



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE PREGRADO

“BIOSÍNTESIS DE ÁCIDO HIALURÓNICO EN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*”

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

Alonso Ignacio Fariña Fernández

Director Seminario de Título

Juan Asenjo De Leuze

Co-Directora

Barbara Andrews Farrow

Patrocinante

Francisco Chávez Espinosa

26 de Agosto de 2019

Santiago, Chile

INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr(ta):

Alonso Ignacio Fariña Fernández

**“BIOSÍNTESIS DE ÁCIDO HIALURÓNICO EN
SACCHAROMYCES CEREVISIAE”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Director Seminario de Título: _____

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión: _____

Evaluator: _____

Santiago de Chile,



Alonso Ignacio Fariña Fernández nació en Quilpué, Quinta Región de Chile, el 11 de Noviembre del año 1992. Desde esa fecha creció y vivió en la ciudad de La Ligua. Realizó sus estudios de enseñanza Básica y Media en el Colegio Domingo Ortiz de Rosas de esta ciudad, entre los años 1999 y 2010.

El año 2012 ingresó a Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, obteniendo el grado de licenciado el año 2016. Desde el año 2017 hasta la fecha ha realizado su Seminario de Título en el Centro de Biotecnología y Bioingeniería (CeBiB) de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la misma casa de estudios. Además, desde el año 2018 a la fecha ha participado en la Rama de Montaña de la Universidad de Chile (RAMUCH)

Agradecimientos

En esta oportunidad quisiera agradecer a todos quienes de alguna u otra forma me han ayudado, acompañado y enseñado durante mi vida para que lograra dar término a este proceso. A mis compañeros y profesores del DOR y a mi amigos y compañeros de la universidad, los cuales volvieron más amena la cotidianidad y exigencia universitaria. Al Dr. Francisco Chávez y las personas de su laboratorio en el momento en que estuve, por permitirme formar parte de su equipo y por su importancia en mi formación científica, al Dr. Juan Asenjo y su equipo de trabajo, por abrirme las puertas de su laboratorio en CeBiB y ayúdame en todo momento no solo con el desarrollo de este trabajo, si no que con las oportunidades que me han dado en el centro en distintas disciplinas. A todos los compañeros de laboratorio de CeBiB con los cuales siempre se generó un muy buen ambiente y era con quienes compartía el día a día. A Francisca, quien me acompaño y apoyo durante todo este proceso y con quien más he disfrutado este tiempo fuera del contexto académico, gracias.

Finalmente quisiera agradecer a mi familia, por su esfuerzo y dedicación, quienes me han dado siempre su apoyo incondicional durante mi vida y me han dado la oportunidad de poder estudiar y sentirme cómodo aún estando fuera de casa.

Índice de contenidos

Resumen	- 1 -
Abstract	- 3 -
Introducción	- 4 -
1) Propiedades y mercado	- 4 -
2) Producción y obtención	- 5 -
3) <i>S. cerevisiae</i> : Hospedero para ruta metabólica	- 11 -
4) Ruta de biosíntesis de ácido hialurónico en <i>S. cerevisiae</i>	- 12 -
Objetivos	- 14 -
Objetivo general	- 14 -
Objetivos específicos	- 14 -
Materiales y Métodos	- 15 -
Microorganismos, plásmidos y medios utilizados	- 15 -
Selección y obtención de elementos reguladores y diseño de genes	- 16 -
Selección de partidores.....	- 17 -
PCR	- 19 -
Geles de agarosa	- 20 -
Digestiones y ligaciones.....	- 20 -
Extracción de ADN.....	- 21 -
Reacciones de Gibson Assembly	- 21 -
Transformación en <i>E. coli</i>	- 24 -
Transformación en <i>S. cerevisiae</i>	- 25 -
Resultados	- 27 -
1) Obtención de los elementos reguladores y los genes utilizados.....	- 27 -
2) Construcción los módulos de expresión.....	- 29 -

a) Módulo <i>ura3</i>	- 29 -
b) Módulo <i>hasA</i>	- 30 -
c) Módulo <i>hasB</i>	- 32 -
d) Ensamble módulo de expresión.....	- 35 -
3) Validación de Mura3 como marcador de selección	- 37 -
4) Transformación en <i>S. cerevisiae</i>	- 38 -
Discusión	- 40 -
1) Obtención de los elementos reguladores y genes utilizados.....	- 41 -
2) Construcción módulos de expresión de <i>ura3</i> , <i>hasA</i> y <i>hasB</i>	- 42 -
a) Módulo <i>ura3</i> y <i>hasA</i>	- 42 -
b) Módulo <i>hasB</i>	- 44 -
c) Ensamble módulo de expresión.....	- 48 -
3) Validación de Mura3 como marcador de selección	- 48 -
4) Transformación en <i>S. cerevisiae</i>	- 49 -
Conclusiones	- 52 -
Bibliografía	- 54 -
Anexos	- 61 -

Índice de tablas

Tabla I: Producción de ácido hialurónico de distintos microorganismos procariontes _____	- 10 -
Tabla II: Cepas utilizadas _____	- 15 -
Tabla III: Plásmido utilizados _____	- 16 -
Tabla IV: Elementos reguladores y genes utilizados _____	- 17 -
Tabla V: Listado de partidores utilizados _____	- 18 -
Tabla VI: Alícuotas 2X para reacciones de Gibson Assembly _____	- 22 -
Tabla VII: Enzimas de restricción y los tamaños obtenidos de pBluescript:MhasB _____	- 35 -
Tabla VIII: Concentraciones de ADN utilizadas en las transformaciones realizadas en <i>S. cerevisiae</i> s288c Δ ura3 _____	- 39 -
Tabla IX: Temperatura de alineamiento para las reacciones de Gibson para la construcción de los módulos de <i>hasA</i> y <i>hasB</i> _____	- 43 -

Índice de figuras

Figura 1: Ruta de biosíntesis de ácido hialurónico propuesta en <i>S. cerevisiae</i> . _____	- 8 -
Figura 2: Diseño experimental de los tres constructos ensamblados en el plásmido pBluescript II SK + y del cluster completo. _____	- 23 -
Figura 3: Obtención de los elementos reguladores y los genes necesarios para los tres módulos de expresión. _____	- 28 -
Figura 4: Construcción por Gibson Assembly y verificación por PCR del módulo <i>ura3</i> . ____	- 30 -
Figura 5: Construcción por Gibson Assembly y verificación por PCR del módulo <i>hasA</i> . ____	- 31 -
Figura 6: Construcción de módulo <i>hasB</i> . _____	- 33 -
Figura 7: Corroboración módulo <i>hasB</i> . _____	- 35 -
Figura 8: Ensamble de los módulos de expresión MhasA y Mura3 al fragmento DOWN22.-	36 -
Figura 9: Validación Mura3 como marcador de selección. _____	- 38 -
Figura 10: Nuevo diseño utilizado para transformar en cepa <i>S. cerevisiae</i> s288c Δ ura 3._	- 39 -

Abreviaturas

ADH1p: Promotor alcohol deshidrogenasa	PCR: Polymerase chain reaction
ADN: Ácido desoxirribonucleico	rpm: Revoluciones por minuto
FBA1t: Terminador fructosa-bifosfato aldolasa	RV: Reverse
FW: Forward	SD: Definido sintéticamente
HA: Ácido hialurónico	TEF1p: Promotor factor elongación traslacional EF-1alpha
cm: Centímetros	TPI1t: Terminador triosa fosfato isomerasa
HAS: Hialuronato Sintasa	UDP: Uridina difosfato
kb: Kilo bases	µg: Microgramo
Da: Dalton	µL: Microlitro
LB: Luria Broth	USD: Dólar de Estados Unidos
MhasA: Módulo <i>hasA</i>	YM: Yeast malt
MhasB: Módulo <i>hasB</i>	YNB: Yeast nitrogen base
MDa: Mega Dalton	YPD: Yeast extract peptone dextrose
pb: pares de bases	

Resumen

El ácido hialurónico es un polímero que pertenece a los glicosaminglicanos formado por subunidades repetidas de N-acetilglucosamina y ácido glucurónico, forma parte de la matriz extracelular en organismos vertebrados como los humanos y posee atractivas propiedades que son de gran interés comercial en el área alimenticia, cosmética y médica. Por esta razón en la última década ha aumentado el uso de la fermentación de microorganismos para su producción con tal de mejorar parámetros de calidad, como su pureza y peso molecular y como alternativa para reemplazar los procesos de obtención actual. *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura que si bien no produce naturalmente ácido hialurónico posee ventajas favorables para su posible escalamiento y producción. Debido al amplio conocimiento y herramientas genéticas que existen de este microorganismo es un hospedero atractivo para la producción de este polímero.

En este trabajo se buscó obtener una cepa de *S. cerevisiae* capaz de producir ácido hialurónico. Para ello se utilizaron enzimas provenientes del microorganismo *Streptococcus pyogenes* el cual produce naturalmente este polímero. Se ensamblaron 3 módulos de expresión mediante Gibson Assembly utilizando promotores y terminadores nativos de *S. cerevisiae*, estos corresponden a; El marcador de selección *ura3*, el cual nos permitirá identificar mediante selección positiva. El módulo de expresión de la hialuronato sintasa (HasA) que polimeriza N-acetilglucosamina y ácido D-glucurónico para sintetizar ácido hialurónico. Finalmente el módulo de expresión de la UDP-glucosa deshidrogenasa (HasB), el cual es fundamental para obtener el precursor ácido D-glucurónico, el cual no se encuentra disponible de manera nativa en *S. cerevisiae*.

A través de recombinación homóloga *in vivo* se intentó integrar el cluster completo en el cromosoma V en una cepa que posee una delección en el gen *ura3*. Se logró obtener

dos de los tres módulos antes mencionados de manera independiente y se validó el funcionamiento del marcador de selección sintético propuesto para curar la auxotrofia del hospedero, no fue posible obtener cepas recombinantes para el constructo completo de expresión para ambas enzimas en el microorganismo *S. cerevisiae*.

Abstract

Hyaluronic acid is a polymer that belongs to the class of glycosaminoglycans and it is composed of repeating subunits of N-acetylglucosamine and glucuronic acid. It is part of the extracellular matrix in vertebrates, such as humans. Furthermore, it has several properties which make it an important product in the food, cosmetic and medical industries. During the last decade the production of HA by microbial fermentation has been improving in order to get better parameters such as purity and molecular weight. *S. cerevisiae* is a yeast which does not produce hyaluronic acid, but it has some advantages that make it a promising cell-factory. Due to the extensive knowledge and genetic tools about *S. cerevisiae*, it is an interesting host for the heterologous production of hyaluronic acid.

The aim of this work was to obtain a *S. cerevisiae* strain able to produce hyaluronic acid. In this work, two enzymes of *S. pyogenes*, which is a hyaluronic acid producer, were selected, The Gibson assembly technique was used to make three clusters with native yeast promoters and terminators; the selectable marker *ura3*, the hyaluronate synthase (HasA) expression module, enzyme that polymerized N-acetylglucosamine and glucuronic acid to produce hyaluronic acid; and, the UDP-glucose dehydrogenase (HasB) expression module, which is the key to obtain the glucuronic acid precursor because it is not produced naturally by *S. cerevisiae*.

Through *in vivo* homologous recombination we tried to integrate the full cluster in chromosome V of a *S. cerevisiae* strain with an *ura3* gene deletion. Two modules were successfully assembled, and the synthetic selectable marker to revert the auxotrophy mutation was validated. However, it was not possible to obtain *S. cerevisiae* transformant strains with the entire expression cluster that contains both enzymes.

Introducción

1) Ácido Hialurónico: Propiedades y mercado

El ácido hialurónico (HA) es un glicosaminoglicano lineal, conformado por unidades repetidas y alternadas de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido D-glucorónico (GlcA), a través de enlaces glucosídicos β -1,3 (GlcA - GlcNAc) y β -1,4 (GlcNAc - GlcA) (DeAngelis & Weigel, 1994). Puede alcanzar tamaños de hasta 10^7 Da y, dadas sus propiedades únicas como la viscosidad y elasticidad, hacen que sea un biomaterial de alto interés médico y cosmético (Cowman et al., 2015). Normalmente en humanos y vertebrados el HA es encontrado en la matriz extracelular del tejido conectivo, por lo que gran parte del HA del cuerpo humano se encuentra en la piel. Además, es abundante en el fluido sinovial (articulaciones), cordón umbilical y el humor vítreo del ojo (Kogan et al., 2007). Es por esto, que dentro de las principales aplicaciones médicas de HA se encuentran, por ejemplo; la viscoprotección en cirugías oftalmológicas, viscosuplementación de fluidos como tratamiento en osteoartritis como paliativo al dolor y recuperación de líquido sinovial, viscoelasticidad en aplicaciones ortopédicas (desarrollo de cartílago, mantenimiento del fluido sinovial y regeneración de tendones) y viscoaumento de tejidos, como la piel en aplicaciones dermatológicas (Cowman et al., 2015; Kogan et al., 2007; Necas et al., 2008)

El ácido hialurónico está involucrado en la mantención de la humedad de la piel ya que es una molécula que se caracteriza por retener agua. Esto último se ha relacionado con el envejecimiento de la piel, lo que le ha dado un interés adicional a este polímero en la industria cosmética como principal ingrediente de productos contra el envejecimiento facial (Papakonstantinou et al., 2012). Es por ello que su mercado ha crecido considerablemente en las últimas décadas, en paralelo al envejecimiento de la población. Asimismo, esta última década ha aumentado su uso en la industria estética en

procedimientos con o sin cirugía. A modo de ejemplo, su versión inyectable en grandes mercados cosméticos como Estados Unidos sólo es superado por el botox (Coleman & Carruthers, 2006; Zhang et al., 2018).

El tamaño del mercado del HA ha crecido sustancialmente en los últimos años. Se ha evaluado que alcanzó los 8,3 miles de millones de USD en 2018 y se estima que crezca a 11,07 miles de millones de USD al 2026, debido al aumento de su uso con fines cosméticos y quirúrgicos principalmente en Norteamérica y Asia Pacífico (Acumen Research and Consulting, 2019). El valor comercial del producto varía con respecto a su calidad y uso, lo cual como ya se ha mencionado está relacionado con el tamaño del polímero y la pureza con que se obtiene. Estas características varían dependiendo de la fuente del HA y los métodos de extracción utilizados (Shiedlin et al., 2004). El HA comercializado con fines medicinales bordea los \$40.000 – \$60.000 USD por kilo, mientras que en la industria cosmética y alimenticia su valor ronda los \$1.000 - \$2.000 USD por kilo, aún así, el volumen de este mercado es entre 10-20 veces mayor del HA de grado médico (Chong et al., 2005)

2) Ácido hialurónico: Producción y obtención

Actualmente, el HA comercializado es extraído desde la cresta de los gallos, ya que es por lejos el tejido animal que posee la mayor cantidad de este polímero (alrededor de 7,5 mg/g). El tamaño con que se logra recuperar el HA depende del método de extracción empleado, aunque en promedio se consiguen moléculas de alrededor de 2-3 MDa (Kogan et al., 2007). Mientras mayor es el tamaño del HA, mayor es el atractivo para el mercado y se comercializa a un mejor valor, ya que es éste el que se utiliza normalmente en cirugías, tratamientos y/o cirugías plásticas debido a la relación directa entre el tamaño y el aumento en la viscosidad (Cowman et al., 2015). El HA al estar unido a diversos polímeros en el tejido conectivo debe ser purificado mediante diversos métodos, tales como; digestión con

proteasas, precipitación con/sin solventes, ultrafiltración y/o liofilización (Mendichi & Schieronni, 2002). Por este motivo, los costos de extracción desde tejidos animales son altos.

Además de los vertebrados el ácido hialurónico es posible encontrarlo en microorganismos, tales como *Pasteurella multocida* y en las especies que conforman género *Streptococcus*. *Streptococcus* es un género de bacterias patógenas gram positivas que se encuentran divididas en grupos según el criterio de clasificación de Lancefield (serotipo proteína M), se ha identificado que los grupos A (Wessels & Bronze, 1994) y C (Kumari & Weigel, 1997) sintetizan HA formando una cápsula que las recubre. Se ha observado que esta cápsula cumple un rol clave en la virulencia de estas cepas ya que protege al microorganismo de la ingestión y de los fagocitos del hospedero durante el proceso de colonización (Wessels & Bronze, 1994).

Si bien es posible producir HA en procesos de fermentación utilizando bacterias del género *Streptococcus* atenuadas (Kim et al., 1996) al tratarse de microorganismo patógeno para varias especies, incluido el humano, la regulación por la posible producción de toxinas y antígenos impiden que el proceso sea escalable y limitan su mayor producción por esta vía (Kogan et al., 2007). Por esta razón, el HA para uso comercial sigue siendo obtenido predominantemente desde la cresta de los gallos. Sin embargo, aún se buscan fuentes alternativas de producción.

La biosíntesis de HA en los microorganismos mencionados anteriormente ocurre a través de proteínas de membrana denominadas hialuronato sintasas (HAS) (Weigel et al., 1997), las cuales polimerizan HA en el citoplasma. Luego, la misma proteína sintasa transloca la cadena a través de la membrana plasmática hacia el exterior de la célula (Heldermon et al., 2001). Existen dos categorías de proteínas HAS basados en su similitud de secuencia y topología (Hoshi et al., 2004). Las de clase I, que incluyen las HAS encontradas en el género *Streptococcus* y vertebrados, y las de clase II que solo han sido reportadas en *Pasteurella multocida* (DeAngelis, 1999). Las HAS de clase II presentan una

secuencia muy diferente a las de clase I, poseen un mayor tamaño (~1000 aa extras) y agregan los residuos glucosídicos en el extremo no-reductor de la cadena de HA.

