

Construcción de plásmidos mediante clonación *in vivo* para la búsqueda y caracterización de oligopéptidos quelantes de hierro en *Saccharomyces cerevisiae*

Plasmid construction via *in vivo* cloning for the search and characterization of iron-binding oligopeptides in *Saccharomyces cerevisiae*

Pamela E. Canales †^{1,2}

<https://orcid.org/0000-0001-6019-8846>
pcanales@lamolina.edu.pe

Alondra I. Badillo †^{1,3}

<https://orcid.org/0000-0001-7067-2054>
20130982@lamolina.edu.pe

Ana A. Kitazono*¹

<https://orcid.org/0000-0002-6924-1799>
anakitazono@lamolina.edu.pe

*Corresponding author

† Estas autoras contribuyeron de igual forma a este trabajo.

1. Laboratorio de Química Biológica y Bioanálisis, Departamento Académico de Química, Universidad Nacional Agraria La Molina, Av. La Molina sn, CP 15026, Lima, Perú.

2. Programa Doctoral en Ciencias e Ingeniería Biológicas, Universidad Nacional Agraria La Molina - Perú.

3. Programa de Maestría en Nutrición, Universidad Nacional Agraria La Molina - Perú.

Citación

Canales PE, Badillo AI, Kitazono AA. 2024. Construcción de plásmidos mediante clonación *in vivo* para la búsqueda y caracterización de oligopéptidos quelantes de hierro en *Saccharomyces cerevisiae*. Revista peruana de biología 31(2): e27218 001- 010 (Junio 2024). doi: <https://dx.doi.org/10.15381/rpb.v31i2.27218>

Presentado: 29/12/2024

Aceptado: 31/05/2024

Publicado online: 30/06/2024

Editor: Leonardo Romero

Resumen

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un suplemento nutricional y aditivo alimentario que podría aportar hierro de alta biodisponibilidad. Asimismo, varios estudios han demostrado la viabilidad del uso de oligopéptidos quelantes de hierro para tratar la anemia y por tanto, su producción en células de levadura podría proporcionar ventajosamente un suplemento fácil de usar. En este estudio, se optimizó una estrategia de clonación *in vivo* para construir una biblioteca de plásmidos semialeatoria que permite la producción de oligopéptidos con seis repeticiones de secuencias Asp/Glu-Asp/Glu-Leu. En éstos, la primera y segunda posición podrían incluir residuos de aspartato o glutamato, mientras que la tercera es siempre leucina. Adicionalmente, varios plásmidos fueron construidos para permitir el estudio de variantes del oligopéptido Arg-Glu-Glu, previamente reportado como quelante de hierro. En cada caso, las construcciones de los plásmidos requeridos se realizaron mediante la estrategia de clonación *in vivo* en la levadura *S. cerevisiae*, que se basa en la reparación de brechas en el ADN por recombinación homóloga. El procedimiento implica la cotransformación de células de levadura con el plásmido linealizado y el fragmento a clonar, ambos con secuencias flanqueantes homólogas. Los transformantes resultantes albergan a los plásmidos correctamente ensamblados y comienzan a expresar los genes clonados, permitiendo así el análisis inmediato de los oligopéptidos sintetizados de secuencias conocidas o semialeatorias.

Abstract

Saccharomyces cerevisiae yeast serves as a nutritional supplement and food additive that may offer highly bioavailable iron. Several studies have demonstrated the viability of using iron-chelating oligopeptides to treat anaemia, suggesting that their production in yeast cells could advantageously provide an easy-to-use supplement. In this study, an *in vivo* cloning strategy was optimized to construct a semi-random plasmid library that enables the production of oligopeptides with six repetitions of Asp/Glu-Asp/Glu-Leu sequences. In these sequences, the first and second positions can include either aspartate or glutamate residues, while the third is always leucine. Additionally, several plasmids were constructed to allow the study of variants of the Arg-Glu-Glu oligopeptide, previously reported as an iron chelator. In each case, the required plasmid constructions were performed using an *in vivo* cloning strategy in *S. cerevisiae*, based on gap repair by homologous recombination. The procedure involves the co-transformation of yeast cells with the linearized plasmid and the fragment to be cloned, both with homologous flanking sequences. The resulting transformants harbor the correctly assembled plasmids and begin expressing the cloned genes, thereby enabling immediate analysis of the synthesized oligopeptides with known or semi-random sequences.

Palabras clave:

Levadura, biblioteca de plásmidos aleatorios, péptidos aleatorios, péptidos quelantes de hierro.

Keywords:

Yeast, random plasmid library, random peptides, iron chelating peptides.

Journal home page: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/index>

© Los autores. Este artículo es publicado por la Revista Peruana de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional. (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>) que permite Compartir (copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato), Adaptar (remezclar, transformar y construir a partir del material) para cualquier propósito, incluso comercialmente.

Introducción

La anemia constituye un problema de salud global que afecta aproximadamente al 40% de los niños menores de cinco años (OMS 2022), impactando negativamente su desarrollo motor y cognitivo. La principal causa de anemia es la deficiencia de hierro y, lamentablemente, a pesar de las estrategias de prevención y diversos tratamientos que se han implementado, la incidencia sigue siendo elevada por diferentes motivos. Por ejemplo, uno de estos tratamientos consiste en la suplementación con sales ferrosas; no obstante, estas pueden provocar efectos secundarios gastrointestinales, como diarrea, náuseas y alteraciones en la microbiota (Allen 2002; Bloor et al. 2021; Georgieff et al. 2019). Por ello, es imperativo desarrollar y aplicar estrategias más efectivas para prevenir y tratar esta enfermedad.

