Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Título de la Tesis

“Caracterización funcional de los genes *CrGPATre* y *CrGPATclA* de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* y su relación con la producción de lípidos totales y triacilglicéridos”

Presenta

MARÍA EUGENIA DUARTE COELLO

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2018

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **María Eugenia Duarte Coello** titulado "**Caracterización funcional de los genes *CrGPATre* y *CrGPATclA* de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* y su relación con la producción de lípidos totales y triacilglicéridos"** fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la **Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia** y el **Dr. Santy Peraza Echeverría**, dentro de la Opción de Doctorado después de Maestría, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

_____

Dr. Manuel Martínez Estévez

Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 25 de junio de 2018.

Mérida, Yucatán, México, a 18 de Junio de 2018

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma:

_____

Nombre: María Eugenia Duarte Coello

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Botecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte de los proyectos titulados: “Estudio de genes involucrados en la síntesis de triacilglicéridos (TAGs) en la microalga modelo *Chlamydomonas reinhardtii* y en la microalga oleaginosa *Chlorella saccharophila*: oportunidades para incrementar la acumulación de TAGs en microalgas para la producción de biodiesel” Responsable técnico: Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, Convocatoria de Investigación Científica Básica 2011 SEP-CONACYT, CB-2011-01, Número: 169217. Y “Fortalecimiento de la capacidad de súper-cómputo en el CICY para impulsar los cada vez más numerosos proyectos de investigación relacionados con tecnologías ÓMICAS” Responsable técnico: Dra. Ingrid Aileen O’Connor Sánchez, Convocatoria INFR-2016-01, Número: 269833. En los que participé bajo la dirección de la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia y Dr. Santy Peraza Echeverría.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores de tesis, la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia y el Dr. Santy Peraza Echeverría, que con sus consejos, comentarios y guía me han ayudado a crecer como persona y futura investigadora, tanto en los estudios de la maestría como ahora en el doctorado.

A la Dra. Virginia A. Herrera Valencia, Dr. Santy Peraza Echeverría y la Dra. Ileana Echevarría Machado, por sus contribuciones y sugerencias, asi como por todo el tiempo, paciencia y apoyo brindado para la realizacion y revisión del artículo de doctorado.

A mi comité tutorial integrado por la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, el Dr. Santy Peraza Echeverría, la Dra. Elizabeth Ortiz Vázquez y al Dr. Jorge Santamaría Fernández, por sus consejos, comentarios, sugerencias y apoyo durante los exámenes tutoriales.

A mi comité de examen predoctoral y de tesis, Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, Dr. Santy Peraza Echeverría, Dra. Elizabeth Ortiz Vázquez, Dr. Jorge Santamaría Fernández, Dr. Sergio R. Peraza Sánchez, Dra. Luisa A. López Ochoa, Dra. Rosa Ma. Escobedo Gracia Medrano, Dr. Gregorio del C. Godoy Hernández y al Dr. Juan de la Cruz Tun Garrido, por sus valiosos comentarios durante el examen predoctoral y revisión de la tesis.

A la Q.B.A. Ileana Cecilia Borges Argáez, la Dra. Melissa L. Casais Molina, Dra. Patricia Contreras Pool, la M. en C. Martha Lizama Gasca y el M. en C. Francisco Leonel Espadas Gil, por el apoyo técnico prestado para la realización de este trabajo, además de sus valiosos consejos.

Al Centro de Investigacion Cientifica de Yucatan (CICY), así como a todo el personal del Posgrado de Ciencias Biológicas, por las facilidades brindadas para la realización de esta tesis de doctorado. En especial a Wendy, Alejandra, Landy y Nancy, por que siempre fueron muy amables, y con su alegria y ocurrencias hicieron muy amena mi estancia en el CICY.

Al laboratorio de “Biotecnologia de Microalgas y Cultivos Tropicales” de la Unidad de Biotecnologia y a la Unidad de Bioquimica y Biologia Molecular de Plantas del Centro de Investigacion Cientifica de Yucatan, por las instalaciones y apoyo logístico brindados para el desarrollo de esta tesis.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca (No. 254372) otorgada para los estudios de doctorado, así como al financiamiento del proyecto de Ciencia Básica 169217 y 269833 otorgado para la realización de este proyecto.

Al grupo del laboratorio BTD04 de Biotecnología grupo de “Biotecnología de Microalgas y Cultivos Tropicales”, Any, Rodrigo, Iván, Ileana, Max, Ricardo, Ángeles, Yoly, Paty, Melissa, Miguel Ángel, por su ayuda, consejos, amistad y por esos momentos inolvidables.

A mis Padres Roberto de Jesús Duarte Peraza y María Eugenia Coello Herrera, a mis Hermanos: Eddy, Roberto y Lety, a mi Familia, por todo lo que han hecho por mí, por lo que me han enseñado, por su amor, cariño, comprensión, consejos y apoyo. Sin ustedes los logros no serian lo mismo.

A mi esposo Ernesto, por su apoyo incondicional, comprensión y paciencia.

A Dios, porque es él quien me da la fuerza para aceptar todas aquellas cosas que no puedo cambiar, el valor para cambiar todas aquellas cosas que puedo, y la sabiduría para distinguir entre las dos.

Y por último, a todas aquellas personas que directa o indirectamente fueron parte de la realización de este trabajo de tesis.

A todos ¡¡¡MUCHISIMAS GRACIAS!!!

DEDICATORIA

A mis Padres, Roberto de Jesús Duarte Peraza y María Eugenia Coello Herrera, Hermanos: Eddy Yolanda, Roberto de Jesús y Leticia Elizabeth, Sobrinos: Evolett Isabella y Roberto Leonardo, mi Esposo: Ernesto Palacios Medel, Familia y Amigos quienes me han brindado su apoyo incondicional, cariño, amor y consejos.