En consecuencia de que las HAS de clase II son específicas de microorganismo *Pasteurella multocida* y presentan las diferencias ya mencionadas con respecto a las HAS encontradas en el resto de los organismos, nos enfocaremos en las HAS de clase I. Pertenecen a un grupo glicosiltransferasas que incluye también a la quitina y a la celulosa sintasa. Sin embargo, solo HAS es capaz de polimerizar ácido hialurónico. Esta proteína utiliza Mg^{+2} como cofactor y posee 6-8 dominios transmembrana o asociados a membrana y un dominio central que posee una zona muy conservada entre HAS de distintas especies (Weigel et al., 1997) en donde se encontraría el sitio catalítico de HA (DeAngelis & Weigel, 1994). Las HAS identificadas en organismos procariontes del género *Streptococcus* poseen al menos 50% de identidad de secuencia entre ellas, mientras que las provenientes de organismos eucariontes poseen dominios adicionales y un mayor residuos en los dominios más conservados. Estos dominios adicionales identificados en organismos eucariontes, estarían involucrados en otras funciones, como regulación enzimática o la interacción con otros componentes celulares (Weigel et al., 1997). Aún así, las HAS de clase I comparten zonas altamente conservadas principalmente en los segmentos de dominio transmembrana y en el dominio central en donde se encontraría el sitio catalítico. En consecuencia, el mecanismo de síntesis en ambos grupos de organismos es muy similar. A pesar de esto, el HA producido por bacterias y vertebrados es muy diferente en cuanto a su peso molecular y difieren en la velocidad de síntesis al cual es producido. Es posible observar polímeros de mucho mayor tamaño en vertebrados, 2 – 3 MDa, mientras que en microorganismos el HA es de unos 0,8 – 1 MDa. Además se ha reportado, *in vitro*, que la velocidad de síntesis de HAS bacteriana sería unas 10 veces mayor que la HAS eucarionte (de 5000 a 500 disacáridos/minuto) (Chong, et al. 2005).

La síntesis del ácido hialurónico emerge desde la glicólisis ya que los dos

precursores, N-acetilglucosamina y ácido-D-glucurónico, son sintetizados a partir de fructosa 6-P y glucosa 6-P, respectivamente (Figura 1). La formación de ambos intermediarios ocurre en el citoplasma independiente del tipo de microorganismo, al igual que la polimerización de ambos monómeros para la formación de HA, en donde luego la cadena es liberada hacia la matriz extracelular (de Oliveira et al., 2016). Cabe resaltar que varios productos intermediarios en la síntesis de HA desde glucosa y fructosa son precursores de polisacáridos encontrados en la pared o matriz extracelular, como por ejemplo lipopolisacáridos y polisacáridos extracelulares de la pared celular, peptidoglicano o quitina.

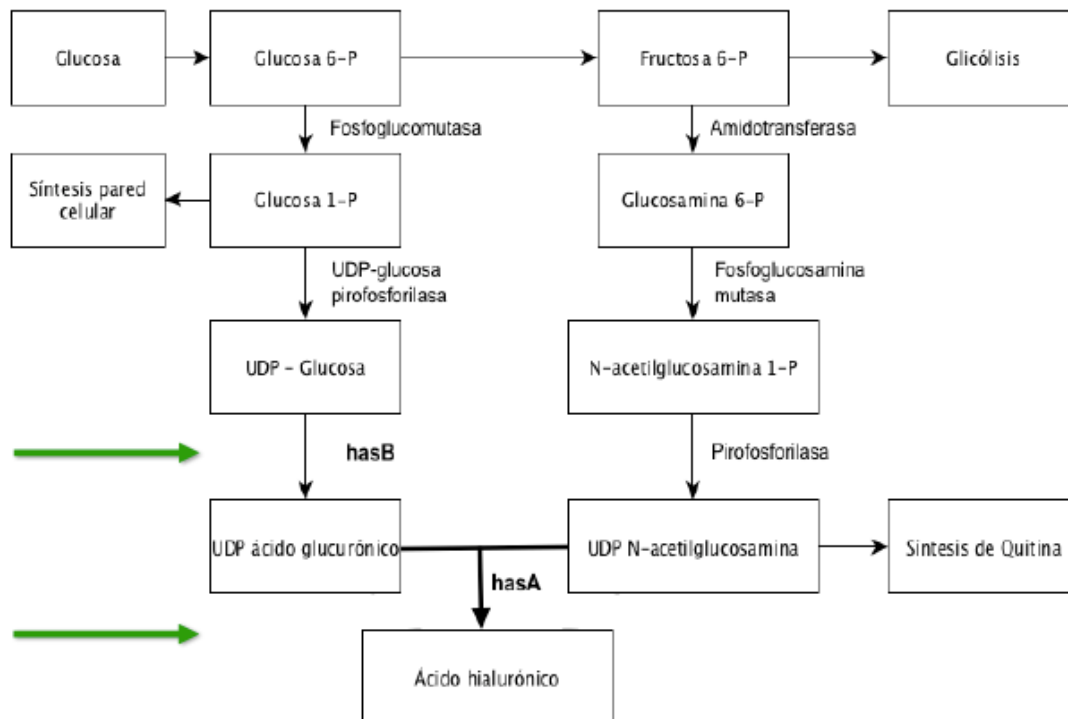


Figura 1: Ruta de biosíntesis de ácido hialurónico. Las flechas de color verde indican las reacciones que realizan las enzimas codificadas por los genes *hasA* y *hasB* del género *Streptococcus*, necesarias para la ruta metabólica propuesta, discutida más adelante.

En el género *Streptococcus*, la síntesis de HA depende genéticamente de la expresión de un operón, el cual posee además de HAS, varios genes de nuestro interés

que permiten la síntesis de HA y de sus precursores (Falaleeva et al., 2014). El gen *hasA* codifica para HAS y el gen *hasB* codifica para una deshidrogenasa que cataliza la reacción de UDP-D-glucosa a UDP ácido D-glucurónico (Figura 1) (DeAngelis, et al., 1993), por lo que nos será posible obtenerlo a partir de glucosa. Cabe mencionar que incluso en bacterias del género *Streptococcus* la síntesis de HA supone una gran carga metabólica para el organismo ya que para obtener un dímero del polímero la síntesis de ambos intermediarios requiere 3 moléculas de ATP, 2 UTP, 2 NAD⁺, glucosa y glutamina (de Oliveira et al., 2016). Es por ello que su producción desencadena una merma en la cinética de crecimiento del microorganismo.

Con el fin de buscar alternativas biológicas de producción de HA que sean amigables con el ambiente y que reduzcan los costos de extracción y purificación, se han identificado trabajos previos en que se ha clonado HAS en microorganismos de rápido crecimiento que normalmente son utilizados en expresión heteróloga de proteínas o subproductos. En el caso de HA se busca obtener mejores rendimientos, aumentar los tamaños de los polímeros y obtener una alternativa de producción de HA escalable a nivel industrial. En la última década es posible identificar diversos trabajos en los que se han clonado HAS y producido HA en distintos hospederos procariontes (Tabla I). Los ejemplos que más abundan y que poseen mayor relevancia son en *E. coli* (Vaisman, 2014; Yu et al., 2008) y el microorganismo gram positivo *B. subtilis* (Widner et al., 2005). Estos dos microorganismos en particular sintetizan de forma natural los precursores en la síntesis de HA, ácido glucurónico y N-acetilglucosamina. En estos microorganismos la N-acetilglucosamina es también precursor en la ruta de síntesis de peptidoglicano (Vollmer, et al. 2008) en conjunto al ácido N-acetilmurámico. Pero, es el ácido glucurónico el principal limitante en la síntesis de HA (Chien & Lee, 2007a; Yu et al., 2008). Por esta razón se observa una menor producción heteróloga de HA en estos organismos, usando glucosa como fuente de carbono, en relación a lo producido de manera nativa por microorganismos del género

Streptococcus en medios de cultivo optimizados (Tabla I) (Vaisman, 2014; Widner et al., 2005; Yu et al., 2008).

Tal y como se puede observar en la Tabla I, a pesar de la diferencia que existe en la producción de HA a favor de *Streptococcus* sp., debido a las limitaciones en escalar a nivel industrial este microorganismo, se continua trabajando optimizar la producción heteróloga de HA y en buscar alternativas a la producción de HA en distintas fuentes. Existe evidencia más reciente de procesos de optimización genética o de cultivo en donde se ha conseguido aumentar considerablemente el rendimiento de producción de HA, alcanzando valores similares a *Streptococcus* sp. citado anteriormente. Por ejemplo, una producción de 6,8 g/L en *B. subtilis* (Jia et al., 2013).

Tabla I: Producción de ácido hialurónico en distintos microorganismos procariontes

Microorganismo	Fuente de carbono (p/v)	Producción de HA (g/L)	Fuente
<i>Streptococcus</i> sp.	Glucosa 4%	6,9	(Im, et al. 2009)
<i>Lactococcus lactis</i>	Glucosa 0,1%	0,65	(Chien & Lee, 2007b)
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Glucosa 4%	0,3 – 0,4	(Hoffmann & Altenbuchner, 2014)
<i>Agrobacterium</i> sp	Sacarosa 4%	0,3	(Mao & Chen, 2007)
<i>Escherichia coli</i>	Glucosa 1 – 10%	0,19 – 0,26	(Yu, et al. 2008)
<i>Bacillus subtilis</i>	Glucosa 1%	1,8	(Chien & Lee, 2007a)
<i>Streptomyces albulus</i>	Glucosa 6%	0,3	(Yoshimura, et al. 2015)

Dentro de la expresión heteróloga de HAS en hospederos eucariontes se han reportado trabajos en *Pichia pastoris*, en donde se obtuvieron polímeros de hasta 2,5 MDa, sin

embargo el rendimiento de producción no es muy alto (0,8 – 1,7 g/L) (Deangelis et al., 1996b; Jeong et al., 2014). En *S. cerevisiae* en tanto, fue posible expresar HAS de origen eucarionte, para luego sintetizar HA *in vitro* (Deangelis et al., 1996a).

3) *S. cerevisiae*: Hospedero para ruta metabólica

El uso de *Saccharomyces cerevisiae* se presenta como una alternativa para la biosíntesis de HA debido a la serie de ventajas que posee. En primer lugar no es patogénica y ha sido ampliamente utilizada a nivel industrial (producción alimenticia de pan o cerveza) por lo que existe gran conocimiento sobre su uso en procesos a gran escala, dándole una ventaja por sobre microorganismos como *E. coli* y *B. subtilis*. Además, existe gran cantidad de información genética y metabólica disponible sobre este microorganismo y, por lo tanto, se han desarrollado varias herramientas y técnicas de manipulación genética de este microorganismo estandarizadas, lo cual facilita el trabajo y ofrece varias ventajas por sobre otros posibles hospederos.

Dentro de las herramientas genéticas más útiles para este trabajo, está la recombinación homóloga *in vivo*, mecanismo de reparación nativo de *S. cerevisiae* en donde a partir de una secuencia de homología a un sitio de ADN de interés es posible integrar o reemplazar fragmentos de material genético (Mézard et al., 1992; Orr-Weaver et al., 1981). Esto nos permite realizar una integración sitio-dirigida en uno de los cromosomas de *S. cerevisiae* de manera específica y sacar ventajas del sitio de inserción seleccionado. Esto es relevante ya que existe evidencia de que los niveles de transcripción de un módulo de expresión integrado al genoma de *S. cerevisiae* dependen del sitio de inserción (Flagfeldt et al., 2009). De igual forma, existe la posibilidad de realizar una mutación por medio de recombinación homóloga que sustituya un gen que entregue un fenotipo de auxotrofia y así facilite el método de selección de la cepa transformada (Bach, Lacroute, & Botstein, 1979).

Es por esto que en este trabajo se utilizará la cepa de *S. cerevisiae* s288c que

previamente fue modificada en el laboratorio mediante recombinación homóloga *in vivo* en el cromosoma V (Flagfeldt et al., 2009). En concreto, se sustituyó el gen *ura3* que codifica para la oritidina-5-fosfato descarboxilasa, una enzima en la ruta de síntesis de la pirimidina y cuya ausencia genera auxotrofia por lo que la cepa necesita uracilo suplementado para crecer (Lacroute, 1967). En su lugar se integró el gen de resistencia al antibiótico geneticina (G418). Este es un antibiótico comúnmente utilizado como marcador de selección eucarionte y permite utilizar esta cepa como hospedero a la transformación utilizando el gen *ura3* como marcador de selección para curar la auxotrofia.

4) Ruta de biosíntesis de ácido hialurónico en *S. cerevisiae*

En consideración de la ruta de síntesis de HA (Figura 1), en *S. cerevisiae* solo es posible encontrar uno de los precursores del HA, N-acetilglucosamina, la cual en el metabolismo central del organismo es el monómero estructural de la quitina, polisacárido que forma parte de la pared celular de este microorganismo (Orlean, 2012). Es por esto que, al igual que en la biosíntesis en *E. coli* habrá un desvío de uno de los sustratos, en este caso, hacia la síntesis de quitina. En cuanto al otro precursor, el ácido D-glucurónico, este no se encuentra de manera nativa en *S. cerevisiae*, por lo tanto, será necesario inducir su producción.

Tal y como se había mencionado anteriormente existen antecedentes de expresión de HAS y producción heteróloga de HA en microorganismos eucariontes, como *Pichia Pastoris* (Deangelis et al., 1996_b; Jeong et al., 2014), o *S. cerevisiae* (Deangelis et al., 1996_a; Weigel et al., 2006). En esta última se ha reportado la expresión de HAS de origen eucarionte, utilizando la proteína DG42 (*Xenopus Laevis*) que posee una secuencia de aminoácidos similar las HAS de origen procarionte (Deangelis et al., 1996_a). También, se ha expresado HAS de origen procarionte, transformando el cADN del gen correspondiente a HAS del género *Streptococcus* (Weigel et al., 2006). En ambos casos solo se realizó

expresión episomal de HAS suplementando externamente los precursores, ácido glucurónico y N-acetilglucosamina, de HA.

En consideración a lo ya mencionado, los genes a utilizar, *hasA* y *hasB*, provienen de *S. pyogenes* y serán obtenidos sintéticamente, en la ruta propuesta (Figura 1) la enzima hialuronato sintasa (HAS) es fundamental para polimerizar el ácido hialurónico, mientras que la enzima UDP-glucosa deshidrogenasa es importante para mantener una fuente intracelular del precursor ácido UDP-glucorónico. Estas son las enzimas mínimas y fundamentales para establecer una ruta de biosíntesis de ácido hialurónico en *S. cerevisiae*.

La construcción de los módulos de expresión de *hasA*, *hasB* y el marcador de selección *ura3* se realizarán a través de la técnica de Gibson Assembly (Gibson et al., 2009) de manera independiente. Esto nos permitirá ensamblar cada fragmento de ADN de interés en una reacción isotérmica. Si bien, la reacción de Gibson Assembly permite ensamblar todos los fragmentos de interés junto al vector utilizado en una reacción, en este caso, se ensambló cada módulo por separado ya que el cluster de expresión completo será conformado por 9 fragmentos y esto aumenta la dificultad de obtener concentraciones de ADN lo suficientemente altas para satisfacer los criterios de equimolaridad de la reacción de Gibson Assembly (Gibson et al., 2009). Esta dificultad se ha reportado en experiencias anteriores en el mismo laboratorio (Méndez, 2018).

Se propone obtener una cepa de *S. cerevisiae* s288c que produzca ácido D-glucurónico y que sea capaz de biosintetizar ácido hialurónico (HA), se utilizará HAS proveniente de una bacteria del género *Streptococcus*, la cual ya ha sido utilizada en trabajos previos en el laboratorio en *E. coli* (Vaisman, 2014). Se construirá mediante ensamble genético *in vitro* el constructo final utilizando *ura3* como marcador de selección en la transformación. Finalmente se pretende integrar en conjunto los módulos de expresión con los tres componentes mencionados (*ura3*, *hasA* y *hasB*) en el cromosoma V de *S. cerevisiae* s288c.

Objetivos

Objetivo general

Obtener mediante recombinación homóloga *in vivo* una cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* s288c que contenga un módulo de expresión con los genes *hasA* y *hasB* que le permitan sintetizar ácido hialurónico

Objetivos específicos

- Obtener los elementos reguladores y los genes que formaran parte del cluster genético de síntesis de ácido hialurónico en *S. cerevisiae*
- Ensamblar mediante Gibson Assembly el marcador de selección *ura3* y los módulos de expresión *hasA* y *hasB*
- Verificar marcador de selección sintético mediante recombinación homóloga *in vivo* en cepas auxótrofas de *S. cerevisiae* s288c
- Transformar e integrar el constructo genético diseñado mediante recombinación homóloga *in vivo* en *S. cerevisiae*.

Materiales y Métodos

Microorganismos, plásmidos y medios utilizados

Se utilizaron las cepas de microorganismos detalladas a continuación en la Tabla II

Tabla II: Cepas utilizadas

Cepas	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i> TOP10	Genotipo: <i>F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ar leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG.</i>	Invitrogen Inc.
<i>S. cerevisiae</i> s288c	Genotipo: <i>MATα, SUC2, gal2, mal2, mel, flo1, flo8-1, 1hap1, ho, bio1, bio6.</i>	Ceparío CeBiB
<i>S. cerevisiae</i> s288c <i>Δura3</i>	Genotipo: <i>MATα, SUC2, gal2, mal2, mel, flo1, flo8-1, 1hap1, ho, bio1, bio6, Δura3::kan.</i>	Ceparío CeBiB

La cepa *E. coli* TOP10 se utilizó para clonar y preservar las distintas construcciones genéticas. Se creció a 37 °C y 200 rpm en medio LB líquido o sólido suplementado con ampicilina 100 µg/mL, según corresponda. Para el crecimiento en placas de medio sólido el agar se suplementó al 1,5% p/v. Todas las cepas se preservaron a -80°C en glicerol 30% (v/v).

Los cultivos de *S. cerevisiae* se realizaron a 30°C y 200 rpm en los medios YPD o medio sintético definido YNB (suplementado o no con aminoácidos, según corresponda). En los cultivos en placas de medio sólido de YPD o YNB se agregó agar al 2% p/p. Se preservaron alícuotas de las cepas en glicerol 30% (v/v) a -80°C.

Los plásmidos detallados a continuación en la Tabla III.

Tabla III: Plásmido utilizados

Plásmido	Características	Referencia
pUC57	Vector de clonamiento en <i>E. coli</i> , posee resistencia a ampicilina.	General Biosystems
pBluescript II SK +	Vector de clonamiento en <i>E. coli</i> , resistencia a ampicilina y sistema Blue-White screening	Cepario CeBiB

El plásmido pBluescript II SK + se utilizó para la construcción de los módulos de expresión. También se utilizó el plásmido pUC57, que posee resistencia a ampicilina, para perpetuar los marcos de lectura de los genes *hasA* y *hasB*.