Los péptidos bioactivos derivados de diferentes fuentes proteicas han ganado reconocimiento debido a sus numerosas propiedades reportadas, como antihipertensivas, antimicrobianas, antioxidantes, antitumorales y de unión a minerales (Chalamaiah et al. 2019). De estos péptidos, los quelantes de hierro representan una alternativa prometedora contra la anemia debido a su alta biodisponibilidad (Sun et al. 2020). Se han identificado diferentes péptidos quelantes de hierro a partir de la hidrólisis enzimática de proteínas de alimentos y subproductos (Caetano-Silva et al. 2018; Li et al. 2019; Ma et al. 2019; Walters et al. 2018). Sin embargo, esta estrategia tiene un alcance muy limitado porque se basa en proteínas naturales seleccionadas. Por tanto, otra opción importante es la búsqueda de oligopéptidos quelantes de hierro mediante cribados utilizando bibliotecas de plásmidos aleatorios o mediante diseño. Respecto a lo primero, las bibliotecas de plásmidos aleatorias o semialeatorias ofrecen una extraordinaria herramienta para generar un sinfín de secuencias posibles (20^n para un péptido de "n" residuos), permitiendo así la búsqueda de péptidos con las funciones deseadas (Scott & Craig 1994). Un ejemplo de lo segundo es el estudio de Xiao et al. sobre el péptido Arg-Glu-Glu complejoado con hierro, que mostró resultados prometedores en ratas con anemia inducida (Xiao et al. 2016). No se han reportado otros estudios sobre este tripéptido y, dados los resultados reportados, es importante investigar si dicha capacidad de unión al hierro podría resultar en la acumulación de hierro en otros organismos, y confirmar el papel de los residuos de glutamato y arginina como quelantes del metal (de la Hoz et al. 2014; Guo et al. 2014; Lv et al. 2009).

Por otro lado, el metabolismo de hierro ha sido extensamente estudiado en diferentes especies de hongos y levaduras (Kosman 2003; Orbegozo et al. 2008), entre éstas, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene desde hace tiempo varias aplicaciones en la industria alimentaria, siendo también un suplemento nutricional muy consumido. Además, el uso de la levadura en la suplementación de hierro en ratas ha sido reportado anteriormente, en el cual las células de levadura expresaron ferritina recombinante (Chang et al. 2005) o se cultivaron en presencia de una alta concentración de hierro (Kyyaly

et al. 2015) demostrando la viabilidad de su implementación en el tratamiento de la anemia.

En este sentido, sería especialmente ventajoso que para este fin se pudieran utilizar células de levadura enriquecidas con hierro, lo que se podría conseguir mediante la producción de oligopéptidos que se unen a este metal. Es importante destacar que la construcción de plásmidos que albergan secuencias codificantes para oligopéptidos específicos o aleatorios se puede realizar de manera eficiente en *S. cerevisiae* mediante clonación (Kitazono 2011). Varias otras estrategias de clonación pueden ser implementadas para la construcción de los plásmidos requeridos; sin embargo, la clonación *in vivo* en levadura permite la expresión y el análisis inmediatos de los genes clonados (Fig. 1). Una aplicación importante de estas propiedades es la construcción de bibliotecas de plásmidos aleatorios o semialeatorios, la que podría utilizarse inmediatamente en busca de plásmidos que confieren características particulares, como la resistencia a hierro.

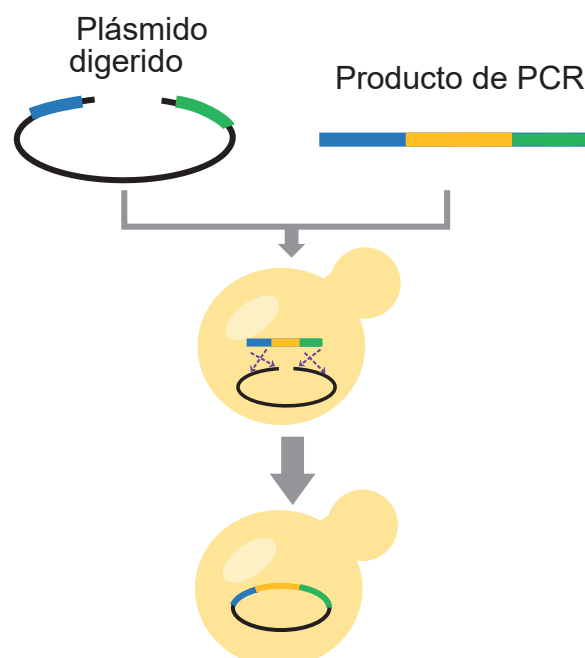


Figura 1. Representación de la estrategia seguida para construir los plásmidos necesarios para la generación de los oligopéptidos. El plásmido digerido (linealizado) y el producto de PCR se utilizaron para transformar *Saccharomyces cerevisiae*, que construye eficazmente el plásmido recombinante (clonación *in vivo*).

En el presente trabajo, estrategias de clonación *in vivo* fueron aplicadas para la construcción de plásmidos en *S. cerevisiae* que permiten la producción de oligopéptidos que incluyen residuos de glutamato y aspartato, frecuentemente encontrados en aquellos quelantes de hierro, y versiones del tripéptido Arg-Glu-Glu reportado por Xiao et al. (2016). En la primera estrategia, una serie de plásmidos semialeatorios fue construida para la producción de miles de diferentes tipos de oligopéptidos semialeatorios que incluyen seis repeticiones de las secuencias Asp/Glu-Asp/Glu-Leu. En la segunda estrategia, los plásmidos construidos permitieron la producción del

tripéptido Arg-Glu-Glu y sus derivados con tres a seis repeticiones (Fig. 2).

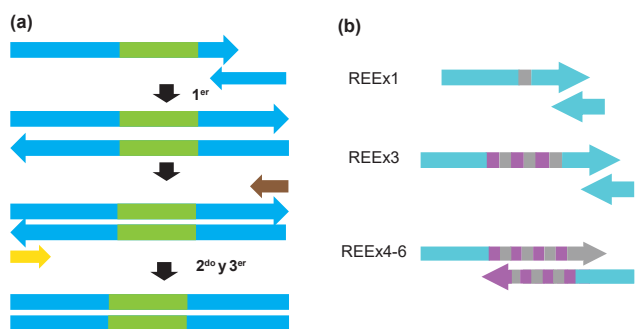


Figura 2. Esquemas de las estrategias de PCR aplicadas para obtener los fragmentos con las secuencias codificantes. (a) Generación de los fragmentos que permite la producción de los oligopéptidos semialeatorios con seis repeticiones de Asp/Glu-Asp/Glu-Leu. El primer ciclo de PCR incluyó los dos oligonucleótidos que permiten la generación del fragmento bicatenario con las secuencias codificantes (verde). Los fragmentos generados se amplificaron en el segundo y tercer ciclo después de la adición de los cebadores flanqueantes (representados por las flechas amarilla y marrón). En celeste se representan las secuencias homólogas al plásmido, necesarias para la recombinación y por tanto, para la clonación *in vivo*. (b) Generación de los fragmentos que permiten la producción de los oligopéptidos Arg-Glu-Glu con una (REEx1), tres (REEx3), o cuatro a seis (REEx4-6) repeticiones. El protocolo de PCR también incluyó un total de tres ciclos como se describe en el panel. (a) Si bien, en cada caso, se requirió un oligonucleótido directo particular, la generación de los fragmentos REEx1 y REEx3 requirió el mismo oligonucleótido inverso representado en el panel a. La generación del fragmento REEx4-6 se basó en un oligonucleótido inverso particular. Las secuencias y descripciones de todos los oligonucleótidos se encuentran en la Tabla 1.

