

Valencia, julio 2020



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Trabajo de fin de grado en Biotecnología

Empleo de herramientas biotecnológicas de recableado y edición génica para redirigir flujos metabólicos asociados a la glicolisis en *Saccharomyces cerevisiae*

Autor:

Jaume Ulzurrun de Asanza Sàez

Tutora: Amparo Pascual-Ahuir Giner

Curso:

2019-2020



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural



RESUMEN

Datos del TFG

Autor	Jaume Ulzurrun de Asanza Sàez
Tutor	Dra. Amparo Pascual-Ahuir
Titulación	Grado en Biotecnología
Título del trabajo	<i>“Empleo de herramientas biotecnológicas de recableado y edición génica para redirigir flujos metabólicos asociados a la glicolisis en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>”</i>
Lugar de realización	Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP)
Localidad y fecha	Valencia, septiembre de 2020

Palabras clave:

Ingeniería Metabólica, Glicolisis, CRISPR-cas12, *Saccharomyces cerevisiae*

Resumen

La manipulación dirigida de flujos metabólicos es de gran interés biotecnológico, sobre todo por el empleo industrial de microorganismos como factorías de productos de gran impacto económico; y permite la obtención de valiosos productos dirigidos a la medicina como son vacunas y fármacos, a un coste relativamente reducido. El metabolismo en su conjunto es un sistema complejo, donde las diferentes rutas metabólicas se coordinan y regulan finamente para asegurar la homeostasis celular. La modificación de estos flujos metabólicos en direcciones concretas es el objetivo de muchos grupos de investigación, pero la manipulación racional del metabolismo resulta ser bastante compleja, y requiere la optimización de nuevas estrategias. En este trabajo trataremos de utilizar una tecnología basada en el recableado con sistema cohesina-Dockerina en *Saccharomyces cerevisiae*, que permite la manipulación de la localización celular de proteínas, en nuestro caso trabajaremos con los enzimas glicolíticos Hxk2 y Fba1, y estudiaremos si un cambio de localización de estos enzimas a la membrana externa mitocondrial influye al equilibrio entre fermentación y respiración. Además realizaremos este proyecto comparando dos métodos de edición génica, uno tradicional donde la manipulación se realiza aprovechando la alta tasa de recombinación homóloga en levadura, otro más innovador mediante la tecnología CRISPR-cas12, de gran interés para el empleo de cepas industriales.

Keywords:

Metabolic Engineering, Glycolysis, CRISPR-cas12, *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract:

The directed manipulation of metabolic flows is of great biotechnological interest, mainly due to the industrial use of microorganisms as factories of products of significant economic impact; and it allows obtaining valuable medicine products such as vaccines and drugs, at a relatively low cost. Metabolism as a whole is a complex system, where the different metabolic pathways are finely coordinated and regulated to ensure cellular homeostasis. Modifying these metabolic flows in specific directions is the goal of many research groups. Still, the rational manipulation of metabolism turns out to be quite complicated and requires the optimization of new strategies. In this work, we will try to use a technology based on the rewiring with the cohesin-Dockerin system in *Saccharomyces cerevisiae*, which allows the manipulation of the cellular location of proteins. In our case, we will work with the glycolytic enzymes Hxk2 and Fba1, and we will study if a change in Localization of these enzymes to the mitochondrial outer membrane influences the balance between fermentation and respiration. We will also carry out this project comparing two gene-editing methods: The traditional approach, where manipulation is carried out, taking advantage of the high rate of homologous recombination in yeast. And the more innovative, using CRISPR-cas12 technology, of great interest for the use of industrial strains.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo marca el final de mis estudios en el grado de Biotecnología, un recorrido que me ha ayudado a tanto en el ámbito académico, aportándome las herramientas necesarias para poder progresar en mi futuro profesional; como a nivel personal, mostrándome mis carencias y ayudándome a superarlas para mejorar como persona, trabajador y compañero.

Sin embargo, esto no habría sido posible sin la ayuda de multitud de personas a lo largo de estos cuatro años. En primer lugar, quería agradecer a todos el profesorado de Biotecnología de la UPV por su esfuerzo y dedicación a la hora de impartir sus conocimientos, tanto teóricos como prácticos, estando siempre dispuestos a ayudarnos si fuera necesario. En especial, me gustaría agradecer a Amparo Pascual-Ahuir Giner por confiar en mi y aceptar ser mi tutora en este proyecto. He aprendido mucho gracias a sus explicaciones y su constante atención, y este trabajo no habría sido posible sin su ayuda.

También quería agradecer el apoyo de mis compañeros y amigos, que a lo largo de estos cuatro largos años de estudio han compartido conmigo muchas experiencias, y cuyo apoyo y compañía me han ayudado a seguir adelante más veces de las que puedo contar.

Finalmente, quería agradecer a mis padres el incondicional apoyo que han dado todo este tiempo. Sin ellos, no habría sido capaz de llegar hasta donde estoy ahora mismo, siempre dispuestos a dejarlo todo para ayudarme en los momentos difíciles, incluso cuando yo había perdido la esperanza. Muchas gracias por estar a mi lado, sin vosotros, nada de esto habría sido posible.

ABREVIATURAS

ORF marco de abierto de lectura

MFA análisis de flujo metabólico

GC-MS cromatografía de gas-espectrometría de masas

LC-MS cromatografía líquida-espectrometría de masas

CoFP predictor de función condicional

Hxk2 hexokinasa 2

Fba1 fructosa-bifosfato aldolasa

AlsS α -acetolactado sintasa

AlsD α -acetolactado descarboxilasa

G6P glucosa 6-fosfato

F6P fructosa 6-fosfato

PFK-1 fosfofructoquinasa

DHAP dihidroxiacetona fosfato

G3P gliceraldehído 3-fosfato

NADH nicotinamida adenina dinucleótido

ATP adenosín trifosfato

ADP adenosín difosfato

PEP fosfoenolpiruvato

CRISPR agrupaciones de repeticiones palindrómicas cortas regularmente interespaciadas

ADN ácido desoxirribonucleico

ARN ácido ribonucleico

crARN ARN no codificante

PAM motivo adyacente a los protoespaciadores

tracrARN crARN trans-activante

gARN ARN guía

PI dominio de interacción con PAM

LB medio Luria Bertani

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. USOS DE LEVADURA	1
<i>a. SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	2
2. INGENIERÍA METABÓLICA	3
<i>a. MODIFICACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA</i>	5
3. SISTEMA COHESINA-DOCKERINA	7
4. LA GLICOLISIS.....	8
5. CRISPR	10
OBJETIVOS	12
MATERIAL Y MÉTODOS	13
MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO.....	13
<i>Condiciones de crecimiento de levadura</i>	13
<i>Condiciones de crecimiento de bacteria</i>	13
<i>Cepas, plásmidos y cebadores empleados</i>	13
METODOLOGÍA EMPLEADA	14
1. <i>Transformar E. Coli y purificar</i>	15
2. <i>Obtención del fragmento TAP-DOC</i>	15
3. <i>Obtención de las cepas hxK2-TAP y Fba1-TAP de la colección</i>	16
4. <i>Transformación de las cepas HxK2-TAP y Fba1-TAP con fragmento TAP-DOC. Selección con geneticina:</i>	17
5. <i>Obtención del plásmido pUG27</i>	18
6. <i>Obtención del fragmento OM45-COH</i>	19
7. <i>Obtención de las cepas HxK2-TAP-DOC y Fba1-TAP-DOC</i>	20
8. <i>Transformación de cepas TAP-DOC con fragmento OM45-COH: selección con auxotrofia de histidina</i>	20
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	22
BIBLIOGRAFÍA	25

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Esquema de la glicolisis (Zara et al., 2017)9

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 2. Esquema de trabajo para realizar la transformación en cepas de levadura en transformaciones consecutivas14

Figura 3. Esquema PCR pUG6-DOC con TAP.....16

Figura 4. Esquema PCR pUG27 con fragmentos TAP-DOC.18

Figura 5. Gel de electroforesis procedente de la comprobación de la PCR de pUG27. .19

Figura 6. Esquema PCR pUG27-COH con OM45.....20

Figura 7. Esquema PCR de comprobación.....21

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Figura 8. Esquema de trabajo de la transformación mediante CRISPR (Ciurkot et al., 2019)22

ÍNDICE DE TABLAS

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en el estudio.....13

Tabla 2. Cebadores empleados en el estudio.....14

INTRODUCCIÓN

1. USOS DE LEVADURA

Las levaduras tienen una amplia gama de usos, principalmente en la industria alimentaria (incluyendo vinicultura, elaboración de cerveza, obtención de productos destilados y horneado) y la producción de biomasa (como la obtención de proteínas unicelulares). En los últimos años se ha expandido su uso a otros campos, como la industria del biocombustible y la obtención de compuestos heterólogos. El uso principal de las levaduras proviene de su capacidad metabólica para realizar transformaciones de azúcares a alcohol etílico y dióxido de carbono en condiciones anaerobias.

Además, son capaces de crear un gran número de compuestos de sabor secundarios, lo cual implica atributos organolépticos específicos a distintos productos alimenticios. Sin embargo, su capacidad metabólica no se limita a su actividad fermentativa. Los principales factores que influyen en el metabolismo de las levaduras son la disponibilidad de oxígeno y la fuente de carbono utilizada (Żymańczyk-Duda et al., 2017).

A pesar del uso intensivo de las levaduras en aplicaciones biotecnológicas y fermentación industrial, aún se pueden mejorar, ya que estos procesos no suelen usar las levaduras más adecuadas. Esto se debe a que las levaduras industriales se seleccionaron debido a razones históricas, generalmente poco optimizadas, en lugar de realizarse una selección cuidadosa para cada aplicación específica. Debido a la demandas de una mayor productividad, más rango de uso de sustratos, la producción de compuestos no convencionales y el cambio en las preferencias de los consumidores; ha sido necesario mejorar las cepas industriales empleadas y seleccionar o desarrollar cepas con nuevas propiedades.

Las levaduras representan un grupo muy diverso de organismos, habiendo grandes divergencias genéticas entre cepas de la misma especie. Esta diversidad natural de las levaduras se ha evidenciado gracias a las tecnologías de secuenciación de próxima generación, que permiten una caracterización profunda de la variación genética.

La recombinación sexual es el proceso más importante para la generación de diversidad genética en eucariotas superiores como animales y plantas. En el caso de las levaduras con ciclo de vida sexual, como *Saccharomyces cerevisiae*, ocurre un fenómeno similar, ya que la reproducción sexual puede remodelar el genoma de distintas cepas de levadura, alterando sus características. Aunque la recombinación sexual es considerado el método más “natural”, también se pueden dar apareamientos entre cepas o especies en condiciones industriales, como es el caso de *S. pastorianus*, un híbrido de *S. cerevisiae* y *S. eubayanus*.

A diferencia de las eucariotas superiores, las levaduras, entre ellas *Saccharomyces spp*, son capaces de reproducirse asexualmente. Esta proliferación asexual vegetativa es mucho más prevalente que su alternativa sexual, dándose un ciclo meiótico cada 1000 divisiones mitóticas. Durante los ciclos de reproducción asexual se pueden dar mutaciones espontáneas, como mutaciones puntuales, InDels, inserción de transposones o eventos de recombinación (Steensels et al., 2014).