Selección y obtención de elementos reguladores y diseño de genes

Se utilizó el marco de lectura de *hasA* y *hasB* del organismo procarionte *S. pyogenes* (Tabla IV), consultado en la base de datos NCBI. Se realizó ajuste de codones de el marco de lectura de ambos genes para *S. cerevisiae*. Los genes *hasA* y *hasB* fueron obtenidos por separado y de manera sintética en el plásmido pUC57 (General Biosystems, Inc). *hasA* y *hasB* fueron amplificados mediante PCR a partir del vector pUC57 obtenido desde General Biosystems, Inc.

Se seleccionaron promotores, terminadores y sitios de recombinación propios de *S. cerevisiae* (Shao, Zhao, & Zhao, 2009) para la construcción de los módulos de *hasA*, *hasB* y el marcador de selección *ura3* (Tabla IV). Junto a los sitios de recombinación UP22 y DOWN22 (Tabla IV), necesarios para la construcción de los módulos de expresión, fueron obtenidos mediante PCR desde el ADN genómico de *S. cerevisiae*.

Tabla IV: Elementos reguladores y genes utilizados

Nombre	Tamaño (pb)	Microorganismo de origen	Referencia
Promotor factor elongación traslacional EF-1alpha (TEF1p)	412	<i>S. cerevisiae</i>	(Shao et al., 2009)
Promotor alcohol dehidrogenasa (ADH1p)	1500	<i>S. cerevisiae</i>	(Shao et al., 2009)
Terminador triosa fosfato isomerasa (TPI1t)	400	<i>S. cerevisiae</i>	(Shao et al., 2009)
Terminador fosfoglucosa isomerasa (PGI1t)	400	<i>S. cerevisiae</i>	(Shao et al., 2009)
Terminador fructosa-bifosfato aldolasa (FBA1t)	400	<i>S. cerevisiae</i>	(Shao et al., 2009)
UP22	504	<i>S. cerevisiae</i>	(Flagfeldt et al, 2009)
DOWN22	501	<i>S. cerevisiae</i>	(Flagfeldt et al., 2009)
Hialuronato Sintasa (<i>hasA</i>)	1260	<i>S. pyogenes</i>	(Weigel et al., 1997)
UDP-glucosa deshidrogenasa (<i>hasB</i>)	1209	<i>S. pyogenes</i>	(Weigel et al., 1997)
Oritidina-5'-fosfato descarboxilasa (<i>ura3</i>)	804	<i>S. cerevisiae</i>	(Flagfeldt et al., 2009)

Selección de partidores

Los partidores utilizados para amplificar cada fragmento y realizar las reacciones de Gibson Assembly fueron diseñados en la herramienta NEBuilder® Assembly Tool v.1.12.17 ("NEBuilder Assembly Tool"). Estos poseen el marco de lectura correcto para su respectivo fragmento y la adición de las bases necesarias para su ensamble mediante reacción de Gibson con el fragmento contiguo. La T_m de los partidores fue verificada en la plataforma online OligoCalc® ("OligoCalc"), en donde se aseguró que la temperatura de las bases adicionales fuera cercana a 50°C. El listado de partidores utilizados se lista en la tabla V.

Tabla V: Listado de partidores utilizados

Nombre	Secuencia 5' -> 3'
TEF1p FW	<u>CCGGGCTGCAGGAATTCGATATAGCTTCAAAATGTTTCTACTC</u>
TEF1p RV	<u>ATCGGCAITTTGTAATTAAACTTAGATTAGATTG</u>
ADH1p FW	<u>GCTGCAGGAATTCGATTAAAACAAGAAGAGGGTTGACTAC</u>
ADH1p RV	<u>CGATTTTCATTGTATATGAGATAGTTGATTGTATGC</u>
TPI1t FW	<u>ATATTTAAATAAATTAATATAATTATATAAAAATATTATCTTCTTTTC</u>
TPI1t RV	<u>GGTATCGATAAGCTTGATCTATATAACAGTTGAAATTTGGATAAG</u>
FBA1t FW	<u>GGGATTAGGTTAATTCAAATTAATTGATATAGTTTTTTAATG</u>
FBA1t RV	<u>ACGGTATCGATAAGCTTGATGTAAGCTACTATGAAAGACTTTAC</u>
HasA FW	<u>TTAATTACAAAATGCCGATCTTTAAAAGACCTTAA</u>
HasA RV	<u>AATTATATTAATTTATTTAAATATAGTTACTTTTTTACGCG</u>
HasB FW	<u>CTCATATACAATGAAAATCGCAGTGGCCGG</u>
HasB RV	<u>TTGAATTAACCTAATCCCTGTTGAAAATGTCTC</u>
pBS FW	<u>ATCAAGCTTATCGATACCGTTCGAC</u>
pBS RV	<u>ATCGAATTCCTGCAGCCCGGG</u>
UP22 FW	<u>AAACGACGTTGAAATTGAGGCTACTGCG</u>
UP22 RV	<u>ACGAGAAGTGGACTAGGATGAGTAGCAGCACGTTCC</u>
DOWN22 FW	<u>CTGTTATATAGGGAAGCATATTTGAGAAGATGCGGC</u>
DOWN22 RV	<u>GGAAACGCTGCCCTACACGTTTCGC</u>
UP_ura3 FW	<u>CGGTATCGATAAGCTTGATAAACGACGTTGAAATTGAGGC</u>
UP_ura3 RV	<u>AGCGATTTGTTTAGTTTTGCTGGCCGCATC</u>
PGI1t FW	<u>GCAAAACTAAACAAATCGCTCTTAAATATATACCTT</u>
PGI1t RV	<u>CCGGGCTGCAGGAATTCGATGGAAACGCTGCCCTACAC</u>
ADH1p_int FW	<u>GCTGCAGGAATTCGATTAAAACAAGA</u>
HasB_int RV	<u>TTGAATTAACCTAATCCCTGTTGAAAATG</u>
FBA1t_int RV	<u>ACGGTATCGATAAGCTTGATGTAAG</u>

Nombre	Secuencia 5' -> 3'
DOWN FW_PGI1t	<u>CAGTATACCGGGAAGCATATTTGAGAAGATGCGGC</u>
PGI1t RV_DOWN	<u>ATGCTTCCCGGTATACTGGAGGCTTCAT</u>
MHasA FW	<u>CATGAAGCCTCCAGTATACCATAGCTTCAAATGTTTCTACTC</u>
MHasA RV	<u>TCTTCTTGTTTTACTATATAACAGTTGAAATTTGGATAAG</u>
MHasB FW	<u>TGTTATATAGTAAAACAAGAAGAGGGTTGACTA</u>
MHasB RV	<u>TCTTCTCAAATATGCTTCCCGTAAGCTACTATGAAAGACTTTAC</u>
Mura 3 FW	<u>AAACGACGTTGAAATTGAGGCTACTGCG</u>
Mura 3 RV	<u>TAGAAACATTTTGAAGCTATGGTATACTGGAGGCTTCATGAGTTATGT</u>

PCR

Las reacciones de PCR fueron realizadas siguiendo el protocolo estándar de la ADN polimerasa Phusion (Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase, New England BioLabs®, Inc) con un tiempo de extensión de 20 segundos por kb. La temperatura de alineamiento a utilizar se seleccionó según los partidores indicados en la tabla V.

Para algunas amplificaciones realizadas en fragmentos utilizados en las reacciones de Gibson Assembly, se utilizó la siguiente modificación: se realizaron 5 ciclos utilizando la temperatura del partidore que sólo híbrida con el templado de interés y luego, 30 ciclos utilizando la temperatura del partidore completo (con cola para la reacción de Gibson Assembly) con respecto a lo indicado en la tabla V.

Para la reacción de PCR de colonia de *E. coli*, se tomó una colonia de placa de medio LB y se resuspendió en 30 µL de agua destilada estéril. De esta mezcla, se utilizaron 15 µL para inocular en cultivo de medio LB. Los 15 µL restantes se incubaron a 100°C por 10 minutos para luego utilizar 1 µL como templado en la reacción de PCR.

Para reacciones de PCR de colonia de *S. cerevisiae*, se tomó una colonia desde

placa de medio sólido y se depositó en tubo tubo eppendorf. Luego se calentó durante 30-60 segundos a máxima potencia en microondas convencional y se resuspendió en 30 μ L de agua destilada estéril. Finalmente, se utilizó 1 μ L de esta mezcla como templado en la reacción de PCR.

Luego de ser amplificados, los fragmentos fueron visualizados en geles de agarosa 1% y purificados, según corresponda, empleando el kit (GeneJETGel Extraction Kit, Thermo Scientific™) siguiendo el protocolo del fabricante.

Geles de agarosa

Las electroforesis en gel de agarosa se realizaron en agarosa 1% con 0,003% de GelRed® (Biotium) y revisualización a través de luz UV. Los marcadores de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific™) y 1kb Ladder (New England Biolabs®, Inc.) se utilizaron.

Digestiones y ligaciones

Las digestiones para linealizar el vector pBluescript SK + fueron realizadas con la enzima EcoRV siguiendo el protocolo estándar del fabricante. También se realizaron digestiones para verificar el tamaño de fragmentos de ADN de interés, para ello se utilizaron las enzimas HindIII, PstI y PvuI, siguiendo el protocolo del fabricante.

Las ligaciones de extremos romos se realizaron en el vector pBluescript SK +, una vez linealizado se utilizó la enzima T4 ligasa (New England Biolabs®, Inc.) junto al fragmento a insertar, siguiendo el protocolo del fabricante. La incubación se realizó a 16°C durante 16 horas.

Extracción de ADN

Para las extracciones de ADN a partir de geles de agarosa se utilizó el kit GeneJET Gel Extraction Kit® (Thermo Scientific™), siguiendo el protocolo del fabricante.

La extracción de ADN plasmidial de *E. coli* se realizó con GeneJET Plasmid Miniprep Kit® (Thermo Scientific™), mientras que la extracción de ADN genómico se realizó con Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp.), siguiendo los protocolos de los fabricantes.

En ambos casos la elución se realizó utilizando agua tibia (a 37°C) libre de nucleasas, en lugar de “Elution buffer”. La cuantificación de muestras de ADN se realizó mediante espectrofotometría en MaestroNano® Micro-Volume Spectrophotometer (Maestrogen, Inc). Mientras que las secuenciaciones fueron enviadas a Macrogen, Inc. y analizadas mediante la plataforma web Benchling (“Benchling,”).

Reacciones de Gibson Assembly

Se siguió el protocolo de ensamblaje de Gibson (Gibson, et al., 2009), en el cual la exonucleasa T5 degrada parcialmente el extremo 5' de los fragmentos de ADN. Esto permite que las secuencias complementarias entre fragmentos distintos hibriden y se recuperen gracias a la enzima polimerasa. Finalmente, la enzima Taq ligasa repara el enlace entre los fragmentos.

Se preparó una mezcla de 25 μ L 2X para reacciones Gibson de 10 μ L con los componentes indicados en la Tabla VI. S 5 μ L de esta mezcla se añaden 5 μ L de los fragmentos de ADN a ensamblar. Se utilizan diferentes concentraciones de cada fragmento con respecto al criterio de equimolaridad, las reacciones fueron incubadas a 50 °C durante 60 minutos.

Tabla VI: Alícuotas 2X para reacciones de Gibson Assembly

Componente	Volumen (μL)
5X Isothermal buffer	10
Phusion Polimerasa	0,6
T5 exonucleasa	0,2
ADN Taq ligasa	5
Agua libre de nucleasas	9,2

Se utilizaron los fragmentos indicados en la tabla IV amplificados con bases adicionales que permiten la hibridación hacia el fragmento contiguo, para obtener los vectores que se indican en la figura 2. Aún así, en principio, cada módulo (Mura3, MhasA y MhasB) se obtuvieron en reacciones de Gibson Assembly independientes en el plásmido pBluescript II SK (+).

Las reacciones se llevaron a cabo de dos maneras. Para el caso del módulo *ura3* se realizó una reacción con cada fragmento del módulo y el vector pBluescript II SK + lineal y luego se transformaba directamente desde la mezcla en *E. coli* TOP10.

Por otro lado el módulo de *hasA* se realizó en una reacción con los tres fragmentos sin el plásmido, luego el fragmento del módulo lineal se ligó mediante extremos romos en el vector pBluescript II SK (+) y se transformó en *E. coli* TOP10.

Por último, el ensamble del módulo *hasB* se obtuvo mediante una reacción sin vector y solo con dos fragmentos del módulo. En cada caso se verificó el tamaño del fragmento resultante a través de un gel de agarosa 1%, se extrajo el ADN de interés y se amplificó mediante PCR con los partidores correspondientes. Para continuar, se realizó una nueva

reacción de Gibson con el fragmento restante (terminador) y se siguió el mismo procedimiento mencionado anteriormente para conseguir el fragmento lineal del módulo de interés. Finalmente se ligó por extremos romos en el vector pBluescript II SK (+) y se transformó en *E. coli* TOP10.

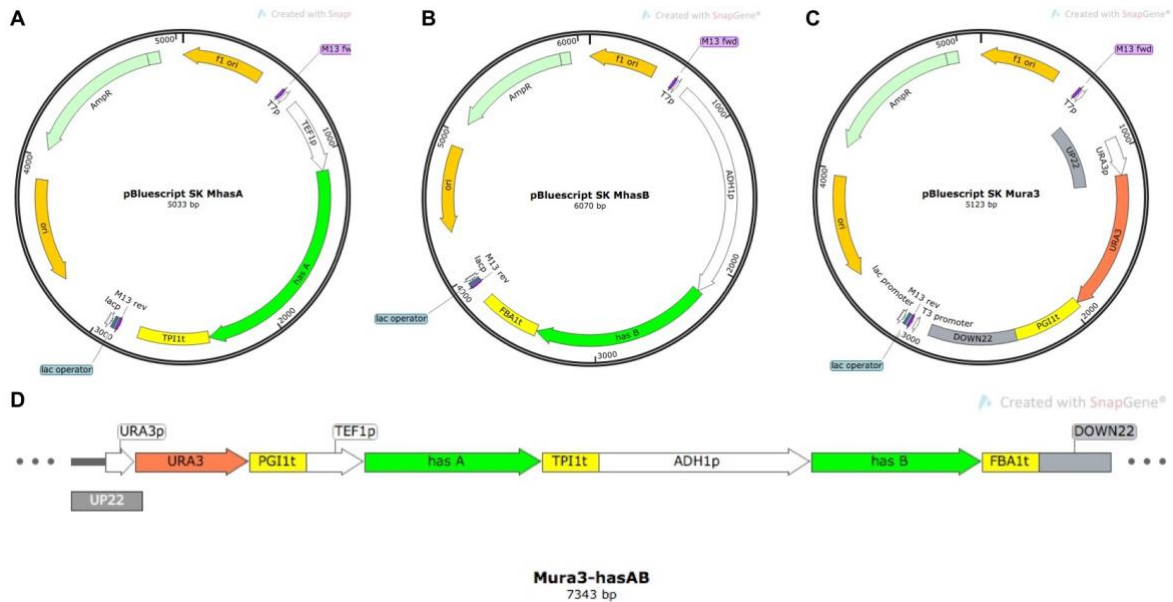


Figura 2: Diseño experimental de los tres constructos ensamblados en el plásmido pBluescript II SK + y del cluster completo que será integrado en *S. cerevisiae*. **A.-** pBluescript SK MhasA: Corresponde al plásmido que contiene al módulo de expresión del gen *hasA*. **B.-** pBluescript SK MhasB; Corresponde al plásmido del módulo de expresión del gen *hasB*. **C.-** pBluescript SK Mura3: Corresponde al plásmido que solo contiene el marcador de selección *ura3* junto al terminador PGI1t flanqueado por los sitios de recombinación UP22 y DOWN22 del cromosoma V de *S. cerevisiae* s288c. **D.-** Diseño del cluster completo de expresión de ambos genes (*hasA* y *hasB*) y el marcador de selección *ura3*, flanqueados por los sitios de recombinación UP22 y DOWN22 del cromosoma V de *S. cerevisiae* s288c.

Transformación en *E. coli*

Las transformaciones en *E. coli* TOP10 se realizaron mediante electroporación. Para ello, en la generación de células electrocompetentes se inoculó 500 mL de medio LB con 5 mL de un precultivo saturado. El cultivo se dejó crecer a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,5 - 0,6. Luego, se mantuvo en hielo durante 30 minutos y se procedió a centrifugarlo a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 500 mL de glicerol 10% frío en hielo. Después, se volvió a centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 250 mL de glicerol 10% frío. Este procedimiento se repitió y después el pellet se resuspendió en 10 mL de glicerol 10% frío y luego en 2 mL de glicerol 10% frío. Finalmente las células se alicuotaron en volúmenes de 60 µL y se almacenan a -80°C.

Para la electroporación de *E. coli* TOP10, se agregó 3 µL del vector de interés en una alícuota de células electrocompetentes y se incubó durante 5 minutos en hielo. Luego, se pasó la totalidad del volumen a una cubeta de electroporación de 0,2 cm y se aplicó un pulso de 2500 volts en un electroporador Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems (BioRad). Inmediatamente después se agregaron 900 µL de medio LB a 37°C y las células se incubaron a 37°C y 200 rpm durante 90 minutos.

La selección de colonias positivas se realizó a través de placas de medio LB sólido suplementado con ampicilina (100 µg/mL), IPTG (0,5mM) y X-gal (80µg/mL). Las colonias transformadas se sembraron por método de extensión y se crecieron a 37°C durante una noche. El análisis de los fragmentos se realizó mediante PCR de colonia a las colonias blancas, utilizando partidores universales M13 (para pBluescript) y partidores necesarios descritos en este trabajo. Las colonias que resultaron positivas para la transformación, se crecieron en medio LB líquido a 37°C suplementado con ampicilina (100 µg/mL) con el fin de preparar stock de glicerol 30%. Finalmente, el vector transformado fue secuenciado.