Material y métodos

Cepas y plásmidos.

La cepa mutante *S. cerevisiae ccc1* utilizada en estos estudios fue del origen genético W303 (*MATa ccc1::LEU2 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1 ade2-1 can1-100 trp1-1*) (Gueldener et al. 2002; Thomas and Rothstein 1989). La cepa de *Escherichia coli* utilizada para la amplificación y purificación de los plásmidos construidos fue TOP10 (*F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80 lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG*).

Los plásmidos pRS416-GPD y pRS416-GPD-sFerH1 fueron proporcionados generosamente por el Dr. Sergi Puig (de Llanos et al. 2016). El primero se utilizó para la construcción de todos los plásmidos, permitiendo la expresión de los genes clonados a partir del promotor, el gen constitutivo de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) (Mumberg et al. 1995). El plásmido pRS416-GPD-sFerH1 incluye el ADN complementario (ADNc) que codifica para la subunidad H1 de la ferritina de la soya (Masuda et al. 2001), y se utilizó como control en los ensayos de resistencia a hierro.

Diseño de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos diseñados permitieron la generación de productos de PCR que albergan las secuencias codificantes deseadas y secuencias flanqueantes homólogas al sitio de clonación en el plásmido (Figs. 1 y 2, Tabla 1).

Así, para los fragmentos que albergaban las secuencias codificantes para los oligopéptidos semialeatorios, el oligonucleótido de 130 bases DEfw incluyó en su extremo 5', 45 bases derivadas del plásmido, la secuencia codificante de 57 bases para el oligopéptido Met-(Asp/Glu-Asp/Glu-Leu)₆, un codón de terminación (TAA) y en su extremo 3', 25 bases que son complementarias al cebador EXTrv (Tabla 1). La secuencia codificante para cada una de las seis repeticiones fue "GANGANTTG", en la que "TTG" codifica para leucina y cada codón degenerado "GAN" podría ser "GAT", "GAC", "GAA" o "GAG". De éstos, los dos primeros codifican para aspartato; y los dos últimos, para glutamato. Por lo tanto, cualquiera de los aminoácidos podría incorporarse dentro del oligopéptido sintetizado.

Por otro lado, el oligonucleótido EXTrv, de 78 bases, incluyó secuencias derivadas del plásmido y en su extremo 3', 28 bases que son complementarias a los cebadores DEfw, REEfw y 3GAG3REE.

Generación de los fragmentos a clonar mediante PCR.

Para la generación del fragmento que albergaba a la secuencia codificante para una repetición Arg-Glu-Glu, el cebador REEfw incluyó en su extremo 5' a 45 bases derivadas del plásmido, la secuencia codificante para el péptido Met-Arg-Glu-Glu, y un codón de terminación (TAA) que forma parte de las 28 bases que son complementarias al cebador EXTrv. El cebador 3GAG3REE tuvo una organización similar excepto por la inclusión de las secuencias codificantes para tres repeticiones Gly-Ala-Gly-Arg-Glu-Glu, en las que los tripéptidos Gly-Ala-Gly actúan como espaciadores (Figs. 2b y 3).

Para la generación de los fragmentos que podrían incluir de cuatro a seis repeticiones Arg-Glu-Glu, se necesitaron dos oligonucleótidos específicos: FW6GAG6REE y RV6GAG6REE. El primer cebador de 128 bases incluyó en su extremo 5' a 45 bases derivadas del plásmido, y la secuencia codificante para el péptido Met-(Gly-Ala-Gly-Arg-Glu-Glu)₄ que incluye 25 bases que eran complementarias al cebador RV6GAG6REE. Este último, al participar en el primer ciclo de PCR, permitió generar el fragmento bicatenario que alberga en su extremo 3' a una secuencia de 75 pb que es homóloga al plásmido. Ventajosamente, y como se representa en la figura 3, debido a las repeticiones en tándem, las secuencias FW6GAG6REE y RV6GAG6REE podrían hibridarse de tres maneras diferentes, dando como resultado tres fragmentos de PCR diferentes que albergan las secuencias codificantes para cuatro, cinco o seis repeticiones Arg-Glu-Glu.

Todos los oligonucleótidos utilizados en este estudio están listados en la Tabla 1 y fueron sintetizados por Macrogen Inc. (Seúl, Corea).

Generación de los fragmentos a clonar. Los fragmentos que portaban las secuencias codificantes para los oligopéptidos Asp/Glu-Asp/Glu-Leu y Arg-Glu-Glu semialeatorios se generaron como se representa en las Figuras 2 y 3. Es importante destacar que en ambos casos los protocolos de PCR incluyeron solo un total de tres ciclos de amplificación, para preservar la diversidad de