Aunque las mutaciones espontáneas son una de las principales fuerzas evolutivas y permiten que los organismos se adapten a distintos nichos ecológicos, la mayoría de las mutaciones son neutrales o incluso deletéreas (Drake, 1991). La mayoría de las especies de levadura (incluyendo *S. cerevisiae*) existen en un estado diploide que puede enmascarar los efectos de las mutaciones deletéreas. Esto puede provocar la acumulación de mutaciones durante el crecimiento asexual, lo que lleva a cepas con alta carga de mutación. Sin embargo, debido a la complejidad del ciclo sexual, las levaduras puede filtrar estas mutaciones deletéreas por un proceso denominado “renovación de genoma”.

Además de la recombinación sexual y las mutaciones espontáneas, la transferencia de material genético a través de mecanismos asexuales, denominada transferencia horizontal de genes, puede contribuir a la diversidad genética.

Finalmente, también pueden ocurrir cambios en el nivel de ploidía, lo cual puede tener efectos fenotípicos profundos, como se observa en *S. cerevisiae*, que sufrió un evento de duplicación del genoma completo hace 100 millones de años. Este fenómeno permite el uso de los genes duplicados para compararlos y determinar el efecto de las mutaciones en los genes (Steensels et al., 2014).

La producción anual de *S. cerevisiae* es superior a la del resto de microorganismos industriales, siendo unos dos ordenes de magnitud superior a estos. El valor económico de las bebidas y los alimentos fermentados por levaduras son enormes. Las levaduras son muy importantes en muchos ámbitos, como el científico, alimentario, médico o agrícola. Las levaduras, sobretodo *S. cerevisiae*, se usan cada vez más como hospedadores para al expresión de biocatalizadores de proteínas y rutas de multi-enzimas para la síntesis de productos químicos y compuestos de bajo peso molecular importantes para la medicina o nutrición. Dentro de la agricultura, la levadura se emplean como agentes de biocontrol, biorremediación e indicadores de calidad ambiental (Türker, 2014).

Uno de los usos más importantes de las levaduras es en la biología para la producción de biofármacos. En este ámbito *S. cerevisiae* es una de las especies de levadura predominantes, aunque existen otras que presentan características interesantes, como capacidad de secretar elevada cantidad de proteína (*Pichia pastoris* y *P. angusta*), de crecimiento a alta temperatura (*Kluyveromyces marxianus*) o de producir una elevada cantidad de lípidos (*Yarrowia lipolytica*) (Walker et al., 2018).

Alrededor de un 20% de la producción total de biofármacos se debe al uso de *S. cerevisiae*, entre los cuales se encuentra la insulina (Nielsen, 2013), cuyo descubrimiento en 1922 por Banting, Best y McLeod fue un avance decisivo para la medicina (Quianzon et al., 2012). Otros biofármacos provenientes de esta levadura incluyen la albumina del suero humano, la hirudina, la transferrina humana, el glucagón y precursores de antígenos de superficie de hepatitis (Hou et al., 2012).

a. SACCHAROMYCES CEREVISIAE

S. cerevisiae es la principal levadura utilizada en biotecnología a nivel mundial, principalmente por su fisiología única y su papel clave en muchos procesos de fermentación de alimentos y otros procesos industriales. También es el principal organismo modelo eucariota, ampliamente empleado en estudios fundamentales. Los Saccharomycetales comprenden un grupo diversos de levaduras ascomicetas.

Irónicamente, a pesar de la gran importancia de *S. cerevisiae*, se conoce relativamente poco de su origen y su estilo de vida natural. Las cepas industriales “domesticadas” suelen diferenciarse de las cepas de laboratorio y de las cepas “salvajes” tanto en sus propiedades fisiológicas como genéticas (Johnson et al., 2011).

Además es un organismo muy abundante con un ciclo de vida asexual y genoma pequeño y ampliamente estudiado (Mustacchi et al., 2006), lo que facilita su empleo tanto industrial como para la investigación. Existen otros factores, incluyen un crecimiento rápido en medios minerales suplementados únicamente con vitaminas, muchas fuentes de carbono y nitrógeno para su crecimiento, alta obtención de biomasa a partir de fuentes de carbono, crecimiento aerobio rápido en quimiostatos limitados en glucosa, crecimiento en medios con condiciones anaerobias estrictas, alta eficiencia de esporulación, viabilidad de esporas y eficiencia reproductiva, alta eficiencia de transformación, estabilidad genética y una buena producción de proteínas heterólogas, tanto intra como extracelularmente (van Dijken et al., 2000).

Cabe destacar que posee un genoma pequeño, solamente una cuantas veces mayor que el de *Escherichia coli* y 200 veces menor que el de células de mamífero, esto simplifica de manera importante el análisis genético y molecular del mismo. Una levadura haploide contiene 16 cromosomas variando en tamaño de 200 a 2200 Kb, en los cuales como resultado del análisis de la secuencia del genoma, se localizaron un total de 6183 marcos de lectura abiertos (ORF, open reading frame) y se predijo que de éstos, 5800 correspondían a genes que codificaban para proteínas (Gonzalez et al., 2001).

Gracias a estas características, y al hecho de ser el primer organismo eucariota secuenciado (Johnston, 1996), *S. cerevisiae* ha sido útil para el estudio del resto de eucariotas. Cómo es posible deducir el funcionamiento de las células humanas a partir de levaduras, y muchas de las mutaciones patológicas se dan en genes que presentan ortólogos en levaduras, es posible realizar el estudio de las enfermedades humanas en levaduras modelo (Bolotin-Fukuhara et al., 2010). Entre estas enfermedades se incluyen los desordenes neurológicos, debidos a la agregación y al plegamiento incorrecto de proteínas y, aunque las levaduras carecen de un sistema nervioso, muchas de las rutas de señalización molecular y de las proteínas afectadas por estos desordenes están presentes en las mismas (Bharadwaj, et al., 2010).

S. cerevisiae es empleado específicamente para los estudios mitocondriales sin necesitar la muerte celular, debido a su capacidad de perder genoma mitocondrial, siempre y cuando se le aporte un sustrato fermentativo. Hay que tener en cuenta que las funciones mitocondriales son muy variadas, al igual que el origen nuclear de las patologías; por ello, el uso de las levaduras para estudiar estos defectos es muy importante para comprender la patología humana (Rinaldi et al., 2010).

2. INGENIERÍA METABÓLICA

El campo de la ingeniería metabólica se define como la “mejora directa de la formación de un producto o de las propiedades celulares a través de la modificación de reacciones bioquímicas específicas o la introducción de nuevos genes con el uso de la tecnología de DNA recombinante” (Stephanopoulos et al., 1998) La ingeniería metabólica se diferenció de la ingeniería genética por su enfoque en la investigación

de las propiedades de las rutas metabólicas integradas y las redes genéticas reguladoras, en lugar del estudio individual de genes y enzimas. En este sentido, la ingeniería metabólica precede a la biología de sistemas al liderar la necesidad de una vista sistémica de las rutas metabólicas y de aproximaciones para su funcionamiento óptimo.

La ingeniería metabólica tiene una vertiente industrial, ya que su objetivo es construir microbios que se puedan usar como biocatalizadores para una producción rentable de combustibles y compuestos químicos y farmacéuticos. Por tanto, incluye mucho más que juntar genes para construir una ruta básica funcional, lo cual es otra diferencia de la ingeniería metabólica respecto a otros campos con los que se superpone, como la biología sintética.

Con el objetivo de superproducir compuestos específicos, la primera pregunta a tener en cuenta es que rutas se pueden usar para producir el compuesto de interés. Esta cuestión es la misma que se plantea en la química orgánica sintética, excepto que en este caso las reacciones deben ser favorables termodinámicamente bajo condiciones biológicas, los metabolitos intermedios no deben ser tóxicos, y las enzimas requeridas deben poder ser expresadas por el organismo hospedador. Muchas veces la interconectividad de las reacciones metabólicas es tal que el número de rutas potenciales que ligan sustrato a producto es inmenso, por lo que es necesario comparar las rutas siguiendo distintos criterios.

Una vez se han establecido las posibles rutas, el siguiente paso en el diseño de la producción de fenotipos es analizar la velocidad a la que estas rutas operan y su arquitectura de control, tras lo cual se proponen objetivos para modificar. El principal método para analizar las rutas es la plataforma de análisis de flujo metabólico (MFA), en la que los flujos se determinan bajo distintas condiciones y sus desviaciones de las condiciones de control se usan para identificar pasos cinéticos limitantes (Ostergaard et al., 2000).

Como el metabolismo y la fisiología de los organismos se comprenden mejor si se tienen buenas herramientas, los microorganismos modelos como *E. coli* y *S. cerevisiae* siguen siendo los organismos más utilizados para la bioproducción de diversos productos. La ingeniería metabólica consta de dos partes: un cuidadoso análisis del sistema celular (parte de análisis o fisiología) y la construcción de la cepa recombinante (parte de síntesis). En algunos casos se puede alterar el orden de estas partes, pero en cualquier caso es importante que estas vayan mano a mano.

En la ingeniería metabólica de *S. cerevisiae*, la parte de síntesis es relativamente simple (siempre que los genes a expresar estén disponibles), siendo más limitante la fisiología. Esto se debe a la complejidad del metabolismo celular, ya que los metabolitos podrían interactuar con la expresión de genes y, por tanto, la expresión de genes podría determinar los niveles de metabolitos a través de concentraciones enzimáticas. Además, en muchos casos son necesarias múltiples modificaciones, cada una de las cuales puede presentar cambios inesperados en el metabolismo celular. Los avances en diferentes tecnologías han permitido realizar un análisis mucho más profundo de la fisiología celular. Entre estas tecnologías se encuentran los arrays de DNA para análisis del transcriptoma, electroforesis en gel bidimensional para análisis del proteoma, métodos de cromatografía de gas-espectrometría de masas (GC-MS) y de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) para análisis del metaboloma, experimentos de etiquetado de ^{13}C para el análisis de redes metabólicas,

experimentos de fermentación avanzada con monitoreo on-line de variables de cultivo importantes, y bioinformática (Woolston et al., 2013).

Generalmente, el objetivo de la ingeniería metabólica es maximizar la producción de un químico específico; coincidiendo a veces con maximizar el crecimiento del organismo. Las reconstrucciones de redes metabólicas combinan datos genómicos y metabólicos para una ruta o todo un organismo. Cuando el genoma de un organismo se ha secuenciado, las reconstrucciones metabólicas se pueden construir a partir de bases de datos de secuencias anotadas previamente. Se pueden emplear herramientas de alineamiento local, como BLAST, para alinear secuencias desconocidas a otras anotadas. Mucha de la información empleada por estas reconstrucciones se obtiene de bases de datos como KREGG, BRENDA o Biocyc. Hay programas disponibles para automatizar el proceso de reconstrucciones de redes, como KAAS o GLOBUS, que proporcionan probabilidades cuantitativas para cada anotación. La red reconstruido se visualiza a través de una red de reacción metabólica que muestra la estequiometría de las interacciones bioquímicas (Choi et al., 2019).