Transformación en *S. cerevisiae*

Las transformaciones en *S. cerevisiae* s288c Δ ura3 se realizaron mediante electroporación. Para obtener las células electrocompetentes, se inocularon 30 mL de medio YM con 200 μ L de un precultivo saturado y se dejó crecer durante una noche a 22°C y 200 rpm. Luego, se agregaron 30 mL de medio YM fresco adicionales y se incubaron hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,3. Entonces, se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante, El pellet se resuspendió en 40 mL de agua destilada fría y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos, repitiendo este paso 3 veces. Una vez que se realizó la tercera centrifugación el sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 4 mL de solución de sorbitol 1 M frío. A continuación se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó y se resuspendió en 0,2 mL de sorbitol 1 M frío. A partir de esta solución se prepararon alícuotas de 40 μ L y se mantuvieron en hielo hasta su uso.

Para el proceso de electroporación, se agregó un máximo de 8 μ L de ADN a distintas concentraciones (reportadas más adelante) a una de las alícuotas de *S. cerevisiae* electrocompetentes y la mezcla se mantuvo en hielo durante 5 minutos. Luego, la mezcla se sometió a un pulso de 1500 volts en electroporador Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems (BioRad). Inmediatamente después del pulso, se agregaron 900 μ L de sorbitol 1 M y la solución se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. Tras lo cual se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de sorbitol 1 M. Esta mezcla se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, tras centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante, y el pellet se resuspendió en 1 mL de medio YPD. Esta mezcla se incubó a 30°C y 200 rpm durante toda la noche.

Para seleccionar por auxotrofia las colonias positivas para la transformación, 100 μ L de cultivo se sembraron por extensión en placas de medio sólido YNB (sin aminoácidos) y

se incubó a 30°C durante 3 días o hasta la aparición de colonias. Luego, en una segunda selección, las colonias que crecieron fueron picadas en placas de medio YPD e YNB (sin aminoácidos) para descartar falsos positivos. Las colonias seleccionadas desde la placa de medio YNB (sin aminoácidos) se crecieron en medio YPD líquido a 30°C a 200 rpm para realizar un stock de glicerol 30% a -80°C y extraer su ADN genómico para realizar los respectivos análisis por PCR.

Como control positivo a los eventos de recombinación, se transformó el fragmento lineal del gen *ura3*, junto a los sitios de recombinación UP22 y DOWN22 (UP22 – *ura3* – DOWN22). El cual se obtuvo mediante PCR desde el ADN genómico de una cepa de *S. cerevisiae* s288c. Se utilizó 1 µg de ADN lineal en todos estos casos de transformación.

Resultados

1) Obtención de los elementos reguladores y los genes utilizados

Los fragmentos necesarios para la construcción de los módulos de expresión fueron obtenidos mediante amplificación (Figura 3). En el caso de los elementos reguladores obtenidos a partir del ADN genómico de *S. cerevisiae* en la Figura 3.A se observa que tanto los promotores ADH1p (carril 3 y 5) y TEF1p (carril 1), como los terminadores TPI1 (carril 2), FBA1 (carril 4) y PGI1t (carril 6) coinciden con los tamaños esperados para estos fragmentos citados en la tabla IV, la razón por la cual se seleccionó estos promotores y terminadores se discutirá más adelante (véase discusión).

Los genes *hasA* y *hasB* fueron amplificados desde el vector pUC57 y visualizados en un gel de agarosa 1% (Figura 1.B). Como se puede observar en la Figura 1.B solo fue posible obtener el tamaño esperado del gen *hasA* (carril 1). Para el caso del gen *hasB* (carril 2) se obtuvo una amplificación inespecífica en donde predominó una banda de mayor tamaño que la esperada, de alrededor de 2 kb. Por ello, se procedió a purificar la banda obtenida de aproximadamente 1 kb y a re amplificarla (carril 3, 4 y 5) con los mismos partidores utilizados para amplificar el gen *hasB*. Se observa que de esta manera se obtuvo una banda del tamaño esperado (~1200 pb).

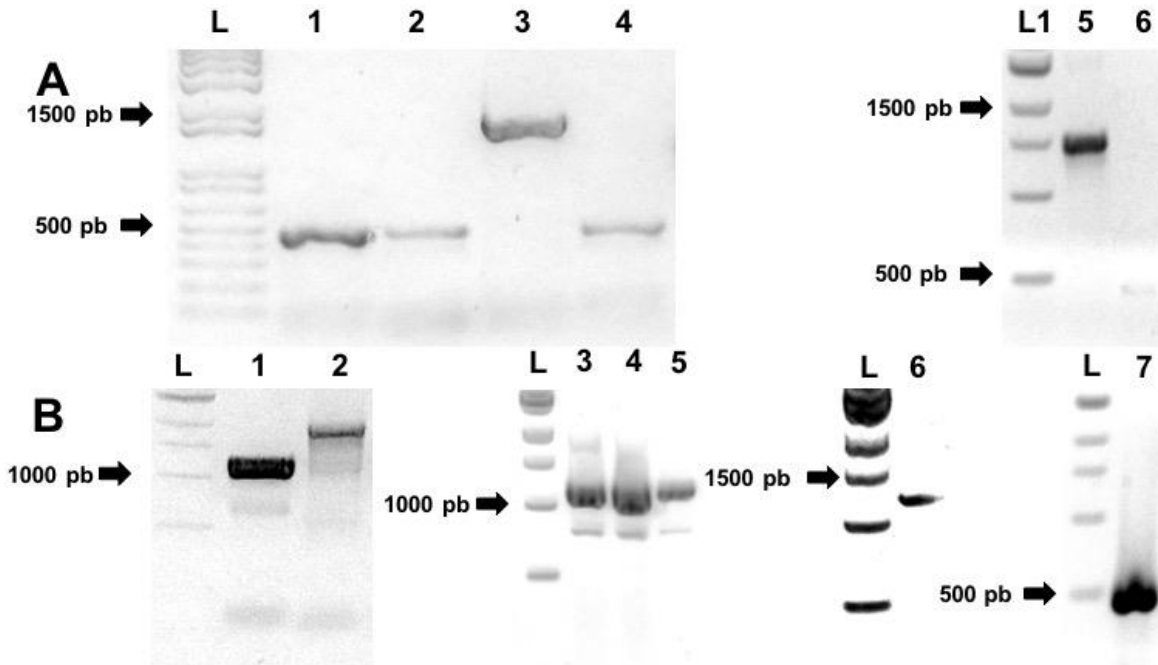


Figura 3: Obtención de los elementos reguladores y los genes necesarios para los tres módulos de expresión propuestos. **A.-** Amplificación de promotores: ADH1p y TEF1p, terminadores: TPI1t, FBA1t y PGI1t. L: Ladder 1 kb, 1: TEF1p (412 pb), 2: TPI1t (400 pb), 3 y 5: ADH1p (1500 pb), 4 FBA1t (412 pb), L1: Ladder 1 kb plus y 6: PGI1t (400 pb). **B.-** Amplificación genes: *hasA*, *hasB* y *ura3* y sitios de recombinación UP22 y DOWN22. L: Ladder 1 Kb plus, 1: *hasA* (1260 pb), 2: *hasB* (1209 pb), 3, 4 y 5: *hasB* (1209 pb), 6 UP22-*ura3* (1261 pb) y 7: DOWN22 (501 pb).

Luego se amplifican los fragmentos que corresponden a los sitios de recombinación y al gen *ura3*. Cabe mencionar que el sitio de recombinación UP22 y el gen *ura3* fueron amplificados juntos a partir del ADNg de *S. cerevisiae*, flanqueando con UP22 FW y *ura3* RV (Tabla V), ya que son fragmentos contiguos en el genoma (Figura 3.B). Se observa a partir del gel de agarosa 1% que el tamaño del fragmento UP22-*ura3* (carril 6) coincide con el tamaño esperado (1261 pb). Igualmente, también se obtuvo el sitio de recombinación DOWN22 (carril 7) en el tamaño esperado teóricamente (501 pb). Cabe resaltar que al disponer de otros conjuntos de partidores para el fragmento DOWN22 fue posible

amplificarlo mediante dos estrategias diferentes, tal como se indica más adelante en la figura 10. En el caso de los partidores DOWN22 FW con homología a los terminadores PGI1t y TPI1t, también se obtuvo el fragmento del tamaño esperado (Imagen no mostrada).

2) Construcción de los módulos de expresión

Se procedió a realizar las reacciones de Gibson Assembly de cada módulo de manera independiente. Para ello se utilizaron los volúmenes y concentraciones de los reactivos según el criterio de equimolaridad del protocolo de Gibson Assembly.

a. Módulo *ura3*

El módulo *ura3*, conformado por el fragmento UP22-*ura3* y el terminador PGI1t, fue ensamblado en una reacción de Gibson junto al vector pBluescript II SK, siendo posible obtener el plásmido pBluescript:Mura3. En la figura 4.A se observa una reacción de Gibson adicional del módulo *ura3*, realizada sin el plásmido pBluescript II SK +. En ella se observa que es posible con esta metodología obtener el fragmento ensamblado de interés, de 1661 pb. Luego de transformar las colonias de *E. coli* TOP10 con el vector obtenido, pBluescript:Mura3, estas se verificaron mediante PCR de colonia utilizando los partidores M13 (Figura 4.B), los cuales son partidores que flanquean el sitio de clonamiento múltiple del plásmido pBluescript II SK + en alrededor de 200 pb. Se logró obtener un fragmento del tamaño esperado (aproximadamente 1,8 kb) en 5 de las 6 colonias analizadas (carriles 1-6), el cual corresponde al tamaño del módulo completo con los fragmentos UP22-*ura3* y PGI1t. Finalmente, se envió a secuenciar el plásmido pBluescript:Mura3 (Anexo 1), estos resultados fueron positivos confirmando la secuencia del módulo.

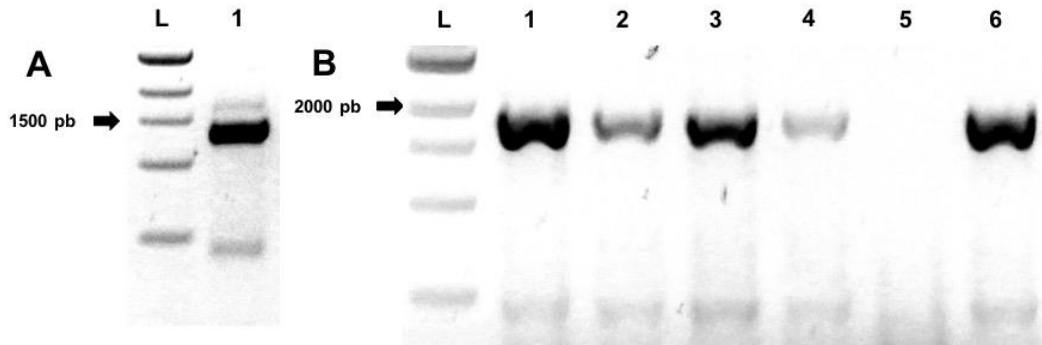


Figura 4: Construcción por Gibson Assembly y verificación por PCR del módulo *ura3*. **A.-** Reacción de Gibson Assembly entre fragmentos de módulo *ura3*. L: Ladder 1 kb plus, 1: Gibson Assembly de fragmentos UP22/*ura3* y PGI1t (1708 pb). **B.-** Corroboración del módulo mediante amplificación de pBluescript:Mura3 utilizando partidores M13. L: Ladder 1 kb plus, 1-6: PCR colonia con partidores M13 a colonias de *E. coli* TOP10 positivas a transformación con pBluescript:Mura3 (1904 pb).

b. Módulo *hasA*

El módulo de *hasA*, conformado por el promotor TEF1p, el gen *hasA* y el terminador TPI1t fue ensamblado de manera lineal. En primera instancia, no fue posible ensamblarlo completo en una sola reacción junto al plásmido pBluescript II SK+ (Imagen no mostrada), Por ello se realizó una reacción de Gibson Assembly con los 3 fragmentos lineales (Figura 5.A), en donde fue posible obtener el fragmento de interés de 2 kb, como se puede observar en el carril 2. Luego este fragmento se ligó mediante extremos romos al plásmido pBluescript II SK +, se transformó en la cepa *E. coli* TOP10 y se analizaron 3 colonias mediante PCR de colonia utilizando los partidores M13. Como se puede observar en la Figura 5.B, en los 3 casos se obtuvo un fragmento sobre los 2 kb, lo cual coincidiría con el tamaño del módulo completo de 2 kb. Además, para corroborar la presencia de cada fragmento en el módulo, se amplificó cada uno de manera independiente (Figura 5.C) en las 3 colonias. En cada caso, se amplificaron los fragmentos del promotor TEF1p, el gen de *hasA* y el terminador TPI1t y se obtuvieron en los tamaños esperados. Finalmente, las

colonias fueron preservadas a -80°C y se envió a secuenciar el plásmido pBluescript:MhasA en donde se confirmó la secuencia y la integridad del ensamblaje del módulo de *hasA* (Anexo 2).

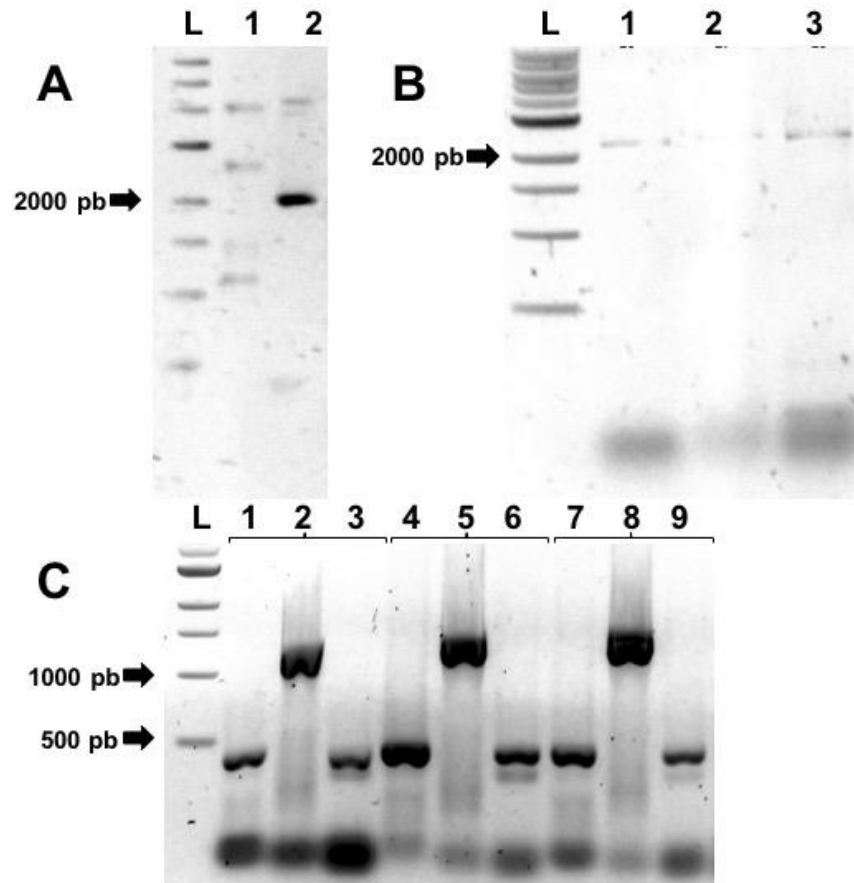


Figura 5: Construcción por Gibson Assembly y verificación por PCR del módulo *hasA*. **A.-** Amplificación *hasA*. L: Ladder 1 kb plus, 1: Reacción de Gibson de Módulo *hasB* (ADH1p-*hasB*-FBA1t, 3109 pb), 2: Reacción Gibson de Módulo *hasA* (TEF1p-*hasA*-TPI1t, 2060 pb). **B.-** Corroboración del módulo mediante amplificación del pBluescript:MhasA con partidores M13. L: Ladder 1 kb plus, 1, 2 y 3: PCR de colonia con partidores M13 a 3 colonias de *E. coli* TOP10 positivas a la transformación con pBluescript:MhasA (2260 pb). **C.-** Corroboración del módulo mediante amplificación a pBluescript:MhasA con partidores de cada fragmento (TEF1p FW – RV, *hasA* FW – RV y TPI1t FW – RV). L: Ladder 1 kb plus, 1, 2 y 3: Amplificaciones a 3 diferentes colonias de *E. coli* TOP10 transformadas para los tres fragmentos; TEF1p (412 pb), *hasA* (1260 pb) y TPI1t (400 pb), respectivamente.

c. Módulo *hasB*

El módulo de *hasB*, conformado por el promotor ADH1p, el gen *hasB* y el terminador FBA1t fue ensamblado de manera secuencial, ya que en una sola reacción de Gibson Assembly con los fragmentos y el plásmido pBluescript y sin el plásmido no fue posible obtener el módulo de interés (Figura 5.A). Es por esto que se utilizó las variantes de partidores denominadas “int” para amplificar cada fragmento (Tabla V) y se realizaron diversas reacciones de Gibson. Para comenzar se realizó una reacción en donde se ensambló el promotor ADH1p (1500 pb) con el gen *hasB* (1209 pb) (Figura 6.A) y otra reacción en donde fue ensamblado el gen *hasB* (1209 pb) con el fragmento FBA1t (400 pb). En el carril 1 de la figura 6.A se observa que en la reacción entre ADH1p y *hasB*, se obtuvo un fragmento de alrededor de 2,7 kb. En el carril 2 (Figura 6.A) en el que se cargó la reacción entre el gen *hasB* y el fragmento FBA1t, no se logró apreciar claramente una banda del tamaño esperado (1,6 kb). Por ello, se decidió continuar con el primer resultado obtenido en la reacción. Al amplificar este fragmento parcial del M*hasB*, constituido por ADH1p y el gen *hasB* se obtiene una banda inespecífica (Figura 6.B) en los carriles 1 y 3 entre los 1,5 y 2 kb. A pesar de esto, se purificó la banda de interés de mayor tamaño, de alrededor de 2,7 kb, y se realizó una nueva reacción de Gibson junto al terminador de FBA1 obteniendo el tamaño del módulo de interés (alrededor de 3 kb).