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Nombre	Secuencia (n=a/t/g/c)	Descripción
DÉfw	<code>aaacaccagaacttagtttcgacggattctagaactagtggatccatgganganttgganganttgganganttgganganttgganganttgganganttgganganttgtaa</code> cccgggctgcaggaattcgatca Oligopéptido codificado: Met -(Asp/Glu-Asp/Glu-Leu) ₆	Cebador directo que incluye las secuencias que codifican para los oligopéptidos semialeatorios y en sus extremos secuencias homólogas al plásmido (5', en azul) y complementarias a EXTrv (3', en rojo)
EXTrv	<code>agcgtgacataactaattacatgactcgaggtcgacggatcgataagctgataatcctgcagcccgggtta</code>	Cebador inverso que incluye las secuencias complementarias a DÉfw, REEfw y 3GAG3REE (3') y homólogas al plásmido (5', en verde)
25fw	<code>aaacaccagaacttagtttcgacgg</code>	Permite la amplificación de los fragmentos que incluyen las secuencias que codifican para los oligopéptidos.
30rv	<code>agcgtgacataactaattacatgactcgag</code>	Permite la amplificación de los fragmentos que incluyen las secuencias que codifican para los oligopéptidos.
REEfw	<code>aaacaccagaacttagtttcgacggattctagaactagtggatccatgagagaagaataa</code> cccgggctgcaggaattcgatca Oligopéptido codificado: Met-Arg-Glu-Glu	Cebador directo que incluye las secuencias que codifican para el oligopéptido y en sus extremos secuencias homólogas al plásmido (5', en azul), y complementarias a EXTrv (3', en rojo)
3GAG3REE	<code>aaacaccagaacttagtttcgacggattctagaactagtggatccatgggtgctggtagagaagaaggtgctggtagagaagaaggtgctggtagagaagaataa</code> cccgggctgcaggaattcgatca Oligopéptido codificado: Met-(Gly-Ala-Gly-Arg-Glu-Glu) ₃	Cebador directo que incluye las secuencias que codifican para el oligopéptido y en sus extremos secuencias homólogas al plásmido (5', en azul), y complementarias a EXTrv (3', en rojo)
FW6GAG6REE	<code>aaacaccagaacttagtttcgacggattctagaactagtggatccatgggtgctggtagagaagaaggtgctggtagagaagaaggtgctggtagagaagaaggtgctggt</code> Oligopéptido codificado: Met-(Gly-Ala-Gly-Arg-Glu-Glu) ₄	Cebador directo que incluye las secuencias que codifican para el oligopéptido y en sus extremos secuencias homólogas al plásmido (5', en azul), y complementarias a RV6GAG6REE (3', en naranja)
RV6GAG6REE	<code>Agcgtgacataactaattacatgactcgaggtcgacggatcgataagctgataatcctgcagcccgggtatttcttctaccagcaccttcttctaccagc</code> Oligopéptido codificado: Arg-Glu-Glu-Gly-Ala-Gly-Arg-Glu-Glu	Cebador inverso que incluye en sus extremos una secuencia complementaria a FW6GAG6REE (3', en naranja), y otra homóloga al plásmido (5', en verde)

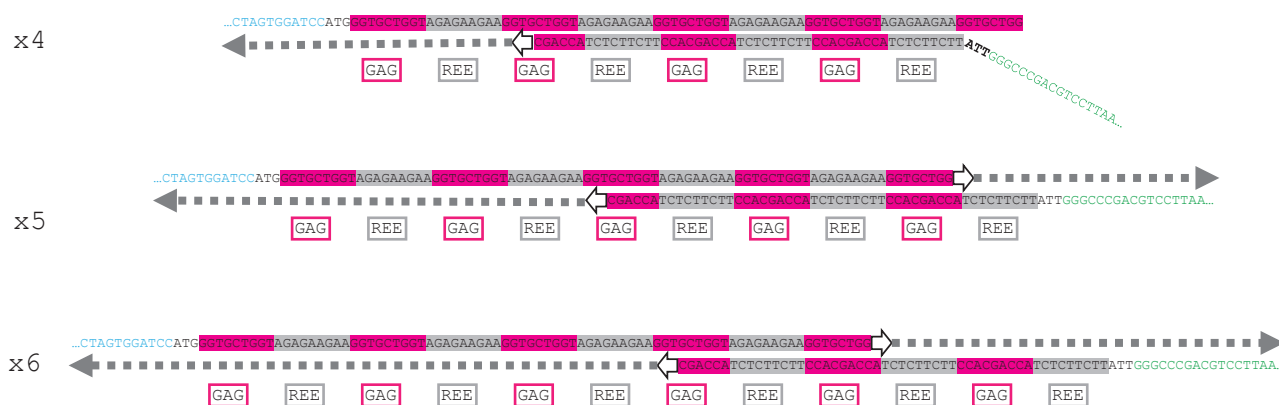


Figura 3. Estrategia seguida para la generación de los tres productos que incluyen las secuencias codificantes para los oligopéptidos de cuatro a seis repeticiones de Arg-Glu-Glu utilizando los mismos dos oligonucleótidos. El panel superior muestra la generación de un fragmento que codifica para un oligopéptido con cuatro repeticiones, mientras que los paneles del medio e inferior hacen lo mismo para los oligopéptidos con cinco y seis repeticiones, respectivamente. Las secuencias codificantes de los espaciadores Gly-Ala-Gly están resaltadas en rosa (GAG), las de las repeticiones Arg-Glu-Glu en gris (REE); y las secuencias homólogas al plásmido en azul o verde. Las secuencias y descripciones de todos los oligonucleótidos se encuentran en la Tabla 1.

las secuencias en los respectivos oligonucleótidos (Figs. 2a y b). En el primer ciclo, cada fragmento bicatenario se generó a partir de dos oligonucleótidos que sirvieron como plantillas y cebadores entre sí.

Para la generación de los fragmentos semialeatorios (Fig. 2a) o aquellos que incluyen las secuencias codificantes para los oligopéptidos Arg-Glu-Glu con una o tres repeticiones (Fig. 2b), el oligonucleótido directo albergó las secuencias codificantes (DEFw, REEFw, o 3GAG3REE en la Tabla 1), y el otro actuó como cebador inverso con una secuencia complementaria en su extremo 3' ("cebador de extensión", EXTrv). Los oligonucleótidos directo e inverso albergaron en sus extremos 5' a las secuencias que eran homólogas al sitio de clonación respectivo en el plásmido, que son necesarias para la clonación *in vivo*. Después del primer ciclo, se agregaron los cebadores directos 25fw y 30rv inversos más cortos para permitir la amplificación de todos los fragmentos generados, en dos ciclos adicionales. Todos los ciclos de PCR consistieron en un paso de desnaturalización a 95 °C durante 30 s seguido de un alineamiento a 68 °C durante 30 s y una extensión a 72 °C durante 20 s.

En el primer ciclo, las reacciones de 25 µL incluyeron 17.75 µL de agua, 2.5 µL de tampón 10X, 1.25 µL de 50 mM cloruro de magnesio, 0.25 µL de 25 mM dNTPs, 0.5 µL de cada una de las plantillas de oligonucleótidos 25 µM (DEFw, REEFw o 3GAG3REE, y EXTrv). Posteriormente, los tubos se colocaron en hielo y se añadió 1.0 µL de cada uno de los cebadores 25fw y 30rv (50 µM). Los tubos se devolvieron al termociclador para completar los ciclos 2 y 3.

