, donde actuó la enzima ADN polimerasa GoTaq.

### 3.3. Cepas

- *Escherichia coli* DH5α™ (Thermo Fisher Scientific). Genotipo: fhuA2 (argF-lacZ) U169 phoA glnV44 80 (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17.
- *Kluyveromyces lactis* GG799 (New England BioLabs).

### 3.4. Enzimas

- ADN ligasa T4 (Promega Corporation).
- ADN polimerasa GoTaq® (Promega Corporation).
- Enzima de restricción Anza™ NotI (Thermo Fisher Scientific).
- Enzima de restricción Anza™ XhoI (Thermo Fisher Scientific).
- Enzima de restricción KpnI (Thermo Fisher Scientific).
- Enzima de restricción SacII (New England BioLabs).

### 3.5. Softwares

- Genome Compiler v2.2.88. Permitió alinear y graficar, con la secuencia de ADN esperada, los cromatogramas obtenidos por secuenciación.
- IBS: Illustrator for Biological Sequences v1.0.3: Permitió generar esquemas de secuencias de ADN e indicar en ellas las regiones de interés.
- OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>): Permitió calcular las temperaturas de melting y el contenido de guanina-citosina de los primers diseñados. Además, fue útil para evaluar la formación de dímeros y horquillas.
- Plasmapper 2.0 (<http://wishart.biology.ualberta.ca/PlasMapper/>): Permitió generar un mapa de las construcciones deseadas.
- Seqman™ II v5.00: Permitió alinear la secuencia original con la obtenida por secuenciación, a fin de verificar la fidelidad de esta última.
- SerialCloner 2.6.1: Permitió realizar digestiones teóricas de las construcciones para establecer los patrones de restricción esperados.

### 3.6. Kits comerciales

- GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific).
- Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega Corporation).

### 3.7. Medios de cultivo

- LB líquido: NaCl (Biopack) 10 g/l; extracto de levadura (Britania) 10g/l; triptona (Biokar) 10 g/l.
- LB sólido: NaCl (Biopack) 10 g/l; extracto de levadura (Britania) 10 g/l; triptona (Biokar) 10 g/l; agar (Chemit) 15 g/l.

- YPGlu líquido: extracto de levadura (Britania) 10 g/l; triptona (Biokar) 20 g/l; glucosa (Sigma) 20g/l.
- YPGlu sólido: extracto de levadura (Britania) 10 g/l; triptona (Biokar) 20 g/l; glucosa (Sigma) 20g/l; agar (Chemit) 24g/l.
- YCB Sólido con acetamida: Tris-HCl 1M, 3% V/V; polvo YCB (New England BioLabs) 11,7 g/l; agar (Chemit) 15g/l; solución de acetamida 100X (New England BioLabs) 1% V/V.

### 3.8. Primers

- **Primer Forward E1:**

Secuencia: VVVC↓TCGAGAAAAGAGAGGCA**GTCTCCAATGGTGA**

↓Sitio de restricción: XhoI.

Temperatura de melting: 73,4 °C

%GC: 52,8 %

- **Primer Reverse E1:**

Secuencia: AATGC↓GGCCGC**TCAAGCTGCTTCTGC**

↓Sitio de restricción: NotI.

Temperatura de melting: 73,3 °C

%GC: 61,5 %

- **Primer Forward E2:**

Secuencia: AAAGGTAC↓C**GTCTCCAATGGTGA**

↓Sitio de restricción: KpnI

Temperatura de melting: 66,6 °C

%GC: 50 %

- **Primer reverse E2:**

Secuencia: AATGC↓GGCCGC**TCAAGCTGCTTCTGC**

↓Sitio de restricción: NotI

Temperatura de melting: 73,3 °C

%GC: 61,5 %

**Nota:** En gris se indica el sitio de restricción añadido; en verde se indica la secuencia que codifica para el sitio de reconocimiento de la proteasa KEX2; en celeste se indica la región de homología con la secuencia a amplificar. V = A, C o G. El %GC y la temperatura de melting fueron calculados a través del software OligoAnalyzer 3.1.

### 3.9. Vectores

- **pGEM®-T Easy (Promega Corporation):** La figura 2.1 muestra su mapa. Es un vector de clonado de alto número de copias que se obtiene del proveedor linealizado y con una timina protruyente en cada extremo 3'. Esto otorga un sitio de inserción para los productos de PCR generados con ciertas polimerasas que dejan adeninas 3' protruyentes (como la polimerasa Taq) impidiendo a su vez la recircularización del plásmido.

Posee el sitio de clonado múltiple (MCS) dentro del gen LacZ, lo que permite la selección de colonias recombinantes mediante screening blanco/azul (a través de la adición de IPTG y X-gal al medio de cultivo).

La selección de bacterias transformantes puede realizarse utilizando ampicilina como presión de selección ya que el vector confiere resistencia a dicho antibiótico a través del gen Amp<sup>r</sup>, el cual codifica una β-lactamasa.

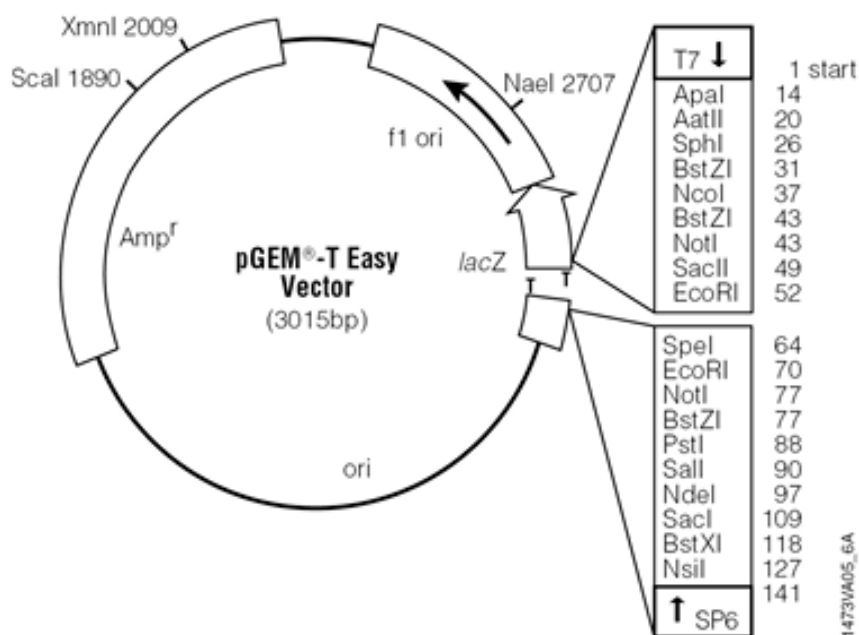
- **pKLAC1 (New England BioLabs):** La figura 2.2 muestra su mapa. Es un vector de alto nivel de expresión de proteínas recombinantes. Luego de ser linealizado con SacII o BstXI, es capaz de integrarse en el locus LAC4 de células *K. lactis* GG799 competentes a través de recombinación homóloga.

Contiene el gen Amp<sup>r</sup> para seleccionar a las bacterias *Escherichia coli* transformantes. Además, posee el marcador de selección amdS, que codifica para una acetamidasa fúngica (enzima que confiere la capacidad de utilizar acetamida como fuente de carbono y nitrógeno). De esta manera, se pueden seleccionar las levaduras transformantes cultivándolas en un medio YCB suplementado con acetamida.

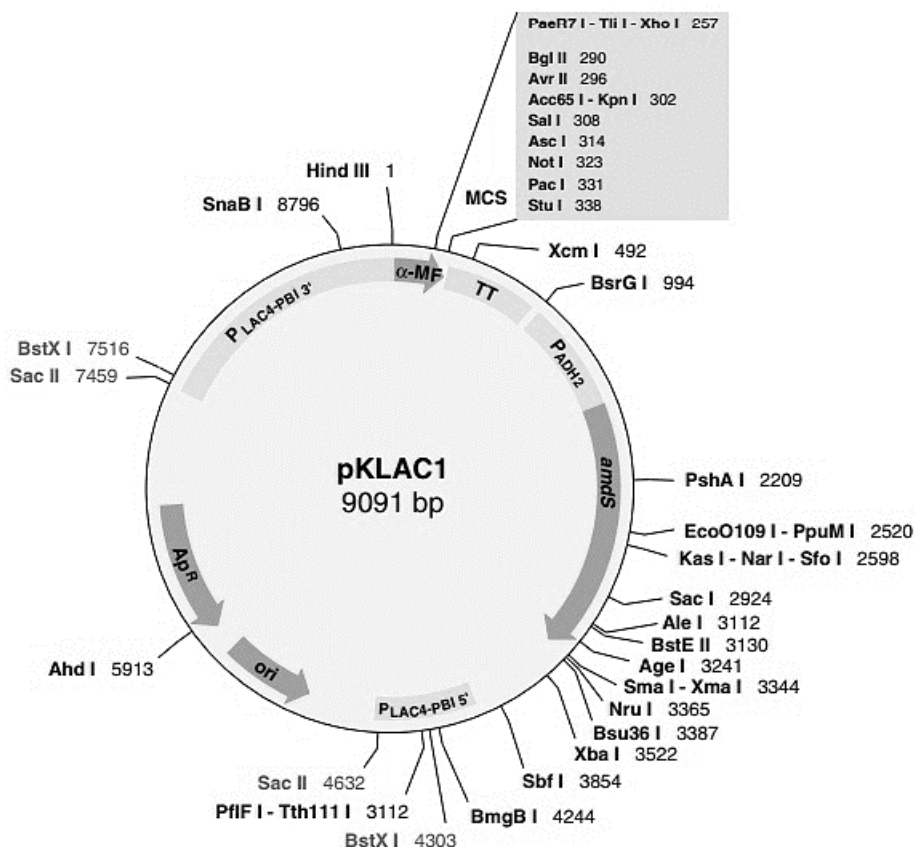
El α-Mating factor (α-MF), ubicado río arriba del MCS, actúa como un péptido señal para la secreción de la proteína recombinante. Por lo tanto, se puede dirigir la proteína hacia el citosol o hacia el medio extracelular dependiendo de cómo se realice la inserción de su marco de lectura abierto (ORF) en el vector.



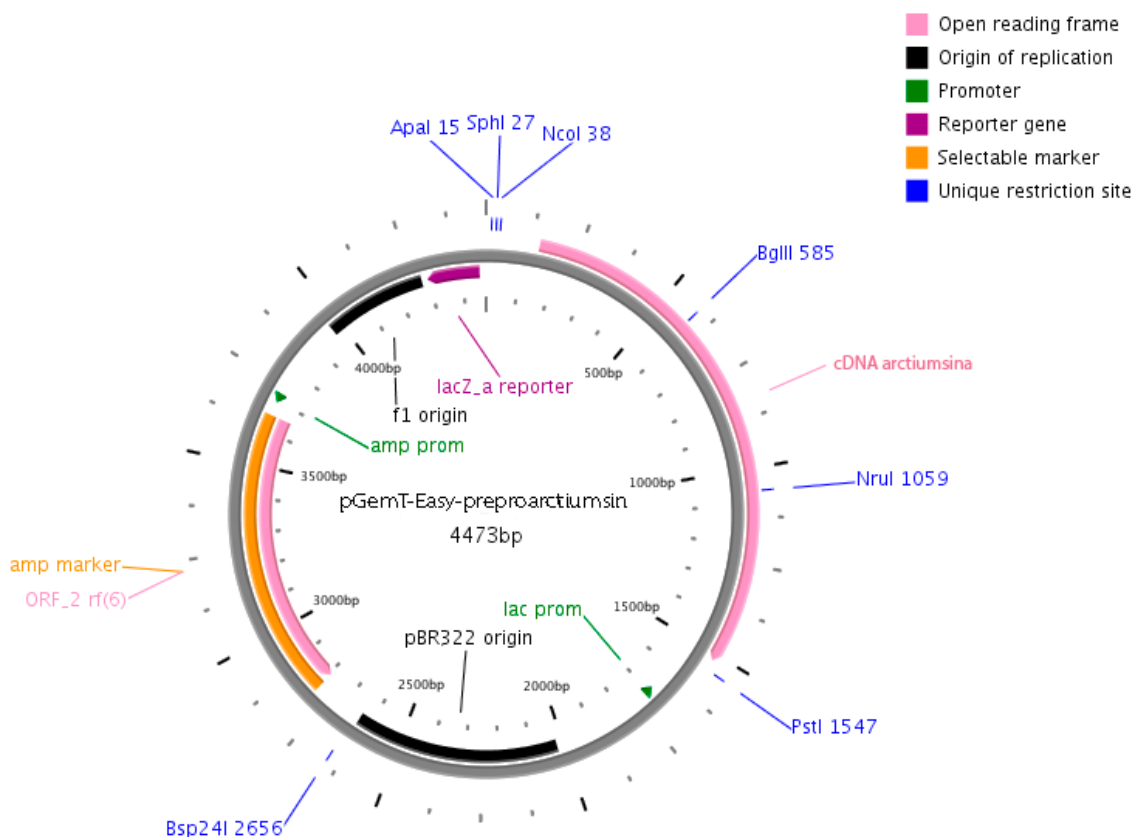
- ***pGEM®-T Easy-preproarctiumsin*** (Figura 2.3): Construcción generada a partir de la ligación del vector pGEM®-T Easy y el cADN de la preproarctiumsina (Número de acceso GenBank: AJA72485.1). Esta construcción se utilizó como ADN molde para las reacciones de PCR que dieron lugar a los fragmentos de cADN con sitios de restricción agregados.



**Figura 2.1.** Mapa del plásmido pGEM®-T Easy. Amp<sup>r</sup>: Gen de β-lactamasa. Ori: Origen de replicación ColE1/pMB1/pBR322/pUC. lacZ: Gen del fragmento α de la enzima β-galactosidasa. f1 ori: origen de replicación del fago F1. T7/SP6: Regiones de hibridación para los primers usados en secuenciación.



**Figura 2.2.** Mapa del plásmido pKLAC1. Ap<sup>r</sup>: Gen de β-lactamasa. Ori: origen de replicación pMB1 para *Escherichia Coli*. α-MF: secuencia señal de secreción. MCS: sitio de clonado múltiple. TT: terminador de la transcripción. amdS: gen de acetamidasa fúngica. PADH2: promotor para la transcripción de amdS. P<sub>LAC4-PBI 3'</sub>: extremo 3' del promotor LAC4, utilizado para la recombinación homóloga. P<sub>LAC4-PBI 5'</sub>: extremo 5' del promotor LAC4, utilizado para la recombinación homóloga.



**Figura 2.3.** Mapa de la construcción *pGEM®-T Easy-preproarctiumsin*. Amp marker: Gen de  $\beta$ -lactamasa. LacZ\_a reporter: Gen del fragmento  $\alpha$  de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Lac prom y amp prom: promotores de los genes amp marker y lacZ\_a reporter, respectivamente. pBR322 origin y f1 origin: orígenes de replicación para *Escherichia coli* y fago F1, respectivamente.

### 3.10. Otros

- Agarosa D1 de baja electroendosmosis (Conda).
- Agua inyectable Braun
- GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 10000X (Biotium).
- IPTG (Agilent Technologies).
- Patrón de peso molecular para electroforesis GeneRuler™ 1kb (Thermo Fisher Scientific).
- PCR Nucleotide Mix 10mM (Promega Corporation).
- Sorbitol (Sigma) 1M.
- Tris – HCl (BioBasic – Anedra) 1M.
- X-Gal (Thermo Fisher Scientific).



En esta sección se detallan los métodos utilizados a lo largo del trabajo, ordenados alfabéticamente.

#### 4.1. Amplificación de ADN

La amplificación de la secuencia de proarctiumsina se realizó a través de dos reacciones de PCR con dos grupos de primers diferentes. Estos primers fueron diseñados en base a las dos estrategias propuestas por el proveedor del sistema para insertar el cADN en el vector pKLAC1 (ver apartado de diseño experimental).

Las condiciones utilizadas en dichas reacciones se muestran en las tablas 4.1 y 4.2.

	Estrategia E1	Estrategia E2
<b>GoTaq<sup>®</sup> Reaction Buffer 5X</b>	10µl	10µl
<b>Primer Forward</b>	0,4µl	0,4µl
<b>Primer Reverse</b>	0,4µl	0,4µl
<b>ADN polimerasa GoTaq<sup>®</sup></b>	0,25µl	0,25µl
<b>PCR Nucleotide Mix 10mM</b>	1µl	1µl
<b>Molde (<i>pGEM<sup>®</sup>-T Easy-preproarctiumsina</i>)</b>	1µl	1µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	36,95µl	36,95µl
<b>Volumen final</b>	50µl	50µl
<b>Temperatura de annealing</b>	50°C	49°C

**Tabla 4.1.** Mezclas de reacción utilizadas en las reacciones de PCR, donde se amplificó el cDNA de arctiumsina.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
<b>Desnaturalización inicial</b>	95	5
<b>30 ciclos</b>	<b>Desnaturalización</b>	95
	<b>Hibridación</b>	Temperatura de annealing
	<b>Extensión</b>	72
<b>Extensión final</b>	72	10

**Tabla 4.2.** Programa de amplificación utilizado en las reacciones de PCR, donde se amplificó el cDNA de proarctiumsina.

#### 4.2. Crecimiento y mantenimiento de cultivos bacterianos

El crecimiento de las distintas cepas bacterianas se realizó en medio LB líquido a 37°C con agitación a 250 rpm en un incubador orbital. Para la selección y mantenimiento de la presión selectiva de clones recombinantes se añadieron diferentes antibióticos. La concentración a la que se llevaron los antibióticos en el medio de crecimiento, ya sea líquido o sólido, se detalla en el apartado 3.1 de la sección Materiales.

Para el repique en medio líquido se tomaron tubos de 15 ml estériles. Se colocaron 5 ml de medio con el antibiótico de selección correspondiente. Se picaron tres o cuatro colonias de cada placa y se colocaron en sendos tubos con el rótulo correspondiente. Se incubaron en agitador orbital a 37°C y 250-280 rpm.

El mantenimiento de las distintas cepas bacterianas y clones recombinantes se realizó en medio LB en presencia de glicerol 15% a -80°C.

#### 4.3. Cuantificación de ADN mediante espectrofotometría

La concentración de ADN de las muestras fue determinada mediante espectrofotometría, con el fin de calcular el volumen de solución requerido para las reacciones de digestión y ligación. En primer lugar, se realizó un blanco con agua destilada. Luego, se midió la absorbancia a 260 nm ( $A^{260nm}$ ) de cada una de las muestras y se calculó la concentración mediante la siguiente ecuación derivada de la ley de Lambert-Beer:

$$C = A^{260nm} \times 50\mu g/ml \times F_{Dilución}$$

Donde **C**: concentración de la muestra;  $A^{260nm}$ : Absorbancia de la muestra a 260nm;  $F_{Dilución}$  (factor de dilución) =  $V_{final}/V_{inicial}$ .