Se amplificó el módulo *hasB* lineal obtenido utilizando distintas combinaciones de partidores (figura 6.C). Se flanqueó con los partidores del módulo completo (M*hasB* FW y RV), los partidores del promotor y terminador (ADH1p FW y FBA1t RV) y las variantes mencionadas del promotor y terminador (ADH1p int FW y FBA1t int RV) indicados en la tabla V. Se observa en la figura 6.C que en los carriles 1, 2, 3 y 4 es posible observar una banda cercana a los 3 kb que correspondería al módulo de *hasB* completo, sin embargo, cabe notar que se observa amplificación inespecífica en el carril 1, 2 y 3. Por otro lado en el carril 4, que corresponde a la amplificación con los partidores ADH1p_int FW y FBA_int

RV, se observa solo una banda de tamaño similar a la banda de interés, por esto, se procedió a purificar desde gel esta banda y se ligó mediante extremos romos en el vector pBluescript II SK +. Finalmente, se transformó el vector obtenido en *E. coli* TOP10 generando varias colonias positivas.

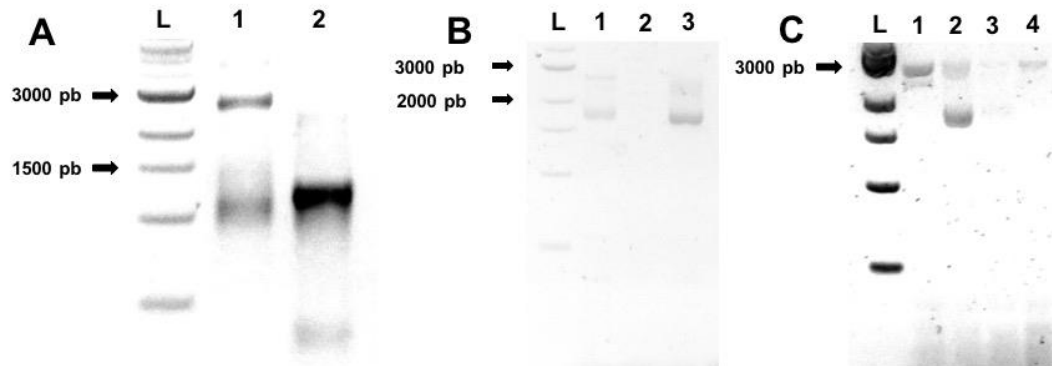


Figura 6: Construcción del módulo *hasB*. **A.-** Reacciones de Gibson Assembly entre fragmentos de módulo *hasB*. L: Ladder 1 kb plus, 1: Reacción Gibson de fragmentos ADH1p - *hasB* (2709 pb), 2: Reacción de Gibson de fragmentos *hasB* - FBA1t (1609 pb). **B.-** Amplificación de fragmento parcial ADH1p – *hasB* obtenido mediante Gibson Assembly L: 1 kb plus, 1, 2 y 3: Amplificación fragmento parcial ADH1p - *hasB* (2709 pb) con partidores ADH1p_int FW – *hasB*_int RV. **C.-** Amplificación módulo *hasB* lineal (3109 pb) utilizando diferentes grupos de partidores (Tabla V). L: 1 kb plus, 1: Amplificación con partidores MhasB FW – RV, 2 y 3: Amplificación con partidores ADH1p FW – FBA1t RV, 4: Amplificación con partidores ADH1p_int FW – FBA1t_int RV.

A pesar de esto, al corroborar el plásmido obtenido no fue posible llegar a un resultado positivo (Figura 7). A partir del PCR de colonia realizado utilizando los partidores M13 (Figura 7.A), se observó que en 4 colonias (carril 2, 6, 9 y 12) fue posible obtener una banda de alrededor de 3 kb, cercano al tamaño esperado y similar al control positivo (carril 15). Adicionalmente se procedió a amplificar los fragmentos *hasB* – FBA1t para corroborar su correcta ubicación (Figura 7.B) En el gel mostrado en la figura 7.B se observa una banda

del tamaño esperado (~1,6 kb), pero también se obtienen varias amplificaciones inespecíficas en los cuatro casos (carriles 1, 2, 3 y 4) y el control negativo con el plásmido vacío. Por ello se decidió entonces, realizar una digestión del plásmido pBluescript:MhasB utilizando las enzimas PvuI, HindIII y PstI (Figura 7.B). Al comparar los tamaños obtenidos en las digestiones con una simulación de cada una realizada en Ape® (Tabla VII), no coincidieron los patrones de tamaños de bandas en ninguna de las 3 digestiones realizadas. En el caso de la enzima PvuI la cual no tiene sitio de corte dentro del módulo *hasB*, se obtuvo una banda de 3 kb y otra de alrededor de 2,5 kb a 3 kb. Con la enzima HindIII solo se realizó un corte, obteniendo el plásmido lineal de alrededor de 6 kb. En tanto que en la digestión con PstI se observan 4 bandas definidas de alrededor de 5 kb, 4 kb, 1,5 kb a 2 kb y de 1 kb. Tanto HindIII como PstI poseen al menos un sitio de restricción dentro del módulo *hasB* por lo que estos resultados indicarían que un fragmento no se encuentra o se encuentra incompleto en la secuencia del plásmido pBluescript:MhasB.

Estos resultados fueron confirmados tras secuenciar el plásmido (Anexo 3), ya que como se puede observar en la figura solo fue posible determinar la presencia del promotor ADH1p. Finalmente, al realizar un BLAST de la secuencia foránea encontrada en el vector pBluescript:MhasB se logró determinar que correspondía a un fragmento no codificante del genoma del microorganismo *E. coli*.

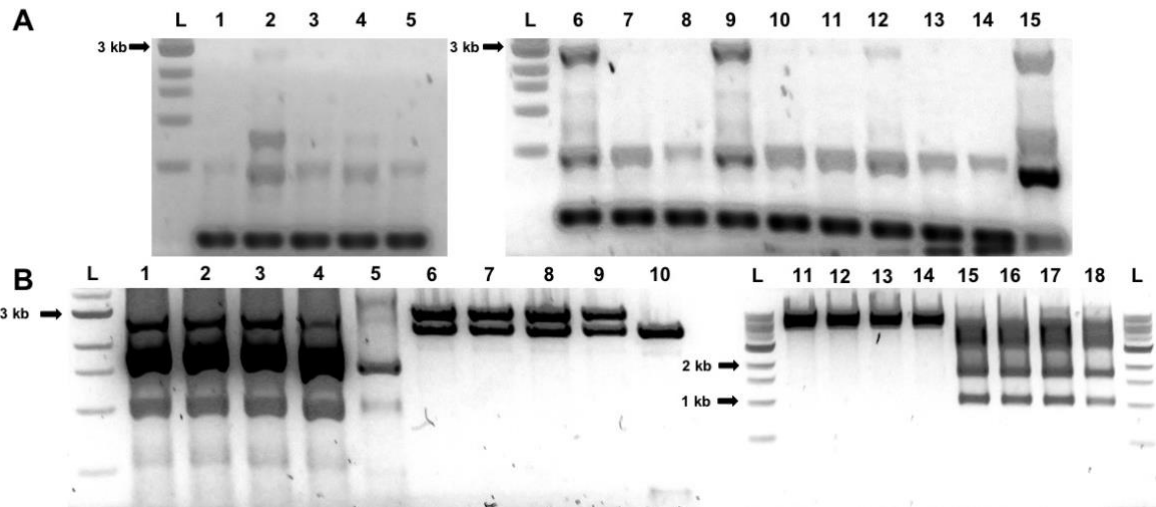


Figura 7: Corroboración módulo *hasB*. **A.-** PCR de colonia con partidores M13 a colonias *E. coli* TOP10 transformantes a plásmido pBluescript:MhasB L: Ladder 1 kb plus, 1 – 14: PCR colonia con partidores M13 a colonias transformantes, 15: Control positivo de amplificación con partidores M13 en plásmido pBluescript:MhasB. **B.-** L: Ladder 1 kb plus, 1 – 4: Amplificación con partidores *hasB*_int FW – FBA1t_int RV (1609 pb) al plásmido pBluescript:MhasB de colonias transformantes 2, 6, 9 y 12, 5: Control positivo (vector vacío), 6 – 9: Digestión pBluescript:MhasB con enzima PvuI a colonias 2, 6, 9 y 12 respectivamente, 9: Control negativo (vector vacío), 11 – 14: Digestión pBluescript:MhasB con enzima HindIII a colonias 2,6, 9 y 12 respectivamente y 15 – 18: Digestión pBluescript:MhasB con enzima PstI a colonias 2,6, 9 y 12 respectivamente.

Tabla VII: Enzimas de restricción y los tamaños teóricos obtenidos de pBluescript:MhasB

Enzima	PvuI	HindIII	PstI
Fragmentos (pb)	5025 y 1045	5142 y 928	4495 y 1575
Fragmento del Sitio de corte	pBluescript y amp	pBluescript y <i>hasB</i>	pBluescript y <i>hasB</i>

d. Ensamble módulo de expresión

A pesar de no lograr obtener ensamblado el módulo de *hasB* se procedió a realizar

un módulo de expresión solo con el marcador de selección Mura3 y el MhasA. Para ello se utilizó la variante de los partidores TPI1t RV₂ y DOWN22 FW₂ (Tabla V) que poseen bases complementarias entre ellas que permiten una reacción de ensamblaje mediante Gibson Assembly. De esta forma se pudieron realizar dos ensayos con el fragmento lineal de MhasA y el fragmento DOWN22 con el plásmido pBluescript y sin él. Si bien se lograron obtener colonias transformantes de *E. coli* TOP10, no fue posible corroborar la presencia del fragmento DOWN22 en todos los casos analizados. Para el caso de la reacción de Gibson utilizando solo los fragmentos lineales de MhasA y DOWN22, a pesar de obtener una banda de mayor tamaño a 2 kb (Figura 8.A, carril 1 y 2) que coincidiría con el tamaño del módulo completo (~2500 pb), esta no se logró amplificar al ser flanqueada con los partidores TEF1p FW y DOWN22 RV.

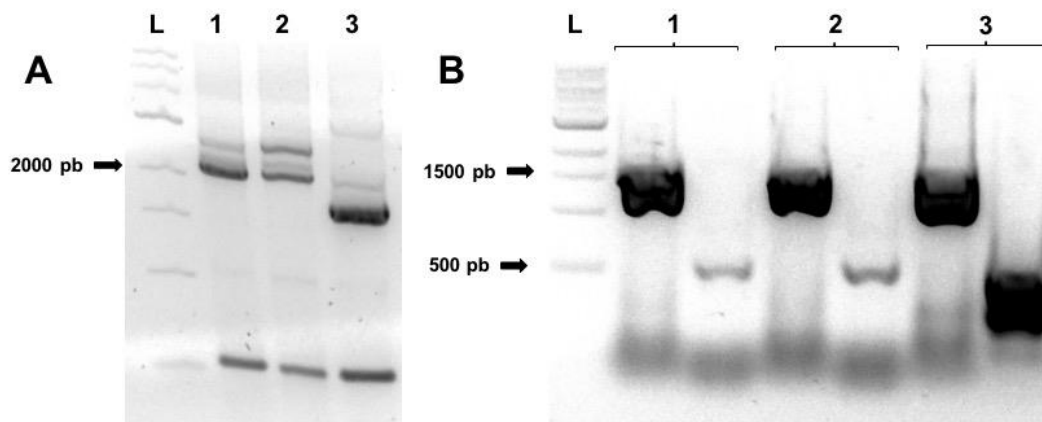


Figura 8: Ensamble de los módulos de expresión MhasA y Mura3 al fragmento DOWN22. **A.-** Reacciones de Gibson lineales L: Ladder 1 kb plus, 1 y 2: Reacciones de Gibson entre MhasA y DOWN22 y 3: Reacción de Gibson lineal entre Mura3 y DOWN22. **B.-** Corroboración módulo completo de *ura3L*: Ladder 1 kb plus, 1 – 3: PCR de colonia a cepas transformantes de *E. coli* TOP10 pBluescript:Mura3 + DOWN22, amplificando en cada caso Mura3 (1708 pb) y el fragmento DOWN22 (501 pb) respectivamente.

3) Validación de Mura3 como marcador de selección

Con el objetivo de corroborar el funcionamiento y expresión del Mura3, se realizó una reacción de Gibson Assembly entre el módulo de *ura3* lineal, el fragmento DOWN22 y el vector pBluescript II SK +. Adicionalmente se realizó una reacción de Gibson entre los fragmentos lineales Mura3 y DOWN22, (Figura 8.A, carril 3) Como se puede observar en la Figura 8.A, en el carril 3 se obtuvo una banda de alrededor de 2 kb que podría tratarse del módulo lineal completo. El plásmido pBluescript:Mura3 + DOWN22 se transformó en *E. coli* TOP10 obteniendo colonias positivas. Se corroboró mediante amplificación por PCR utilizando los partidores del módulo *ura3* completo en 3 colonias, las cuales resultaron ser positivas (Figura 8.B). Tal y como se observa en la Figura 8.B, en los carriles 1, 2 y 3 se logró obtener amplificación del módulo de *ura3* (~1700 pb) y el control positivo (fragmento DOWN22, ~500 pb) a partir de las cepas transformantes. Finalmente, estas colonias fueron preservadas a -80°C.

Una vez obtenido el plásmido pBluescript:Mura3 con los sitios de recombinación UP22 y DOWN22 se procedió a transformar *S. cerevisiae* s288c Δ *ura3* mediante electroporación. Como control positivo se utilizó el gen *ura3* nativo junto a los mismo sitios de recombinación(UP22-*ura3*-DOWN22). El cual fue obtenido desde una cepa de *S. cerevisiae* s288c. En primera instancia las células recombinantes fueron sembradas en medio YNB sin aminoácidos (Figura 9), en donde se puede observar que se obtuvo crecimiento de las levaduras transformadas con el Mura3 completo y el control positivo. Además, no hubo crecimiento en el control negativo. Luego, las colonias obtenidas en la transformación con el módulo y el control positivo fueron transferidas a placas de medio YNB sin aminoácidos y de medio YPD, con el fin de evidenciar falsos positivos. De esta forma, fue posible obtener una serie de colonias que habrían recombinado con el módulo *ura3* y el control positivo. Posteriormente, siete de estas colonias positivas fueron

seleccionadas para la amplificación mediante PCR de colonia utilizando los partidores para Mura3 y el fragmento DOWN22 (control positivo). Se observa a partir del gel de agarosa 1% (Figura 9.B) que en la transformación realizada con el Mura3 se obtuvo una banda correspondiente al tamaño de interés (~1600 pb en carril 7) en una de las colonias analizadas, mientras que la amplificación del fragmento control DOWN22 (501 pb) se obtuvo en 6 de 7 colonias (carriles 8 – 14).

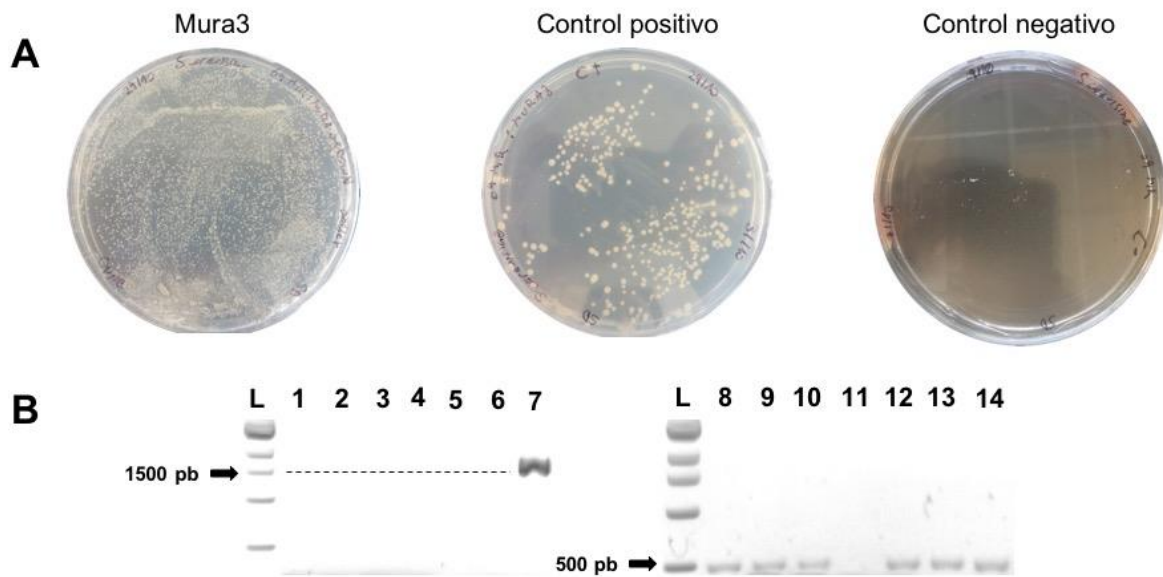


Figura 9: Validación Mura3 como marcador de selección. **A.-** Transformación *S. cerevisiae* s288c Δ ura3 con Mura3 en medio YNB sin aminoácidos, Mura3: Recombinación Mura3 en *S. cerevisiae* s288c Δ ura3 en medio YNB sin aminoácidos, Control positivo: (UP22 – ura3 – DOWN22) de recombinación en *S. cerevisiae* s288c Δ ura3 y Control negativo: Transformación sin ADN en *S. cerevisiae* s288c Δ ura3 en medio YNB sin aminoácidos. **B.-** Corroboración de recombinación de Mura3 en *S. cerevisiae* s288c Δ ura3 L: Ladder 1 kb plus, 1 – 7: PCR de colonia con partidores Mura3 FW y RV (1661 pb), 8-14: PCR colonia con partidores DOWN22 FW y RV (Control positivo, 501 pb).