Para la generación de los fragmentos que portaron las secuencias codificantes para los oligopéptidos con cuatro a seis repeticiones de Arg-Glu-Glu se aplicó una estrategia similar, utilizando los oligonucleótidos FW-6GAG6REE y RV6GAG6REE.

Transformación de levadura y clonación *in vivo*. Se optimizó un protocolo descrito previamente para todas las construcciones de plásmidos y se representa en la fi-

gura 1 (Kitazono 2011). El plásmido pRS416GPD se linealizó usando la enzima de restricción *Bam*HI (Promega) y se desfosforiló usando fosfatasa antártica® (NEB). Para cada transformación, el plásmido linealizado y desfosforilado se mezcló con cada fragmento a clonar en una proporción molar de 6:1, para una cantidad total de 200 ng.

Saccharomyces cerevisiae fue transformada con estas mezclas utilizando un protocolo basado en acetato de litio y choque térmico (Guthrie and Fink 2002). Los transformantes se cultivaron en medio sólido sintético sin uracilo (-URA) durante tres días y a 30 °C.

Para la amplificación y purificación de todos los plásmidos, se aisló ADN total de levadura y éste fue utilizado para transformar células competentes TOP10 de *Escherichia coli* utilizando protocolos convencionales. La construcción correcta de todos los plásmidos se confirmó mediante análisis de secuenciación de nucleótidos (Macrogen Inc. - Corea).

Ensayo de resistencia al hierro. El ensayo de resistencia se basó en la capacidad de los transformantes para crecer y formar colonias en medio sintético carente de uracilo (-URA) que incluyeron 3mM FeCl₃, con incubaciones a 30 °C durante tres días. Para las pruebas de dilución en serie los transformantes se cultivaron primero en caldo -URA a 30 °C durante cuatro días. Las células agregadas fueron separadas mediante sonicación de 4 a 5 pulsos, las diluciones en serie se hicieron con agua esterilizada, y se colocaron alícuotas de 4 µL de éstos en los diferentes medios. Las placas resultantes fueron incubadas a 30 °C durante tres días.

Resultados

La estrategia de clonación *in vivo* en *S. cerevisiae* permite la construcción eficiente de plásmidos y produce transformantes que pueden ser inmediatamente analizados (Fig. 1). Esta estrategia puede adaptarse fácilmente a distintas aplicaciones como la construcción de bibliotecas de plásmidos. En este estudio, se aplicó la clonación *in vivo* para la construcción de una biblioteca

de plásmidos semialeatorios que permitió la síntesis de oligopéptidos con seis repeticiones, cada una con un aspartato o glutamato en la primera y segunda posición, y una leucina en la tercera (Asp/Glu-Asp/Glu-Leu) (Fig. 2). Adicionalmente, se construyeron una serie de plásmidos con secuencias que codifican para un oligopéptido con una, tres, y cuatro a seis repeticiones Arg-Glu-Glu (Figs. 2 y 3). Para todos estos estudios se usó el mutante *ccc1*, que carece de la proteína que le permite transportar el exceso de hierro hacia la vacuola como un mecanismo de detoxificación (Li et al. 2001). Por esta razón, la cepa mutante presenta mayor sensibilidad al hierro y puede ser usada eficientemente para investigar los efectos de las proteínas o péptidos quelantes.

Construcción de una biblioteca de plásmidos semialeatorios para la síntesis de oligopéptidos con seis repeticiones (Asp/Glu-Asp/Glu-Leu). Para la construcción de una biblioteca de plásmidos es crucial

que se logre primero cantidades suficientes de los distintos fragmentos de ADN a ser clonados. Un hallazgo clave en este estudio fue que era necesario minimizar el número de ciclos para preservar la diversidad de los fragmentos (Fig. 2A). Pese a que el protocolo de PCR implicó dos ciclos de amplificación, se logró un rendimiento significativo y se produjeron fragmentos del tamaño esperado (180 pb, Fig. 4A). El producto de PCR obtenido y el plásmido pRS146GPD linealizado fueron usados para transformar la cepa de levadura *ccc1*. Se seleccionaron tres transformantes (DE-1, DE-2 y DE-3) para evaluar la resistencia al FeCl_3 en comparación con un transformante que portaba un plásmido vacío ("C") y uno que expresaba la subunidad H1 de ferritina de soya ("FerH1", Fig. 4B). Finalmente, los plásmidos purificados se sometieron a análisis de secuenciación de nucleótidos, lo que demostró que la estrategia permite la generación eficiente de oligopéptidos semialeatorios (Fig. 5).