#### 4.4. Digestión de ADN

Para introducir la secuencia de proarctiumsina en el sitio de clonado múltiple del vector pKLAC1, fue necesario en primer lugar digerir las construcciones *pGEM®-T Easy-AmE1*, *pGEM®-T Easy-AmE2* y pKLAC1 con las enzimas de restricción

correspondientes a cada estrategia de clonado. En primer lugar, se intentó realizar reacciones de doble digestión con las condiciones indicadas en la tabla 4.3.

	<b>pKLAC1 (E1)</b>	<b>pKLAC1 (E2)</b>	<b>pGEM®-T Easy-AmE1</b>	<b>pGEM®-T Easy-AmE2</b>
<b>ADN</b>	3 µl	3 µl	1,28 µl	1,28 µl
<b>Buffer Anza™ red 10x</b>	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
<b>Thermofisher KpnI</b>	-	2 µl	-	2 µl
<b>Anza™ XhoI</b>	2 µl	-	2 µl	-
<b>Anza™ NotI</b>	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	29 µl	µl	30,72µl	30,72 µl
<b>tiempo</b>	1h	1h	1h	1h

**Tabla 4.3.** Condiciones utilizadas en la digestión doble de las construcciones *pGEM®-T Easy-AmE1*, *pGEM®-T Easy-AmE2* y *pKLAC1*, con las enzimas de restricción correspondientes a cada estrategia.

Luego se realizaron las digestiones correspondientes a la estrategia E2 de forma secuencial, primero con *KpnI* (tabla 4.4) y luego con *NotI* (tabla 4.5).

	<b>pKLAC1</b>	<b>pGEM®-T Easy-AmE2</b>
<b>ADN</b>	15 µl	15 µl
<b>Buffer KpnI 10x</b>	5 µl	5 µl
<b>Thermofisher KpnI</b>	2,5 µl	2,5 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	27,5 µl	27,5 µl
<b>Tiempo</b>	4hs	4hs
<b>Temperatura</b>	37°C	37°C

**Tabla 4.4.** Condiciones utilizadas en la digestión de las construcciones *pGEM®-T Easy-AmE2* y *pKLAC1* con la enzima de restricción *KpnI*.

	<b>pKLAC1</b>	<b>pGEM®-T Easy-AmE2</b>
<b>Producto de la digestión con KpnI</b>	40 µl	40 µl
<b>Buffer Anza™ red 10x</b>	5 µl	5 µl
<b>Anza NotI</b>	2,5 µl	2,5 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	2,5 µl	2,5 µl
<b>Tiempo</b>	1h	1h
<b>Temperatura</b>	37°C	37°C

**Tabla 4.5.** Condiciones utilizadas en la digestión de las construcciones *pGEM®-T Easy-AmE2* y *pKLAC1* (previamente digeridas con *KpnI*) con la enzima de restricción *NotI*.

Una vez obtenida la construcción *pKLAC1-AmE1*, esta fue digerida con *SacII* para linealizarla e introducirla en *K. lactis* (Tabla 4.6).

<i>pKLAC1-AmE1</i>	
<b>SacII</b>	1 $\mu$ l
<b>Buffer CutSmart® 10X</b>	5 $\mu$ l
<b>ADN</b>	12,5 $\mu$ l
<b>H<sub>2</sub>O</b>	31,5 $\mu$ l
<b>Temperatura</b>	37°C
<b>Tiempo</b>	1h

**Tabla 4.6.** Condiciones utilizadas en la digestión de la construcción *pKLAC1-AmE1* con la enzima de restricción *SacII*.

#### 4.5. Electroforesis en geles de agarosa

Las muestras de ADN plasmídico, productos de digestión enzimática y fragmentos de amplificación de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 0,7%, que permitieron separar fragmentos de entre 0,8 y 12 kb. El gel se preparó disolviendo la agarosa y el colorante GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 10000X (Biotium) en buffer TAE 1X. La electroforesis se llevó a cabo con buffer TAE a voltaje constante de 90 voltios durante 30-60 minutos en un sistema Mini-Sub Cell GT Cell (Bio-Rad). Los ácidos nucleicos se observaron en un transiluminador (Vilber Lourmat) con luz ultravioleta a 260 nm.

#### 4.6. Ligación entre el ADN amplificado y el vector pGEM®-T Easy

La ligación se realizó con la mezcla de reacción indicada en la tabla 4.7. Se incubó toda la noche a 4°C para lograr la máxima eficiencia posible.

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
<b>2X Rapid Ligation Buffer</b>	5 $\mu$ l
<b>ADN ligasa T4</b>	1 $\mu$ l
<b>Producto de purificación E1/E2</b>	3 $\mu$ l
<b>Vector pGEM®-T Easy</b>	1 $\mu$ l

**Tabla 4.7.** Mezcla de reacción utilizada en la ligación entre el vector pGEM®-T Easy y los fragmentos de DNA de proarctiusina provenientes de las reacciones de PCR.



#### 4.7. Ligación entre el fragmento de ADN de proarctiumsina y el vector pKLAC1

Se puso a punto la ligación para la estrategia E1, probando tres relaciones de vector:inserto (tabla 4.8). En todos los casos se incubó durante toda la noche a 4°C.

	Relación 1:3	Relación 1:5	Relación 1:10
<b>H<sub>2</sub>O</b>	2,25	1,25	-
<b>Buffer</b>	0,5	0,5	0,5
<b>pKLAC1</b>	0,5	0,5	0,5
<b>fragmento E1</b>	1,5	2,5	3,75
<b>T4 ligasa</b>	0,25	0,25	0,25

**Tabla 4.8.** Mezclas de reacción utilizadas para la optimización de la ligación entre el vector pKLAC1 y el fragmento de DNA de arctiumsina a insertar según la estrategia de clonado E1. Se utilizaron tres relaciones de concentración vector:inserto.

#### 4.8. Obtención de ADN plasmídico

Se utilizó el kit comercial “Wizard<sup>®</sup> Plus SV Miniprep DNA Purification System”, cuyo protocolo es el siguiente:

- 1) Centrifugar entre 1ml y 10ml del cultivo saturado durante 5 minutos.
- 2) Resuspender el pellet en 250µl de solución de resuspensión.
- 3) Añadir 250µl de solución de lisis y mezclar 4 veces por inversión.
- 4) Añadir 10µl de solución de proteasa alcalina y mezclar 4 veces por inversión.
- 5) Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- 6) Añadir 350µl de solución de neutralización y mezclar 4 veces por inversión.
- 7) Centrifugar a máxima velocidad a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 8) Colocar el sobrenadante en una columna de centrifugación, la cual a su vez debe insertarse en un tubo colector.
- 9) Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto. Descartar el líquido del tubo colector.
- 10) Añadir 750µl de solución de lavado a la columna. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto y descartar el líquido del tubo colector.
- 11) Repetir el paso anterior utilizando 250µl de solución de lavado.
- 12) Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos.

- 13) Transferir la columna de centrifugación a un eppendorf estéril de 1,5ml.
- 14) Añadir 100µl de agua libre de nucleasas a la columna. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto.
- 15) Descartar la columna y reservar a -20°C el eppendorf (que contiene el ADN plasmídico).

#### **4.9. Obtención de *Escherichia coli* DH5α™ competentes mediante el uso de cloruro de rubidio y cloruro de calcio**

Se partió de un stock glicerolado de *E. coli* DH5α, el cual se plaqueó en un agar LB sin antibiótico e incubó toda la noche a 37°C. Se repicó una colonia en un tubo Falcon con 5ml de medio LB y se incubó a 37°C con agitación (250 rpm) toda la noche. Se tomaron 500 µl de dicho cultivo saturado y se realizó una dilución 1/100 con medio LB fresco (500 µl de cultivo + 50 ml de LB) en un Erlenmeyer. Se incubó a 37°C durante 2,5 horas, alcanzando una DO(600nm) de 0,5063. Se colocó el Erlenmeyer en hielo durante 10 minutos y luego se tomó una alícuota de 40 ml, la cual se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos y 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 16 ml de buffer TBF1 (ajustado a pH 5,8 con ácido acético y esterilizado por filtración). La nueva suspensión se colocó en hielo durante 5 minutos y posteriormente se centrifugó a 6000rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1,6ml de buffer TBF2 (ajustado a pH= 6,5 con KOH y esterilizado por filtración). Se incubó en hielo durante una hora y finalmente se fraccionó en alícuotas de 50µl en tubos eppendorf estériles, los cuales se reservaron inmediatamente a -80°C.

Se realizaron controles de esterilidad, plaqueando la suspensión final de bacterias en agar LB y agar LB + ampicilina (100µg/ml). Solo se observó crecimiento en el agar LB, lo cual se esperaba de un cultivo sin contaminación, ya que la cepa DH5α no posee resistencia a los antibióticos antes mencionado.

#### **4.10. Obtención de levaduras *K. lactis* GG977 electrocompetentes**

Se tomaron 5 ml de cultivo líquido de levaduras *K. lactis* GG977 y se los colocaron en un Erlenmeyer de 2 litros que contenía 250ml de medio YPGlu líquido. Se incubó a 30°C con agitación (170 rpm) durante aproximadamente 20 horas.

El cultivo obtenido ( $DO^{600nm} = 4$ ) se centrifugó 10 minutos a 4°C y 5000 rpm; se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 40 ml de agua estéril y fría. Luego, se añadió más agua hasta alcanzar un volumen final de 250 ml.

La nueva suspensión de levaduras se centrifugó 10 minutos a 4°C y 6500 rpm, y el pellet se resuspendió en 125 ml de agua.

Finalmente, se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 4°C y 6500 rpm; la resuspensión del pellet se realizó en 15 ml de sorbitol 1M estéril y frío. La suspensión final se fraccionó en alícuotas de 100  $\mu$ l con glicerol al 16%, que fueron almacenadas a -80 °C.

#### **4.11. Purificación de ADN a partir de gel de agarosa**

Se utilizó el kit comercial “GeneJET Gel Extraction Kit”, cuyo protocolo se detalla a continuación:

- 1) Cortar con un bisturí la banda del gel de agarosa que contiene el fragmento de ADN de interés. Colocar el fragmento del gel en un eppendorf de 1.5ml (cuyo peso se conoce) y pesar en balanza analítica.
- 2) Añadir el buffer de adhesión en una proporción de 100 $\mu$ l/100mg de gel.
- 3) Incubar a 50°C, hasta que la agarosa se disuelva completamente. Mezclar la solución resultante en un vórtex. La solución debe quedar de color amarillo, lo cual indica un pH óptimo para continuar trabajando. Si la solución es de color naranja o violeta, añadir 10 $\mu$ l de solución 3M de acetato de sodio de pH 5,2.
- 4) Colocar la solución obtenida en los pasos anteriores en la columna de purificación (capacidad máxima: 800 $\mu$ l). Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto y descartar el líquido del tubo colector.
- 5) Añadir 700 $\mu$ l de buffer de lavado, previamente diluido con etanol en una proporción 1:5, en la columna de purificación. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto y descartar el líquido del tubo colector.
- 6) Centrifugar a máxima velocidad la columna de purificación vacía durante 1 minuto para eliminar cualquier resto de etanol (ya que puede inhibir las reacciones enzimáticas del proceso downstream).

- 7) Transferir la columna de purificación a un eppendorf de 1,5ml. Añadir 20µl de buffer de elución en el centro de la membrana de la columna de purificación. Centrifugar por 1 minuto a máxima velocidad.
- 8) Descartar la columna de purificación y reservar el eppendorf, que contiene el ADN, a -20°C.

#### **4.12. Transformación de *Escherichia coli* DH5α por shock térmico**

Para realizar la transformación por shock térmico se descongeló lentamente, en baño de hielo, una fracción (50µl) de las bacterias *E. coli* DH5α competentes generadas anteriormente. Se adicionó al eppendorf 1µl de la solución del plásmido (proveniente de la reacción de ligación) y 1µl de DMSO. Se incubó en hielo durante 30' y luego se realizó el shock térmico a 42°C durante 45 segundos. Al finalizar, se colocó rápidamente el eppendorf en baño de hielo y se lo dejó ahí durante 5 minutos. Se añadió 250µl de medio LB sin antibiótico y se incubó durante 2 horas a 37°C con agitación (250rpm). Se plaqueó la suspensión en agar LB suplementado con el antibiótico de selección correspondiente (ampicilina), IPTG y Xgal y se incubó toda la noche a 37°C.

El IPTG y el X-gal permitieron hacer un screening blanco-azul para diferenciar aquellas colonias cuyos plásmidos posee un inserto en el MCS (color blanco) de aquellas colonias cuyos plásmidos no lo poseen (color azul). El IPTG es un inductor de la expresión del operón LAC, dentro del cual se haya el marco de lectura de la β-galactosidasa. El X-gal es hidrolizado por la β-galactosidasa para dar un producto de color azul. El sistema se basa en que la secuencia codificante del péptido α de la β-galactosidasa, que se haya en el plásmido, queda interrumpida por el inserto cuando éste se coloca dentro del MCS. Cuando esto ocurre no se expresará correctamente el péptido α y la bacteria, que no puede sintetizarlo por sí misma debido a una deleción en su genoma, no tendrá una β-galactosidasa funcional.

#### **4.13. Transformación de *Kluyveromyces lactis* GG977 por electroporación**

Se tomaron 40 µl de suspensión de levaduras *K. lactis* GG977 electrocompetentes y se añadieron, junto con 1 µl del fragmento de ADN de 7734 pb (obtenido en la digestión de *pKLAC1-AmE1* con SacII), a un eppendorf de 1,5 ml. Se homogeneizó la mezcla en un vórtex y se trasvasó a una cubeta de electroporación Gene-Pulser® que se encontraba en

baño de hielo. Se aplicó, mediante un electroporador MicroPulser™, un pulso de 1,5 kV, 25  $\mu$ F y 200  $\Omega$ . Luego, se agregó 1 ml de Sorbitol 1M estéril y se mezcló con una punta de micropipeta p200. Finalmente, con la misma micropipeta, se tomaron 150  $\mu$ l de la mezcla y se plaquearon en medio YCB sólido suplementado con acetamida (el cual permite la selección de levaduras transformantes que poseen el gen AmdS, debido a que la acetamida es la única fuente de nitrógeno presente). La incubación se realizó a 30°C durante 72 horas.



En el CIProVe se intentó generar un sistema de expresión recombinante de la peptidasa arctiumsina a través de la transformación de *Kluyveromyces lactis* con el vector de expresión pKLAC1. Para lograr dicho objetivo se diseñó un protocolo para insertar la secuencia del zimógeno (proarctiumsina), obtenida a partir del cADN de la preproarctiumsina (figura 8.2 del apartado material complementario) bajo el promotor LAC4 del vector mencionado.

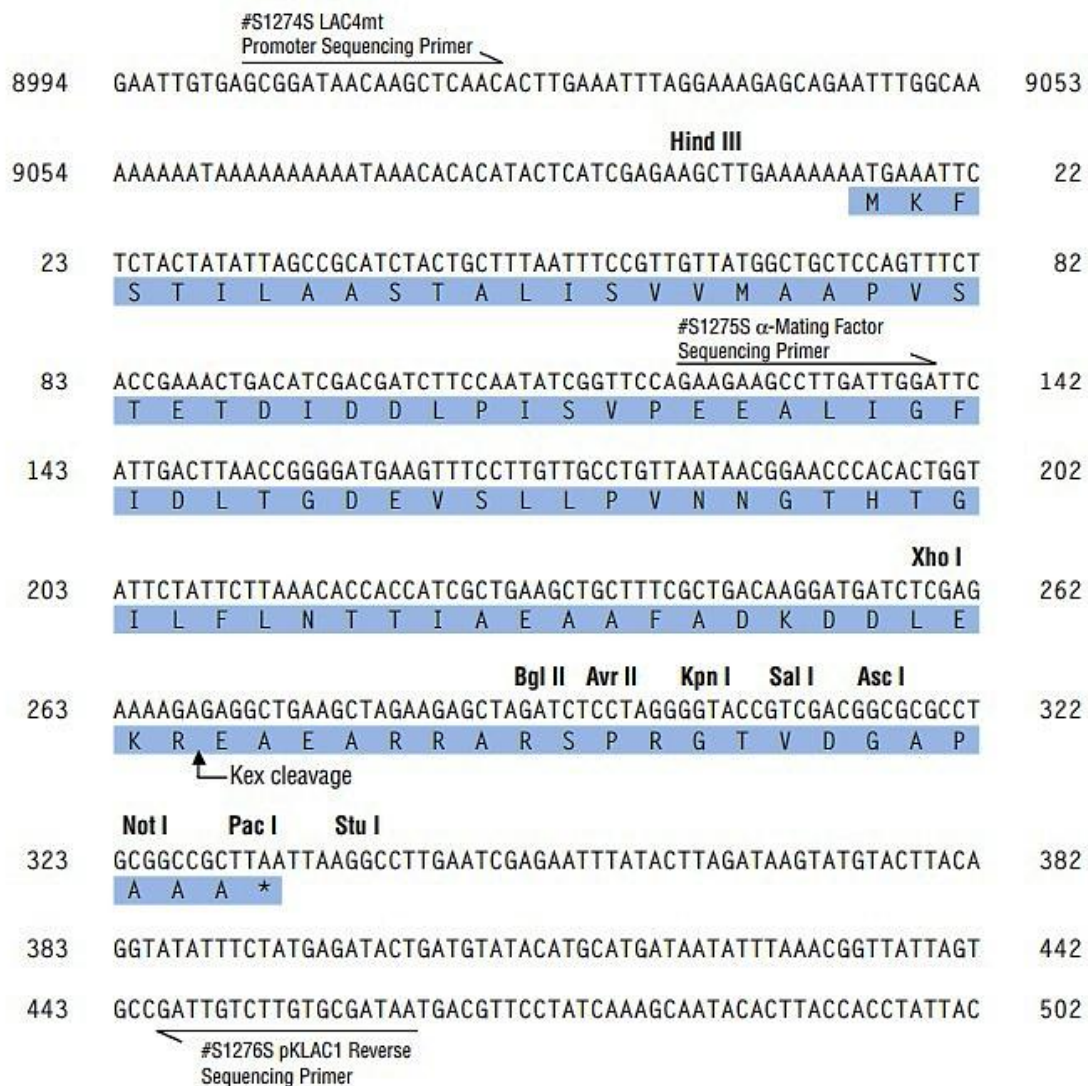
El protocolo completo se basaba en amplificar el cADN de la preproarctiumsina desde el pool de mARNs proveniente de un extracto acuoso de flores de *A. minus*. El producto de la amplificación se insertaría en el vector pGEM®-T Easy, generando así una construcción, *pGEM®-T Easy-preproarctiumsina*, que se introduciría en *Escherichia coli*. La construcción se obtendría luego mediante miniprep y se utilizaría de molde para realizar una nueva amplificación por PCR de la secuencia del zimógeno proarctiumsina (el péptido señal *pre* no es clonado porque es innecesario, puesto que el vector pKLAC1 aporta el péptido señal “alpha-Mating factor” ( $\alpha$ -MF) para la secreción de proteínas al medio extracelular en *K. lactis*. El segmento *pro*, si bien será eliminado en el procesamiento postraduccional, es clonado ya que contribuye al correcto plegamiento de la proteína). Durante esta segunda amplificación se incorporarían, a través de los primers, los sitios de restricción necesarios para introducir luego la secuencia del zimógeno en el vector pKLAC1. Dichos sitios de restricción fueron seleccionados en base a dos estrategias de clonado propuestas por el fabricante:

Para la **estrategia E1** se seleccionaron los sitios de restricción XhoI (en el extremo 5') y NotI (en el extremo 3') con el fin de que el inserto se introduzca río arriba del sitio de clivaje de la proteasa Kex2. Por este motivo, el primer *forward* debe contener dicho sitio de clivaje para que ocurra la eliminación del  $\alpha$ -MF. En esta estrategia, la proenzima se traduce con su extremo N-terminal nativo.