Dentro de este ámbito *S. cerevisiae* es uno de los organismos más empleados, como es el caso de la producción de licopeno. El licopeno es un carotenoide que se encuentra en vegetales y frutas, principalmente el tomate, y es un importante antioxidante con efectos fisiológicos positivos, como prevención de cáncer. Debido a esto, tiene un gran valor comercial y se ha intentado llevar a cabo su producción en diferentes organismos como *Blakeslea trispora*, *E. coli*, aunque estos no han sido capaces producir licopeno de forma satisfactoria, ya que requieren inhibir la función ciclasa y provocan la liberación de la endotoxina 14 respectivamente. A diferencia de los organismos anteriores, *S. cerevisiae* sí es capaz de producir licopeno sin efectos no deseados (Shi et al. 2019).

Otro campo en el que el empleo de ingeniería metabólica en *S. cerevisiae* es fundamental es la obtención de biocombustibles como el etanol. El etanol es un biocombustible de primera generación que se usa por si mismo o mezclado con gasolina, y su principal productor es *S. cerevisiae*. Para evitar la competencia con la alimentación, se intenta emplear recursos no alimentarios, como polímeros, dímeros y monómeros; que de manera natural no son metabolizables por *S. cerevisiae*. Sin embargo, gracias a la ingeniería metabólica, se puede modificar la ruta catabólica de la galactosa para permitir la obtención de este biocombustible en la levadura (Hong et al., 2012).

a. MODIFICACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA

La distribución de una proteína en compartimentos celulares depende de (i) los tipos y números de señales de localización en la proteína; (ii) la fuerza relativa de cada señal; (iii) la concentración de moléculas difundidas libremente; y (iv) la concentración y actividad de los receptores de las señales de localización (Bauer et al., 2015).

La localización subcelular de una proteína es de gran importancia, ya que determina el ambiente en el que puede funcionar. Es vital que las proteínas se localicen en lugares donde puedan interactuar con sustratos metabólicos, ácidos nucleicos u otras proteínas; permitiendo que actúen los mecanismos subcelulares que apuntalan el

funcionamiento correcto de las células. En muchos casos la localización subcelular de las proteínas es altamente dinámica, habiendo proteínas que se desplazan continuamente, mientras que otras se localizan en compartimentos subcelulares específicos. Además, hay muchas proteínas que se desplazan en respuesta a señales externas e internas.

Son muchos los factores que controlan donde se localizan las proteínas y se sabe poco de los mismos. En algunos casos las señales codificadas en la secuencia primaria de la proteína controlan su destino final. Esto se puede basar en características psiquicoquímicas, como las etiquetas de secuencias C-terminales HDEL o KDEL. En otros casos, las proteínas se trasladan a un nicho subcelular basándose en interacciones entre compañeros proteicos, como la proteína quinasa PRAK, que contiene una secuencia de localización nuclear determinada por que isoforma de la quinasa p38 aguas arriba se une. El destino de una proteína también está influido por las modificaciones post-transcripcionales, como el splicing alternativo.

Múltiples estudios informan del uso de etiquetas de proximidad para estudiar la localización subcelular de las proteínas en *S. cerevisiae*. La premisa de estos métodos es que una enzima capaz de biotinilar, generalmente biotin ligasa (BirA) o ascorbato peroxidasa (APEX), se usa como etiqueta en ORFs específicos de interés expresados *in vivo*.

La localización proteica se puede estudiar caracterizando la presencia o ausencia, o la diferencia relativa en abundancia, de proteínas de preparados de uno o múltiples orgánulos. Hay que tener en cuenta que las proteínas que pueden encontrarse en más de una localización subcelular no se distinguen mediante este método.

Múltiples estudios han utilizado aproximaciones cuantitativas basadas en correlación de perfiles para mapear el proteoma espacial a escala de célula completa. Estos métodos se basan en la observación de que cuando los lisados celulares se fraccionan, las proteínas que se localizan en el mismo lugar subcelular se comportarán de forma similar.

El etiquetado fluorescente de proteínas ha emergido como una herramienta poderosa para visualizar la localización de proteínas individuales por microscopía a escala de célula completa en *S. cerevisiae*. Las variantes de este método se han usado extensivamente para el mapeo espacial del proteoma en varias condiciones de estrés: produciendo una variante del mapa de referencia (en condiciones de no perturbación) (Nightingale et al., 2019).

Para predecir la localización dependiente de condición y la función bajo distintos estreses, se ha desarrollado un framework de predicción basado una red de proteínas que usa múltiples características tanto de proteínas individuales como de los vecinos con los que interactúa; este framework se denomina predictor de función condicional (CoFP).

CoFP se basa en asumir que las proteínas que interactúan entre ellas y se coexpresan tienen lugares y funciones similares. Para comprobar esto se examinaron los acuerdos funcionales entre pares de proteínas divididas en varios grupos: (i) todos los pares de proteínas que interactúan, (ii) todos los pares de proteínas con correlación positiva

(coeficiente de correlación pearson $\gamma \geq 0,3$) o sin correlación ($-0,3 < \gamma < 0,3$) entre los patrones de expresión; y (iii) pares de proteínas que interactúan con correlación positiva, negativa o sin correlación entre los patrones. Muchas proteínas que interactúan entre sí comparten el mismo proceso (>62%), función (>35%) o localización (>58%) en contraste con lo que se espera si fuese al azar.

Posteriormente se analizaron los perfiles de expresión obtenidos bajo 17 estreses diferentes para calcular la puntuación de coherencia funcional entre los pares de proteínas que interactúan en cada condición. Tras esto, se predijeron las localizaciones y funciones de las proteínas en cada condición. En la mayoría de los casos, la localización y función de la proteína en condición de estrés era consistente con su estado natural.

Las proteínas cuya localización cambiaba más frecuentemente sufrían un desplazamiento de la mitocondria al núcleo, o del retículo endoplasmático al aparato de Golgi (Lee et al., 2014).

En este estudio se va a trabajar con dos proteínas, la hexokinasa 2 (codificada por el gen HXK2) y la fructosa-bifosfato aldolasa (codificada por el gen FBA1).

La hexokinasa 2 se encuentra tanto en el citosol, el núcleo, la mitocondria y la membrana mitocondrial (UNITPROT, 2020b).

La fructosa-bifosfato aldolasa se encuentra en la pared celular, la membrana plasmática, el citosol y la mitocondria (UNITPROT, 2020a).

3. SISTEMA COHESINA-DOCKERINA

La segregación de cromátidas hermanas en polos opuestos de una célula durante su mitosis es un evento muy importante en la célula. La cohesión de las cromátidas hermanas es esencial para preparar las conexiones entre los cinetocoros hermanos y huso cromático. Esta cohesión es posible gracias a un complejo proteico denominado cohesina. Éste presenta un núcleo con dos proteínas Smc, Smc1 y Smc3, y dos proteínas no Smc, Scc1 y Scc3 (Nasmyth et al., 2009). Uno de los posibles ligandos enzimáticos de este complejo es la dockerina (Jobst et al., 2015).

El sistema cohesina-dockerina representa una interacción proteína-proteína de alta afinidad ($K_d 10^{-9}$ - 10^{-10} M), que tiende a ser inespecífica dentro de una especie y específica entre especies distintas. Por tanto, una cohesina de una especie tendría que ser capaz de reconocer y unirse a todas las dockerinas de la misma especie, pero no con las de otra especie distinta. Este sistema presenta dos tipos de interacciones distintas, denominadas de tipo I y de tipo III.

Se ha observado que en las interacciones de tipo I no es necesaria una simetría casi perfecta en la secuencia y en la estructura de los elementos repetidos de la dockerina para llevar a cabo la unión a la cohesina. Además, una dockerina se puede unir a su cohesina ya sea mediante su primer o segundo motivo repetido.

En el caso de las interacciones de tipo III se ha comprobado que los residuos específicos de especie putativos son pequeños e hidrofóbicos. Por otra parte, es posible que la dockerina de tipo III se una a la cohesina de forma no simétrica, actuando ambos segmentos de forma equitativa (WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2020).

Este sistema multi-enzimático, denominado celulosoma, se caracteriza por la proximidad espacial de las celulasas ligadas a su estructura, lo cual proporciona una gran eficiencia degradando sustratos celulósicos. Sin embargo, este no es el único uso al que se limita el sistema, sino que también es importante para la purificación de proteínas, el uso como biosensor o la construcción de complejos enzimáticos estáticos (Kim et al., 2014).

El estudio de la organización espacial de las enzimas metabólicas ha dado lugar al efecto de canalización de sustratos, el cual tiene muchas posibles ventajas, como prevenir la pérdida de intermediarios en rutas con las que se compete, reducir la acumulación de intermediarios tóxicos, proteger intermediarios inestables y aumentar las tasas de conversión (Kim et al., 2016).

Han habido múltiples estudios sobre el uso del celulosoma para alterar la organización espacial de las enzimas. El primer caso fue el de la conversión de piruvato a 2,3-butanodiol mediante el uso de las proteínas α -acetolactado sintasa (AlsS) y α -acetolactado descarboxilasa (AlsD) unidas a dockerina y posteriormente ensambladas a un andamio con múltiples dominios de cohesina. La canalización de sustrato fue exitosa, consiguiendo canalizar α -acetolactato en 2,3-butanodiol, aunque no de forma tan eficiente como la ruta de producción del etanol nativo (Kim et al., 2014). Otro estudio ha tratado de emplear la canalización de sustratos en el flujo de fraccionamiento de piruvato. Para ello se sobreexpresaron enzimas convertidoras de piruvato con dockerina fusionada, consiguiendo aumentar el flujo de piruvato tanto en la producción de lactato como en la de 2,3-butanodiol (Kim et al., 2016).

4. LA GLICOLISIS

La glicolisis es una ruta metabólica y fuente anaerobia de energía que ha evolucionado en casi todos los organismos. El proceso consiste en la oxidación de moléculas de glucosa, consumiéndose una molécula de glucosa y 2 moléculas de ATP para producirse 4 moléculas de ATP, 2 de NADH y 2 piruvatos.

La glicolisis ocurre en el citosol de la célula, siendo capaz de crear ATP con o sin presencia de oxígeno. En el caso de las células que emplean la respiración aerobia como principal fuente de energía, el piruvato se emplea en el ciclo del ácido cítrico y sufre una fosforilación oxidativa para oxidarse en dióxido de carbono y agua. En tejido altamente oxidativo la producción de piruvato es importante para la síntesis de acetil-CoA y de L-malato, sirviendo como precursor de muchas moléculas, como el lactato, alanina u oxaloacetato.

La glicolisis tiene dos fases distintas: la fase de gasto energético y la fase de beneficio energético. Durante la fase de gasto energético se consume la energía en forma de ATP, mientras que durante la fase de beneficio energético se crean las moléculas de NADH y ATP.