4) Transformación en *S. cerevisiae*

Al no lograr ensamblar el fragmento DOWN22 al módulo del gen *hasA* se decidió transformar con este fragmento lineal junto con los módulos lineales de *ura3* y *hasA*

previamente amplificados con los partidores MhasA FW y RV y Mura3 FW y RV (Tabla V). El nuevo diseño experimental se muestra en la figura 10. Para su aplicación, se utilizaron las concentraciones de ADN indicadas en la tabla VIII, en donde se observa que se realizaron 3 ensayos a distintas concentraciones de cada fragmento con el fin de intentar aumentar la probabilidad de que ocurriera el evento de recombinación. Lamentablemente, no fue posible obtener crecimiento en placas de medio YNB sin aminoácidos en ninguna de las 3 transformaciones realizadas. Por lo que esta estrategia no proporcionó ningún resultado positivo

Tabla VIII: Concentraciones de ADN utilizadas en las transformaciones realizadas en *S. cerevisiae* s288c Δ ura3

Ensayo	Concentración de ADN (ng)		
	Control positivo	Mura3 – MhasA – DOWN22	ADN total
1	480	98 – 154 – 87,85	339,85
2	840	343 – 385 – 351,4	1079
3	840	441 – 539 - 441	1421

A



Mura3-hasA
4234 bp

Figura 10: Nuevo diseño utilizado para transformar en cepa *S. cerevisiae* s288c Δ ura 3. **A.-** Diseño para la recombinación homóloga *in vivo* en donde se transformó el módulo *ura3*, MhasA y el fragmento DOWN22 lineales. Todos los fragmentos fueron amplificados previamente con partidores que otorgan complementariedad entre los fragmentos contiguos y poseen la cantidad de bases suficientes para que sea probable la ocurrencia de recombinación en *S. cerevisiae*.

Discusión

En el primer diseño experimental propuesto (Figura 2) se decidió utilizar las enzimas hialuronato sintasa (HasA) y UDP-glucosa deshidrogenasa (HasB) del microorganismo *S. pyogenes* en módulos de expresión independientes (promotor – gen – terminador) a pesar de que en este microorganismo estas enzimas se encuentran dentro de un operon que codifica para 3 proteínas (las dos ya mencionadas más una UDP-glucosa pirofosforilasa) (Weigel et al., 1997). Esto se debe a que nos aseguraría la correcta expresión de ambos genes al agregar terminador fuertes después del codón de término (Flagfeldt et al., 2009) y, principalmente, para facilitar el ensamblaje a través de Gibson Assembly. Esto se debe a que una sola reacción con todos los componentes del cluster propuesto (nueve fragmentos) nos obligaría a obtener concentraciones muy altas de cada fragmento de ADN para cumplir con el criterio de equimolaridad del protocolo bajo estas condiciones (Gibson et al., 2009). Para ambos genes la secuencia genética fue optimizada para *S. cerevisiae*, utilizando codones de preferencia en este microorganismo. Para la construcción del módulo de producción de HA, el gen *hasB* fue considerado ya que la enzima para la que codifica sintetiza ácido UDP – glucorónico, uno de los precursores del HA que no se encuentra de manera nativa en el metabolismo central de *S. cerevisiae*. Tampoco se ha reportado que pudiera suplir esta función enzima similar en su genoma (Deangelis & Achyuthan, 1996b). Por otro lado el gen *hasA*, codifica para la sintasa capaz de polimerizar el HA y fue seleccionada del microorganismo del género *Streptococcus* (*S. pyogenes*) ya que, a pesar de tratarse de un organismo procarionte y de obtener teóricamente polímeros algo más pequeños (0,8-1 MDa) que los reportados en mamíferos (2 MDa), posee una mayor velocidad de reacción (de Oliveira et al., 2016) y nos permitiría dilucidar si esta enzima con la cual ya se trabaja en el laboratorio sería capaz de ser activa y producir HA en *S.*

cerevisiae.

Los sitios de recombinación UP22 y DOWN22 del constructo propuesto (Figura 2) corresponden a sitios de integración genómica en el cromosoma V de *S. cerevisiae*, los cuales fueron descritos por Flagfeldt et al., 2009. Estos fragmentos en el ADN genómico de *S. cerevisiae* se encuentran flanqueando al gen *ura3* que codifica para Oritidina-5'-fosfato descarboxilasa la cual es una enzima esencial en la ruta de síntesis del uracilo, por lo que su ausencia genera auxotrofia y comúnmente es utilizada como marcador (Flagfeldt et al., 2009). Por esta razón se utilizó el *ura3* como marcador de selección ya que se usó como hospedero a la integración genómica la cepa *S. cerevisiae* s288c Δ *ura3* la cual presenta resistencia a G418 y posee una deleción del gen *ura3* en el cromosoma V.

1) Obtención de los elementos reguladores y genes utilizados

Los elementos reguladores seleccionados para los módulos de expresión (Shao et al., 2009) son nativos de *S. cerevisiae* (Tabla IV) por lo que pudieron ser obtenidos por amplificación desde el ADNg del microorganismo. Los promotores son constitutivos por lo que esto nos permite asegurar la expresión de los genes de cada módulo.

Al amplificar cada fragmento requerido para los módulos de expresión (Figura 3) con cada uno de los partidores diseñados para las reacciones de Gibson Assembly, se obtuvieron los tamaños esperados para cada uno salvo en el caso de la amplificación del gen *hasB* a partir del vector pUC57:*hasB*, que fue construido mediante síntesis. Al reamplificar, usando como templado el fragmento inespecífico de mayor tamaño y los mismos partidores, se consiguió un resultado del tamaño esperado en 3 reacciones distintas (Figura 3.B), lo cual podría sugerir que hubo uniones inespecíficas de uno de los partidores al vector pUC57:*hasB*. Esto no pudo ser corroborado ya que al ser obtenido de manera comercial conteniendo el gen *hasB*, no se pudo conocer su secuencia.

Cabe destacar que a pesar de contar con los partidores para el gen *ura3*, este se

amplificó junto al fragmento UP22 (Figura 3.B), los cuales son contiguos en el genoma de *S. cerevisiae* s288c, esto se debe a que las secuencias promotoras nativas del gen *ura3* se encuentran incluidas dentro del sitio de recombinación UP22 descrito por Flagfeldt et al. 2009, tal como se puede observar en la Figura 4. Es por esto que se decidió mantener el promotor nativo de *ura3* en el diseño experimental. Por otro lado, las secuencias de término del gen *ura3* se encuentran dentro del sitio de recombinación DOWN22. Como este sitio se utilizará en el extremo 3' del constructo (Figura 2) se decidió incluir un terminador sintético (PGI1t) para asegurar el término de la transcripción del gen *ura3*.

2) Construcción de los módulos de expresión de *ura3*, *hasA* y *hasB*.

a. Módulo *ura3* y *hasA*

Con todos los fragmentos lineales disponibles se realizaron las reacciones de Gibson Assembly, el cual es un método que nos permite ensamblar varios fragmento lineales en un paso y sin mutaciones (Gibson, et al., 2009), tal y como se observa en las figuras 4 y 5 no hubo mayor dificultad para obtener los módulos de *ura3* y de *hasA* en el plásmido pBluescript II SK +, el cual es un vector de clonamiento simplificado que posee resistencia a ampicilina y el método Blue/White screening. Este método genera colonias blancas al insertar un fragmento e interrumpir el gen *lacZ*. La presencia de los módulos se confirmó mediante amplificación utilizando los partidores universales M13 (Figura 3 y 4). Estos partidores se utilizaron ya que el vector pBluescript SK + posee origen viral con sitios de homología para los partidores del fago M13, los cuales flanquean el sitio de clonamiento múltiple en donde se insertó el marco de lectura de los módulos de interés. Igualmente cada módulo era finalmente enviado a secuenciar para confirmar el correcto ensamble. Sin embargo, cabe mencionar que en el caso del módulo *hasA*, no fue posible ensamblarlo en el plásmido en una sola reacción, por lo que se debió realizar una reacción de Gibson con

los fragmentos TEF1p, *hasA* y TPI1t y luego ligar mediante extremos romos el módulo al plásmido. Esta adaptación a la metodología se realizó siguiendo experiencias previas con Gibson Assembly en el laboratorio, en donde se corroboró que era posible realizar el ensamble en una reacción sin el vector con alta eficiencia (Méndez, 2009). Una vez que se presentó este inconveniente se confirmó en la plataforma web “Oligocalc®” cada una de las temperaturas de hibridación de los partidores involucrados y de las bases adicionales, las cuales son complementarias al fragmento contiguo. Se encontró que la serie de bases añadida al partidor TEF1p FW (Tabla V) presentaba una temperatura de hibridación de 62,5° hacia la secuencia del plásmido pBluescript (Tabla IX), este error en el diseño experimental habría impedido que ocurriera la correcta hibridación entre el promotor TEF1p y el plásmido pBluescript ya que la reacción isotérmica de Gibson se realiza a 50°, la cual fue la temperatura diseñada para el resto de hibridaciones para el ensamblaje. Esto deja en evidencia la relevancia del correcto diseño de partidores que serían utilizados para esta metodología, en una reacción isotérmica.

A pesar de este inconveniente, fue posible obtener el módulo *hasA* en el plásmido ligando el fragmento lineal en el vector pBluescript II SK +. Sin la necesidad de diseñar y solicitar partidores adicionales corregidos a 50°C.

Tabla IX: Temperatura de alineamiento para las reacciones de Gibson para la construcción de los módulos de *hasA* y *hasB*

Módulo <i>hasA</i>		Módulo <i>hasB</i>	
Alineamiento	T°	Alineamiento	T°
pBluescript	62,5	pBluescript	48,2
TEF1p		ADH1p	
TEF1p	46,4	ADH1p	50,2
<i>hasA</i>		<i>hasB</i>	

Módulo <i>hasA</i>		Módulo <i>hasB</i>	
<i>hasA</i>	44,7	<i>hasB</i>	46,9
TPI1		FBA1t	
TPI1	49,3	FBA1t	54,3
pBluescript		pBluescript	

b. Módulo *hasB*

Al momento de ensamblar el módulo *hasB* (Figura 6) en una sola reacción de Gibson junto al plásmido pBluescript, no fue posible. Al comparar las temperaturas de hibridación de las bases de los partidores para las reacciones de Gibson, al igual como se hizo para la construcción del módulo de *hasA*, se nota que existe una diferencia de 7°C (47°C a 54°C) entre la temperatura máxima y mínima óptima de hibridación entre los distintos fragmentos y el plásmido pBluescript y una diferencia de 3-4°C con la temperatura de reacción (50°C) (Tabla IX). Si bien existe esta diferencia de temperatura en el diseño experimental esto no debería impedir la hibridación entre los fragmentos, solo considerando que para la reacción de ensamble del módulo *hasA* existen diferencias similares con respecto a la temperatura de reacción y aún así fue posible obtener el módulo lineal con esta metodología, además, se ha reportado que es posible mantener la especificidad en el alineamiento en hasta 10°C con buffers comerciales adecuados (Heydenreich et al., 2017). Para corroborar lo mencionado anteriormente, se repitió esta metodología realizando la reacción de Gibson a 48°C y 52°C con el vector pBluescript II SK + y sin él. En todos los casos no se obtuvo resultados positivos (Imagen no mostrada). Es por esto, que es probable que los fragmentos no hayan hibridado por otros motivo. Debido a que los partidores poseen la temperatura de hibridación y contenido G/C correcto (bajo 60%) y la metodología de Gibson ya había sido utilizada correctamente según lo reportado (Gibson et al., 2009) es probable que los problemas con el módulo de *has B* dependan de la integridad de los fragmentos a ensamblar, cabe recordar que tal y como se mencionó anteriormente, los partidores del gen

hasB presentaron dificultades para obtener una amplificación totalmente específica.

Al igual que en el caso del módulo *hasA* se procedió a realizar la reacción sin el vector pBluescript, en donde tampoco fue posible obtener un fragmento del tamaño de interés. Como última opción, se procedió a realizar las reacciones de Gibson secuencialmente solo con dos fragmentos lineales (Figura 6.A). En primer lugar, se realizó las reacciones entre el promotor ADH1p y el gen *hasB* y entre el gen *hasB* y el terminador FBA1t, con las temperaturas óptimas de reacción señaladas en la tabla IX. Si bien se obtuvo el fragmento ADH1p-*hasB*, era necesario volver a amplificar este fragmento para de obtenerlo a la mayor concentración posible con el fin de realizar la reacción siguiente. En este paso no se obtuvo la banda de interés (2709 pb) con los partidores ADH1p FW y HasB RV empleados, debido a preferencias por amplificaciones inespecíficas. Esto nos indica que, tal y como se ha mencionado anteriormente, es probable que los partidores HasB FW y RV generen estos inconvenientes. Al verificar nuevamente estos partidores no fue posible encontrar uniones inespecíficas con el mismo gen *hasB* permitiendo hasta 5 “mismatch”, sin embargo, si se encontró posibles eventos de alineamiento a sí mismo en el partidior HasB RV permitiendo 1 “mismatch”. Es probable que esta condición genere las uniones inespecíficas en el templado con una baja probabilidad (Brownie et al., 1997).

Para solventar este problema se utilizó otro par de partidores: ADH1p_int FW y HasB_int RV (Tabla IV). Estos partidores poseen un menor tamaño, en relación a los utilizados anteriormente, ya que se mantuvo el mismo número de bases asociadas a las reacción de Gibson pero se redujo considerablemente el número de bases que hibridan al fragmento al cual amplifican. Esto se realizó asumiendo que el fragmento parcial entre el promotor y gen poseen en sus extremos 5' y 3' las bases que permiten la hibridación al plásmido pBluescript y al terminador FBA1t respectivamente, intentando disminuir lo más posible las uniones inespecíficas que ocurrieron con el los primeros partidores utilizados. De esta manera, fue posible amplificar el fragmento parcial promotor-gen (Figura 6.B) y

ensamblarlo mediante Gibson al terminador FBA1t. Finalmente, el fragmento que correspondería al módulo de expresión de *hasB* (ADH1p – *hasB* – FBA1t) (Figura 6.C) fue amplificado con distintos conjuntos de partidores. Se observó que en las amplificaciones realizadas con los partidores ADH1p FW y FBA1t RV se obtuvo amplificación inespecífica de menor tamaño (bajo los 2 kb). Esto quiere decir que estos partidores se unían de igual forma al fragmento que fueron diseñados como al resto del plásmido a pesar de que previamente se corroboró que no existieran uniones inespecíficas con el resto de los fragmentos y el plásmido pBluescript. Esto, sumado a los problemas anteriormente mencionado al amplificar el fragmento parcial entre el promotor-gen, sugiere que es probable que a esa T_m de reacción los partidores completos tienden a hibridar inespecíficamente con otros fragmentos. Aún así, como se observa en la misma figura 6.C, fue posible obtener un fragmento con el tamaño del módulo *hasB* con los nuevos partidores modificados y con los partidores MhasB FW y RV, los cuales se diseñaron con bases adicionales para ensamblar MhasB con MhasA en 5' y con el fragmento DOWN en 3', según el diseño de la figura 2. Finalmente, se decidió utilizar el módulo *hasB* obtenido con este último par de partidores para ligar mediante extremos romos en el plásmido pBluescript, ya que no era necesario utilizar bases complementarias al plásmido con esta metodología.

Al corroborar el plásmido pBluescript:MhasB desde colonias transformantes, se obtuvieron 4 posibles colonias con el módulo de interés, de alrededor de 3 kb, que fueron verificadas antes de ser enviadas a secuenciar. Como se observa en la Figura 7.B se flanqueó el gen y terminador, si bien se obtuvo amplificación con el tamaño de interés por la presencia de bandas inespecíficas no se podría confirmar el correcto orden y existencia de estos fragmentos. Además, el control negativo correspondiente al vector vacío obtuvo amplificaciones de tamaño similar, salvo una banda de alrededor de 2,7 kb que no corresponde al tamaño de interés. Como era de esperar al amplificar cada fragmento por separado con sus respectivos partidores completos no fue posible obtener bandas del

tamaño de esperado. Es por esto que para comprobar el ensamblaje, se realizaron digestiones. Tal como se observa en la figura 7.B y en la tabla VI. En la digestión realizada con PvuI se observa una banda de 3 kb y otra de alrededor de 2,5 kb – 3 kb, por lo que no se obtuvo el patrón teórico esperado en ninguna de las 4 colonias, ambos fragmentos suman alrededor de 5,5 kb – 6 kb comparado con el tamaño total de plásmido (6070 pb). En la digestión con HindIII se observa que solo se realizó un corte el cual dejó el plásmido lineal con un tamaño cercano a las 6 kb. Teóricamente, este ensayo posee sitios de corte en la secuencia del plásmido pBluescript II SK + y el fragmento de *hasB*, por lo que es posible que ese sitio del fragmento *hasB* no se encuentre. Finalmente, en el ensayo de digestión con PstI, enzima que también posee dos sitios de corte: En la secuencia del plásmido pBluescript II SK + y en el fragmento de *hasB*, se obtuvo 4 fragmentos de distintos tamaño. Considerando el tamaño del fragmento de mayor tamaño es probable que haya digestión parcial del plásmido, en tanto el resto de los fragmentos no coinciden con los tamaños teóricos de la digestión (Tabla VI). A partir de estos resultados se puede inferir que, a pesar de que el plásmido completo tiene un tamaño similar al tamaño esperado, algún fragmento del módulo *hasB* podría estar incompleto, muy probablemente el gen *hasB*. Esto fue confirmado por la secuenciación (Anexo 3) en donde se observa que solo fue posible determinar correctamente las primeras 1000 pb del promotor ADH1p, pero ninguna de las reacciones de secuenciación del gen *hasB* o del módulo desde el extremo 3' fue coincidente con la secuencia del módulo *hasB*. Por esto no fue posible confirmar la presencia del gen de *hasB* y el terminador FBA1t. Luego se observó que la secuencia obtenida a partir del partidor M13 RV corresponde a un fragmento no codificante del microorganismo *E. coli* (Anexo 3). Vale la pena resaltar que no fue posible determinar la presencia del terminador FBA1t en el MhasB y no fue posible ensamblarlo junto al módulo *hasB* en una reacción lineal (Figura 6). Esto nos hace suponer que este podría ser el evento tope en el diseño de este módulo, por lo que se propone rediseñar los partidores que

amplifican *hasB* y FBA1t.

c. Ensamble módulo de expresión

Al no contar con el módulo *hasB* se prosiguió a transformar el módulo *ura3* del marcador de selección junto al módulo *hasA* de la hialuronato sintasa. Esto fue posible ya que se contaba con los partidores TPI1t RV₂ y DOWN22 FW₂ con bases adicionales que hibridan entre los respectivos fragmentos, permitiendo realizar reacciones de ensamblaje Gibson entre el módulo *hasA* y el fragmento DOWN22 con el fin de obtener el nuevo diseño de la Figura 10. No fue posible demostrar mediante amplificación el ensamblaje del módulo *hasA* y DOWN22, lo cual fue confirmado mediante secuenciación (Anexo 2). En donde se observa que en todos los casos analizados solo se encontró el módulo *hasA* en el plásmido. A pesar de que solo el fragmento DOWN22 posee bases complementarias al plásmido pBluescript II SK +, en este caso el módulo *hasA* tuvo preferencia a ensamblarse a pBluescript sin reaccionar con el fragmento DOWN22. Además, se intentó amplificar la banda lineal obtenida del ensamblaje de el módulo *hasA* y DOWN22 (Figura 8.A), la cual coincide con el tamaño esperado. No fue posible obtener resultados positivos en la amplificación, esto se puede deber a que las T_m de alineamiento de los partidores TEF1p FW y DOWN22 RV utilizados, que flanquean este fragmentos, difieren en 9°C, disminuyendo la especificidad del alineamiento. Si bien, se realizó la amplificación en un gradiente de temperatura, no fue posible obtener la banda del tamaño de interés.