Para la **estrategia E2** se seleccionaron los sitios de restricción KpnI (en el extremo 5') y NotI (en el extremo 3') para que el inserto se introduzca río abajo del sitio de clivaje de la proteasa Kex2. En este caso el primer *forward* carece de dicho sitio de clivaje y el extremo N-terminal de la proenzima tendrá 11 aminoácidos extra. Esta estrategia fue diseñada originalmente para los casos en los que la secuencia a clonar incluye uno o más sitios XhoI. En esta ocasión, se utilizará para evaluar cómo varía la eficiencia de la proteasa Kex2 en la eliminación del  $\alpha$ -MF de la proarctiumsina con una secuencia alternativa en su extremo N-terminal. Esto se propuso porque existen antecedentes de

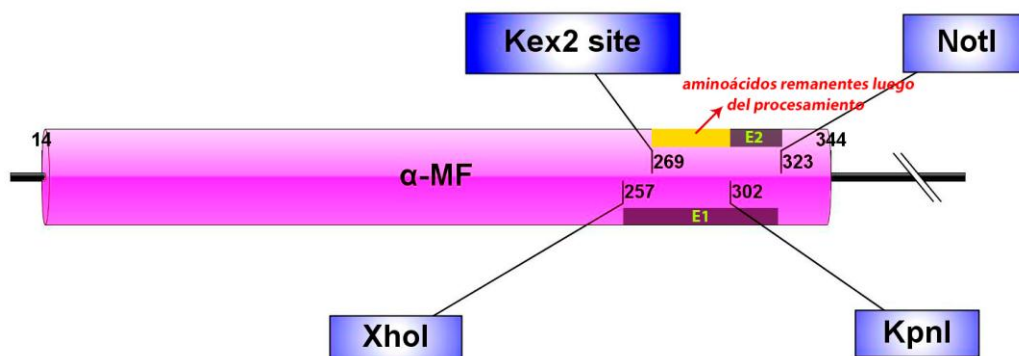
otras peptidasas aspárticas recombinantes donde el  $\alpha$ -MF no es completamente eliminado (Lufrano, 2012).

En la figura 5.1 se ilustra el sitio de clonado múltiple (MCS) del vector pKLAC1, necesario para comprender el diseño de las estrategias antes mencionadas, y en la figura 5.2 se muestra un esquema de las posiciones donde se insertaría el cADN de acuerdo a cada estrategia. En las figuras 8.1 A y B del apartado de material complementario se muestran las construcciones finales deseadas (*pKLAC1-AmE1* y *pKLAC1-AmE2*).



**Figura 5.1.** Secuencia nucleotídica del MCS del vector pKLAC1. La secuencia de aminoácidos del  $\alpha$ -MF se encuentra resaltada en celeste y está ubicada debajo de su secuencia nucleotídica correspondiente. Además, se indican las posiciones de clivaje para las distintas enzimas de restricción y las zonas de hibridación de los primers utilizados para secuenciación.





**Figura 5.2.** Esquema de las posiciones donde se insertará la secuencia de la proarctiumsina según cada estrategia (E1 y E2) en el vector pKLAC1. XhoI, NotI, KpnI: sitios donde actuarán las enzimas XhoI, KpnI, NotI, respectivamente. Kex2 site: secuencia que al traducirse generará el sitio de clivaje para la proteasa kex2. El tamaño de las secuencias no se encuentra en escala.

Tanto la secuencia que codifica para proarctiumsina como el vector pKLAC1 serían digeridos con las enzimas de restricción correspondientes y luego ligados entre sí. Las construcciones resultantes, *pKLAC1-AmE1* y *pKLAC1-AmE2*, se utilizarían para transformar en primer lugar a *E. coli* y posteriormente a *K. lactis*, generando así un microorganismo capaz de expresar arctiumsina recombinante. Las levaduras transformantes se seleccionarían haciendo uso del gen *AmdS*, el cual permite el crecimiento en medio mínimo con acetamida como fuente de nitrógeno.

Previo a este trabajo se logró generar la construcción *pGEM®-T Easy-preproarctiumsina* y se optimizó la amplificación de la secuencia de proarctiumsina con sitios de restricción agregados. Sin embargo, no se lograron obtener levaduras *K. lactis* *AmdS+* a partir de la transformación con los productos de ligación entre las secuencias del zimógeno y el vector pKLAC1. La incapacidad de obtener *pKLAC1-AmE1* y *pKLAC1-AmE2* probablemente fue causada por una falla en alguna de las digestiones enzimáticas. Si bien se habían realizado como control las digestiones simples sobre el vector pKLAC1 para verificar que ambas provocaban la linealización, fue imposible corroborar el éxito de las digestiones sobre la secuencia de la proarctiumsina. Esto ocurrió porque los fragmentos liberados eran del orden de los 3bp y la diferencia de tamaño entre el ADN digerido y sin digerir no podría haberse apreciado en una electroforesis.

Se propuso entonces un nuevo protocolo para evadir la posible problemática, similar al utilizado por otro grupo de investigación (Almeida *et. al.*, 2014). Este consistía en introducir las secuencias de la proarctiumsina (con los sitios de restricción añadidos y

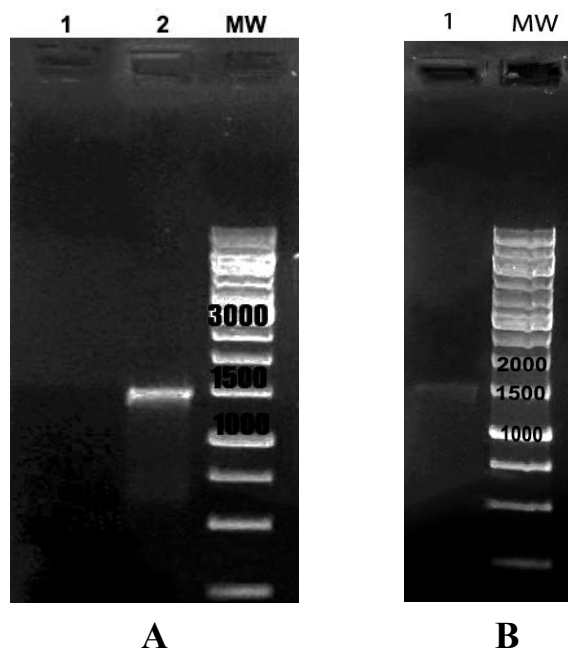
amplificadas desde la construcción *pGEM®-T Easy-preproarctiumsin*) en un nuevo vector *pGEM®-T Easy*. Estas nuevas construcciones, *pGEM®-T Easy-AmE1* y *pGEM®-T Easy-AmE2*, serían utilizadas para transformar *E. coli*, luego se obtendrían por miniprep y se digerirían para liberar al fragmento de la secuencia de proarctiumsin del vector (pudiendo así corroborar la correcta digestión mediante electroforesis). Además, de esta manera se dispondría de más masa de ADN en comparación a la que se obtuvo anteriormente, mejorando así la probabilidad de éxito de las reacciones de digestión y de ligación con *pKLAC1*.

El nuevo protocolo se llevó a cabo durante este trabajo y sus resultados se detallan a continuación.



En primer lugar, se realizó la amplificación de la secuencia de proarctiumsina [Métodos 4.1.], utilizando como molde la construcción *pGEM®-T Easy-preproarctiumsina* generada con anterioridad. Se utilizaron primers diseñados a partir de regiones conservadas de los extremos 5' y 3' del marco de lectura abierto, en base a las dos estrategias de clonado propuestas (descritas en el apartado de diseño experimental).

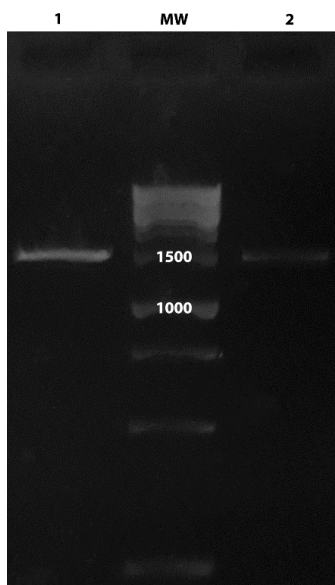
La reacción de amplificación en ambos casos dio como resultado una banda bien definida de un tamaño cercano a los 1500pb (determinado a partir del marcador de peso molecular Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1kb; figura 8.5 del apartado material complementario) y la ausencia de dicha banda en la calle del control negativo (Figuras 6.1 A y B). El peso de las bandas concuerda con el esperado (1490 bp para la estrategia E1 y 1478 bp para la estrategia E2).



**Figura 6.1. Chequeo de amplificación del cDNA de arctiumsina por electroforesis en gel de agarosa (0.7%).** **A)** cDNA amplificado mediante la estrategia E2 (sitios de restricción KpnI en extremo 5' y NotI en extremo 3'). Calle 1: control negativo (sin polimerasa). Calle 2: producto de amplificación. MW: marcador de peso molecular Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1kb. **B)** cDNA amplificado mediante la estrategia E1 (sitios de restricción XhoI en el extremo 5' y NotI en el extremo 3'). Calle 1: producto de amplificación. MW: marcador de peso molecular Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1kb.

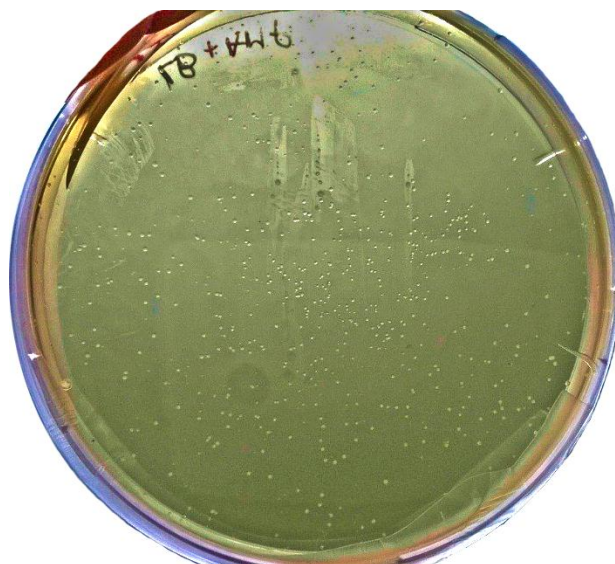
Otra alícuota de la PCR se sembró en un nuevo gel a fin de purificar los productos de amplificación. Las bandas fueron cortadas con un bisturí y el ADN contenido en ellas fue

purificado utilizando el kit comercial “GeneJET Gel Extraction Kit” de Termofisher [Métodos 4.11.]. El chequeo de la purificación se muestra en la figura 6.2.



**Figura 6.2. Chequeo de la purificación de los productos de PCR.** 1: Purificación de la banda de la estrategia E1. 2: Purificación de la banda de la estrategia E2. MW: marcador de peso molecular Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1kb.

Cada uno de los fragmentos de ADN amplificados y purificados se ligaron al vector pGEM®-T Easy [Métodos 4.6.]. Las construcciones obtenidas se utilizaron para transformar bacterias *E. coli* DH5α™ [Métodos 4.12.], que se hicieron competentes a través un método químico basado en la utilización de cloruro de rubidio y cloruro de calcio [Métodos 4.9.]. Luego de la incubación de las bacterias transformadas en medio LB con ampicilina se obtuvieron colonias (Figura 6.3), algunas de las cuales fueron seleccionadas al azar y repicadas en picos de flauta. Estos fueron utilizados para secuenciar el inserto, con el fin de escoger un clon para purificar la construcción.



**Figura 6.3.** Colonias de *E. coli* transformantes en medio LB suplementado con ampicilina. Las colonias de la imagen corresponden a la transformación con la construcción de la estrategia E2.

Una vez obtenidas las secuencias de las construcciones de cada uno de los clones seleccionados (tres de cada estrategia), se analizaron los cromatogramas y se alinearon con la secuencia del ADN de proarctiumsina para descartar la presencia de mutaciones mediante el software Seqman™ II v5.00. Se corroboró la ausencia de mutaciones en un clon de cada estrategia.

A partir de estos clones se aislaron las construcciones *pGEM®-T Easy -AmE1* y *pGEM®-T Easy-AmE2* haciendo uso del kit comercial “Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System” [Métodos 4.8.]. El vector pKLAC1 se obtuvo de igual manera, a partir de un clon de *E. coli* que lo contenía.

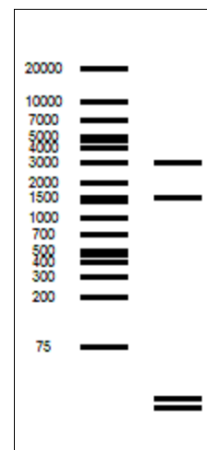
Antes de proceder con las reacciones de digestión, fue necesario cuantificar, mediante espectrofotometría, tanto el vector pKLAC1 como las construcciones [Métodos 4.3.]. Una vez conocidas las concentraciones, se calculó cuánto volumen de estas soluciones era necesario agregar a la mezcla de reacción, según lo indica el proveedor de las enzimas de digestión. Además, se utilizó el software SerialCloner 2.6.1 para obtener el patrón de bandas esperados en la corrida electroforética luego de la digestión (Figura 6.4 A y B).

<Serial Cloner V2.5> -- <mar, 27 de mar de 2018 06:42 p.m.>

Restriction analysis of pGemT-Easy E1 [Circular]  
Incubated with NotI + XhoI

4 fragments generated.

- 1: 2.981 bp - From NotI[1566] To NotI[42]
- 2: 1.476 bp - From XhoI[64] To NotI[1540]
- 3: 26 bp - From NotI[1540] To NotI[1566]
- 4: 22 bp - From NotI[42] To XhoI[64]



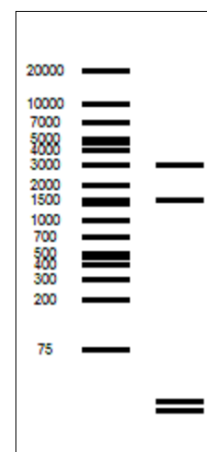
**A**

<Serial Cloner V2.5> -- <mar, 27 de mar de 2018 06:44 p.m.>

Restriction analysis of pGemT-Easy E2 [Circular]  
Incubated with KpnI + NotI

4 fragments generated.

- 1: 2.981 bp - From NotI[1554] To NotI[42]
- 2: 1.464 bp - From KpnI[64] To NotI[1528]
- 3: 26 bp - From NotI[1528] To NotI[1554]
- 4: 22 bp - From NotI[42] To KpnI[64]



**B**

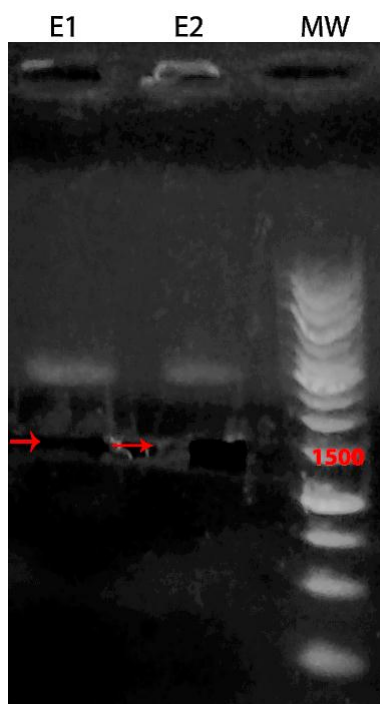
**Figura 6.4. Digestiones virtuales generadas a partir del software SerialCloner 2.6.1 para cada una de las estrategias de clonado.** A: Digestión de *pGEM®-T Easy-AmE1* con las enzimas de restricción XhoI y NotI (estrategia E1). B: Digestión de *pGEM®-T Easy-AmE2* con las enzimas de restricción KpnI y NotI (estrategia E2).

Primero se realizó una digestión doble simultánea con las dos enzimas de restricción para cada una de las construcciones (*pGEM®-T Easy-E1*, *pGEM®-T Easy-E2* y *pKLAC1*) [Métodos 4.4.]. Para evaluar el éxito de la digestión se analizó, a través de una electroforesis, la liberación del inserto de aproximadamente 1500pb de las construcciones *pGEM®-T Easy-AmE1* y *pGEM®-T Easy-AmE2*. Se observó que las digestiones correspondientes a la estrategia E1 fueron exitosas, no así las de la estrategia E2. Probablemente el fracaso de estas digestiones fue debido a una incompatibilidad entre la enzima KpnI (ThermoFisher) y el buffer Anza™ de la enzima NotI.

Para intentar solucionar este problema, se realizó una nueva digestión simultánea para la estrategia E2, esta vez con el cuádruple de volumen de ADN y con un tiempo de incubación de 4hs. Estas condiciones tampoco fueron óptimas.

Por último, se propuso realizar las digestiones de la estrategia E2 por separado, de forma secuencial. En primer lugar, se realizó la digestión con KpnI con un tiempo de reacción de 4hs en lugar de 1h. Luego, se realizó la digestión con NotI utilizando casi la totalidad del volumen proveniente de la reacción anterior. En este caso las reacciones de digestión fueron exitosas.