En la fase de gasto energético se añaden 2 fosfatos a la glucosa. La glicolisis empieza con la hexokinasa fosforilando la glucosa en glucosa 6-fosfato (G6P), consumiéndose así el primer ATP de forma irreversible. La fosforilación atrapa la molécula de glucosa en la célula al no poder atravesar la membrana celular. A partir de aquí la fosfoglucosa isomerasa isomeriza G6P en fructosa 6-fosfato (F6P). Entonces, se añade el segundo fosfato por la fosfofructoquinasa (PFK-1), que consume el segundo ATP y fosforila la

F6P en fructosa 1,6-bifosfato de forma irreversible. Posteriormente, la fructosa 1,6-bifosfato se lisa en 2 mediante la fructosa bifosfato aldolasa, obteniéndose dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído 3-fosfato (G3P). La DHAP se convierte en G3P mediante triosefosfato isomerasa. DHAP y G3P están en equilibrio, de forma que se transforman entre ellas continuamente.

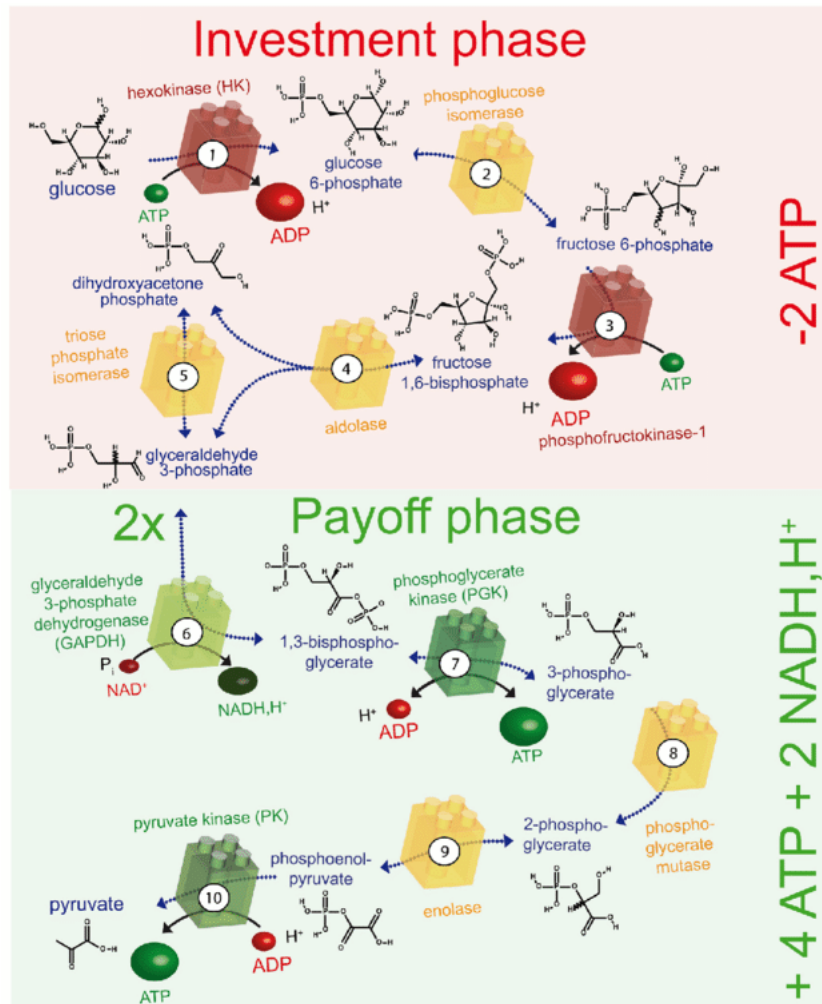


Figura 1. Esquema de la glicólisis (Zara et al., 2017)

En la fase de beneficio energético es importante recordar que hay 2 azúcares de 3 carbonos por cada glucosa. La enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa metaboliza el G3P en 1,3-difosfoglicerato al reducir NAD⁺ en NADH. Posteriormente, el 1,3-difosfoglicerato pierde un grupo fosfato por la fosfoglicerato quinasa, obteniéndose 3-fosfoglicerato y 1 ATP mediante fosforilación a nivel de sustrato. En este momento se han creado 2 ATPs, uno de cada molécula de 3 carbonos. El 3-fosfoglicerato se convierte en 2-fosfoglicerato por la fosfoglicerato mutasa, y una enolasa convierte el 2-fosfoglicerato en fosfoenolpiruvato (PEP). Finalmente, la piruvato quinasa convierte PEP en piruvato y fosforila ADP en ATP, obteniéndose 2 ATPs de forma irreversible. En el caso de las células es fundamental que el NADH se recicle en NAD⁺ para mantener la glicólisis. En el caso de las células aerobias esto se hace mediante la fosforilación oxidativa, mientras que en células anaerobias se consigue por fermentación, ya sea láctica o alcohólica (Chaudry et al., 2019).

Respecto al papel regulatorio de la glucosa, la hexokinasa actúa como un sensor de glucosa conservada en varios organismos, como *S. cerevisiae*, en el que la hexokinasa 2 (Hxk2p) es tanto una enzima glicolítica como un regulador de la transcripción de genes en el núcleo gracias a su localización tanto en el citoplasma como en la mitocondria y el núcleo (Zheng et al., 2020).

5. CRISPR

CRISPR es una familia de secuencias de ADN repetitivas cuyo nombre significa “agrupaciones de repeticiones palindrómicas cortas regularmente interespaciadas” (Jansen et al., 2002). Los sistemas CRISPR-Cas son sistemas inmunes adaptativos que se encuentran en aproximadamente la mitad de las especies bacteriales y en la mayoría de las arqueas. Estos sistemas han evolucionado a lo largo de miles de millones de años para defender a los microbios de ácidos nucleicos foráneos, como el genoma de bacteriófagos. La maquinaria molecular involucrada en la inmunidad CRISPR-cas está codificada por el locus CRISPR en dos conjuntos de componentes genéticos que suelen estar adyacentes en los genomas microbiales; (i) un operón de múltiples genes cas y (ii) un conjunto de CRISPR ARNs no codificantes (crARNs) que incluyen los codificados por una matriz repetitiva CRISPR con espaciadores entre repeticiones cortas CRISPR.

Los sistemas CRISPR-Cas median la inmunidad adaptativa en tres fases distintas: adaptación, procesamiento de crRNA e interferencia. Durante la fase de adaptación, un subconjunto de proteínas Cas denominadas “módulo de adaptación” obtiene e inserta fragmentos de un virus invasor u otro material genético foráneo en una secuencia espaciador al principio de la matriz CRISPR, junto con una nueva repetición CRISPR duplicada. La secuencia del virus o plásmido que coincide con el espaciador adquirido se denomina protoespaciador. En segundo lugar, la matriz de CRISPR se transcribe y procesa en crARNs individuales que contienen un fragmento de ARN correspondiente al encontrado previamente en el virus o plásmido, junto con una porción de la repetición CRISPR. En tercer lugar, durante la fase de interferencia, los crARNs guían el “módulo de interferencia” codificado ya sea por el complejo de subunidades de Cas efector o por una única proteína efectora, destruyendo el invasor (Zang, 2019).

Sin embargo, la importancia de este sistema radica en su uso como herramienta de edición genética. Anteriormente la complejidad de desarrollar proteínas modulares que unan ADN a dianas específicas requería amplio conocimiento de ingeniería de proteínas; pero esto ya no es necesario gracias a que la especificidad de CRISPR-Cas depende de los pares de bases de los ácidos nucleicos en lugar de reconocimiento de proteínas (Pickar-Oliver et al., 2019).

Para llegar a este punto han sido fundamentales una serie de hallazgos. El primero de ellos fue observar la similitud entre las secuencias espaciadores adquiridas y los motivos adyacentes a los protoespaciadores (PAMs). Independientemente de esto se descubrió que de las muchas proteínas Cas, únicamente Cas9 tenía actividad en *Streptococcus thermophilus*; además de ser necesario dos ARN cortos para su funcionamiento. Finalmente se consiguió transferir el sistema CRISPR desde una cepa de bacteria a otra, incluyendo *E. coli* (Zang, 2019). Estudios posteriores demostraron que las enzimas Cas9 pueden reprogramarse para actuar sobre una secuencia de ADN

específica en bacterias, además de simplificar el sistema CRISPR al emplear ARN simple corto formado por la fusión de crARN y crARN trans-activante (tracrARN), denominado ARN guía (gRNA), en lugar de usar ambos por separado.

Hay varios tipos de sistemas CRISPR/Cas, entre los que se encuentran el sistema tipo II, caracterizado por la acción de una proteína Cas específica denominada Cas9 (Jinek et al., 2012). Otro sistema CRISPR/Cas empleado es el tipo V, caracterizado por la presencia de la proteína Cas12a en lugar de la Cas9.

En el sistema tipo II, Cas9 identifica el ADN objetivo usando su dominio de interacción con PAM (PI) mediante el reconocimiento de la secuencia PAM (específicamente 5'-NGG-3') semejante localizada aguas abajo del protoespaciador. Cas9 reconoce los nucleótidos conservados PAM dG-2 y dG-3 gracias a interacciones entre dos residuos de arginina. Esta actividad es regulada por el ARN. Una vez es reconocido el PAM y se pre-organiza la secuencia en una conformación helicoidal A, Cas9 activa la separación de las cadenas de ADN y la formación del bucle-R. El dúplex de ADN objetivo adyacente al PAM se desestabiliza a través de un mecanismo de bloqueo de bucle de fosfato. Los cambios de configuración estabilizan la distorsión estructural en la cadena de ADN deseada y juega un papel importante en el emparejamiento de bases entre el ARN guía y el ADN. Seguidamente, interactuando con la región pre-ordenada, un heterodúplex de ARN-ADN, desplazando la cadena no deseada. El heterodúplex forma una estructura de bucle-R junto con la secuencia no deseada. El bucle-R activa el corte en un lugar específica a 3 pares de bases del PAM, generando principalmente extremos romos.

En el sistema de tipo V, a diferencia de Cas9, Cas12a no necesita tracrARN y se basta con crARN para el corte. Esta proteína cas reconoce el PAM (5'-TNN-3') aguas arriba del protoespaciador, De forma similar a Cas9, Cas12a también sufre grandes reordenamientos estructurales, formando una hendidura para acomodar al heterodúplex ARN-ADN. Cas12a emplea un dominio catalítico RuvC para generar extremos cohesivos 5 nucleótidos después del PAM (Yao et al., 2018).