3) Validación de Mura3 como marcador de selección

El módulo *ura3* se obtuvo ensamblado junto al fragmento DOWN22 mediante Gibson en una reacción en el plásmido pBluescript. Las colonias fueron corroboradas mediante amplificación del fragmento codificante *ura3* y del fragmento DOWN22 (Figura 8.B). Luego,

con el objetivo de corroborar el marcador de selección diseñado, se procedió a transformar el plásmido pBluescript:Mura3+DOWN22 en la cepa de *S. cerevisiae* Δ ura3, la cual posee resistencia a G418 y auxotrofia por uracilo. Se espera que mediante recombinación homóloga la cepa recupere el gen *ura3* y pueda crecer en medio mínimo sin aminoácido. Este mecanismo ocurre gracias a la maquinaria nativa de reparación del microorganismo, permitiendo la integración de un fragmento en un sitio específico de homología (Orr-Weaver & Szostak, 1983). En este caso se utilizan los sitios UP22 y DOWN22 del cromosoma V descritos por Flagfeldt et al., 2009 que generan una sustitución por un doble evento de recombinación. El terminador utilizado en este módulo (PGI1t) es nativo de *S. cerevisiae*, por lo que representa un nuevo sitio de recombinación en la transformación disminuyendo la probabilidad del evento de interés. Sin embargo, solo el evento de doble recombinación de UP22 y DOWN22 recupera la auxotrofia y permite a la cepa crecer en medio mínimo. Se obtuvieron varias colonias en la transformación con Mura3, seleccionándose siete al azar para verificar mediante PCR (Figura 9.B). Solo fue posible confirmar la presencia del gen *ura3* en una de ellas por lo que el resto de colonias serían falsos positivos y en menor medida problemas en el proceso de PCR de colonia (material genético no logró quedar expuesto) ya que no todas las colonias utilizadas presentaron amplificación en el control positivo. La transformación con el control positivo con el fragmento lineal UP-*ura3*-DOWN, obtuvo gran cantidad de colonias validando la metodología de selección propuesta al curar la auxotrofia de la cepa *S. cerevisiae* s288c Δ ura3.

4) Transformación en *S. cerevisiae*

Finalmente, se procedió a transformar la cepa auxótrofa *S. cerevisiae* s288c Δ ura3 con los constructos obtenidos indicados en la Figura 10. En el diseño inicial se habían considerado como alternativa además de los partidores para las reacciones de ensamblajes

para Gibson, pares de partidores con bases adicionales que permitieran realizar recombinación *in vivo*. Estos partidores (MhasA FW-RV, MhasB FW-RV y Mura3 FW-RV) generan un sitio de recombinación de 50 pares de bases. Es por esto que se amplificaron los módulos de *ura3* y *hasA* con estos partidores previo a la transformación. Como no fue posible comprobar el ensamble del fragmento DOWN22 se decidió transformar este fragmento lineal amplificado con los partidores convencionales utilizados para las reacciones de Gibson, con el fin de que se completara el constructo a través de recombinación homóloga (Paul L. Gunyuzlu, et al. 2001). El diseño de estos partidores consideraban un menor número de bases, por lo que el sitio de recombinación sería de alrededor de 30 pb. Esta es una cantidad suficiente para la ocurrencia de la recombinación (Chan, Zhu, Luo, Hua, & Qiu, 2002). Aún así existía una baja probabilidad de ocurrencia de la serie de eventos de recombinación que permitieran que se integrara de manera integra tanto el marcador de selección como el módulo de *hasA*. Se intentaron 3 transformaciones distintas variando la concentración total de ADN (~500 ng, ~1000 ng y ~1500 ng) (Tabla VII), variando la relación entre los fragmentos para favorecer la probabilidad del sitio más pequeño. No fue posible obtener crecimiento en las cepas auxótrofas transformadas en ninguno de los 3 casos.

La mejor alternativa para afrontar este último inconveniente habría sido obtener el constructo de la Figura 10 en un solo fragmento lineal con el fin de aumentar la probabilidad de la inserción a través de una doble recombinación de los fragmentos UP22 y DOWN22. Sin embargo, cabe destacar que tanto los promotores como terminadores utilizados en los módulos corresponden al mismo microorganismo, por lo que también son nuevos sitios de recombinación que disminuyen la probabilidad de que ocurra el evento de interés. Con ese objetivo se podría obtener nuevos partidores para reacciones de Gibson que permitan obtener correctamente MhasB contenido en un vector junto a Mura3 y MhasA. Además, amplificar los fragmentos de mayor número de bases (>3 kb) con enzimas comerciales

Phusion® High-Fidelity o KOD Hot Start (Gelfand, et al. 1992) que aseguren mejores resultados con templados de mayores tamaños. Otra alternativa es transformar con un vector episomal de levadura al menos el módulo *hasA*, con el fin de satisfacer el último objetivo del trabajo de tesis ya que esto nos permitiría dilucidar más fácilmente si la proteína se puede expresar y es activa en este microorganismo.

Conclusiones

En este trabajo se logró obtener cada uno de los elementos reguladores, genes y sitios de recombinación necesarios para ensamblar los módulos de *ura3*, *hasA* y *hasB*. Mediante la técnica de Gibson Assembly fue posible obtener dos de los tres módulos propuestos, Mura3 y MhasA, contenidos en vectores independientes. También se generó un vector que contiene el marcador de selección Mura3 junto a los sitios de recombinación UP22 y DOWN22, los cuales permiten que ocurra un evento de recombinación homóloga *in vivo* en el cromosoma V de *S. cerevisiae*. De esta forma se obtuvieron cepas transformantes que curaron la auxotrofia de la cepa *S. cerevisiae* s288c Δ *ura3* validando tanto el método de integración como la expresión del marcador de selección propuesto. No fue posible obtener un constructo que contenga los 3 módulos de expresión en un solo vector, a pesar de esto se realizaron transformaciones con los fragmentos Mura3, MhasA que permitieran la integración en *S. cerevisiae* sin obtener resultados positivos.

El módulo *hasB* no pudo ser ensamblado debido a inconvenientes en la unión entre los fragmentos *hasB* y FBA1t. Es probable que esto haya ocurrido por los problemas señalados al amplificar *hasB* o en la reacción de ensamblaje entre estos fragmentos. Con el fin de conseguir el objetivo del trabajo se proponen tres alternativas: Primero, es obtener nuevos partidores que nos permitan completar íntegramente el módulo de *has B* y realizar una reacción de Gibson Assembly entre los tres módulos en un vector. De esta forma, aumentaría significativamente la probabilidad de que ocurra un doble evento de recombinación en *S. cerevisiae*. En segundo lugar, debido a los menores costos actuales en los servicios de síntesis de ADN, el módulo restante de *hasB* podría ser obtenido por esta vía para completa el cluster de expresión completo, y luego, seguir continuar como se

indicó anteriormente. Finalmente, se podría clonar en *S. cerevisiae* al menos HAS en un vector episomal para determinar si es posible lograr expresar esta proteína en la levadura.

Bibliografía

- Acumen Research and Consulting. (2019). *Hyaluronic Acid Market Size , Share & Trends Analysis Report By Application (Dermal Fillers, Osteoarthritis, Ophthalmic, Vesicoureteral Reflux), By Region (North America, APAC, Europe, MEA), And Segment Forecasts , 2019 - 2026.*
- Bach, M. L., Lacroute, F., & Botstein, D. (1979). Evidence for transcriptional regulation of orotidine-5'-phosphate decarboxylase in yeast by hybridization of mRNA to the yeast structural gene cloned in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76, 386–390. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.1.386>
- Benchling. (n.d.). Retrieved from <https://benchling.com/>
- Brownie, J., Shawcross, S., Theaker, J., Whitcombe, D., Ferrie, R., Newton, C., & Little, S. (1997). The elimination of primer-dimer accumulation in PCR, 25(16), 3235–3241
- Chan, E., Zhu, L., Luo, Y., Hua, S., & Qiu, M. (2002). Minimum Length of Sequence Homology Required for *VivoCloning* by Homologous Recombination in Yeast. *Plasmid*, 38, 91–96. <https://doi.org/10.1006/plas.1997.1305>
- Chien, L. J., & Lee, C. K. (2007a). Enhanced hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis* by coexpressing bacterial hemoglobin. *Biotechnology Progress*, 23, 1017–1022. <https://doi.org/10.1021/bp070036w>
- Chien, L. J., & Lee, C. K. (2007b). Hyaluronic acid production by recombinant *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 339–346. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1153-z>
- Chong, B. F., Blank, L. M., McLaughlin, R., & Nielsen, L. K. (2005). Microbial hyaluronic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, 341–351. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1774-4>
- Coleman, K. R., & Carruthers, J. (2006). Combination therapy with BOTOX™ and fillers:

- The new rejuvenation paradigm. *Dermatologic Therapy*, 19, 177–188.
<https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2006.00072.x>
- Cowman, M. K., Schmidt, T. A., Raghavan, P., & Stecco, A. (2015). Viscoelastic Properties of Hyaluronan in Physiological Conditions. *F1000Research*, 1–13.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.6885.1>
- de Oliveira, J. D., Carvalho, L. S., Gomes, A. M. V., Queiroz, L. R., Magalhaes, B. S., & Parachin, N. S. (2016). Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. *Microbial Cell Factories*, 15, 1–19.
<https://doi.org/10.1186/s12934-016-0517-4>
- DeAngelis, P. L. (1999). Molecular directionality of polysaccharide polymerization by the *Pasteurella multocida* hyaluronan synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 26557–26562. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.37.26557>
- Deangelis, P. L., & Achyuthan, A. M. (1996a). DG42 Protein of *Xenopus* Can Synthesize Hyaluronan in Vitro *. *Biochemistry*, 2, 23657–23660.
- Deangelis, P. L., & Achyuthan, A. M. (1996b). Yeast-derived Recombinant DG42 Protein of *Xenopus* Can Synthesize Hyaluronan in Vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 2, 23657–23661.
- DeAngelis, P. L., Papaconstantinou, J., & Weigel, P. H. (1993). Isolation of a *Streptococcus pyogenes* gene locus that directs hyaluronan biosynthesis in acapsular mutants and in heterologous bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 14568–14571.
- DeAngelis, P. L., & Weigel, P. H. (1994). Immunochemical Confirmation of the Primary Structure of Streptococcal Hyaluronan Synthase and Synthesis of High Molecular Weight Product by the Recombinant Enzyme. *Biochemistry*, 33, 9033–9039.
<https://doi.org/10.1021/bi00197a001>
- Falaleeva, M., Zurek, O. W., Watkins, R. L., Reed, R. W., Ali, H., Sumbly, P., Korotkova, N. (2014). Transcription of the *Streptococcus pyogenes* hyaluronic acid capsule

- biosynthesis operon is regulated by previously unknown upstream elements. *Infection and Immunity*, 82, 5293–5307. <https://doi.org/10.1128/IAI.02035-14>
- Flagfeldt, D. B., Siewers, V., Huang, L., & Nielsen, J. (2009). Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 26, 545–551. <https://doi.org/10.1002/yea>
- Gelfand, D., Stoffel, S., Lawyer, F., & Saiki, R. (1992). Purified thermostable enzyme. *Geothermics*. [https://doi.org/10.1016/0375-6505\(85\)90011-2](https://doi.org/10.1016/0375-6505(85)90011-2)
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6, 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R., Venter, J. C., Iii, C. A. H., Smith, H. O., & America, N. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6, 12–16. <https://doi.org/10.1038/NMETH.1318>
- Heldermon, C., DeAngelis, P. L., & Weigel, P. H. (2001). Topological organization of the hyaluronan synthase from *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 2037–2046. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002276200>
- Heydenreich, F. M., Miljuš, T., Jaussi, R., Benoit, R., Milić, D., & Veprintsev, D. B. (2017). High-throughput mutagenesis using a two-fragment PCR approach. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07010-4>
- Hoffmann, J., & Altenbuchner, J. (2014). Hyaluronic acid production with *Corynebacterium glutamicum*: effect of media composition on yield and molecular weight. *Journal of Applied Microbiology*, 117, 663–678. <https://doi.org/10.1111/jam.12553>
- Hoshi, H., Nakagawa, H., Nishiguchi, S., Iwata, K., Niikura, K., Monde, K., & Nishimura, S.-I. (2004). An Engineered Hyaluronan Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 2341–2349. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305723200>
- Im, J. H., Song, J. M., Kang, J. H., & Kang, D. J. (2009). Optimization of medium components

- for high-molecular-weight hyaluronic acid production by *Streptococcus* sp. ID9102 via a statistical approach. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 1337–1344. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0618-8>
- Jeong, E., Shim, W. Y., & Kim, J. H. (2014). Metabolic engineering of *Pichia pastoris* for production of hyaluronic acid with high molecular weight. *Journal of Biotechnology*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.05.018>
- Jia, Y., Zhu, J., Chen, X., Tang, D., Su, D., Yao, W., & Gao, X. (2013). Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for the efficient biosynthesis of uniform hyaluronic acid with controlled molecular weights. *Bioresource Technology*, 132, 427–431. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.150>
- Kim, J.-H., Yoo, S.-J., Oh, D.-K., Kweon, Y.-G., Park, D.-W., Lee, C.-H., & Gil, G.-H. (1996). Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 19, 440–445. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)00019-1](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00019-1)
- Kogan, G., Šoltés, L., Stern, R., & Gemeiner, P. (2007). Hyaluronic acid: A natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, 29, 17–25. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9219-z>
- Kumari, K., & Weigel, P. H. (1997). Molecular Cloning, Expression, and Characterization of the Authentic Hyaluronan Synthase from Group C *Streptococcus equisimilis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 32539–32546.
- Lacroute, F. (1967). Regulation of pyrimidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 95, 824–832. <https://doi.org/10.1128/jb.172.10.6145-6147.1990>
- Mao, Z., & Chen, R. R. (2007). Recombinant synthesis of hyaluronan by *Agrobacterium* sp. *Biotechnology Progress*, 23, 1038–1042. <https://doi.org/10.1021/bp070113n>
- Méndez, G. E. (2018) *Ingeniería Metabólica en Saccharomyces cerevisiae para la*

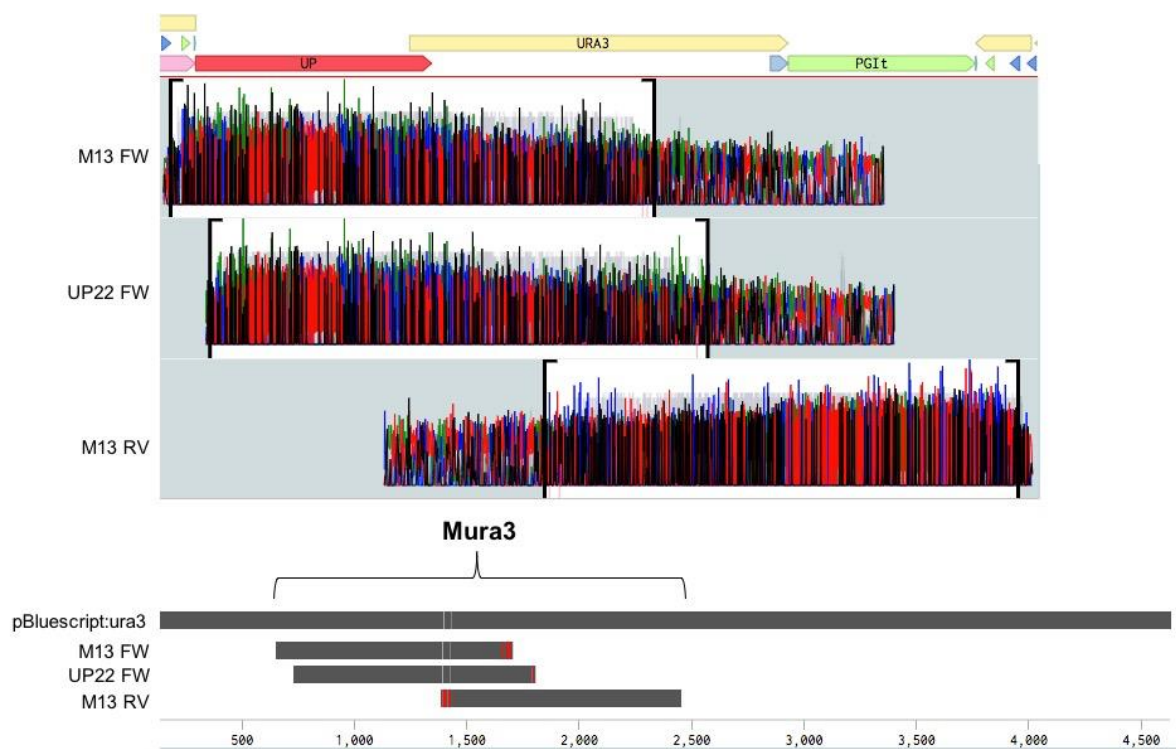
- producción de isobutanol*. Tesis de pregrado en Ingeniería en Biotecnología Molecular.
- Mendichi, R., & Schieron, A. G. (2002). Fractionation and characterization of ultra-high molar mass hyaluronan: 2. On-line size exclusion chromatography methods. *Polymer*, 43, 6115–6121. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(02\)00586-4](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(02)00586-4)
- Mézard, C., Pompon, D., & Nicolas, A. (1992). Recombination between similar but not identical DNA sequences during yeast transformation occurs within short stretches of identity. *Cell*, 70, 659–670. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90434-E](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90434-E)
- NEBuilder Assembly Tool. (n.d.). Retrieved from <http://nebuilder.neb.com/>
- Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., & Kolar, J. (2008). Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. *Veterinarni Medicina*, 53, 397–411. <https://doi.org/10.17221/1930-VETMED>
- OligoCalc. (n.d.). Retrieved from <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>
- Orlean, P. (2012). Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics*, 192, 775–818. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.144485>
- Orr-Weaver, T. L., & Szostak, J. W. (1983). Yeast recombination: the association between double-strand gap repair and crossing-over. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80, 4417–4421. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.14.4417>
- Orr-Weaver, T. L., Szostak, J. W., & Rothstein, R. J. (1981). Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78, 6354–6358. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.10.6354>
- Papakonstantinou, E., Roth, M., & Karakioulakis, G. (2012). A key molecule in skin aging Hyaluronic acid. *Dermato-Endocrinology*, (December), 253–258. <https://doi.org/10.4161/derm.21923>
- Paul L. Gunyuzlu, Gregory F. Hollis, and J. H. T. (2001). Plasmid construction by linker-assisted homologous recombination in yeast. *BioTechniques*, 31, 1246–1250. <https://doi.org/10.2144/01316bm03>
- Shao, Z., Zhao, H., & Zhao, H. (2009). DNA assembler , an in vivo genetic method for rapid