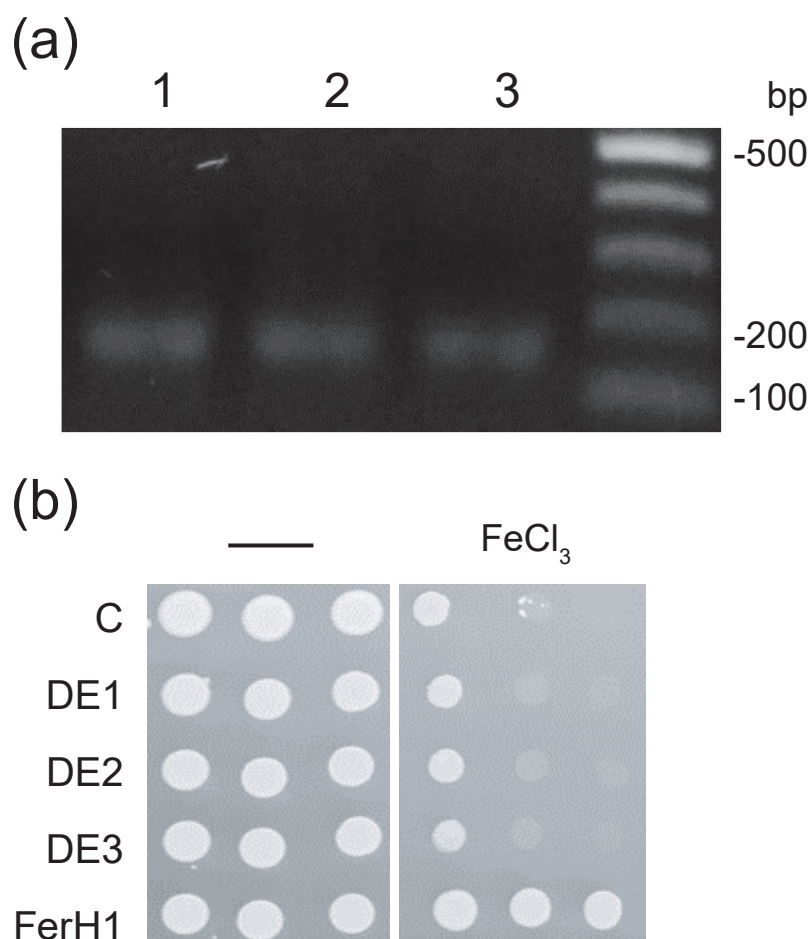


Figura 4. Productos de PCR que permiten la generación de los péptidos semialeatorios Asp/Glu y el ensayo de resistencia a hierro. (a) Tres resultados representativos de las amplificaciones por PCR que permiten la generación de los fragmentos a clonar. Cada carril se cargó con 4 μL de una reacción de PCR independiente. Los fragmentos generados y el plásmido pRS416-GPD linealizado se usaron para cotransformar células de levadura para permitir la clonación in vivo. (b) Se analizó el crecimiento de tres transformantes de levadura seleccionados en medios sintéticos que carecían de uracilo con o sin cloruro férrico (FeCl_3) 3 mM. Se incluyeron otros dos transformantes como controles, uno albergó un plásmido vacío (C) y el otro, el mismo plásmido que porta el gen que codifica para la subunidad H1 de la ferritina de soya (FerH1).

Posiciones	1	2-3	4	5-6	7	8-9	10	11-12	13	14-15	16	17-18	19	20	Número posible de secuencias
Codones	ATG	GAN	TTG	GAN	TTG	GAN	TTG	GAN	TTG	GAN	TTG	GAN	TTG	TAA	
Número de codones posibles	1	4-4	1	4-4	1	4-4	1	4-4	1	4-4	1	4-4	1	*	16 777 216
Aminoácidos codificados	M	D/E	L	D/E	L	D/E	L	D/E	L	D/E	L	D/E	L	*	
Número de posibles aminoácidos	1	2-2	1	2-2	1	2-2	1	2-2	1	2-2	1	2-2	1	*	4 096

DE-1 DDL**E**DLE**D**LE**D**LDELD**D**L
 DE-2 DELE**E**LE**D**LE**D**LDDLE**D**L
 DE-3 DELE**D**L**D**LE**D**LE**E**L**D**L

Figura 5. Diversidad de la biblioteca de plásmidos semialeatorios para la producción de oligopéptidos con residuos Asp o Glu. El panel superior muestra la gran diversidad que se podría lograr con la estrategia seguida, que permitió la construcción de oligopéptidos semialeatorios de 19 residuos. Los fragmentos de PCR obtenidos (Figura 4a) incluyen secuencias que podrían codificar un total de 4096 oligopéptidos diferentes, en los que después del primer residuo de metionina, hay un aspartato o un glutamato en las posiciones 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11,12,14,15, 17 y 18. Todas las demás posiciones incluyen residuos de leucina. Tres plásmidos (DE-1, DE-2 y DE-3) fueron seleccionados para estudios adicionales, y el análisis de secuenciación de nucleótidos permitió inferir las respectivas secuencias de aminoácidos.

Construcción de plásmidos para la síntesis de oligopéptidos con repeticiones Arg-Glu-Glu.

La estrategia aplicada para la síntesis de los oligopéptidos Arg-Glu-Glu también resultó muy eficiente. Las longitudes de los productos de PCR esperados para las secuencias codificantes para un tripéptido Arg-Glu-Glu y aquellos con tres, cuatro, cinco o seis repeticiones (Gly-Ala-Gly-Arg-Glu-Glu) fueron 135, 180, 198, 216 y 234 pb, respectivamente. La generación de los dos primeros productos fue posible usando combinaciones de los oligonucleótidos EXTrv y REEFw o 3GAG3REE (Tabla 1), en reacciones de PCR separadas (carriles 1 y 2 en la Fig. 6A). Para generar los últimos tres productos, solo se necesitó una única reacción de PCR, utilizando los oligonucleótidos FW6GA-G6REE y RV6GAG6REE (Fig. 3 y carril 3 en la Fig. 6A). Siguiendo esta estrategia, la generación de los fragmentos a clonar fue altamente eficiente y consistente, y permitió generar productos de los tamaños esperados (135, 180 y 198-234 pb).

Los productos de la PCR y el plásmido pRS416GPD linealizado se utilizaron para transformar la cepa *ccc1*. Se seleccionó un transformante de cada mezcla para estudios posteriores. Sin embargo, no se observó diferencias en su crecimiento en medios que contenían FeCl₃ (Fig. 6B). La correcta construcción del plásmido se verificó mediante análisis de secuenciación de nucleótidos, que también confirmó que el inserto en el plásmido pREEx4 codificaba para un oligopéptido con cuatro repeticiones (Gly-Ala-Gly-Arg-Glu-Glu).

Discusión

La estrategia de clonación empleada en este estudio permitió la construcción rápida y eficiente de los plásmidos deseados y el análisis inmediato de los genes expresados.

Como prueba de concepto, se generó una colección de oligopéptidos Asp/Glu-Asp/Glu-Leu semialeatorios, y también se seleccionaron los oligopéptidos Arg-Glu-Glu con capacidad reportada para unirse al hierro.

La eficiencia de la clonación fue alta, con más del 50% de las colonias mostrando una clonación exitosa en la mayoría de los casos (no mostrado). Debido a esto, se logró fácilmente la construcción de la biblioteca de plásmidos semialeatorios. Asimismo, también se logró la construcción de plásmidos que contenían secuencias codificantes específicas, y esto incluyó la generación de oligopéptidos con tres y cuatro a seis repeticiones (Gly-Ala-Gly-Arg-Glu-Glu).