OBJETIVOS

El metabolismo es un sistema de gran interés, ya que su manipulación permite obtener muchos productos importantes desde un punto de vista económico, ya sea por su valor intrínseco o por reducir los costes de producción de compuestos importantes para la población, como los fármacos. El objetivo de este trabajo es poner a punto una herramienta biotecnológica para la edición genética en *Saccharomyces cerevisiae* mediante el uso del sistema cohesina-dockerina sobre los enzimas glicolíticos Hxk2 y Fba1, viendo si el cambio de localización de estas proteínas a la membrana mitocondrial afecta al equilibrio entre la fermentación y respiración. Para llevar a cabo este objetivo, se van a emplear dos métodos de edición genética distintos:

1. Inicialmente se realizará una técnica tradicional de manipulación que aproveche la alta tasa de recombinación homóloga en levadura.
2. Posteriormente se empleará la tecnología CRISPR-Cas12 debido a su interés al usar cepas industriales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico y condiciones de crecimiento

Condiciones de crecimiento de levadura

Las células de levadura se cultivaron siguiendo métodos estándar (Holz et al., 2003), creciendo en un medio rico YPD o medio mínimo SD a 28 °C en agitación a 200 rpm. El medio YPD presenta glucosa (2%, m/v), peptona bacteriológica (2%, m/v) y extracto de levadura (1%, m/v). El SD contiene glucosa (2%, m/v), base nitrogenada de levadura (YNB, 0,7%, m/v) y ácido succínico (50 mM) a pH 5,5 ajustado mediante Tris.

El medio SD también se usó para seleccionar cepas mediante auxotrofías, suplementando los aminoácidos necesarios: histidina (100 µg/mL), leucina (100 µg/mL), metionina (100 µg/mL) y uracilo (30 µg/mL).

Durante la selección de cepas el medio se complementó con ampicilina.

Condiciones de crecimiento de bacteria

Las células bacterianas crecieron en un medio Luria Bertani (LB) a 37 °C en agitación a 200 rpm. Los componentes de este medio son: extracto de levadura (0,5%, m/v), triptona (1%, m/v) y cloruro sódico (1%, m/v).

De forma similar a las levaduras, en la selección de plásmidos se suplementa el medio con ampicilina (50 µg/mL).

Cepas, plásmidos y cebadores empleados

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en el estudio.

Nombre	Características relevantes	Procedencia
Cepa de <i>Escherichia coli</i>		
DH5α	Células quimiocompetentes eficientes para subclonaje	Thermofisher Scientific
Cepa de levadura		
HXK2-TAP	BY4741 HXK2-TAP-His3	Ghaemmaghami et al., 2003
HXK2-Doc	BY4741 HXK2-TAP-Doc-Kan	En este laboratorio
FBA1-TAP	BY4741 FBA1-TAP-His3	Ghaemmaghami et al., 2003
FBA1-Doc	BY4741 FBA1-TAP-Doc-Kan	En este laboratorio
OM45-Coh	BY4741 OM45-Coh-His3	En este laboratorio
HXK2-Doc-OM45-Coh	BY4741 HXK2-TAP-Doc-Kan, OM45-Coh	En este estudio
FBA1-Doc-OM45-Coh	BY4741 FBA1-TAP-Doc-Kan, OM45-Coh	En este estudio
Plásmidos		
pUG6-Doc	Doc-[loxP-Kan+-loxP]	En este laboratorio
pUG27-Cohx2-Myc	Cohx2-Myc-[loxP-His5+-loxP]	Kim et al., 2016

Tabla 2. Cebadores empleados en el estudio.

Cebadores	Secuencia (5' - 3')	Procedencia
TAPDOC forward	CTAAATGATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACGCG AATCATCAGTCTACTAAATTATACGGCGACGTC	Thermofisher Scientific
TAPDOC reverse	TCGATGAATTTCGAGCTCGTTAAACTGGATGGCGG CGTTAGGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Thermofisher Scientific
KanB	CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT	Thermofisher Scientific
ChkTAPDOC	ATTCCA ACTACTGCTAGCGAG	Thermofisher Scientific
OM45 forward	GATAAGGGTGATGGTAAATTCTGGAGCTCGAAA A AGGACCCTGTAACAACACCACCTGC	En este laboratorio
OM45 reverse	TAGATATATAACGGTATTTTATGTATGCAGCTATA CCCCGCATAGGCCACTAGTGGATC	En este laboratorio
OM45 ChkTAP	ATGGGGTGAAACAGCCGCTC	Thermofisher Scientific

Metodología empleada

El proyecto trata de elaborar una herramienta para la transformación de *S. cerevisiae* basándose en transformaciones consecutivas. Para ello, se elaboró en un esquema de trabajo que indica todos los pasos necesarios para realizar la transformación de cepas, los cuales se desarrollaron a lo largo del proyecto.



Figura 2. Esquema de trabajo para realizar la transformación en cepas de levadura en transformaciones consecutivas

1. Transformar E. Coli y purificar

1. Obtención del plásmido pUG6-DOC.

1. Se deshela la cantidad adecuada de células competentes y se pre-enfrían los tubos de microcentrífuga de 1,5 mL que se requieran.
2. Se pipetea μL alícuotas de células en los tubos pre-enfriados.
3. Se añaden 5 ng de plásmido a cada tubo.
4. Se mezcla suavemente.
5. Se incuban los tubos en hielo durante 30 minutos.
6. Se provoca un choque térmico a las células durante 45 segundos a 42 °C o 2 minutos a 37 °C.
7. Colocar los tubos en hielo al menos 2 minutos.
8. Se añaden 800 μL de medio SOC a cada tubo y se incuba durante 1 hora a 37 °C.
9. Se transfieren los cultivos a tubos de microcentrífuga de 1,5 mL y realizar un spin de 1 minuto a 6000 rpm.
10. Se eliminan 800 μL de sobrenadante y se resuspende el pelet.
11. Se introduce la suspensión en una placa de agar LB con ampicilina.
12. Se incuban las placas toda la noche a 37 °C.

2. Purificación con miniprep:

1. Se obtienen 2 alícuotas de 750 μL de cultivo en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, y se recogen las bacterias centrifugando a 12000 rpm durante 1 minuto; tras lo cual se elimina el sobrenadante.
2. Se resuspende completamente el pelet bacteriano vorteadando en 100 μL de tampón de suspensión.
3. Se añaden 100 μL de tampón de lisis y se mezcla por inversión 5-6 veces a temperatura ambiente.
4. Se añaden 120 μL de tampón de neutralización (acetato potásico 5M, pH 5,5) y se mezcla suavemente por inversión 5-6 veces. Tras esto se incuba la solución a temperatura ambiente durante 3 minutos.
6. Se eliminan los restos bacterianos y de proteínas mediante centrifugación a 12000 rpm durante 2 minutos y se transfiere el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga nuevo.
7. Se añaden 200 μL de isopropanol para precipitar el ADN al sobrenadante, seguido de una mezcla por inversión 10 veces o un vorteadado breve. Tras esto, se incuba a temperatura ambiente durante 1 minuto.
8. Se recoge el ADN por centrifugación a 15000 rpm durante 1 minuto. Inmediatamente después se elimina el isopropanol.
9. Se añaden 500 μL de etanol al 70% al tubo, mezclando por inversión, y se centrifuga el ADN a 14000 rpm durante 1 minuto.
10. Se elimina el etanol y se centrifuga el tubo durante 1 minuto.
11. Se resuspende el ADN en 20-35 μL de agua.

3. Cuantificación en nanodrop.

2. Obtención del fragmento TAP-DOC

1. PCR pUG6-DOC (con cebadores TAPDOC forward y TAPDOC reverse):

1. Se prepara el mix de PCR con 4 μL de Mg^{+} , 5 μL de tampón, 0,5 μL de primer 3', 0,5 μL de primer 5', 5 μL de dNTPs, 2 μL de Taq polimerasa, 2 μL de DNA genómico extraído y agua.
 2. Se utilizan las condiciones de PCR siguientes: 1 ciclo a (i) 95 $^{\circ}\text{C}$ de 3 minutos; 25 ciclos de las fases (ii) a (iv), consistentes en: (ii) 95 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 minuto, (iii) 55 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 minuto y (iv) 72 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 minutos; finalmente, 1 ciclo a (v) 4 $^{\circ}\text{C}$ durante 59 minutos para mantener el producto de PCR el tiempo que sea necesario.
2. Comprobación mediante electroforesis:
1. Se prepara el gel. Para ello, se mezclan 0,35 g de agarosa con 50 mL de TBE 1x, tras lo cual se introduce 1 μL de bromuro de etilio y se deposita en el molde del gel, donde se deja solidificar.
 2. Una vez ha solidificado el gel, se introduce en un equipo de electroforesis, sumergido en TBE 1x. En el primer pocillo del gel se introducen 5 μL de un patrón (Mass Ruler Mix), mientras que en el resto se introducen 10 μL de la mezcla del producto de PCR con 10 μL de LB. Una vez se han introducido todas las muestras, se deja correr el gel a unos 110 V.

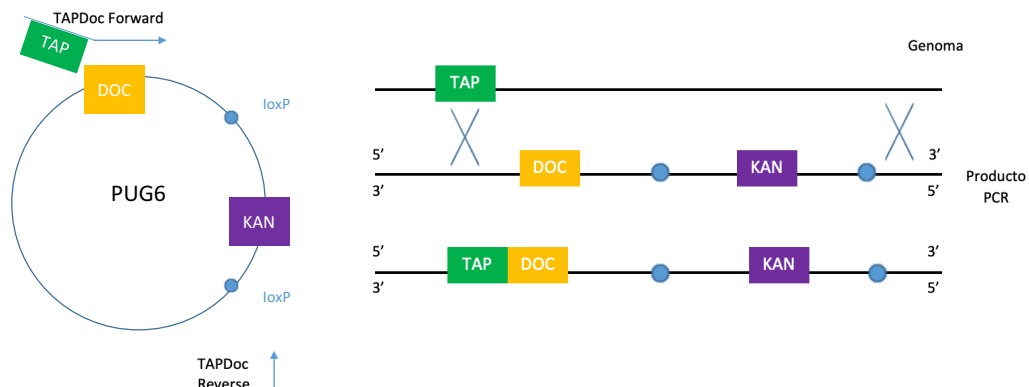


Figura 3. A la izquierda se observa la amplificación con los cebadores TAPDOC Forward y TAPDOC Reverse del fragmento DOC-loxP-Kan-loxP del plásmido pUG6. A la derecha se observa la inserción por recombinación homóloga de TAP en el fragmento anterior

3. Purificación:

1. Se emplea el kit de purificación de PCR QIAquick de Qiagen, con algunas modificaciones. En primer lugar se añaden 5 volúmenes de tampón PE a un volumen de reacción de PCR y se mezclan. La mezcla se introduce en una columna QIAquick, que a su vez está dentro de un tubo colector de 2 mL, y se centrifuga durante 30-60 segundos. Se descarta el sobrenadante, se añaden 750 μL del tampón PE y se vuelve a centrifugar, descartándose otra vez el sobrenadante. Se vuelve a centrifugar durante 1 minuto para eliminar el tampón residual. La columna se transfiere a un tubo de microcentrifuga, y se añaden 15 μL de agua en la membrana de la columna, dejándolo reposar durante 5 minutos. Tras esto, se centrifuga la columna y se repite el proceso.
4. Cuantificación con nanodrop.

3. Obtención de las cepas hxK2-TAP y Fba1-TAP de la colección

1. Despertar cepas de -80 °C. Las cepas pertenecen a la colección TAP (Ghaemmaghami et al., 2003).
 1. Se introduce una pequeña porción del glicerol congelado que contiene las cepas en un medio SD.
 2. Se incuba la placa a 30 °C hasta que las colonias de levaduras alcanzan unos 2 mm de diámetro (en unos 3-5 días).
2. Comprobar genotipo.
3. Mantener en medio SD suplementado con leucina, metionina y uracilo, ya sea líquido o sólido.