Los fragmentos de cADN liberados por digestión de las construcciones *pGEM®-T Easy-AmE1* y *pGEM®-T Easy-AmE2* de 1500pb fueron purificados desde las bandas de un gel de agarosa (Figura 6.5), para deshacerse así del vector *pGEM®-T Easy* linealizado, el cual podría interferir en las reacciones de ligación posteriores. Nótese que los fragmentos de 22 y 26pb, esperados según la digestión virtual, no fueron retenidos en el gel por ser muy pequeños.



**Figura 6.5.** Gel a partir del cual se purificaron las bandas correspondientes a los fragmentos de cDNA de arctiumsina liberados del vector *pGEM®-T Easy* mediante digestión enzimática. E1: Calle correspondiente a la digestión de la construcción *pGEM®-T Easy-AmE1* con XhoI y NotI. E2: Calle correspondiente a la digestión de la construcción *pGEM®-T Easy-AmE2* con KpnI y NotI. En ambos casos se señala con flechas la zona de donde se cortó la banda para ser purificada (correspondiente a un tamaño de aproximadamente 1500pb). MW: marcador de peso molecular Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1kb.



Se procedió a ligar el vector pKLAC1 digerido con los fragmentos de cADN liberados de las construcciones *pGEM®-T Easy-AmE1* y *pGEM®-T Easy-AmE2*. Se probaron tres relaciones de vector:inserto para la ligación de la estrategia E1 (1:3, 1:5 y 1:10) [Métodos 4.7.]. Las tres ligaciones fueron utilizadas para transformar bacterias *E. coli* competentes; la selección de bacterias transformantes se logró añadiendo ampicilina al medio LB. En este caso no fue posible distinguir aquellas colonias cuyo plásmido pKLAC1 poseía un inserto, ya que este vector no posee un sistema de screening que lo permita. La ligación con relación 1:5 de vector:inserto fue la que generó el mejor patrón de colonias en la placa de Petri (teniendo en cuenta cantidad y espacio entre ellas).

Una vez optimizada las digestiones del inserto y el vector con KpnI y NotI, se realizó la ligación de la estrategia E2. Se decidió utilizar la relación vector:inserto de 1:5, ya que fue la mejor condición para la estrategia E1. Esta relación vector:inserto generó para la estrategia E2 un número y espaciado entre colonias aceptable.

A partir de las colonias obtenidas se seleccionaron tres clones al azar de cada estrategia para secuenciar las construcciones. Hasta la fecha solo se dispone de las secuencias de los clones de la estrategia E1, ya que fueron enviados a secuenciar antes que los clones de la estrategia E2 (en las figuras 8.4 A y B del material complementario se muestran los cromatogramas provenientes de la secuenciación).

A la hora de analizar los cromatogramas para verificar que la secuencia obtenida es la deseada, debe tenerse en cuenta que durante una cromatografía (o electroforesis capilar) hay fenómenos de difusión del soluto (en este caso ADN) que provocan un ensanchamiento en los picos y perjudica la resolución de estos. Estos fenómenos se vuelven más importantes cuanto más tiempo esté el soluto dentro de la columna (tiempo de retención).

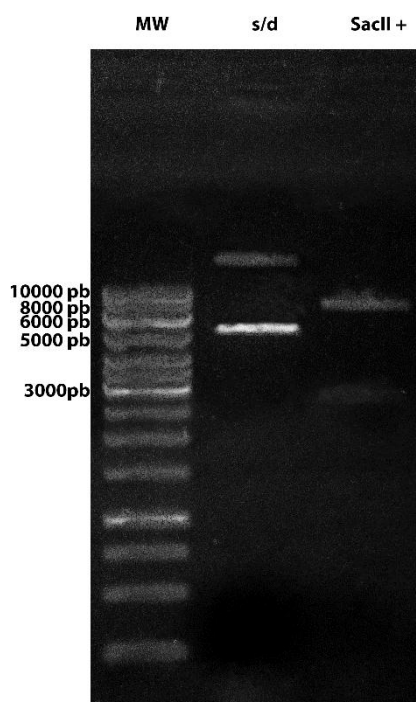
Por otra parte, hay que recordar que durante una secuenciación se generan varios fragmentos de ADN de diferente tamaño. Estos fragmentos son separados por tamaño; los más pequeños eluyen antes que los más grandes de la columna capilar.

En sumatoria, a medida que el cromatograma avanza, se analizan fragmentos de ADN de mayor tamaño y con mayores tiempos de retención en la columna. Esto provoca que la resolución de los picos vaya disminuyendo poco a poco, hasta el punto de no poder obtener una secuencia fiable. Por lo tanto, es necesario ignorar la última porción de los dos cromatogramas (esto no es problema, ya que la secuenciación con el primer forward

se realiza en sentido inverso a la secuenciación con el primer reverse, y el inicio de un cromatograma reemplaza la región final del otro). Si bien este análisis se realiza de forma automática por programas como Seqman™ II v5.00, es conveniente observar ambos cromatogramas y definir manualmente un punto de corte a partir del cual aparecen los errores debidos a la falta de resolución.

En base al análisis propuesto anteriormente, se observa que la secuencia obtenida mediante secuenciación coincide con la esperada para la estrategia E1. El análisis informático mediante alineamiento de secuencias apoya esta afirmación (Figura 8.3 del material complementario).

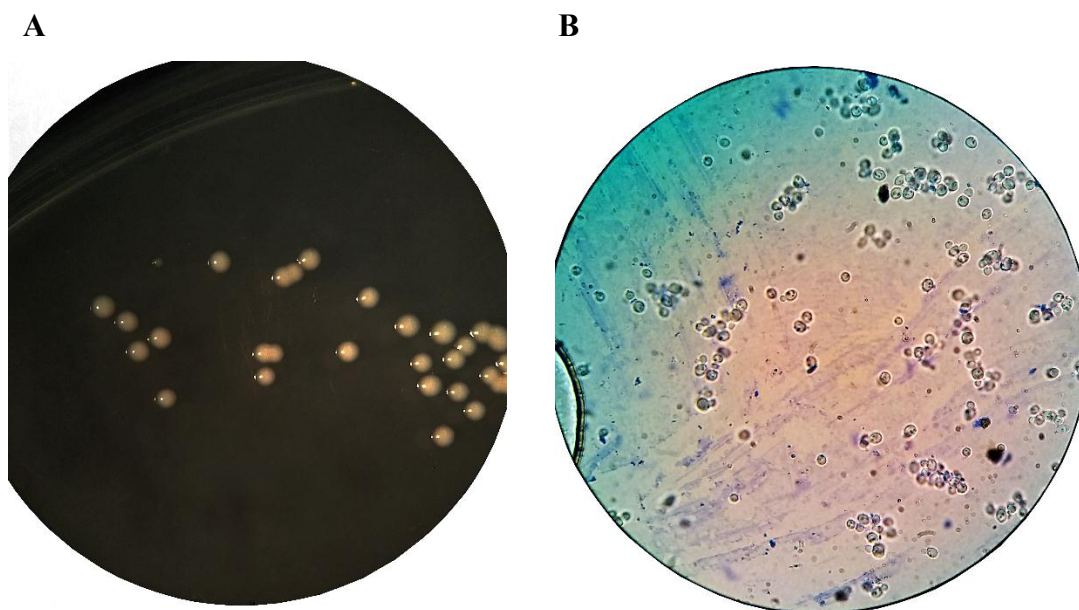
La construcción *pKLAC1-AmE1* fue obtenida por miniprep, cuantificada y digerida con la enzima de restricción SacII, con el fin de linealizarla para poder introducirla luego en *K. lactis*. Las bandas observadas en el gel de electroforesis (Figura 6.6) poseen tamaños que concuerdan con los esperados para la digestión con dicha enzima (2827 y 7734 pb).



**Figura 6.6. Chequeo de la digestión de *pKLAC1-AmE1* con *SacII*.** MW: marcador de peso molecular Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1kb. S/D: construcción sin digerir (la banda superior corresponde al plásmido relajado, mientras que la inferior corresponde al plásmido superenrollado). SacII+: Construcción digerida con *SacII*.

Se purificó luego, desde el gel de electroforesis, la banda de 7734 pb. Este fragmento es el casete de expresión que debe introducirse en *K. lactis*, puesto que contiene la secuencia que codifica para proarctiumsina, el  $\alpha$ -MF, el gen AmdS y los extremos 3' y 5' del promotor LAC4 (que permitirán la inserción en el genoma de la levadura por recombinación homóloga). El fragmento de 2827 pb fue descartado porque no es de utilidad, ya que solo posee el origen de replicación y el marcador de selección correspondientes a *E. coli*.

El siguiente paso fue reactivar las levaduras *K. lactis* GG799 que estaban almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para lograrlo, se plaqueó una alícuota del stock glicerolado en una placa con medio YPGlu sólido, y se incubó 72 horas a  $30^{\circ}\text{C}$ . Se obtuvieron colonias circulares, planas, brillantes, de margen entero y color crema (Figura 6.7 A). Además, se tomó una colonia para observarla al microscopio óptico (Figura 6.8 B).



**Figura 6.7.** **A:** Colonias de *K. lactis* GG799 observadas en lupa estereoscópica (40X). **B:** Levaduras *K. lactis* GG799 observadas al microscopio óptico (1000X).

Otra colonia fue utilizada para realizar un cultivo líquido en YPGlu, que luego se usó para generar levaduras electrocompetentes [Métodos 4.10.], que se fraccionaron en alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  (con glicerol al 16%) y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Una de las fracciones se utilizó luego para la transformación mediante electroporación [Métodos 4.13.] con el casete de expresión. Se plaqueó la suspensión de levaduras electroporadas en medio YCB con acetamida para seleccionar aquellas que adquirieron el gen AmdS a través del evento de recombinación homóloga descrito en la introducción de este trabajo. Luego de 72 horas de incubación a 30°C se obtuvieron 10 colonias, las cuales fueron repicadas en medio YPGlu líquido para almacenarlas a -80°C con glicerol al 16%.



Las peptidasas aspárticas constituyen el segundo tipo más abundante de proteasas vegetales, superado sólo por el grupo de las cisteínicas. Su mecanismo de acción, descrito por Suguna (1987), involucra residuos aspartato que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos. El sitio donde ocurre la hidrólisis del péptido no se determina al azar, sino que está definido por la secuencia primaria de aminoácidos del sustrato. En particular, las peptidasas aspárticas suelen actuar sobre secuencias que poseen aminoácidos hidrofóbicos en las posiciones P1 y P1' (Dunn & Hung, 2000; Rawlings *et al.*, 2012).

Dentro de las plantas, las peptidasas aspárticas cumplen una amplia gama de roles, dependiendo de la especie, tejido y estadio de vida en que se expresan (Simões & Faro, 2004; Mazorra-Manzano *et al.*, 2010). Además, la actividad proteolítica de estas peptidasas puede ser aprovechada en la industria biotecnológica, en procesos como la producción de péptidos bioactivos, fabricación de quesos, entre otros.

En el CIProVe, se observó que el extracto acuoso de flores de *Arctium minus* (parcialmente purificado a través de cromatografía de exclusión molecular) presentaba actividad coagulante de leche. El suero obtenido luego de la coagulación demostró poseer péptidos con actividad antioxidante y actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina. Mediante ensayos de inhibición específica se demostró que la actividad coagulante era debida a la acción de peptidasas aspárticas. Mediante PCR, utilizando el ARN total de flores jóvenes de *A. minus* como molde y empleando primers complementarios a los extremos 5' y 3' conservados de las secuencias de proteasas aspárticas vegetales, se obtuvo un producto de 1530 pb correspondiente a una endopeptidasa aspártica que fue denominada arctiumsina. El cADN obtenido codifica para el precursor de esta enzima (preproenzima) que posee 509 residuos, de los cuales 24 pertenecen a un péptido señal "pre" de carácter hidrofóbico, 44 al prosegmento y 105 al inserto específico de planta (PSI); la estructura de la secuencia primaria concuerda con la clasificación de peptidasa aspártica vegetal típica. Las triadas catalíticas se encuentran en las posiciones 103-105 y 290-292, y los residuos de tirosina, glicina y treonina (ubicados en las posiciones 147, 148 y 149, respectivamente) que participarían en la interacción con el sustrato determinando la especificidad también están conservados en esta peptidasa (Cimino *et al.*, 2015).

Se propuso entonces estudiar a la proteína pura, para lo cual era conveniente generar un sistema de expresión heterólogo en un organismo de fácil crecimiento y

mantenimiento. Además, era necesario que dicho organismo sea eucariota, puesto que este tipo de proteínas requieren de modificaciones postraduccionales para su correcto plegamiento, que no ocurren en organismos procariontes como *E. coli*. Las levaduras eran buenas candidatas, ya que son de crecimiento relativamente rápido y económico, son capaces de secretar altas cantidades de proteínas, la integración de casetes de expresión en sus cromosomas es altamente estable, y no presentan endotoxinas ni carcinógenos. White y colaboradores (1999) reportaron la expresión de procyprosina, una PA de *C. cardunculus*, en *Picchia pastoris* como proteína secretada. Previo a la expresión en levaduras y como parte del mismo trabajo, los autores expresaron la proteína en *E. coli* (cepa BL21 (DE3) pLysS) lo que dio lugar a la acumulación de una alta concentración de proteína recombinante (estimado en 10-20 mg / litro de cultivo), sin embargo, la proteína estaba insoluble y mal plegada. Los autores reportaron además que, a pesar de grandes esfuerzos, no pudieron establecer las condiciones adecuadas para preparar cantidades significativas de proteína correctamente plegada.

Se decidió expresar arctiumsina utilizando el kit de expresión de proteínas en *Kluyveromyces lactis* (desarrollado por New England BioLabs® Inc.), el cual hace uso del vector de expresión pKLAC1 para insertar, a través de recombinación homóloga, marcos de lectura abiertos bajo el promotor P<sub>LAC4</sub> del cromosoma de *K. lactis*. Esta especie se ha convertido en una de las levaduras más importantes para la investigación. Además, es Crabtree-negativa y tiene la capacidad de alcanzar altos niveles de secreción de proteínas, lo que la hace una alternativa atractiva para la producción a escala industrial. Ha sido utilizada con éxito en la expresión de quimosina bovina (Van Den Berg, *et al.*, 1990; O' Sullivan & Fox, 1991) que se comercializa como rennet en presentaciones como Maxiren®600, Maxiren®XDS BF (DSM Food Specialties), del inserto específico de planta de la peptidasa aspártica cirsina (Curto *et al.*, 2014) y de procardosina B (Almeida *et al.*, 2014), entre varias otras proteínas. Además, *K. lactis* es un organismo GRAS, lo cual es una ventaja adicional, ya que implica que puede utilizarse con confianza para generar productos destinados al uso humano. Esta característica ha sido aprovechada en la industria farmacéutica, por ejemplo, en la producción de interferón- $\alpha$  para terapia contra el cáncer (Chen *et al.*, 1992; Kumar, 2005) y de interferón- $\gamma$  (Pandey & Veeranki, 2018).

Se intentó introducir en forma directa la secuencia de proarctiumsina amplificada por PCR en dicho vector de expresión. Dado que no pudo lograrse, en este trabajo fue

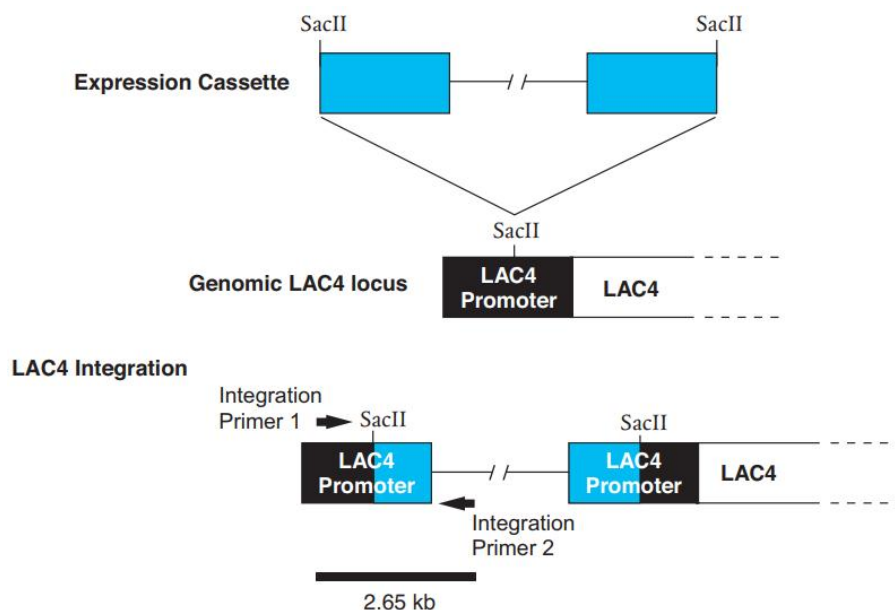
necesario insertar la secuencia con sitios de restricción agregados en el vector de clonado pGemT-Easy como paso previo, lo que permitió corroborar mediante electroforesis la digestión del amplicón por las endonucleasas. Este vector resultó conveniente debido a que estaba disponible en el laboratorio, puede introducirse en *E. coli* (bacteria de fácil crecimiento) y es de alto número de copias. De la misma manera, Almeida y colaboradores (2014) debieron subclonar procardosina B en pGemT-Easy como paso previo al clonado en el vector pKLAC1.

Debido al límite de tiempo establecido, y luego de varios intentos para poner a punto las reacciones de digestión del ADN, sólo fue posible obtener la construcción final de la estrategia E1 (*pKLAC1-AmE1*); el análisis de su secuencia corroboró la correcta inserción del marco de lectura abierto de proarctiumsina en el vector pKLAC1. Esta construcción permitirá expresar la proarctiumsina con su dominio N-terminal nativo, a diferencia de la estrategia E2, que daba como resultado la proenzima con 11 aminoácidos extra en el extremo N-terminal. Cabe aclarar que, si bien la estructura del extremo N-terminal de la proenzima podría impactar en la eficiencia del clivaje del  $\alpha$ -MF por parte de Kex2, las peptidasas maduras deberían ser idénticas para ambas estrategias, puesto que el prosegmento también es eliminado durante el procesamiento postraduccional.

La construcción pKLAC1-AmE1 fue linealizada con la enzima de restricción SacII y utilizada para transformar levaduras *K. lactis* electrocompetentes. Se obtuvieron 10 clones AmdS positivos, que en principio deberían contener la secuencia de la peptidasa en su genoma.

Para completar el objetivo de obtener un sistema de expresión de arctiumsina recombinante, será necesario corroborar la inserción de la secuencia de dicha proteína en el genoma de *K. lactis* mediante una reacción de PCR propuesta por el fabricante. En ésta, el primer *forward* hibridará en el comienzo del promotor LAC4 del genoma (que no se ve modificado luego de la recombinación homóloga) y el primer *reverse* hibridará en una región del casete de expresión que se encuentra río arriba de la secuencia de proarctiumsina. El producto de la reacción será un fragmento de 2,65 kb (Figura 7.1).