En la construcción de una biblioteca aleatoria o semialeatoria, además de la alta eficiencia de la clonación *in vivo* en *S. cerevisiae*, también es importante preservar su diversidad y conseguir secuencias homólogas flanqueantes que tengan al menos 45 pb de longitud (Kitazono 2009). Las estrategias aplicadas de PCR permitieron la generación de dichos fragmentos con alto rendimiento, pese a que los ciclos de amplificación se redujeron a solo dos (Fig. 2).

En general, se espera que la presencia de péptidos quelantes de hierro cause un aumento en la resistencia al tricloruro férrico, permitiendo a su vez incrementar la acumulación del metal en las células. Sin embargo, los oligopéptidos DE-1, DE-2 y DE-3 no confirieron una mayor resistencia al tricloruro férrico, lo que indica que sería necesaria una secuencia particular de aminoácidos para ver esa propiedad (Fig. 4B) y/o modificaciones en los ensayos de resistencia a emplear. Por otro lado, la estrategia de clonación aplicada también permitió la construcción eficiente de los plásmidos necesarios para la síntesis de los oligopéptidos que contenían una, tres o cuatro repeticiones Arg-Glu-Glu, con capacidad reportada de unión al

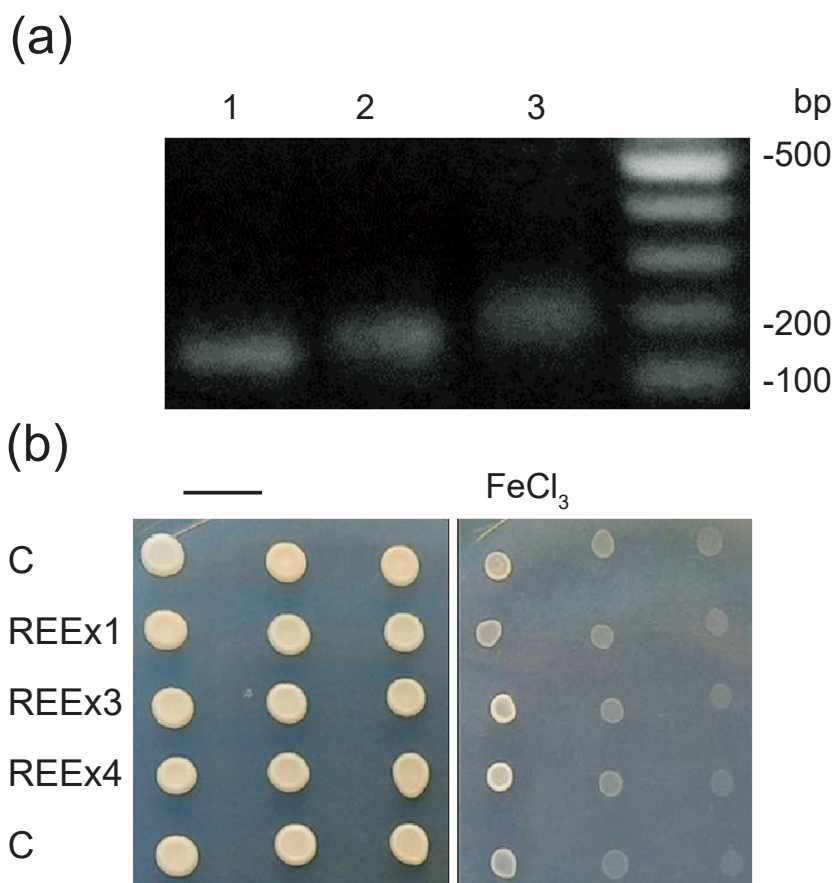


Figura 6. Productos de PCR que permiten la generación de los oligopéptidos Arg-Glu-Glu y ensayo de resistencia a hierro. (a) Resultados representativos de las amplificaciones por PCR que permiten la generación de los fragmentos a clonar, que codifican para oligopéptidos con una (carril 1), tres (carril 2), o de cuatro a seis (carril 3) repeticiones REE. Cada carril se cargó con 4 μ L de una reacción de PCR independiente. (b) Se analizó el crecimiento de tres transformantes de levadura seleccionados en medios sintéticos que carecían de uracilo, con o sin cloruro férrico (FeCl_3) 3 mM. Se utilizaron como controles transformantes con un plásmido vacío (C).

hierro (Xiao et al. 2016). Estos oligopéptidos no incrementaron la resistencia de los transformantes de levadura al hierro, lo que también sugiere que el efecto es específico a determinadas condiciones y/o que el ensayo no es adecuado para permitir su demostración (Fig. 6). Sin embargo, la estrategia de clonación aquí reportada será aplicada para estudiar más a fondo los oligopéptidos quelantes de hierro reportados y continuar la búsqueda de nuevas secuencias con esta capacidad en la levadura.

Este estudio demostró la alta eficiencia de un método que permite la producción eficiente de oligopéptidos de secuencias conocidas o semialeatorias en la levadura *S. cerevisiae*. Además de la aplicación de la clonación *in vivo* para la construcción de bibliotecas de plásmidos semialeatorios, se describe un protocolo de PCR que produce las cantidades requeridas de fragmentos de alta diversidad con sólo dos ciclos de amplificación.

Literatura citada

- Allen LH. 2002. Iron supplements: Scientific issues concerning efficacy and implications for research and programs. *The Journal of Nutrition*. 132(4):813S-819S. <https://doi.org/10.1093/jn/132.4.813S>
- Bloor SR, Schutte R, Hobson AR. 2021. Oral iron supplementation-gastrointestinal side effects and the impact on the gut microbiota. *Microbiology Research*. 12(2):491-502. <https://doi.org/10.3390/microbiol-res12020033>
- Caetano-Silva ME, Cilla A, Bertoldo-Pacheco MT, Netto FM, Alegría A. 2018. Evaluation of in vitro iron bioavailability in free form and as whey peptide-iron complexes. *Journal of Food Composition and Analysis*. 68:95-100. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.03.010>
- Chalamaiah M, Keskin Ulug S, Hong H, Wu J. 2019. Regulatory requirements of bioactive peptides (protein hydrolysates) from food proteins. *Journal of Functional Foods*. 58:123-129. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.050>
- Chang Y-J, Jo M-Y, Hwang E-H, Park C-U, Kim K-S. 2005. Recovery from iron deficiency in rats by the intake of recombinant yeast producing human h-ferritin. *Nutrition*. 21(4):520-524. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2004.07.016>
- de la Hoz L, Ponezi AN, Milani RF, Nunes da Silva VS, Sonia de Souza A, Bertoldo-Pacheco MT. 2014. Iron-binding properties of sugar cane yeast peptides. *Food Chemistry*. 142:166-169. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.133>