4. Transformación de las cepas HxK2-TAP y Fba1-TAP con fragmento TAP-DOC. Selección con geneticina:

1. Transformar las cepas siguiendo el protocolo publicado en *Nature* (Gietz & Schiestl, 2007):
 1. Tras el cultivo celular se realiza la centrifugación de las células a 3000 g durante 5 minutos, resuspendiéndose el pellet obtenido en 1 mL de agua estéril.
 2. De la suspensión celular se transfieren 100 µL a un nuevo eppendorf, que son centrifugados a 13000 g durante 30 segundos, tras lo cual se elimina el sobrenadante.
 3. Se resuspende en la mezcla de transformación descrita anteriormente y se incuba en un baño de agua a 42 °C durante 40 minutos.
 4. Tras la incubación se centrifuga a 13000 g durante 30 segundos, se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento con 200 µL de agua estéril.
 5. Se pipetea el volumen a placas con medio SD empleando geneticina como método de selección, extendiéndose por la placa con una varilla de vidrio, que se esteriliza usando el mechero Bunsen y mojándose en alcohol.
 6. Las placas se incuban durante 3-4 días a 30 °C.
2. Extracción de genómico:
 1. Se dejan crecer 2-5 mL de cultivos YPD durante la noche.
 2. Se centrifuga y elimina el sobrenadante, resuspendiendo el pellet restante en 200 µL de tampón de protoplasto y se deja incubar a 37 °C durante 1 hora.
 3. Se añaden 200 µL de tampón de lisis y se incuba a 65 °C durante 20 minutos.
 4. Se añaden 200 µL de acetato potásico 5 M y se centrifuga durante 3 minutos.
 5. Se añaden 600 µL de isopropanol, se centrifuga y se elimina el sobrenadante, limpiando el pellet con 1 mL de etanol al 70%, tras lo cual se seca y resuspende en 50 µL de agua.
3. PCR con cebadores ChkTAPDOC y kanB:
 1. Se prepara el mix de PCR con 4 µL de Mg⁺, 5 µL de tampón, 1 µL de primer 3', 1 µL de primer 5', 5 µL de dNTPs, 2 µL de Taq polimerasa, 2 µL de DNA genómico extraído y agua.
 2. Se utilizan las condiciones de PCR siguientes: 1 ciclo a (i) 95 °C de 3 minutos; 20 ciclos de las fases (ii) a (iv), consistentes en: (ii) 95 °C durante 1 minuto, (iii) 55 °C durante 1 minuto y (iv) 72 °C durante 2 minutos; finalmente, 1 ciclo a (v) 4 °C durante 59 minutos para mantener el producto de PCR el tiempo que sea necesario.
4. Comprobación mediante electroforesis:

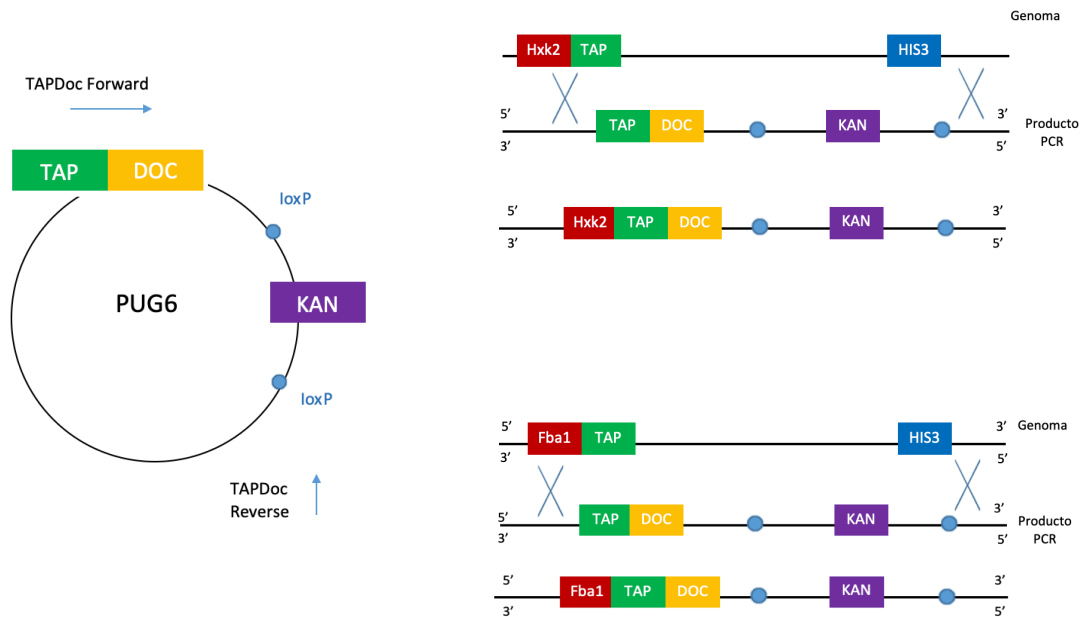


Figura 4. A la izquierda se observa la amplificación con los cebadores Kan B y ChkTAPDOC del fragmento TAP-DOC-loxP-Kan-loxP del plásmido pUG6. A la derecha se observa la inserción por recombinación homóloga de Hxk2 y Fba1 en el fragmento anterior.

5. Obtención del plásmido pUG27

1. Transformar *E. coli* siguiendo el siguiente protocolo:
 1. Descongela las células competentes en hielo.
 2. Añade 50 μL de células competentes al ADN y mézclalos con cuidado 50 μL (sin vortear).
 3. Coloca la mezcla en hielo durante 30 minutos, no lo mezcles.
 4. Choque térmico a 42°C durante 30 segundos, no lo mezcles.
 5. Añade 950 μL de medio a temperatura ambiente al tubo.
 6. Deja el tubo a 37°C durante 60 minutos. Agítalo vigorosamente (250 rpm) o róttalo.
 7. Calienta las placas de selección a 37°C.
 8. Esparce 50-100 μL de las células y la mezcla de ligación en las placas.
 9. Incuba durante la noche a 37°C.
2. Purificar.
3. Extracción del plásmido:
 1. Centrifuga el cultivo bacteriano en un tubo de microcentrífuga durante 2 minutos a 10000 rpm.
 2. Decanta el sobrenadante y añade 200 μL de tampón de resuspensión.
 3. Añade 250 μL de tampón de lisis y mézclalo por inversión.
 4. Añade 350 μL de tampón de lisis y mézclalo por inversión hasta formarse un precipitado
 5. Centrifuga el tubo durante 10 minutos a 10000 rpm y transfiere el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga.
 6. Añade 0,7 volúmenes de isopropanol al sobrenadante e incúbalo a -20 °C durante 15 minutos.

7. Transfiere la solución a una columna de spin.
8. Centrifuga la columna de spin durante 1 minuto a 7000 rpm y descarta el líquido filtrado.
9. Añade 400 μL de tampón de lavado y centrifuga durante 1 minuto a 7000 rpm. Descarta el líquido filtrado y repite el paso.
10. Centrifuga durante 2 minutos a 10000 rpm para eliminar el tampón de lavado residual.
11. Transfiere la columna a un tubo de 1,5 mL, añade 500 μL de tampón de elución y centrifuga durante 1 minuto a 10000 rpm.

6. Obtención del fragmento OM45-COH

1. PCR pUG27-COH (con cebadores OM45 forward y OM45 reverse):
 1. Se prepara el mix de PCR con 4 μL de Mg^{2+} , 5 μL de tampón, 2 μL de primer 3', 2 μL de primer 5', 5 μL de dNTPs, 1 μL de Taq polimerasa, 0,5 μL de DNA genómico extraído y agua.
 2. Se utilizan las condiciones de PCR siguientes: 1 ciclo a (i) 95 °C de 3 minutos; 25 ciclos de las fases (ii) a (iv), consistentes en: (ii) 95 °C durante 1 minuto, (iii) 53 °C durante 1 minuto y (iv) 72 °C durante 2 minutos; finalmente, 1 ciclo a (v) 4 °C durante 59 minutos para mantener el producto de PCR el tiempo que sea necesario.
2. Comprobación mediante electroforesis.

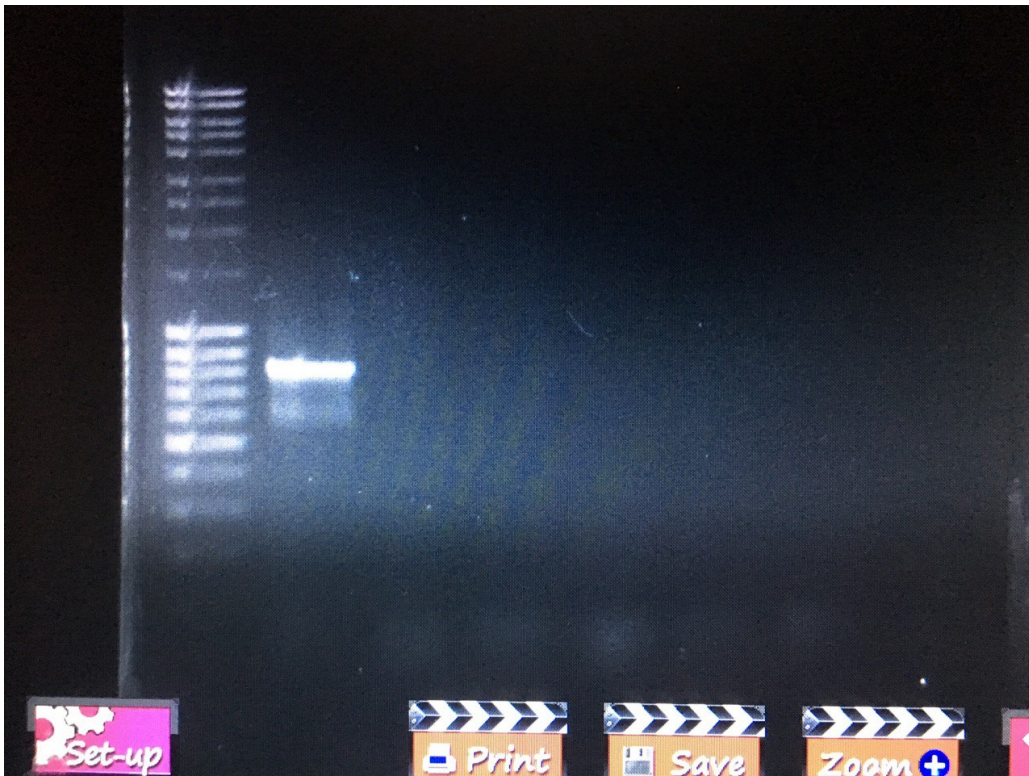


Figura 5. Gel de electroforesis procedente de la comprobación de la PCR de pUG27. Se puede determinar que la PCR fue exitosa debido a la banda correspondiente al fragmento de 2 kpb característica de la cohesina que se observa en el gel.