**Figura 7.1. Esquema de la reacción de PCR que permitirá verificar la inserción del casete de expresión en el genoma de *K. lactis*.** Integration Primer 1: primer *forward* de la reacción; Integration Primer 2: primer *reverse* de la reacción.

Una vez confirmada la inserción del casete de expresión, se obtendrá la proteína recombinante a escala de laboratorio y se estudiará su aplicación en diferentes procesos. Uno de ellos es el de la utilización de la enzima en la producción de quesos, como reemplazo total o parcial de la quimosina. La utilización de peptidasas recombinantes en este campo permitió solventar el aumento en la demanda global de queso sin incurrir en los problemas éticos asociados al aislamiento del cuajo animal; la utilización de peptidasas aspárticas vegetales confiere además características distintivas en el sabor y olor del producto final. Existen variedades de quesos portugueses y españoles tradicionales producidos con extractos de flores de cardos que actualmente poseen estatus de Denominación de Origen Protegida. En estos ha sido demostrada la participación de las peptidasas aspárticas como agentes coagulantes; algunos ejemplos son “Serra da Estrela”, “Azeitão”, “Serpa”, “La serena” y “Torta del Casar” (Macedo *et al.* 1993; Roseiro *et al.* 2003; Ordiales *et al.*, 2013). Los atributos reológicos únicos y las propiedades sensoriales características de estos quesos hacen que se destaquen como productos (Malaquias *et al.*, 2018). *Carthamus tinctorius* y *Cynara cardunculus* son ejemplos de plantas que se han utilizado habitualmente en esta industria (Malaquias *et al.*, 2018) y en la actualidad otras especies vegetales están siendo estudiadas para el mismo fin. Por ejemplo, en el CIProVe, un extracto enzimático de flores de *Silybum*

*marianum* se empleó en combinación con quimosina comercial para producir quesos tipo cheddar de intenso aroma y cuya actividad antioxidante (determinada *in vitro*) fue mayor que la de sus respectivos controles obtenidos sin utilización del extracto (Colombo, M. L. *et al.*, 2018). En el mismo laboratorio, también se utilizaron extractos de *Cynara scolymus* y *Onopordum acanthium* para producir quesos tipo Gouda en escala de planta piloto y de planta industrial, respectivamente (Lorente *et al.*, 2014; Brutti *et al.*, 2012).

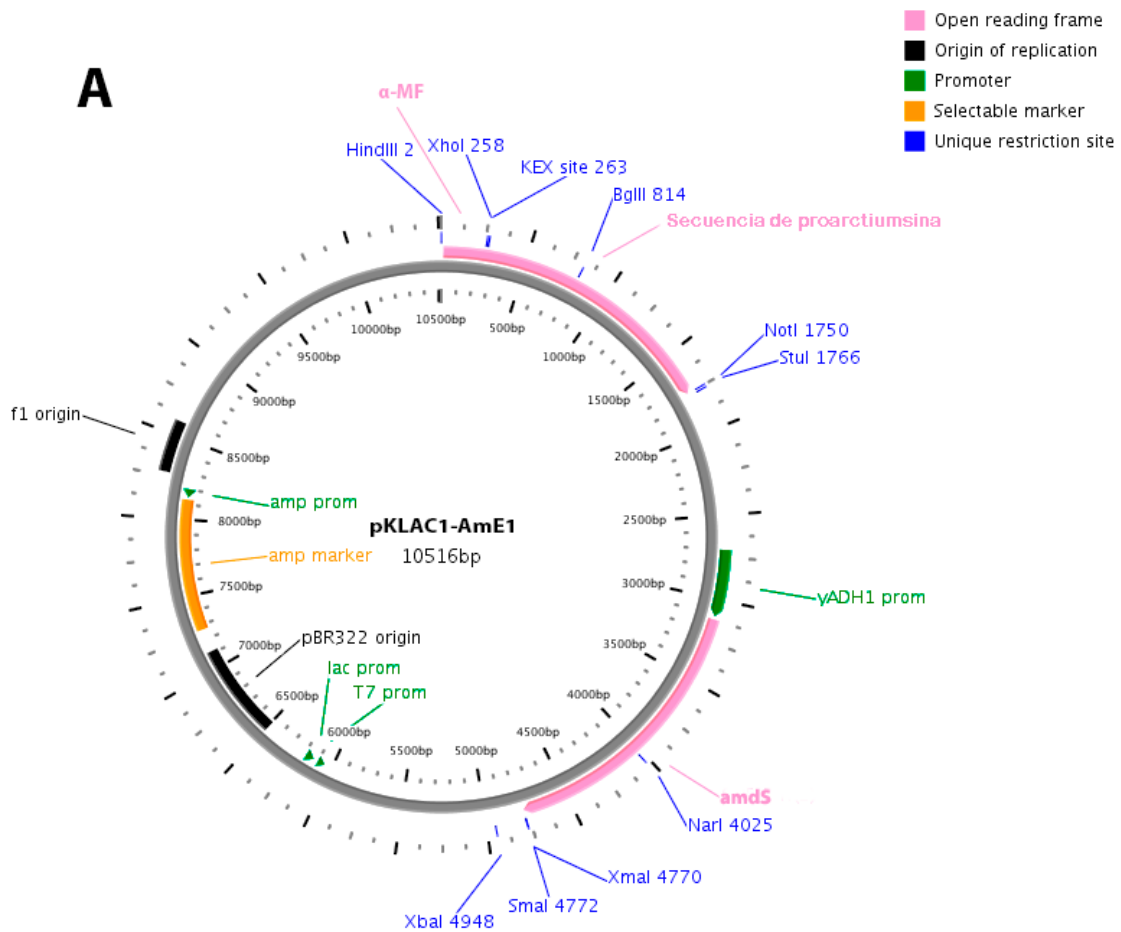
También se ha considerado estudiar la digestión alternativa de proteínas mediante arctiumsina para generar péptidos bioactivos y determinar la potencial aplicación de estos en la industria. Además, se comparará la actividades antioxidante e inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina de los péptidos obtenidos con el extracto enzimático frente a los obtenidos con la enzima recombinante.



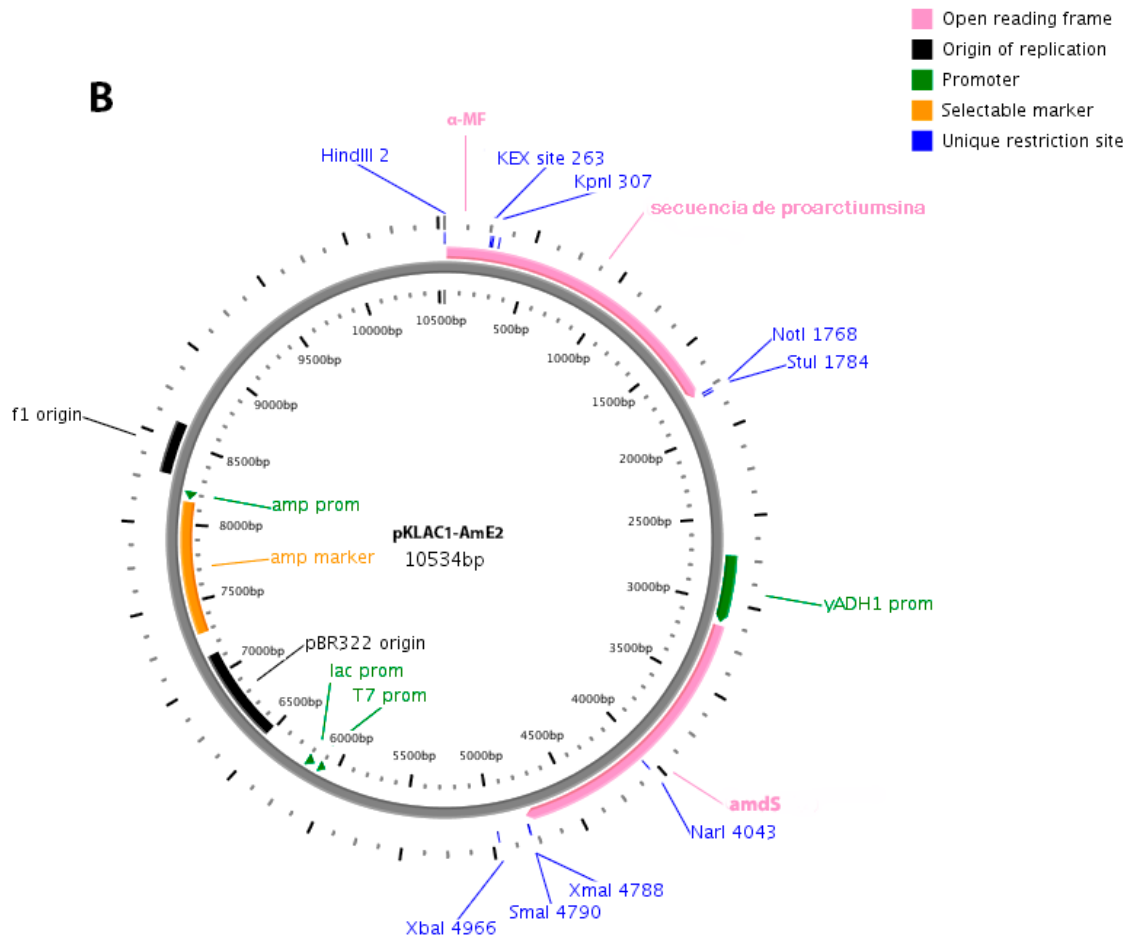
Se pueden arribar a las siguientes conclusiones sobre este trabajo:

- Se logró obtener una construcción (*pKLACI-AmE1*) que permitirá expresar la peptidasa aspártica arctiumsina, propia de las flores del cardo *A. minus* y con potencial aplicación biotecnológica.
- Se transformaron levaduras *K. lactis* GG799 con la construcción mencionada, obteniéndose 10 clones AmdS+ que, en principio, deberían ser capaces de producir arctiumsina recombinante.
- El clonado de la secuencia de proarctiumsina en el vector pGemT-Easy permitió resolver los problemas que habían surgido, en trabajos anteriores, al intentar realizar digestiones con enzimas de restricción sobre el amplicón de dicha secuencia.





**Figura 8.1 A. Esquema de la construcción pKLAC1-AmE1.** En azul se muestran los sitios de restricción; en verde se muestran los promotores de transcripción; en negro se muestran los orígenes de replicación; en rosa se muestran los marcos de lectura abiertos; en naranja se muestran los marcadores de selección. amdS: gen de acetamidasa.  $\alpha$ -MF: péptido señal “Alpha mating factor”. Amp marker: gen de  $\beta$ -lactamasa (resistencia a la ampicilina).



**Figura 8.1 B. Esquema de la construcción pKLAC1-AmE2.** En azul se muestran los sitios de restricción; en verde se muestran los promotores de transcripción; en negro se muestran los orígenes de replicación; en rosa se muestran los marcos de lectura abiertos; en naranja se muestran los marcadores de selección. amdS: gen de acetamidasa.  $\alpha$ -MF: péptido señal “Alpha mating factor”. Amp marker: gen de  $\beta$ -lactamasa (resistencia a la ampicilina).

```

atgggtaactcaatcaaagcaagcctgcttgcttgttttgtttttctgctatcacct
M G N S I K A S L L A L F L F F L L S P
actgcattttcggtctccaatgggtggattaattagagttggacttaaaaagaggaaggtg
T A F S V S N G G L I R V G L K K R K V
gaccaaattaaccaacttcgtggacatgggtgctctatggaaggaaggtagaaaagat
D Q I N Q L R G H G A S M E G K A R K D
ttggcttcgggtggtactttgagggactcggacagtgacattattgcaactaaagaactac
F G F G G T L R D S D S D I I A L K N Y
atggatgctcagtattatgggtgaaattgggtattggagctccacctcaaaagttcactgtg
M D A Q Y Y G E I G I G A P P Q K F T V
attttgacaccggaagttctaatactatgggtgcttctgcaaagtgctacttttcagta
I F D T G S S N L W V P S A K C Y F S V
gcttgctttttcactcaaaagtacaagtcgagccattcaagtacctataagaaaaatggg
A C L F H S K Y K S S H S S T Y K K N G
acatctgccgctattcaatatggaactggatcaatctctggttttggtagccaagactct
T S A A I Q Y G T G S I S G F V S Q D S
gtcaaactcgggtgcttgggttaagagcaggattttatagaggcaaccaagagcct
V K L G D L V V K E Q D F I E A T K E P
ggcgtcactttctggctgccaaagtttgatgggtataacttggccttggatttcaggagatc
G V T F L A A K F D G I L G L G F Q E I
tctgttgggaaatctgttctgtctgtgtacaacatgggttaatcaaggtcttgttccagaa
S V G K S V P V W Y N M V N Q G L V P E
cctgtgttttcttttgggttaatcgcaatgctgatgaggaagaagggggtgaactcgtg
P V F S F W F N R N A D E E E G G E L V
tttgggtggagttgaccctaatacatttaagggtaaacacacatatgtccctgtgactgaa
F G G V D P N H F K G K H T Y V P V T E
aagggctattggcagtttgataggggtgacgttcttattgaagataaaaacaaccggattt
K G Y W Q F D M G D V L I E D K T G F
tgttctgatgggtgtgcaagcaattgccgactctggaacctcttggttggcaggtccaacg
C S D G C A A I A D S G T S L L A G P T
gctgttattactcaaatcaatcatgcaattgggtgctaagggggtcatgagccagcaatgc
A V I T Q I N H A I G A K G V M S Q Q C
aaaacattgggttagtcagtatggaaagactataattgagatgctcctgtctgagggcgcaa
K T L V S Q Y G K T I I E M L L S E A Q
cctgataaaaatagtctcagatgaagttatgcacttttgatgggtgctcgcgatgttagt
P D K I C S Q M K L C T F D G A R D V S
tcaataattgagagcgtgggttgacaagagtaacggcaagtcttctgggtggcgtacatgat
S I I E S V V D K S N G K S S G V H D
gagatgtgtacctctgtgagatggcagtcggttggatgcaaaaccaaatcvaacgaaac
E M C T F C E M A V V W M Q N Q I K R N
gagactgaagataacataatcaactatgtcaatgagctgtgtgatcgcttaccaggtcca
E T E D N I I N Y V N E L C D R L P S P
atgggagaatcagcagtagactgcaacagtccttctccatgcccaatattgccttcaca
M G E S A V D C N S L S S M P N I A F T
attgggtgaaaagtttttgagctctgcccagaacagtacatcctcaaaatcgggtgagga
I G G K V F E L C P E Q Y I L K I G E G
gaagcagcacaatgcatcagtggttactgctatggacgtacccccctcctcgcgacct
E A A Q C I S G F T A M D V P P P R G P
ctatggatcttgggagatgttttattgggtcgataccatacagtggttcgattatggcaag
L W I L G D V F M G R Y H T V F D Y G K
ctacgagttggatttgcagaagcagcttga
L R V G F A E A -

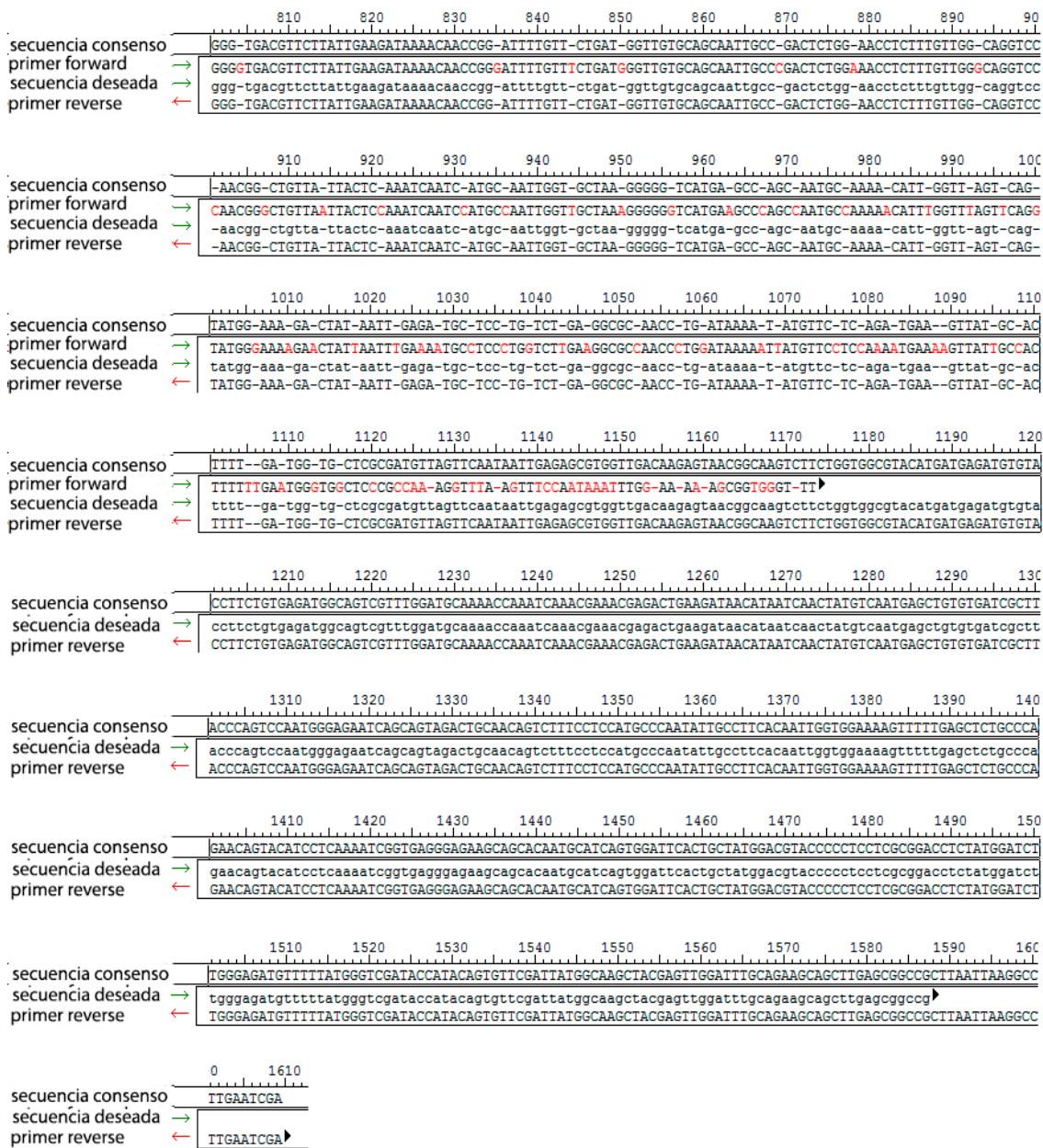
```

Figura 8.2. Secuencia nucleotídica del cDNA de la enzima preproarctiumisina y su secuencia aminoacídica derivada. La línea punteada indica la secuencia del segmento *pre* (péptido señal) y la línea discontinua indica la secuencia del segmento *pro* (porción que se elimina durante el procesamiento post-traducciona). Con un rectángulo se señalan las triadas catalíticas y con un círculo los sitios de N-glicosilación.