- de Llanos R, Martinez-Garay CA, Fita-Torro J, Romero AM, Martinez-Pastor MT, Puig S. 2016. Soybean ferritin expression in *Saccharomyces cerevisiae* modulates iron accumulation and resistance to elevated iron concentrations. *Appl Environ Microbiol.* 82(10):3052-3060. <https://doi.org/10.1128/AEM.00305-16>
- Georgieff MK, Krebs NF, Cusick SE. 2019. The benefits and risks of iron supplementation in pregnancy and childhood. *Annual Review of Nutrition.* 39(1):121-146. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-082018-124213>
- Gueldener U, Heinisch J, Koehler GJ, Voss D, Hegemann JH. 2002. A second set of loxp marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 30(6):e2. <https://doi.org/10.1093/nar/30.6.e23>
- Guo L, Harnedy PA, Li B, Hou H, Zhang Z, Zhao X, FitzGerald RJ. 2014. Food protein-derived chelating peptides: Biofunctional ingredients for dietary mineral bioavailability enhancement. *Trends in Food Science & Technology.* 37(2):92-105. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.02.007>
- Guthrie C, Fink GR. 2002. Guide to yeast genetics and molecular and cell biology, part c. Gulf Professional Publishing.
- Kitazono AA. 2009. Improved gap-repair cloning method that uses oligonucleotides to target cognate sequences. *Yeast.* 26(9):497-505. <https://doi.org/10.1002/yea.1680>
- Kitazono AA. 2011. Optimized protocols and plasmids for in vivo cloning in yeast. *Gene.* 484(1):86-89. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.06.006>
- Kosman DJ. 2003. Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. *Molecular microbiology.* 47(5):1185-1197. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03368.x>
- Kyyaly MA, Powell C, Ramadan E. 2015. Preparation of iron-enriched baker's yeast and its efficiency in recovery of rats from dietary iron deficiency. *Nutrition.* 31(9):1155-1164. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2015.04.017>
- Li B, He H, Shi W, Hou T. 2019. Effect of duck egg white peptide-ferrous chelate on iron bioavailability in vivo and structure characterization. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 99(4):1834-1841. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9377>
- Li L, Chen OS, Ward DM, Kaplan J. 2001. Ccc1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *Journal of Biological Chemistry.* 276(31):29515-29519. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103944200>
- Lv Y, Liu Q, Bao X, Tang W, Yang B, Guo S. 2009. Identification and characteristics of iron-chelating peptides from soybean protein hydrolysates using IMAC-Fe³⁺. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 57(11):4593-4597. <https://doi.org/10.1021/jf9000204>
- Ma X, Liu C, Song W, Che S, Wang C, Feng X, Li B, Dai Y. 2019. Evaluating the efficacy of a ferrous-ion-chelating peptide from alaska pollock frame for the improvement of iron nutritional status in rats. *Food & Function.* 10(8):4888-4896. <https://doi.org/10.1039/C9FO00310J>
- Masuda T, Goto F, Yoshihara T. 2001. A novel plant ferritin subunit from soybean that is related to a mechanism in iron release. *Journal of Biological Chemistry.* 276(22):19575-19579. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011399200>
- Mumberg D, Müller R, Funk M. 1995. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene.* 156(1):119-122. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00037-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00037-7)
- Orbegozo J, Abanto M, García R, Ramírez P. 2008. Identificación molecular de *Pichia guilliermondii* aislada de aguas ácidas de minas en el Perú y su resistencia a metales pesados. *Revista Peruana de Biología.* 15(1):91-95. <https://doi.org/10.15381/rpb.v15i1.1681>
- Scott JK, Craig L. 1994. Random peptide libraries. *Curr Opin Biotechnol.* 5(1):40-48. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(05\)80068-0](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(05)80068-0)
- Sun X, Sarteshnizi RA, Boachie RT, Okagu OD, Abioye RO, Pfeilsticker Neves R, Ohanenye IC, Udenigwe CC. 2020. Peptide-mineral complexes: Understanding their chemical interactions, bioavailability, and potential application in mitigating micronutrient deficiency. *Foods.* 9(10):1402. <https://doi.org/10.3390/foods9101402>
- Thomas BJ, Rothstein R. 1989. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell.* 56(4):619-630. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90584-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90584-9)
- Walters ME, Esfandi R, Tsopmo A. 2018. Potential of food hydrolyzed proteins and peptides to chelate iron or calcium and enhance their absorption. *Foods.* 7(10):172. <https://doi.org/10.3390/foods7100172>
- Xiao C, Lei X, Wang Q, Du Z, Jiang L, Chen S, Zhang M, Zhang H, Ren F. 2016. Effects of a tripeptide iron on iron-deficiency anemia in rats. *Biological Trace Element Research.* 169(2):211-217. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0412-6>

Agradecimientos / Acknowledgments:

Agradecemos al Dr. Sergi Puig por proporcionar los plásmidos de expresión de levadura que albergan el ADNc de ferritina de soya, y al Dr. Taro Masuda, quien originalmente realizó la clonación. Agradecemos a todos los miembros del Laboratorio de Química Biológica y Bioanálisis por su apoyo.

Conflicto de intereses / Competing interests:

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Rol de los autores / Authors Roles:

PEC: investigación, escritura-preparación del borrador original, escritura-revisión y edición.

AIB: investigación, escritura-preparación del borrador original, escritura-revisión y edición.

AAK: conceptualización, metodología, supervisión, adquisición de Fondos, redacción-revisión y edición.

Fuentes de financiamiento / Funding:

Este trabajo contó con el financiamiento de los convenios 004-2020-Fondecyt-BM y 188-2018-Fondecyt-BM, del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico y de Innovación Tecnológica (Fondecyt) y el Banco Mundial. PC fue beneficiaria de una beca y apoyo a la investigación según convenio N° 177-2015-FONDECYT otorgada al Programa de Doctorado en Ciencias e Ingeniería Biológicas de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Aspectos éticos / legales; Ethics / legals:

Las autoras declaran que no violaron ni omitieron normas éticas o legales en esta investigación.