- construction of biochemical pathways. *Nucleic Acids Research*, 37, 1–10.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkn991>
- Shiedlin A., Bigelow R., Christopher W., Arbabi S., Yang L., Maier R., Wainwright N., Childs A., Miller. (2004). Evaluation of Hyaluronan from different sources: *Streptococcus zooepidemicus*, Rooster comb, Bovine Vitreous, and Human Umbilical cord. *Biomacromolecules*, 5, 2122 - 2127. <https://doi.org/10.1021/bm0498427>
- Vaisman Romero, D. B. (2014). *Optimización de la biosíntesis de ácido hialurónico en escherichia coli recombinante a partir de xilosa*. Tesis de doctorado en Ciencias de la Ingeniería, mención Química
- Vollmer, W., Blanot, D., & Pedro, M. A. De. (2008). Peptidoglycan structure and architecture, 32, 149–167. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>
- Weigel, P. H., Hascall, V. C., & Tammi, M. (1997). Hyaluronan synthases. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 13997–14000. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.22.13997>
- Weigel, P. H., Deangelis, P. L., & Kshama, K. (2006). US patent No. 7.060.466 B2. Methods of producing Hyaluronic Acid using a recombinant hyaluronan synthase gene.
- Wessels, M. R., & Bronze, M. S. (1994). Critical role of the group A streptococcal capsule in pharyngeal colonization and infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 12238–12242. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7991612>
- Widner, B., Dollen, S. Von, Tang, M., Heu, T., Sloma, A., Sternberg, D., ... Brown, S. (2005). Hyaluronic Acid Production in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 3747–3752. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3747>
- Yoshimura, T., Shibata, N., Hamano, Y., & Yamanaka, K. (2015). Heterologous production of hyaluronic acid in an ϵ -Poly-L-Lysine producer, *Streptomyces albulus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 3631–3640. <https://doi.org/10.1128/AEM.00269-15>
- Yu, H., & Stephanopoulos, G. (2008). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for

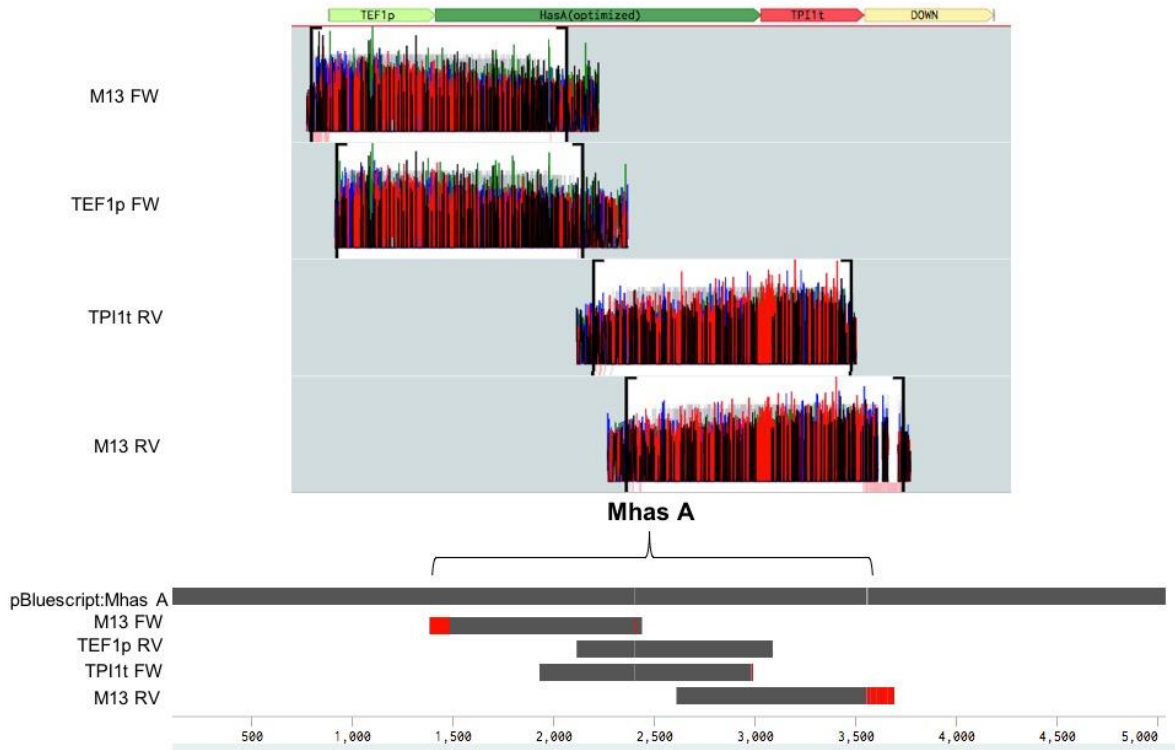
biosynthesis of hyaluronic acid.pdf.

Zhang, W., Xie, Y., Liu, W., Lei, J., & Liu, Y. (2018). Combination therapy of botulinum toxin type A and hyaluronic acid filler for facial rejuvenation. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 11, 5033–5038.

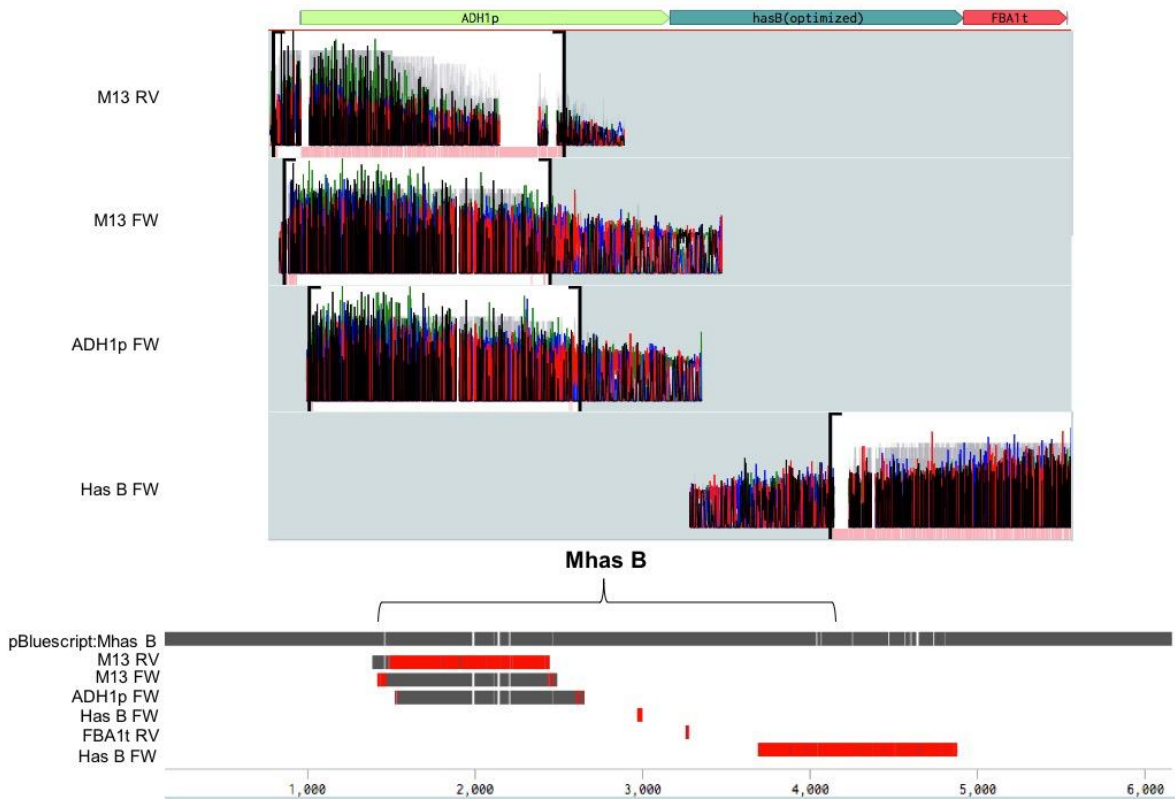
Anexos



Anexo 1: Secuenciación y alineamiento Mura3 realizado en plataforma Benchling



Anexo 2: Secuenciación y alineamiento MhasA realizado en plataforma Benchling



Anexo 3: Secuenciación y alineamiento MhasB realizado en plataforma Benchling

Anexo 4: Secuencias módulos de expresión

Nombre	Secuencia
Mura3 UP 1 >457 URA3 458 >1261 PGI1 1262 >1661 DOWN 1662 >2162	AAACGACGTTGAAATTGAGGCTACTGCGCCAATTGATGACAATACAGACGATGATAACAACCCGAAGTTATCTGATGTAGAAAA GGATTAAGATGCTAAGAGATAGTGATGATATTCATAAATAATGTAATTCTATATATGTTAATTACCTTTTTGCGAGGCATATT TATGGTGAAGGATAAGTTTTGACCATCAAAGAAGGTTAATGTGGCTGTGGTTTCAGGGTCCATAAAGCTTTTCAATTCATCTTTT TTTTTTTTGTTCTTTTTTTGATTCCGGTTCTTTGAAATTTTTTTGATTCCGGTAATCTCCGAGCAGAAGGAAGAACGAAGGAAGG AGCACAGACTTAGATTGGTATATACGCATATGTGGTGTGAAGAAACATGAAATTGCCAGTATTCTTAACCCAACCTGCACA GAACAAAACTGCGAGAAACGAAGATAAATCATGCGAAAGCTACATATAAGGAACGTGCTGCTACTCATCTAGTCTGTTG CTGCCAAGCTATTTAATATCATGCACGAAAAGCAAACAACCTTGTGTGCTTTCATTGGATGTTCTGACCACCAAGGAATTACTGG AGTTAGTTGAAGCATTAGGTCCCAAAATTTGTTTACTAAAAACACATGTGGATATCTTGACTGATTTTTCCATGGAGGGCAGAGT TAAGCCGCTAAAGGCATTATCCGCAAGTACAATTTTTACTCTTCCGAGACAGAAAATTTGCTGACATTGGTAATACAGTCAAAA TTGCAGTACTCTGCGGTGTATACAGAATAGCAGAATGGGAGACATTACGAATGCACACGGTGTGGTGGGCCAGGTATTGT TAGCGGTTTGAAGCAGCGCGGAAGAAGTAACAAGGAACCTAGAGGCCTTTTGTGTTAGCAGAATTGTCATGCAAGGGCT CCCTAGCTACTGGAGAATATACTAAGGTACTGTTGACATTGCGAAGAGCGACAAAGATTTTGTATCGGCTTTATTGCTCAAA GAGACATGGTGAAGAGATGAAGTTACGATTGGTGTATTATGACACCCGGTGTGGGTTTAGATGACAAGGGAGAGCGCATT GGGTCAACAGTATAGAACCCTGGATGATGTGGTCTTACAGGATCTGACATTATTATTGTTGGAAGAGGACTATTTGCAAAGGG AAGGGATGCTAAGGTAGAGGGTGAACGTTACAGAAAAGCAGGCTGGGAAGCATATTTGAGAAGATGCGGCCAGCAAACTAA ACAAATCGCTCTTAAATATATACCTAAAGAACATTAAGCTATATTATAAGCAAAGATACGTAATTTTGTCTTATATTATTATACAC ATATCATATTTCTATATTTTTAAGATTGGTTATATAATGTACGTAATGCAAAGGAAATAAATTTTATACATTATTGAACAGCGTCC AAGTAAC TACATTATGTGCACTAATAGTTTAGCGTCGTGAAGACTTTATTGTGTCGCGAAAAAGTAAAAATTTAAAAATTAGAGC ACCTTGAACCTTGCAAAAAGGTTCTCATCAACTGTTTAAAAGGAGGATATCAGGTCCTATTTCTGACAACAATATACAAATTTA GTTTCAAAGATGAATCAGTGCAGGAAGGACATAAECTATGAAGCCTCCAGTATACC GGGAAAGCATATTTGAGAAGATGCGGCC AGCAAACTAAAAACTGTATTATAAGTAAATGCATGTATACTAAACTCACAAATTAGAGCTTCAATTTAATTATATCAGTTATTAC CCGGGAATCTCGGTCGTAAATGATTCTATAATGACGAAAAAAAAAAATTTGAAAGAAAAAGCTTCATGGCCTTTATAAAAAAGG AACTATCCAATACCTCGCCAGAACCAAGTAACAGTATTTACGGGGCACAAATCAAGAACAATAAGACAGGACTGTAAAGATGG ACGCATTGAACTCAAAGAACAACAAGAGTTCCAAAAAGTAGTGAACAAAAGCAAATGAAGGATTTTCATGCGTTTGTACTCTA ATCTGGTAGAAAGATTTTACAGACTGTGCAATGACTTCACAACATCAAAGCTAACCAATAAGGAACAAACATGCATCATGA AGTGCTCAGAAAAGTTCTTGAAGCATAGCGAACGTGTAGGGCAGCGTTTCC
MhasA TEF1p 1 >412 hasA 413 >1672 TPI1t 1673 >2072	ATAGCTTCAAATGTTTCTACTCCTTTTTACTCTTCCAGATTTTCTCGGACTCCGCGCATCGCCGTACCCTTCAAACACCCA AGCACAGCATACTAAATTTCCCTCTTTCTTCCCTAGGGTGTGTTAATTACCCGTAATAAGGTTTGAAAAAGAAAAAGAG ACCGCTCGTTTCTTTTCTTCTGTCGAAAAAGGCAATAAAAAATTTTATCACGTTTCTTTTCTTGAAAATTTTTTTTTGATTTT TTCTTTTCGATGACCTCCATTGATATTAAGTTAATAAAGGCTTCAATTTCTCAAGTTTCAGTTTCATTTTTCTTGTCTATT ACAACTTTTTTACTTCTTGCTCATTAGAAAGAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGTTTAAATTACAAAATGCCGATCTTTAAAAAG ACCTTAATAGTTTTGTCATTATCTTTCTGATAAGCATCCTAATATATCTAAATATGTATCTATTCCGGTACATCTACTGTTGGCATC TACGGGGTATATAATTACGTATCTGGTAATTAAGCTGGGACTATCTTTCCTGTACGAACCTTTTAAAGGGAAGCCACACGAT TATAAAGTGGCTGCAGTTATACCGAGCTATAATGAAGATGCGGAGAGTTTGGCTTGAGACTCTAAATCTGTTCTAGCTCAAACA TACCCGCTTAGCGAAATCTATATCGTAGATGATGGCTCTAGTAATACAGATGCAATCCAACCTGATCGAGGAGTACGTGAACCGT GAGGTAGACATTTGCCGTAATGTGATCGTACATAGAGTCTTGTGAATAAGGGGAAGCGTCATGCCAGGCTTGGGCGTTCCG AGAGAAGCGATGTGATGATTCTTGACAGTGGACTCTGATACATACATCTATCCTAACGCTCTGGAGGAACCTTGAAGTCCT TTAACGACGAACTGTCTACGCGGCGACTGGTCAATTAACGCGAGGAACAGACAGACAAACCTGCTGACTCGTTTGACCGAC

	<p>ACTGAAAAGCAAGGACATCAAGATTATAATATATGAGCCTATGCTTAATAAGCTAGAATCAGAGGACCAATCTGCCTGGTGAA TGATCTTGAAAACTTTAAAAAGCAGGCAAATATAATTGTAACGAACCGTTACGATAACGAACTTCAGGATGTCAAGAATAAGGT CTATAGTAGAGACATTTTCAACAGGGATTAGGTTAATTCAAATTAATTGATATAGTTTTTAAATGAGTATTGAATCTGTTTAGAAA TAATGGAATATTATTTTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTGGTCGGCTCTTTTCTTCTGAAGGTCAATGACAAAATGATATGAAGGAAA TAATGATTTCTAAAATTTTACAACGTAAGATATTTTACAAAAGCCTAGCTCATCTTTTGTTCATGCACTATTTTACTCACGCTTGAA ATTAACGGCCAGTCCACTGCGGAGTCATTTCAAAGTCATCCTAATCGATCTATCGTTTTTGATAGCTCATTTTGGAGTTCGCGAT TGTCTTCTGTTATTCACAACGTTTTAATTTTTATTTTATTCTGGAACCTTCGAGTTCCTTGAAAGTCTTTCATAGTAGCTTAC</p>
--	--