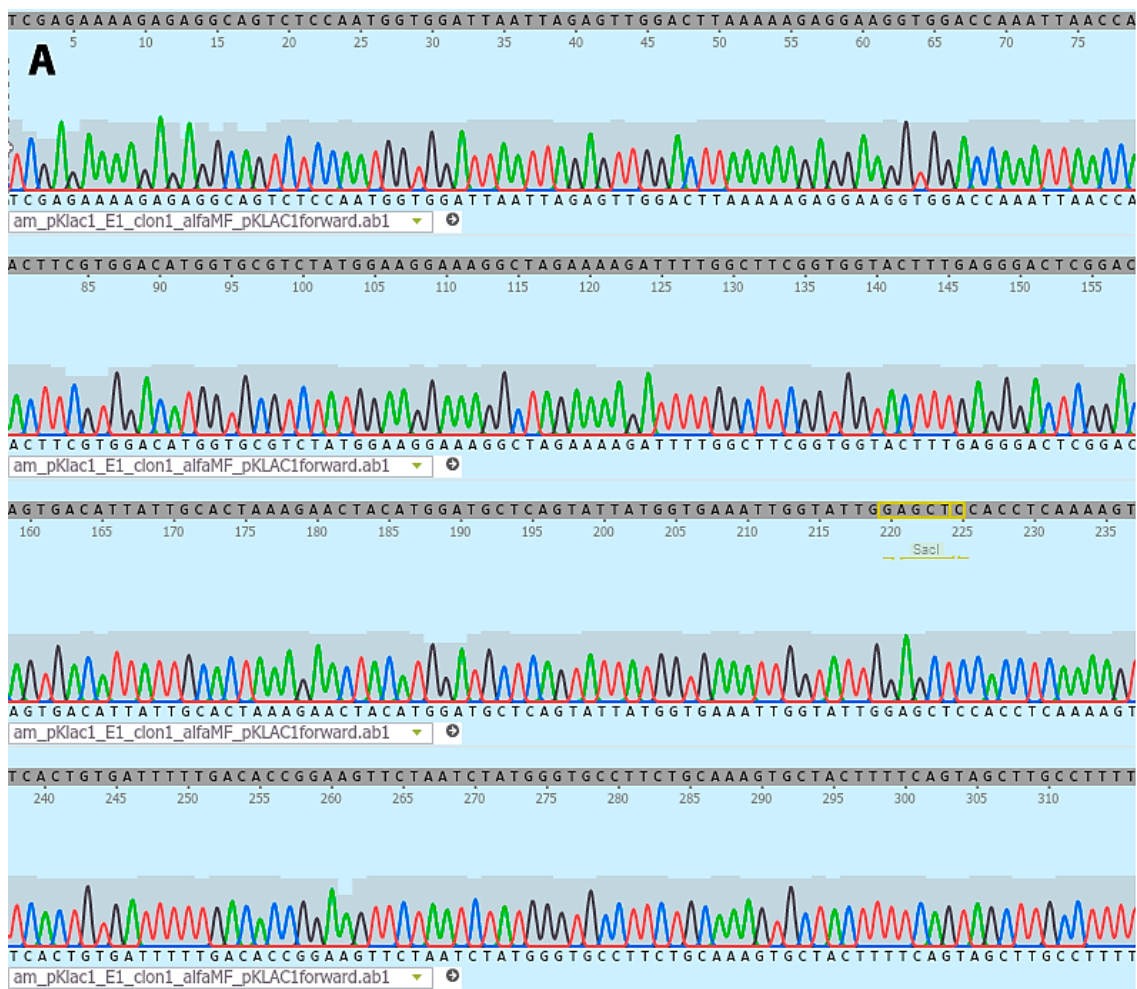




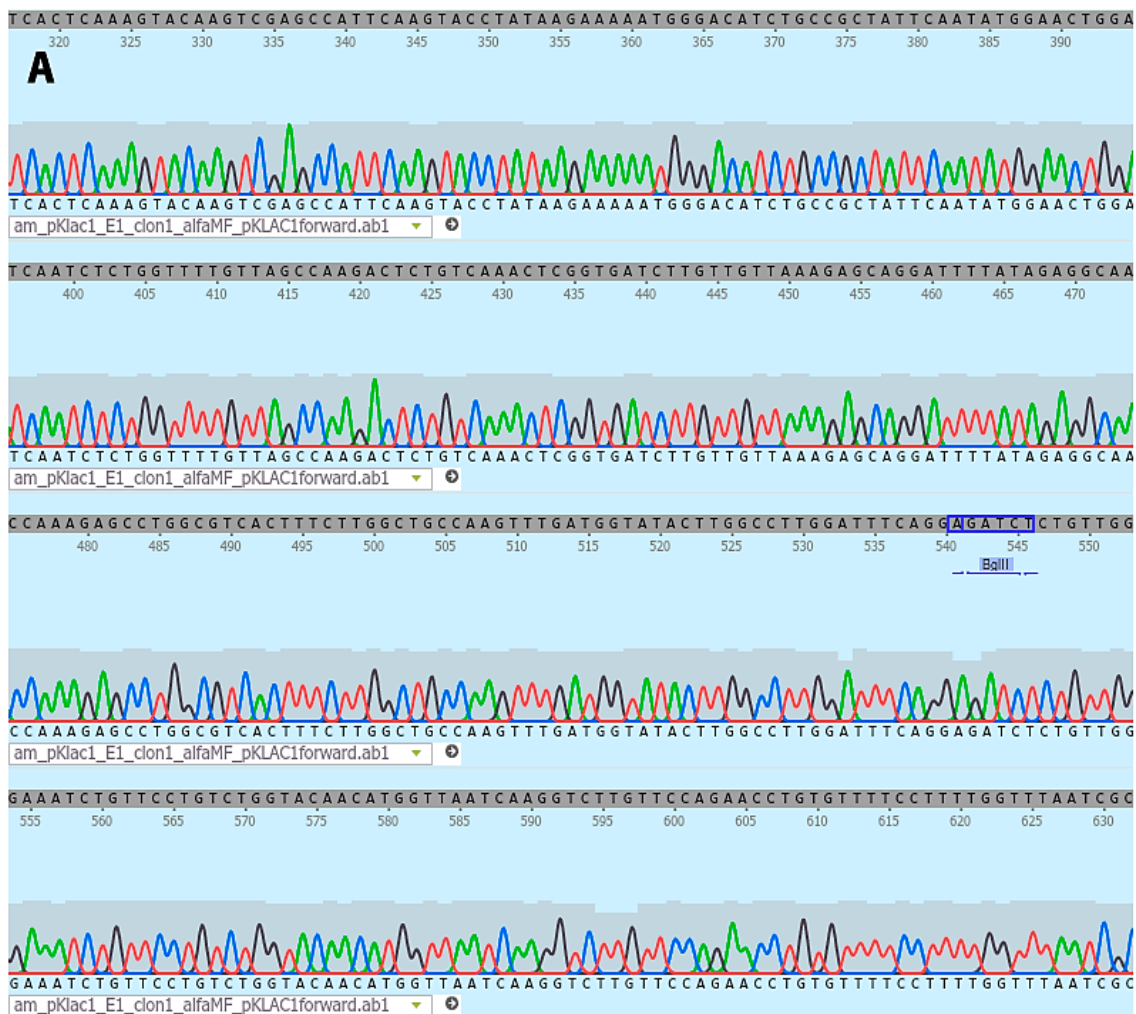
Figura 8.3 (parte 1). Alineamiento de la secuencia deseada para la estrategia E1 y las obtenidas por secuenciación a partir de los primers forward y reverse. La secuencia consenso es la secuencia real que posee la construcción. En rojo se muestran las bases que no coinciden con la secuencia consenso.



**Figura 8.3. (parte 2).** Alineamiento de la secuencia deseada para la estrategia E1 y las obtenidas por secuenciación a partir de los primers forward y reverse. La secuencia consenso es la secuencia real que posee la construcción. En rojo se muestran las bases que no coinciden con la secuencia consenso.

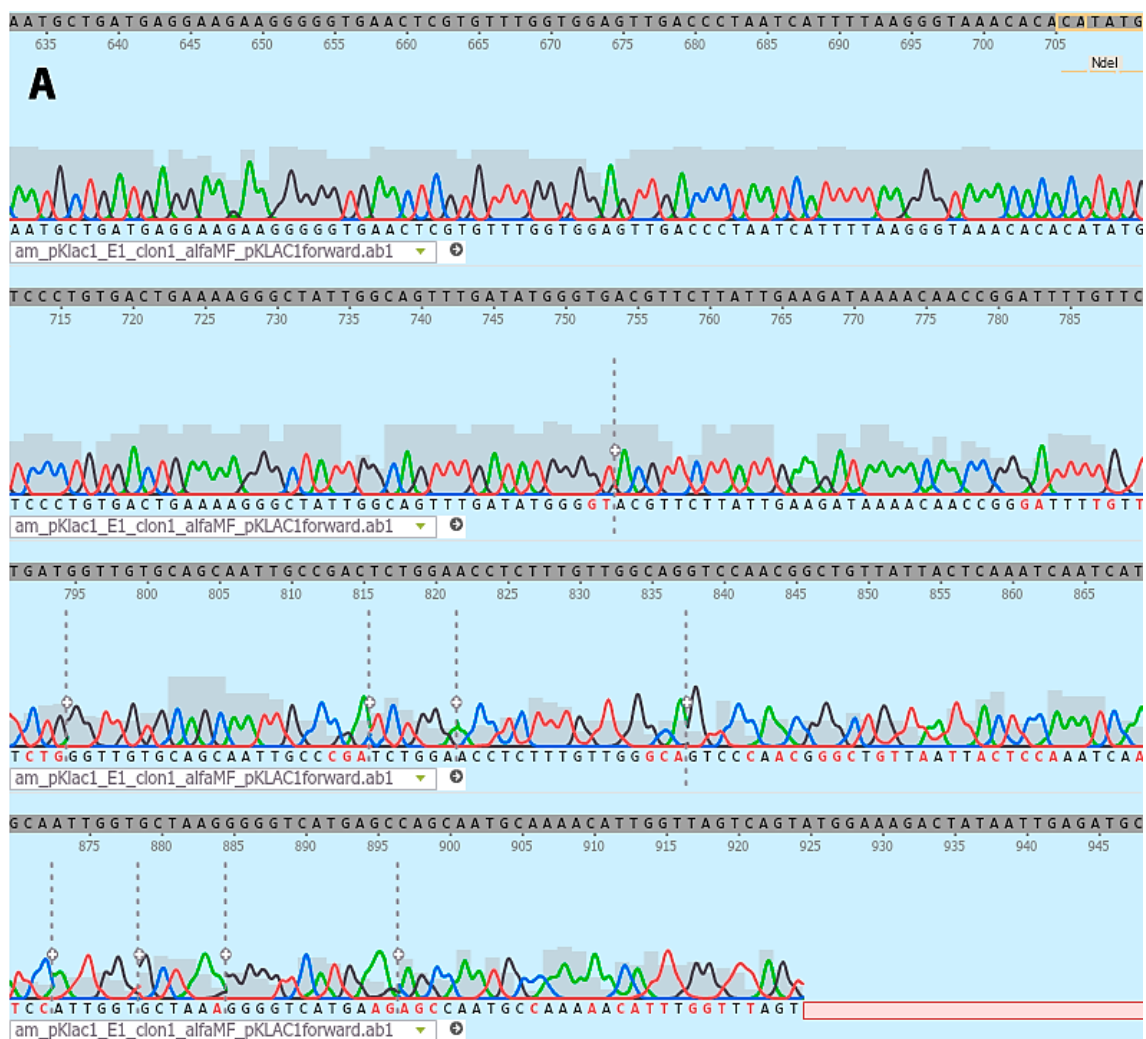


**Figura 8.4 A (parte 1).** Alineamiento del cromatograma obtenido a partir de la secuenciación del cDNA de arctiumsina (insertado en pKLAC1 según la estrategia E1) con el primer “forward E1”. En el cromatograma, cada base se ilustra con un color diferente: Verde: adenina; Negro: guanina; azul: citocina; rojo: timina. Sobre el cromatograma y sombreado con gris se muestra la secuencia de DNA esperada. La secuencia obtenida a partir del análisis de los picos del cromatograma se muestra debajo de éste; las regiones que concuerdan con la secuencia esperada se ilustran con letras en negro, mientras que las que no concuerdan se ilustran con letras en rojo.

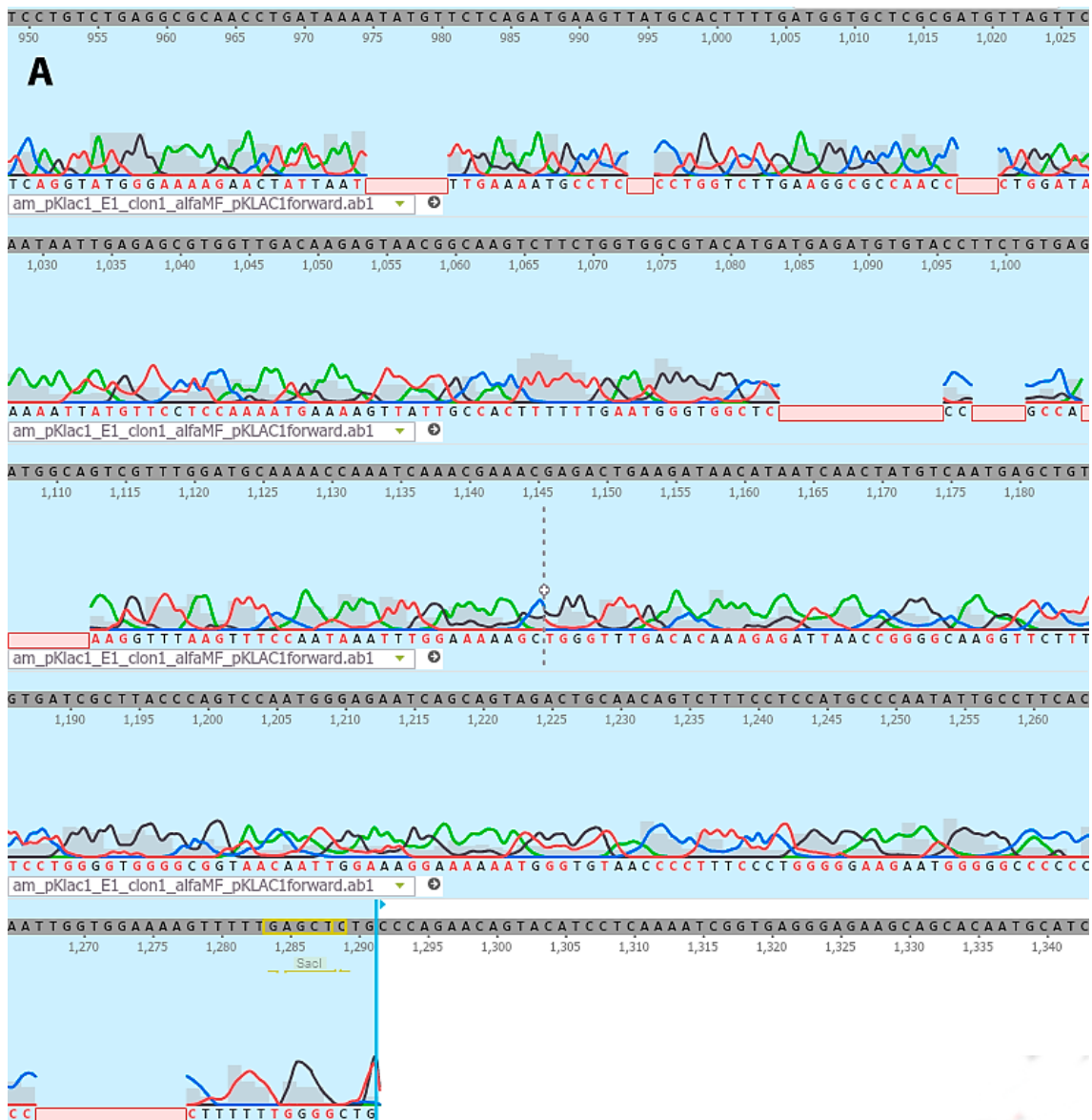


**Figura 8.4 A (parte 2). Alineamiento del cromatograma obtenido a partir de la secuenciación del cDNA de arctiumsina (insertado en pKLAC1 según la estrategia E1) con el primer “forward E1”.** En el cromatograma, cada base se ilustra con un color diferente: Verde: adenina; Negro: guanina; azul: citocina; rojo: timina. Sobre el cromatograma y sombreado con gris se muestra la secuencia de DNA esperada. La secuencia obtenida a partir del análisis de los picos del cromatograma se muestra debajo de éste; las regiones que concuerdan con la secuencia esperada se ilustran con letras en negro, mientras que las que no concuerdan se ilustran con letras en rojo.