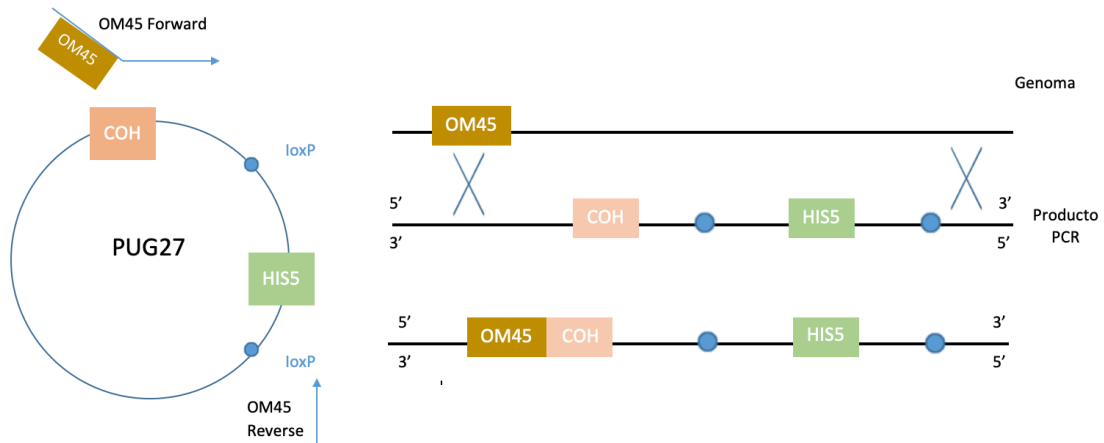


Figura 6. A la izquierda se observa la amplificación con los cebadores OM45 Forward y OM45 Reverse del fragmento COH-loxP-HIS5-loxP del plásmido pUG27. A la derecha se observa la inserción por recombinación homóloga de OM45 en el fragmento anterior.

3. Purificación mediante el kit de purificación QIAquick:

1. Se añaden 5 volúmenes de tampón PE a un volumen de reacción de PCR y se mezclan.
2. La mezcla se introduce en una columna QIAquick, que a su vez está dentro de un tubo colector de 2 mL, y se centrifuga durante 30-60 segundos.
3. Se descarta el sobrenadante, se añaden 750 μ L del tampón PE y se vuelve a centrifugar, descartándose otra vez el sobrenadante.
4. Se vuelve a centrifugar durante 1 minuto para eliminar el tampón residual.
5. La columna se transfiere a un tubo de microcentrifuga, y se añaden 15 μ L de agua en la membrana de la columna, dejándolo reposar durante 5 minutos.
6. Se centrifuga la columna y se repite el proceso.

4. Cuantificación con nanodrop.

7. Obtención de las cepas HxK2-TAP-DOC y Fba1-TAP-DOC

1. Comprobar genotipo y mantener en medio líquido y sólido.

8. Transformación de cepas TAP-DOC con fragmento OM45-COH: selección con auxotrofia de histidina

1. Transformar las cepas siguiendo el protocolo publicado en *Nature* (Gietz & Schiestl, 2007):

1. Tras el cultivo celular se realiza la centrifugación de las células a 3000 g durante 5 minutos, resuspendiéndose el pellet obtenido en 1 mL de agua estéril.
2. De la suspensión celular se transfieren 100 μ L a un nuevo eppendorf, que son centrifugados a 13000 g durante 30 segundos, tras lo cual se elimina el sobrenadante.
3. Se resuspende en la mezcla de transformación descrita anteriormente y se incuba en un baño de agua a 42 $^{\circ}$ C durante 40 minutos.
4. Tras la incubación se centrifuga a 13000 g durante 30 segundos, se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento con 200 μ L de agua estéril.

5. Se pipetea el volumen a placas con medio SD empleando auxotrofia de histidina como método de selección, extendiéndose por la placa con una varilla de vidrio, que se esteriliza usando el mechero Bunsen y mojándose en alcohol.
6. Las placas se incuban durante 3-4 días a 30 °C.
2. PCR de comprobación con cebadores OM45 CHK TAP y kanB.
 1. Se prepara el mix de PCR con 4 µL de Mg⁺, 5 µL de tampón, 0,5 µL de primer 3', 0,5 µL de primer 5', 5 µL de dNTPs, 2 µL de Taq polimerasa, 2 µL de DNA genómico extraído y agua.
 2. Se utilizan las condiciones de PCR siguientes: 1 ciclo a (i) 95 °C de 3 minutos; 20 ciclos de las fases (ii) a (iv), consistentes en: (ii) 95 °C durante 1 minuto, (iii) 55 °C durante 1 minuto y (iv) 72 °C durante 2 minutos; finalmente, 1 ciclo a (v) 4 °C durante 59 minutos para mantener el producto de PCR el tiempo que sea necesario.
3. Comprobar electroforesis.

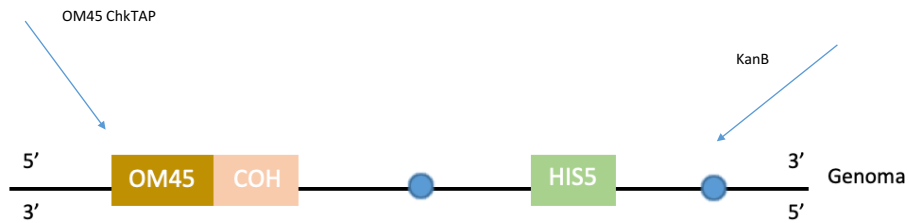


Figura 7. A PCR comprobatoria mediante los cebadores OM45 ChkTAP y KanB del genoma obtenido anteriormente.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Debido a las medidas de cuarentena que se impusieron durante el desarrollo del estudio, no se pudieron obtener resultados de ningún tipo, ya que la investigación se vio paralizada tras realizar las cepas de Hxk2-TAP-DOC y Fba1-TAP-DOC.

Sin embargo, es posible comparar la eficacia de los dos métodos que se iban a emplear, el de transformación tradicional explicado anteriormente y el método CRISPR.

El método de transformaciones consecutivas se basaba en el esquema de trabajo diseñado en el laboratorio presente en materiales y métodos, mientras que el método que se iba a emplear para la transformación por CRISPR se basaba en el protocolo descrito en *Jove* (Ciurkot et al., 2019).

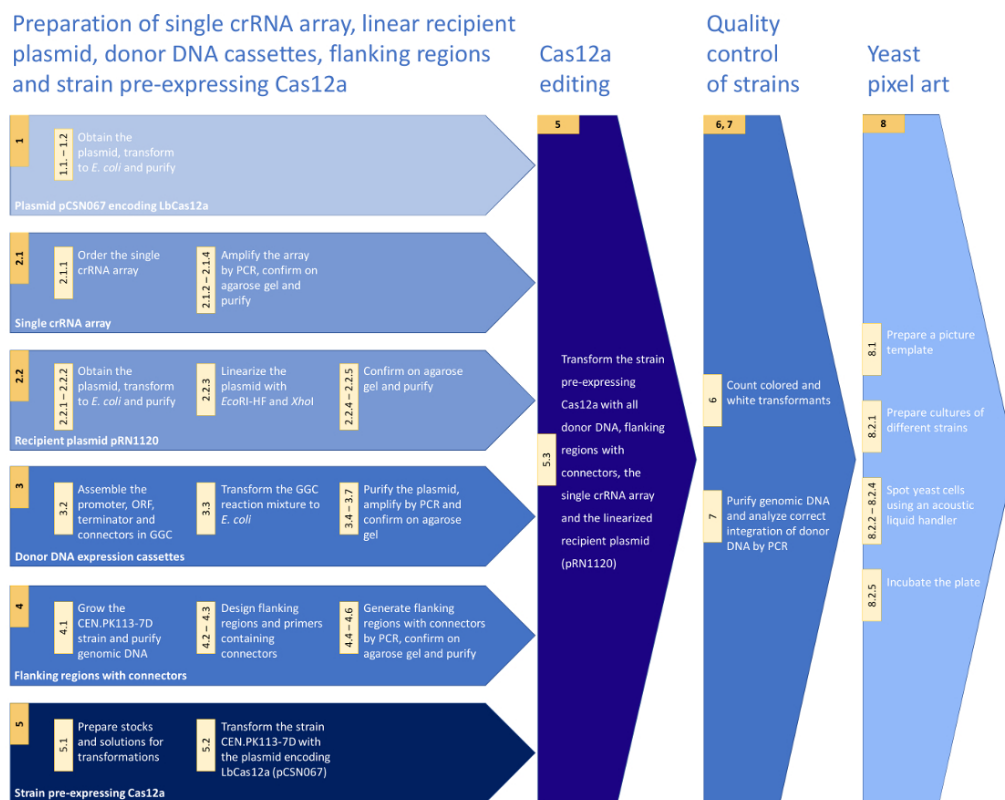


Figura 8. Esquema de trabajo de la transformación mediante CRISPR (Ciurkot et al., 2019)

Empezando con el método tradicional, un factor importante a tener en cuenta es el tiempo necesario para llevarlo a cabo. Cada transformación intermedia necesaria para el proceso conlleva un período de crecimiento, transformación y comprobación; que en conjunto representan más de una semana de trabajo para cada transformación, considerando que el ensayo en sí sea exitoso.

Por otra parte, debido a la gran cantidad de experimentos necesarios, es probable que algunos de ellos sean erróneos, ya sea debido a errores durante la manipulación por parte del investigador, o simplemente por factores externos que no se pueden controlar, como material defectuoso.

Sin embargo, aquí la modularidad del proceso es una ventaja clave en este aspecto, ya que aunque un ensayo no funcione, simplemente se repite el experimento en cuestión o, en el peor de los casos, se tiene retrocede ligeramente en la investigación, ya que un problema a la hora de transformar un plásmido no tiene ningún efecto sobre las transformaciones de levaduras que se han realizado previamente.

Además, los costes de realizar estos ensayos son reducidos, ya que los materiales empleados en los mismos son económicos y reutilizables, siempre que no se produzca una contaminación de los mismos; mientras que los instrumentos requeridos son de uso habitual en un laboratorio, como termocicladores o Nanodrop.

Finalmente, debido a todos los factores anteriores, la técnica de transformación basada en transformaciones consecutivas requiere un amplio conocimiento genético de las proteínas con las que se trabaja para poder diseñar cebadores y emplear los plásmidos adecuados para el objetivo en mente.

Respecto al uso de CRISPR, destaca su reducido coste, ya que los materiales requeridos son similares a los empleados en otros métodos de transformación una vez se pone a punto este sistema.

El problema radica en el procedimiento previo a los ensayos. Antes de poder realizar cualquier transformación, es necesario preparar un protocolo que optimice el uso de CRISPR, por lo que hay que obtener un casete de ARN guía e introducirlo en un vector que contenga el gen Cas12a, que posteriormente se introducirá en las células que se quieren transformar. Esto implica un largo preparativo antes de poder realizar ningún ensayo, aunque una vez se haya conseguido optimizar, ya no es necesario repetir el proceso cuando se quiere realizar otra transformación.