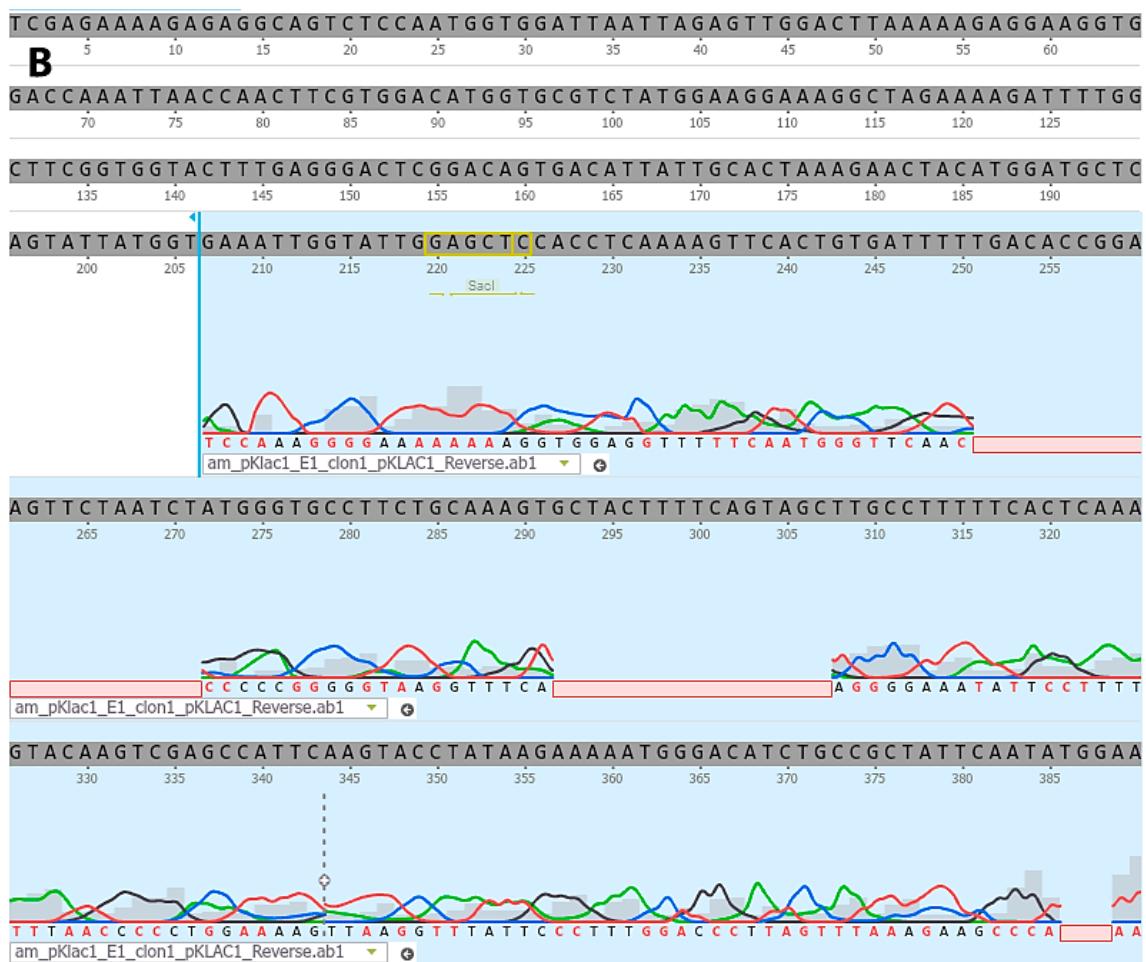




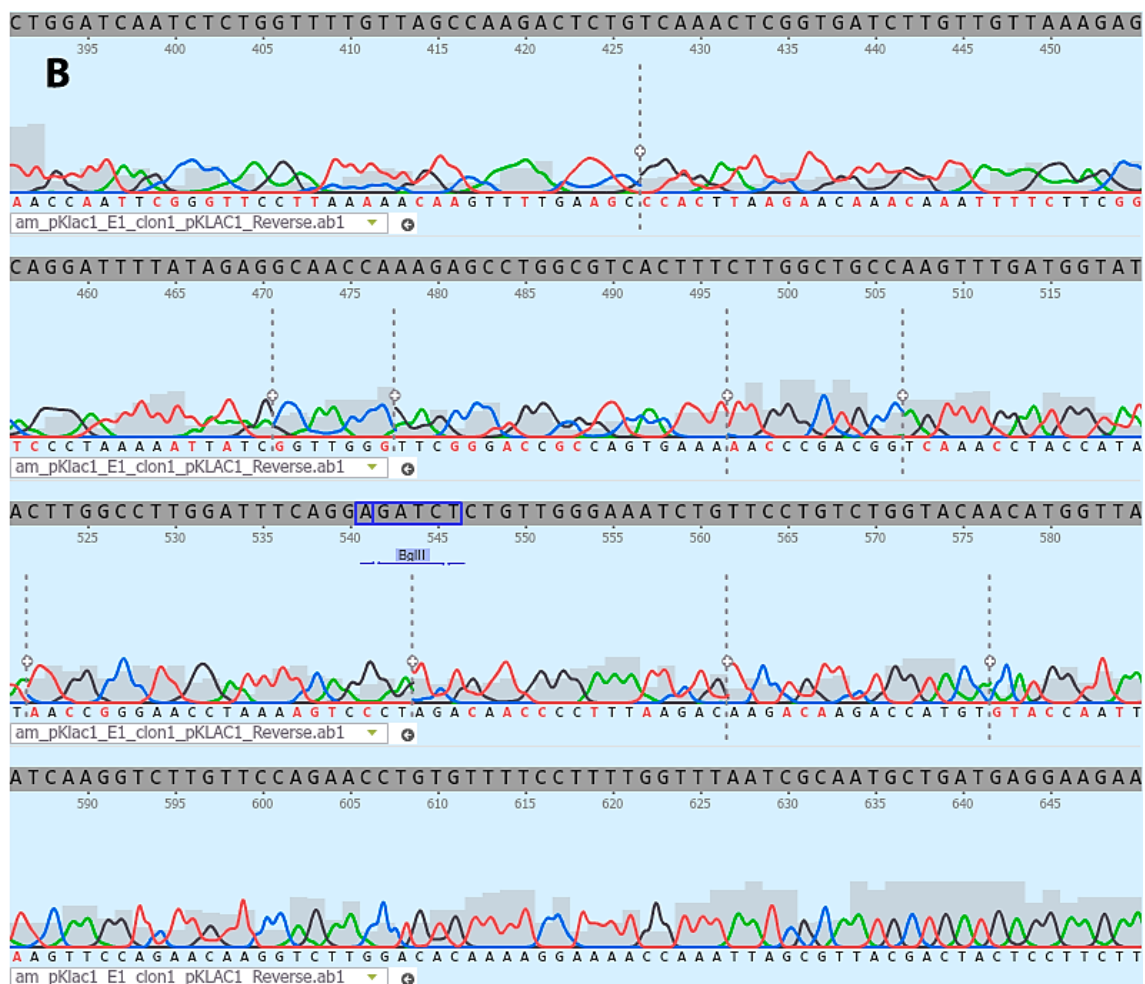
**Figura 8.4 A (parte 3). Alineamiento del cromatograma obtenido a partir de la secuenciación del cDNA de arctiumsina (insertado en pKLAC1 según la estrategia E1) con el primer “forward E1”. En el cromatograma, cada base se ilustra con un color diferente: Verde: adenina; Negro: guanina; azul: citocina; rojo: timina. Sobre el cromatograma y sombreado con gris se muestra la secuencia de DNA esperada. La secuencia obtenida a partir del análisis de los picos del cromatograma se muestra debajo de éste; las regiones que concuerdan con la secuencia esperada se ilustran con letras en negro, mientras que las que no concuerdan se ilustran con letras en rojo.**



**Figura 8.4 A (parte 4).** Alineamiento del cromatograma obtenido a partir de la secuenciación del cDNA de arctiúmsina (insertado en pKLAC1 según la estrategia E1) con el primer “forward E1”. En el cromatograma, cada base se ilustra con un color diferente: Verde: adenina; Negro: guanina; azul: citocina; rojo: timina. Sobre el cromatograma y sombreado con gris se muestra la secuencia de DNA esperada. La secuencia obtenida a partir del análisis de los picos del cromatograma se muestra debajo de éste; las regiones que concuerdan con la secuencia esperada se ilustran con letras en negro, mientras que las que no concuerdan se ilustran con letras en rojo.

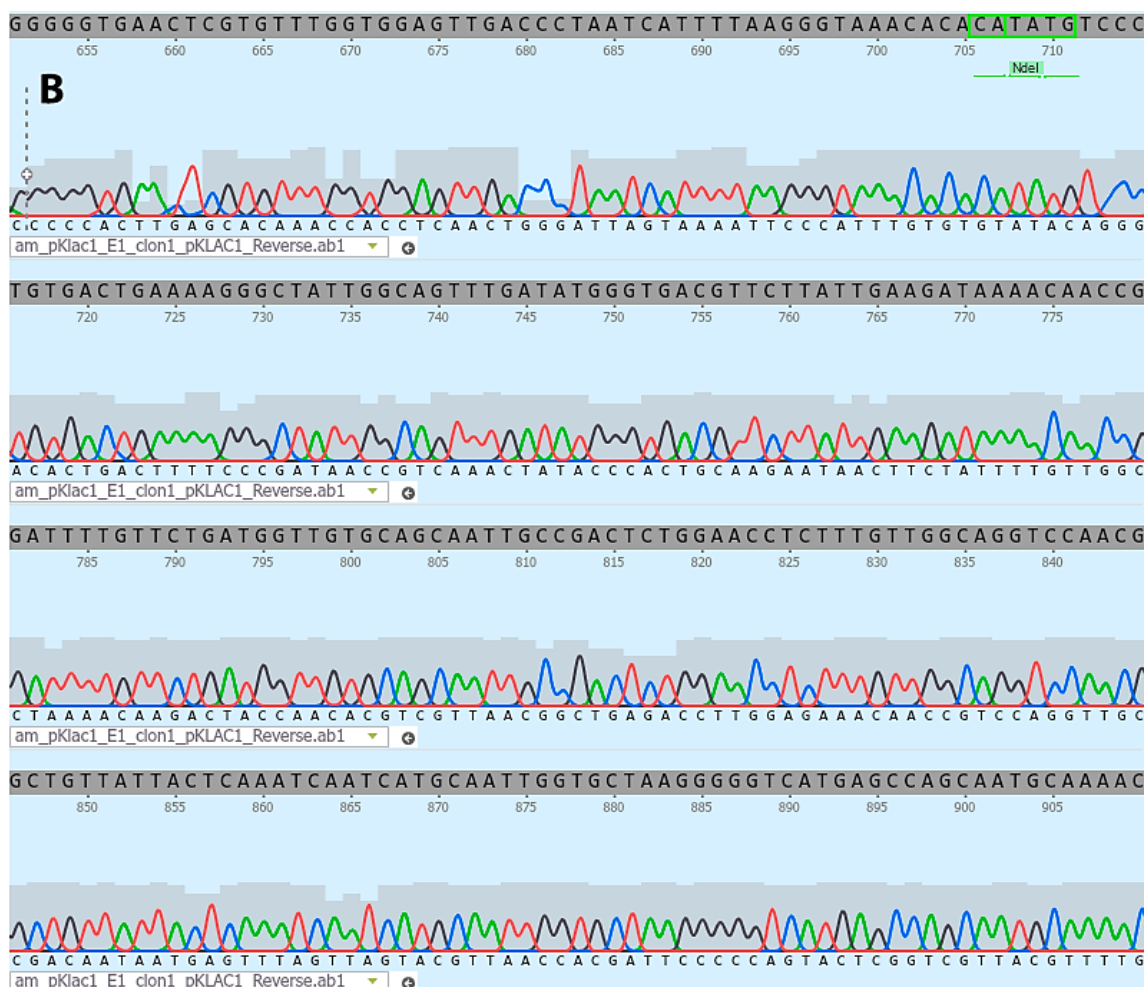


**Figura 8.4 B (parte 1).** Alineamiento del cromatograma obtenido a partir de la secuenciación del cDNA de arctiimsina (insertado en pKLAC1 según la estrategia E1) con el primer “reverse E1”. En el cromatograma, cada base se ilustra con un color diferente: Verde: adenina; Negro: guanina; azul: citocina; rojo: timina. Sobre el cromatograma y sombreado con gris se muestra la secuencia de DNA esperada. La secuencia obtenida a partir del análisis de los picos del cromatograma se muestra debajo de éste; las regiones que concuerdan con la secuencia esperada se ilustran con letras en negro, mientras que las que no concuerdan se ilustran con letras en rojo.

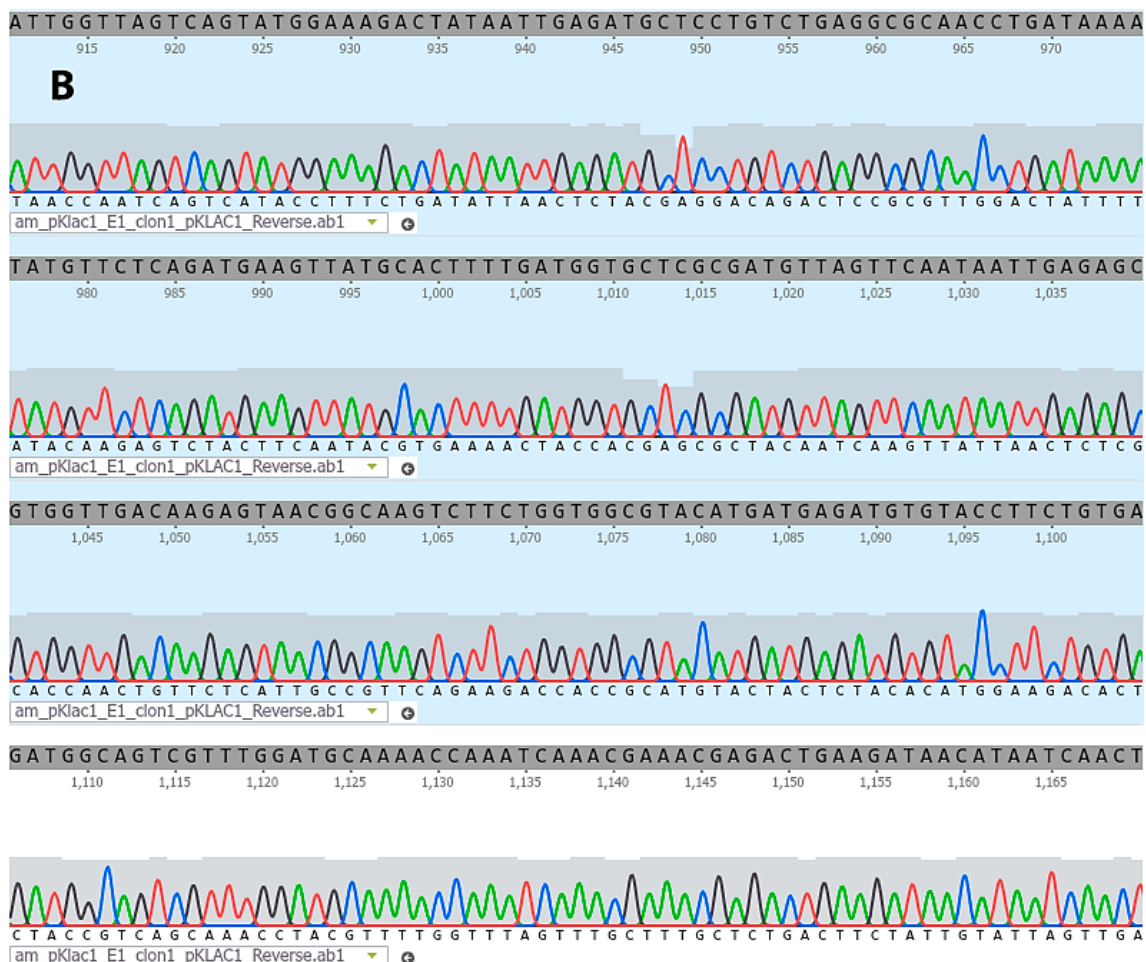


**Figura 8.4 B (parte 2).** Alineamiento del cromatograma obtenido a partir de la secuenciación del cDNA de arctiumsin (insertado en pKLAC1 según la estrategia E1) con el primer "reverse E1". En el cromatograma, cada base se ilustra con un color diferente: Verde: adenina; Negro: guanina; azul: citocina; rojo: timina. Sobre el cromatograma y sombreado con gris se muestra la secuencia de DNA esperada. La secuencia obtenida a partir del análisis de los picos del cromatograma se muestra debajo de éste; las regiones que concuerdan con la secuencia esperada se ilustran con letras en negro, mientras que las que no concuerdan se ilustran con letras en rojo.

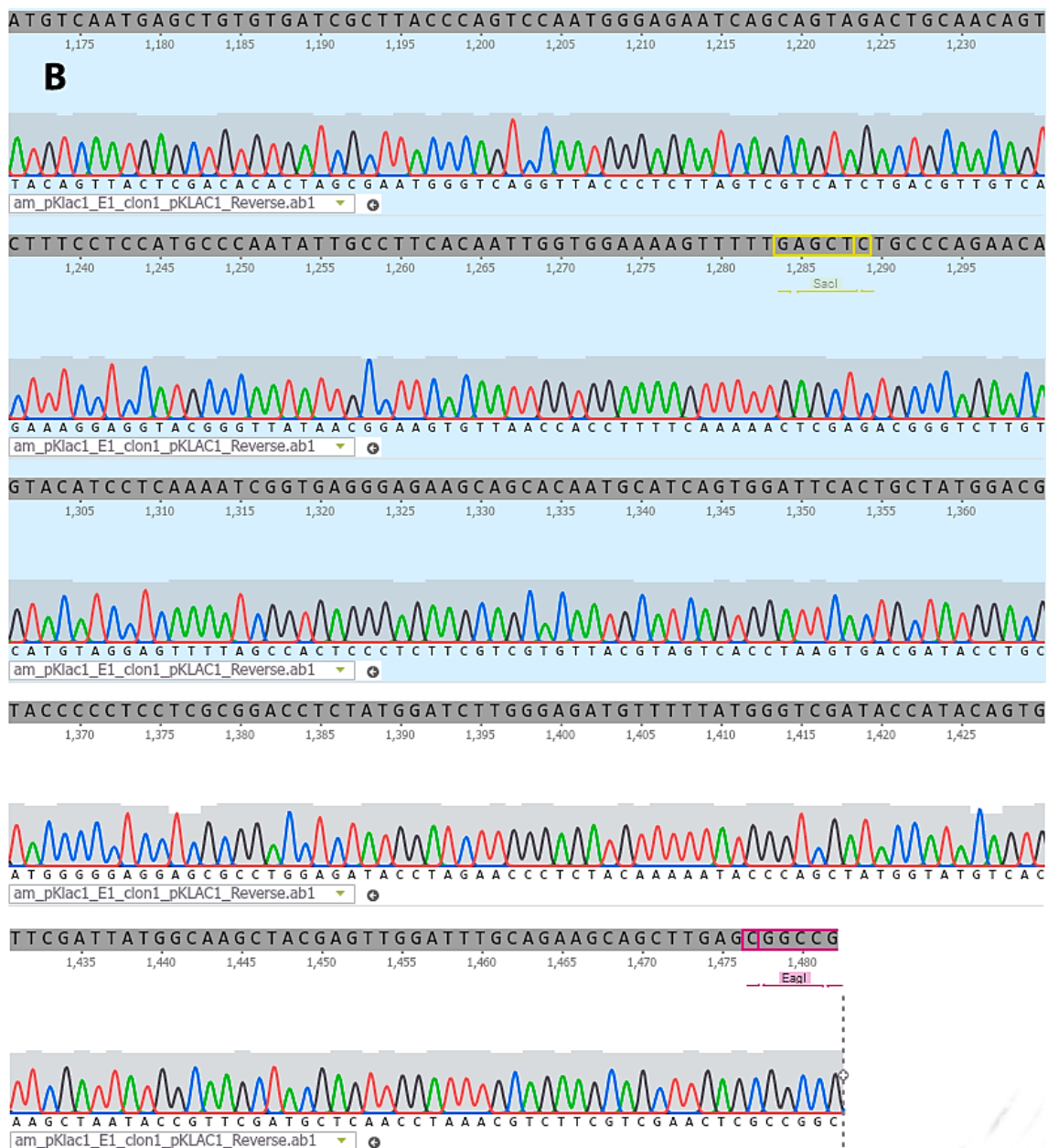




**Figura 8.4 B (parte 3).** Alineamiento del cromatograma obtenido a partir de la secuenciación del cDNA de arctiumsina (insertado en pKLAC1 según la estrategia E1) con el primer “reverse E1”. En el cromatograma, cada base se ilustra con un color diferente: Verde: adenina; Negro: guanina; azul: citocina; rojo: timina. Sobre el cromatograma y sombreado con gris se muestra la secuencia de DNA esperada. La secuencia obtenida a partir del análisis de los picos del cromatograma se muestra debajo de éste; las regiones que concuerdan con la secuencia esperada se ilustran con letras en negro, mientras que las que no concuerdan se ilustran con letras en rojo.