Además, el procedimiento propiamente dicho es mucho más rápido que las alternativas tradicionales, ya que todas las transformaciones se producen a la vez. Aunque hay que tener en cuenta que la rapidez con la que se realiza la transformación se ve parcialmente contrarrestada por la baja eficiencia de transformación comparado con las técnicas tradicionales, por lo que la parte de las cepas que se intenten transformar no sufrirán el efecto deseado.

Centrándonos en los pasos teóricos en si mismos, ambos protocolos tienen el mismo objetivo, pero hay una clara diferencia en los procedimientos necesarios.

En el caso de la transformación tradicional, todos los pasos del proceso forman parte los requisitos para realizar la transformación en si misma, con la excepción del octavo y último paso, que es una comprobación del éxito de la transformación. Este protocolo conlleva una gran cantidad de transformaciones previas antes de alcanzar el objetivo, requiriendo todas una cantidad de tiempo y material similar.

Por otra parte, en el caso de la transformación mediante CRISPR, vemos que el protocolo presenta cuatro partes completamente diferenciadas, tres de ellas correspondientes a la transformación en si misma. Estas partes son: el proceso previo de preparación para poder realizar la transformación, el proceso de transformación en si mismo, y la comprobación de la transformación.

A diferencia del método tradicional y como se ha mencionado previamente, la transformación mediante CRISPR tiene un requisito fundamental: una extensa preparación previa. Esto está reflejado en el primer apartado del esquema de trabajo, que incluye la mayoría de los ensayos realizados, cuyo objetivo es obtener una cepa

que pre-expresa Cas12a y un plásmido que contenga ADN donante, regiones flanqueantes y una matriz de crARN de cadena simple.

Respecto al paso de la comprobación de la transformación, no es de extrañar que sea similar en ambos protocolos, ya que no se ve afectado por el procedimiento empleado para realizar la transformación en si.

Por tanto, se puede concluir que el empleo de un método tradicional basado en transformaciones consecutivas o el basado en CRISPR se reduce principalmente al uso que se le vaya a dar a la cepa en cuestión. Si no se va a realizar múltiples transformaciones de una misma cepa, el método tradicional es más adecuado, ya que no requiere ningún tipo de inversión previa; sin embargo, si el estudio conlleva realizar diferentes transformaciones de una misma cepa, es conveniente emplear el sistema basado en CRISPR, ya que la inversión de tiempo inicial en preparar los elementos fundamentales de la CRISPR es inferior al tiempo necesario para realizar múltiples transformaciones tradicionales.

BIBLIOGRAFÍA

1. BAUER, N., DOETSCH, P. and CORBETT, A., 2015. Mechanisms Regulating Protein Localization. *Traffic*, 16(10), pp.1039-1061.
2. BHARADWAJ, P., MARTINS, R. and MACREADIE, I., 2010. Yeast as a model for studying Alzheimer's disease. *FEMS Yeast Research*, 10(8), pp.961-969.
3. BOLOTIN-FUKUHARA, M., DUMAS, B. and GAILLARDIN, C., 2010. Yeasts as a model for human diseases. *FEMS Yeast Research*, 10(8), pp.959-960.
4. CHAUDHRY R and VARACALLO M. Biochemistry, Glycolysis. [Updated 2019 Apr 21]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482303/>
5. CHOI, K., JANG, W., YANG, D., CHO, J., PARK, D., LEE, S., 2019. Systems Metabolic Engineering Strategies: Integrating Systems and Synthetic Biology with Metabolic Engineering. *Trends in Biotechnology*, 37(8), pp.817-837.
6. CIURKOT, K., VONK, B., GOROCHOWSKI, T., ROUBOS, J. and VERWAAL, R., 2019. CRISPR/Cas12a Multiplex Genome Editing of *Saccharomyces cerevisiae* and the Creation of Yeast Pixel Art. *Journal of Visualized Experiments*, (147).
7. VAN DIJKEN, J., BAUER, J., BRAMBILLA, L., DUBOC, P., FRANCOIS, J., GANCEDO, C., GIUSEPPIN, M., HEIJNEN, J., HOARE, M., LANGE, H., MADDEN, E., NIEDERBERGER, P., NIELSEN, J., PARROU, J., PETIT, T., PORRO, D., REUSS, M., VAN RIEL, N., RIZZI, M., STEENSMA, H., VERRIPS, C., VINDELØV, J. and PRONK, J., 2000. An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(9-10), pp.706-714.
8. DRAKE, J., 1991. A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(16), pp.7160-7164.
9. GHAEMMAGHAMI, S., HUH, W., BOWER, K., HOWSON, R., BELLE, A., DEPHOURE, N., O'SHEA, E. and WEISSMAN, J., 2003. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, 425(6959), pp.737-741.
10. GONZALEZ, A. and VALENZUELA, L., 2001. *Microbiología En Línea*. México: UNAM, Coordinación Científica. *Saccharomyces cerevisiae*.
11. HOLZ, C., PRINZ, B., BOLOTINA, N., SIEVERT, V., BÜSSOW, K., SIMON, B., STAHL, U. and LANG, C., 2003. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 4(2/3), pp.97-108.
12. HONG, K. and NIELSEN, J., 2012. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: a key cell factory platform for future biorefineries. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(16), pp.2671-2690.
13. HOU, J., TYO, K., LIU, Z., PETRANOVIC, D. and NIELSEN, J., 2012. Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 12(5), pp.491-510.
14. JANSEN, R., EMBDEN, J., GAASTRA, W. and SCHOOLS, L., 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43(6), pp.1565-1575.
15. JINEK, M., CHYLINSKI, K., FONFARA, I., HAUER, M., DOUDNA, J. and CHARPENTIER, E., 2012. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096), pp.816-821.

16. JOBST, M., MILLES, L., SCHOELER, C., OTT, W., FRIED, D., BAYER, E., GAUB, H. and NASH, M., 2015. Resolving dual binding conformations of cellulosome cohesin-dockerin complexes using single-molecule force spectroscopy. *eLife*, 4.
17. JOHNSON, E. and ECHAVARRI-ERASUN, C., 2011. Yeast Biotechnology. *The Yeasts*, pp.21-44.
18. JOHNSTON, M., 1996. Genome sequencing: The complete code for a eukaryotic cell. *Current Biology*, 6(5), pp.500-503.
19. KIM, S., BAE, S. and HAHN, J., 2016. Redirection of pyruvate flux toward desired metabolic pathways through substrate channeling between pyruvate kinase and pyruvate-converting enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 6(1).
20. KIM, S. and HAHN, J., 2014. Synthetic scaffold based on a cohesin–dockerin interaction for improved production of 2,3-butanediol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, 192, pp.192-196.
21. LEE, K., SUNG, M., KIM, J., KIM, K., BYUN, J., PAIK, H., KIM, B., HUH, W. and IDEKER, T., 2014. Proteome-wide remodeling of protein location and function by stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(30), pp.E3157-E3166.
22. MUSTACCHI, R., HOHMANN, S. and NIELSEN, J., 2006. Yeast systems biology to unravel the network of life. *Yeast*, 23(3), pp.227-238.
23. NASMYTH, K. and HAERING, C., 2009. Cohesin: Its Roles and Mechanisms. *Annual Review of Genetics*, 43(1), pp.525-558.
24. NIELSEN, J., 2013. Production of biopharmaceutical proteins by yeast. *Bioengineered*, 4(4), pp.207-211.
25. NIGHTINGALE, D., GELADAKI, A., BRECKELS, L., OLIVER, S. and LILLEY, K., 2019. The subcellular organisation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Opinion in Chemical Biology*, 48, pp.86-95.
26. OSTERGAARD, S., OLSSON, L. and NIELSEN, J., 2000. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), pp.34-50.
27. PICKAR-OLIVER, A. and GERSBACH, C., 2019. The next generation of CRISPR–Cas technologies and applications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(8), pp.490-507.
28. QUIANZON, C. and CHEIKH, I., 2012. History of insulin. *Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives*, 2(2), p.18701.
29. RINALDI, T., DALLABONA, C., FERRERO, I., FRONTALI, L. and BOLOTIN-FUKUHARA, M., 2010. Mitochondrial diseases and the role of the yeast models. *FEMS Yeast Research*, 10(8), pp.1006-1022.
30. SHI, B., MA, T., YE, Z., LI, X., HUANG, Y., ZHOU, Z., DING, Y., DENG, Z. and LIU, T., 2019. Systematic Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Lycopene Overproduction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(40), pp.11148-11157.
31. STEENSELS, J., SNOEK, T., MEERSMAN, E., NICOLINO, M., VOORDECKERS, K. and VERSTREPEN, K., 2014. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5), pp.947-995.
32. STEPHANOPOULOS G, ARISTODOU A, and NIELSEN J. Metabolic engineering. San Diego, Calif: Academic Press, Inc.; 1998.

33. TÜRKER, M. 2014. Yeast Biotechnology: Diversity and Applications.
34. UNITPROT. 2020. *FBA1 - Fructose-Bisphosphate Aldolase - Saccharomyces Cerevisiae (Strain ATCC 204508 / S288c) (Baker's Yeast) - FBA1 Gene & Protein*. [online] Available at: <<https://www.uniprot.org/uniprot/P14540>>.
35. UNITPROT. 2020. *HXK2 - Hexokinase-2 - Saccharomyces Cerevisiae (Strain ATCC 204508 / S288c) (Baker's Yeast) - HXK2 Gene & Protein*. [online] Available at: <<https://www.uniprot.org/uniprot/P04807>>.
36. WALKER, R. and PRETORIUS, I., 2018. Applications of Yeast Synthetic Biology Geared towards the Production of Biopharmaceuticals. *Genes*, 9(7), p.340.
37. WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE. Ed Bayer's Group. 2020. *Cohesin-Dockerin Interactions*. [online] Available at: <http://www.weizmann.ac.il/Biomolecular_Sciences/Bayer/research-activities/cohesin-dockerin-interactions>.
38. WOOLSTON, B., EDGAR, S. and STEPHANOPOULOS, G., 2013. Metabolic Engineering: Past and Future. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 4(1), pp.259-288.
39. YAO, R., LIU, D., JIA, X., ZHENG, Y., LIU, W. and XIAO, Y., 2018. CRISPR-Cas9/Cas12a biotechnology and application in bacteria. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 3(3), pp.135-149.
40. ZALA, D., SCHLATTNER, U., DESVIGNES, T., BOBE, J., ROUX, A., CHAVRIER, P. and BOISSAN, M., 2017. The advantage of channeling nucleotides for very processive functions. *F1000Research*, 6, p.724.
41. ZHANG, F., 2019. Development of CRISPR-Cas systems for genome editing and beyond. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 52.
42. ZHENG, L., WEI, S., WU, M., ZHU, X., BAO, X., HOU, J., LIU, W. and SHEN, Y., 2020. Improving Xylose Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* by Expressing Nuclear-Localized Hexokinase 2. *Microorganisms*, 8(6), p.856.
43. ŻYMAŃCZYK-DUDA, E., BRZEZIŃSKA-RODAK, M., KLIMEK-OCHAB, M., DUDA, M. and ZERKA, A., 2017. Yeast as a Versatile Tool in Biotechnology. *Yeast - Industrial Applications*,.