**Figura 8.4 B (parte 4).** Alineamiento del cromatograma obtenido a partir de la secuenciación del cDNA de arctiumsina (insertado en pKLAC1 según la estrategia E1) con el primer “reverse E1”. En el cromatograma, cada base se ilustra con un color diferente: Verde: adenina; Negro: guanina; azul: citocina; rojo: timina. Sobre el cromatograma y sombreado con gris se muestra la secuencia de DNA esperada. La secuencia obtenida a partir del análisis de los picos del cromatograma se muestra debajo de éste; las regiones que concuerdan con la secuencia esperada se ilustran con letras en negro, mientras que las que no concuerdan se ilustran con letras en rojo.



**Figura 8.4 B (parte 5). Alineamiento del cromatograma obtenido a partir de la secuenciación del cDNA de arctimsina (insertado en pKLAC1 según la estrategia E1) con el primer “reverse E1”.** En el cromatograma, cada base se ilustra con un color diferente: Verde: adenina; Negro: guanina; azul: citocina; rojo: timina. Sobre el cromatograma y sombreado con gris se muestra la secuencia de DNA esperada. La secuencia obtenida a partir del análisis de los picos del cromatograma se muestra debajo de éste; las regiones que concuerdan con la secuencia esperada se ilustran con letras en negro, mientras que las que no concuerdan se ilustran con letras en rojo.

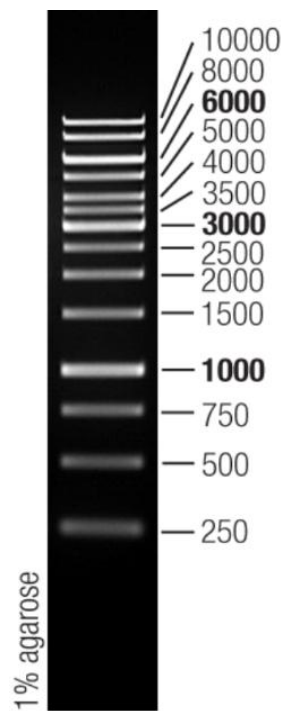


Figura 8.5. Patrón de peso molecular Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1 kb.



- Almeida, C. M., Gomes, D., Faro, C., & Simões, I. (2014). Engineering a cardosin B-derived rennet for sheep and goat cheese manufacture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(1), 269–281. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5902-5>
- Barrett, A. J. & Rawlings, N. D. (1999). Handbook of proteolytic enzymes, 693–694.
- Barrett, A. J. & Rawlings, N. D. (2004). Handbook of proteolytic enzymes: Second Edition, 1–1140.
- Bonekamp, F. J., & Oosterom, J. (1994). On the safety of *Kluyveromyces lactis* – A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41(1), 1–3. <https://doi.org/10.1007/s002530050097>
- Brutti CB, Pardo MF, Caffini NO, Natalucci CL. *Onopordum acanthium* L. (Asteraceae) flowers as coagulating agent for cheesemaking. *LWT - Food Sci Technol.* 2012; 45(2):172-179. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.09.001>.
- Brutti, C. B., Pardo, M. F., Caffini, N. O., & Natalucci, C. L. (2012). *Onopordum acanthium* L. (Asteraceae) flowers as coagulating agent for cheesemaking. *LWT - Food Science and Technology*, 45(2), 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.09.001>
- Bryksa, B. C., & Yada, R. Y. (2017). Protein Structure Insights into the Bilayer Interactions of the Saposin-Like Domain of *Solanum tuberosum* Aspartic Protease. *Scientific Reports*, 7(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16734-2>
- Bryksa, B. C., Bhaumik, P., Magracheva, E., De Moura, D. C., Kurylowicz, M., Zdanov, A., Yada, R. Y. (2011). Structure and mechanism of the saposin-like domain of a plant aspartic protease. *Journal of Biological Chemistry*, 286(32), 28265–28275. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.252619>
- Chen, X., Gao, B., Shi, W., Li, Y., 1992. Expression and secretion of human interferon alpha A in yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yi Chuan Xue Bao* 9 (3), 284–288.
- Cimino C.V., Liggieri C.S., Priolo Nora, Bruno Mariela & Vairo Cavalli Sandra. (2010). *Arctium minus* (Hill) Bernh. (Asteraceae) aspartylendopeptidases with

potential application in the formulation of nutraceutical products. *Molecular medicinal chemistry*, 21, 11 – 16.

- Cimino, C. V., Colombo, M. L., Liggieri, C., Bruno, M., & Vairo-Cavalli, S. (2015). Partial Molecular Characterization of *Arctium minus* Aspartylendopeptidase and Preparation of Bioactive Peptides by Whey Protein Hydrolysis. *Journal of Medicinal Food*, 18(8), 856–864. <https://doi.org/10.1089/jmf.2014.0101>
- Colombo, M. L., Fernández, A., Cimino, C. V., Liggieri, C., Bruno, M., Faro, C., Vairo-Cavalli, S. (2018). Miniature cheeses made with blends of chymosin and a vegetable rennet from flowers of *Silybum marianum*: Enzymatic characterization of the flower-coagulant peptidase. *Food Chemistry*, 266, 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.007>
- Colussi, P. A., & Taron, C. H. (2005). *Kluyveromyces lactis* LAC4 promoter variants that lack function in bacteria but retain full function in *K. lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7092–7098. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7092-7098.2005>
- Cordeiro, M. C., Xue, Z. T., Pietrzak, M., Salomé Pais, M., & Brodelius, P. E. (1994). Isolation and characterization of a cDNA from flowers of *Cynara cardunculus* encoding cyprosin (an aspartic proteinase) and its use to study the organ-specific expression of cyprosin. *Plant Molecular Biology*, 24(5), 733–741. <https://doi.org/10.1007/BF00029855>
- Dalgleish, D. G. (1980). A mechanism for the chymosin-induced flocculation of casein micelles. *Biophysical Chemistry*, 11(2), 147–155. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(80\)80017-2](https://doi.org/10.1016/0301-4622(80)80017-2)
- Domingos, A., Cardoso, P. C., Xue, Z. T., Clemente, A., Brodelius, P. E., & Pais, M. S. (2000). Purification, cloning and autoprolytic processing of an aspartic proteinase from *Centaurea calcitrapa*. *European Journal of Biochemistry*, 267(23), 6824–6831. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2000.01780.x>
- Duarte, A. S., Pereira, A. O., Cabrita, A. M. S., Moir, A. J. G., Pires, E. M. V., & Barros, M. M. T. (2005). The characterisation of the collagenolytic activity of cardosin a



- demonstrates its potential application for extracellular matrix degradative processes. *Current Drug Discovery Technologies*, 2(1), 37–44.  
<https://doi.org/10.2174/1570163053175448>
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregela, S., Lafontaine, I., Souciet, J. L. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature*, 430(6995), 35–44.  
<https://doi.org/10.1038/nature02579>
- Dunn, B. M., & Hung, S. H. (2000). The two sides of enzyme-substrate specificity: Lessons from the aspartic proteinases. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1477(1–2), 231–240.  
[https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00275-7](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00275-7)
- Egas, C., Lavoura, N., Resende, R., Brito, R. M. M., Pires, E., Pedroso De Lima, M. C., & Faro, C. (2000). The saposin-like domain of the plant aspartic proteinase precursor is a potent inducer of vesicle leakage. *Journal of Biological Chemistry*, 275(49), 38190–38196. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006093200>
- Faro, C., & Gal, S. (2005). Aspartic Proteinase Content of the *Arabidopsis* Genome. *Current Protein & Peptide Science*, 6(6), 493–500.  
<https://doi.org/10.2174/138920305774933268>
- Feijoo-Siota, L., & Villa, T. G. (2011). Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 1066–1088. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0431-4>
- FitzGerald, R. J., & Meisel, H. (2003). Milk Protein Hydrolysates and Bioactive Peptides. *Advanced Dairy Chemistry: Vol. 1. Proteins*, 675–698.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3_20)
- Frazão, C., Bento, I., Costa, J., Soares, C. M., Veríssimo, P., Faro, C., Carrondo, M. A. (1999). Crystal structure of cardosin A, a glycosylated and Arg-Gly-Asp-containing aspartic proteinase from the flowers of *Cynara cardunculus* L. *Journal of Biological Chemistry*, 274(39), 27694–27701.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.39.27694>



- Gross, R. S., Werner, P. A., & Hawthorn, W. (1980). The biology of Canadian weeds. 38. *Arctium minus* (Hill) Bernh. and *A. lappa* L. *Canadian Journal of Plant Science*, 60, 621–634.
- Kakudo, S., Kikuchi, N., Kitadokoro, K., Fujiwara, T., Nakamura, E., Okamoto, H., Yoshida, N. (1992). Purification, characterization, cloning, and expression of a glutamic acid-specific protease from *Bacillus licheniformis* ATCC 14580. *Journal of Biological Chemistry*, 267(33), 23782–23788.
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2003). Food-derived Bioactive Peptides - Opportunities for Designing Future Foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1297–1308. <https://doi.org/10.2174/1381612033454892>
- Kumar, L., Gangadharan, V., Raghunadha Rao, D., Saikia, T., Shah, S., Malhotra, H., Bapsy, P., Singh, K., Rao, R., 2005. Safety and efficacy of an indigenous recombinant interferon-alpha-2b in patients with chronic myelogenous leukaemia: results of a multicentre trial from India. *Natl. Med. J. India* 18 (2), 66–70.
- Llorente BE, Obregón WD, Avilés FX, Caffini NO, Vairo-Cavalli S. Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: Characterization of aspartic proteases. *Food Chem.* 2014; 159:55-63. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.007>
- Lufrano, D. (2012). Tesis doctoral “Relación estructura—función de cirsiina, una proteasa aspártica de *Cirsium vulgare*, y compuestos peptídicos derivados con actividad biológica”, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Macedo, A. C., & Malcata, F. X. (1997). Technological optimization of the manufacture of serra cheese. *Journal of Food Engineering*, 31(4), 433–447. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(96\)00069-6](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(96)00069-6)
- Macedo, A. C., Xavier Malcata, F., & Oliveira, J. C. (1993). The Technology, Chemistry, and Microbiology of Serra Cheese: A Review. *Journal of Dairy Science*, 76(6), 1725–1739. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77505-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77505-0)

- Mazorra-Manzano, M. A., Tanaka, T., Dee, D. R., & Yada, R. Y. (2010). Structure-function characterization of the recombinant aspartic proteinase A1 from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 71(5–6), 515–523. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.12.005>
- Meisel, H. (1997). Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopolymers*, 43(2), 119–128. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(1997\)43:2<119::AID-BIP4>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(1997)43:2<119::AID-BIP4>3.0.CO;2-Y)
- Muñoz, F., Palomares-Jerez, M. F., Daleo, G., Villalaín, J., & Guevara, M. G. (2014). Possible mechanism of structural transformations induced by StAsp-PSI in lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838(1 PARTB), 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.08.004>
- Muñoz-Pinedo C. (2012) Signaling Pathways that Regulate Life and Cell Death: Evolution of Apoptosis in the Context of Self-Defense. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 738. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1680-7\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1680-7_8)
- O’Sullivan, M. O., & Fox, P. F. (1991). Evaluation of microbial chymosin from genetically engineered *Kluyveromyces lactis*. *Food Biotechnology*, 37–41. <https://doi.org/10.1080/08905439109549788>
- Ordiales, E., Benito, M. J., Martín, A., Fernández, M., Hernández, A., & De Guia Córdoba, M. (2013). Proteolytic effect of *Cynara cardunculus* rennet for use in the elaboration of “Torta del Casar” cheese. *Journal of Dairy Research*, 80(4), 429–438. <https://doi.org/10.1017/S0022029913000411>
- Pandey, R., & Veeranki, V. D. (2018). Optimizing secretory expression of recombinant human interferon gamma from *Kluyveromyces lactis*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* (Vol. 6068). <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1425706>
- Pereira, C., Pereira, S., Satiat-Jeunemaitre, B., & Pissarra, J. (2013). Cardosin A contains two vacuolar sorting signals using different vacuolar routes in tobacco epidermal cells. *Plant Journal*, 76(1), 87–100. <https://doi.org/10.1111/tpj.12274>

- Pesquet, E. (2012). Plant proteases - from detection to function. *Physiologia Plantarum*, 145(1), 1–4. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01614.x>
- Pihlanto, A., & Korhonen, H. (2003). Bioactive peptides and proteins. *Advances in Food and Nutrition Research*, 47. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(03\)47004-6](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(03)47004-6)
- Puente, X. S., Sánchez, L. M., Overall, C. M., & López-Otín, C. (2003). Human and mouse proteases: A comparative genomic approach. *Nature Reviews Genetics*, 4(7), 544–558. <https://doi.org/10.1038/nrg1111>
- Rábade, N., Badillo-Corona, J. A., Aranda-Barradas, J. S., & Oliver-Salvador, M. del C. (2011). Production of plant proteases in vivo and in vitro - A review. *Biotechnology Advances*, 29(6), 983–996. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.017>
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., & Bateman, A. (2011). Asparagine peptide lyases: A seventh catalytic type of proteolytic enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 286(44), 38321–38328. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.260026>
- Rawlings, N. D., Waller, M., Barrett, A. J., & Bateman, A. (2014). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D503–D509. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt953>
- Roberts P.R. & Zaloga G.P. (1994). Dietary bioactive peptides. *New Horizons*; 2:237–243.
- Roseiro, L. B., Barbosa, M., Ames, J. M., & Wilbey, R. A. (2003). Cheesemaking with vegetable coagulants - The use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 56(2), 76–85. <https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2003.00080.x>
- Sarmiento, A. C., Lopes, H., Oliveira, C. S., Vitorino, R., Samyn, B., Sergeant, K., Barros, M. T. (2009). Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus L.* *Planta*, 230(2), 429–439. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-0948-9>

- Schaller, A. (2004). A cut above the rest: The regulatory function of plant proteases. *Planta*, 220(2), 183–197. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1407-2>
- Schechter, A. B., & Harper, E. (1972). On the size of the active site in proteases: Pronase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46(5), 1956–1960. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(72\)90076-9](https://doi.org/10.1016/0006-291X(72)90076-9)
- Silva, S. V., & Malcata, F. X. (2005a). Partial identification of water-soluble peptides released at early stages of proteolysis in sterilized ovine cheese-like systems: influence of type of coagulant and starter. *Journal of Dairy Science*, 88(6), 1947–1954. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72870-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72870-8)
- Silva, S. V., & Malcata, F. X. (2005b). Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.04.009>
- Simões, I., & Faro, C. (2004). Structure and function of plant aspartic proteinases. *European Journal of Biochemistry*, 271(11), 2067–2075. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04136.x>
- Suguna K, Padlan EA, Smith CW, Carlson WD, Davies DR (1987). Binding of a reduced peptide inhibitor to the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis*: implications for a mechanism of action. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84 (20): 7009–13. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.20.7009>
- Swinkels, B. W., van Ooyen, A. J. J., & Bonekamp, F. J. (1993). The yeast *Kluyveromyces lactis* as an efficient host for heterologous gene expression. *International Journal of General and Molecular Microbiology*, 64(2), 187–201. <https://doi.org/10.1007/BF00873027>
- Tamer, I. M. (1993). Identification and partial purification of a novel milk clotting enzyme from *Onopordum turcicum*. *Biotechnology Letters*, 15(4), 427–432. <https://doi.org/10.1007/BF00128289>
- Tavano, O. L., Berenguer-Murcia, A., Secundo, F., & Fernandez-Lafuente, R. (2018). Biotechnological Applications of Proteases in Food Technology. *Comprehensive*

- Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(2), 412–436.  
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12326>
- Tsiatsiani, L., Gevaert, K., & Van Breusegem, F. (2012). Natural substrates of plant proteases: How can protease degradomics extend our knowledge? *Physiologia Plantarum*, 145(1), 28–40. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01534.x>
- van Den Berg, J. A., Van Der Laken, K. J., Van Ooyen, A. J. J., Renniers, T. C. H. M., Rietveld, K., Schaap, A., Shuster, J. R. (1990). *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: Expression and secretion of prochymosin. *Bio/Technology*, 8(2), 135–139. <https://doi.org/10.1038/nbt0290-135>
- van der Hoorn, R. A. (2008). Plant Proteases: From Phenotypes to Molecular Mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 191–223.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092835>
- van Ooyen, A. J. J., Dekker, P., Huang, M., Olsthoorn, M. M. A., Jacobs, D. I., Colussi, P. A., & Taron, C. H. (2006). Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research*, 6(3), 381–392.  
<https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00049.x>
- Vieira, M., Pissarra, J., Veríssimo, P., Castanheira, P., Costa, Y., Pires, E., & Faro, C. (2001). Molecular cloning and characterization of cDNA encoding cardosin B, an aspartic proteinase accumulating extracellularly in the transmitting tissue of *Cynara cardunculus* L. *Plant Molecular Biology*, 45(5), 529–539.  
<https://doi.org/10.1023/A:1010675015318>
- Wang, W., & Gonzalez De Mejia, E. (2005). A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4(4), 63–78. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2005.tb00075.x>
- White, P. C., Cordeiro, M. C., Arnold, D., Brodelius, P. E., Kay, J. (1999). Processing, Activity, and Inhibition of Recombinant Cyprosin, an Aspartic Proteinase from Cardoon (*Cynara cardunculus*). *The Journal of Biological Chemistry*, 274(24), 16685–16693. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.16685>