PRODUCTOS ACADÉMICOS DERIVADOS DE ESTA TESIS DOCTORAL

ARTÍCULOS PUBLICADOS EN REVISTAS INDIZADAS

Duarte-Coello, M.E., V.A. Herrera-Valencia, I. Echevarría-Machado, M.L. Casais-Molina, S. Peraza-Echeverría (2018). Molecular cloning and functional characterization of two glycerol 3-phosphate acyltransferase from the green microalgae C*hlamydomonas reinhardtii.* Phycological Research.

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

Duarte-Coello, M.E., S. Peraza-Echeverría y V.A. Herrera-Valencia (2015). Caracterización funcional de los genes *CrGPATre* y *CrGPATclA* de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* y su relación con la producción de lípidos totales y triacilglicéridos. Modalidad de carteles en el XVI congreso de estudiantes del CICY, realizado en Marzo del 2015.

Duarte-Coello, M.E., S. Peraza-Echeverría, I. Echevarría-Machado, M.L. Casais-Molina, V.A. Herrera-Valencia. Caracterización funcional de los genes *CrGPATre* y *CrGPATclA* de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* y su relación con la producción de lípidos totales y triacilglicéridos. Modalidad de carteles en el XVII congreso de estudiantes del CICY, realizado en Marzo del 2016.

INDICE

RESUMEN
ABSTRACT
INTRODUCCIÓN.....1
CAPÍTULO I 3
ANTECEDENTES 3
1.1 Lípidos para la producción de biocombustibles 3
1.1.1 Generalidades de biocombustibles a partir de lípidos 5
1.2 Metabolismo de lípidos en microalgas 7
1.2.1 Comparación del metabolismo de triacilglicéridos entre plantas vasculares y microalgas ...7
1.2.2 Síntesis de lípidos, ácidos grasos y triacilglicéridos en microalgas en general.....9
1.3 La enzima Glicerol 3 fosfato aciltransferasa. 11
1.4 Características de las isoenzimas GPAT.....15
1.5 Levaduras mutantes de GPAT para expresión heteróloga.....17
1.6 Patentes relacionadas con la enzima Glicerol 3 fosfato aciltransferasa.....18
1.7 Generalidades de *C. reinhardtii*.....18
1.7.1 Características morfológicas.....18
1.7.2 Clasificación taxonómica.....20
1.7.3 *C. reinhardtii* como modelo de estudio.....20
1.8 Justificación.....22
1.9 Hipótesis.....23
1.10 Objetivos.....23
1.10.1 Objetivo General 23
1.10.2 Objetivos Específicos 23
1.11 Estrategia experimental.....24
CAPÍTULO 2 25
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GLICEROL 3-FOSFATO ACILTRANSFERASA DE LAS PROTEÍNAS CODIFICADAS POR LOS GENES *CrGPATre* Y *CrGPATCIA*. 25
2.1 Introducción.....25
2.2 Materiales y Métodos 27
2.2.1 Cepa de *Escherichia coli*.....27
2.2.2 Cepa de *Saccharomyces cerevisiae.*.....27
2.2.3 Clonación de los genes *CrGPAT* en el vector de transformación.....27
2.2.4. Electroforesis en gel de agarosa.....31

2.2.5 Transformación de *S. cerevisiae* por medio de PEG. 31
2.2.5.1 Preparación de las células de *S. cerevisiae* 31
2.2.5.2 Transformación de las células de *S. cerevisiae* 32
2.2.6 Extracción de ADN genómico. 33
2.2.7 Identificación del transgén por medio de PCR 33
2.2.8 Cultivo y extracción de proteínas totales de *S. cerevisiae* 33
2.2.8.1 Cultivo de *S. cerevisiae* para extracción de proteínas. 34
2.2.8.2 Extracción de proteínas de *S. cerevisiae.* 35
2.2.9 Ensayo enzimático. 36
2.3 Resultados 37
2.3.1 Obtención del vector de transformación pLGTre y pLGTclA. 37
2.3.2 Transformación de *S. cerevisiae* 39
2.3.4 Análisis del "pool" de colonias de *S. cerevisiae* transformados con los vectores pLGTre y pLGTclA. 40
2.3.5 Extracción de proteínas totales y verificación de integridad. 42
2.3.6 Ensayo enzimático. 44
2.4 Discusión 46
CAPÍTULO 3 49
ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE LOS GENES *CrGPATre* Y *CrGPATClA* Y LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS TOTALES Y TRIACILGLICÉRIDOS EN *C. reinhardtii*. 49
3.1 Introducción 49
3.2 Materiales y Métodos 50
3.2.1 Cepa de *C. reinhardtii* y cultivo. 50
3.2.2 Cepa de *Escherichia coli*. 50
3.2.3 Cálculo de la concentración celular en el cultivo de *C. reinhardtii*. 50
3.2.4 Clonación de los genes *CrGPAT* en el vector de transformación 52
3.2.5. Electroforesis en gel de agarosa. 53
3.2.6 Transformación de *C. reinhardtii* por medio de biobalística. 54
3.2.6.1 Preparación de las células. 54
3.2.6.2 Esterilización de las membranas. 54
3.2.6.3 Protocolo de transformación por biobalística. 54
3.2.7. Extracción de ácidos nucléicos. 58
3.2.7.1. Extracción de ADN genómico. 58
3.2.7.2. Extracción de ARN. 59

3.2.8. Detección de clonas transformadas por medio de PCR. 59
3.2.9 Análisis de clonas transformadas mediante Southern blot 60
3.2.9.1 Digestión con la enzima SacII y BamHI 60
3.2.9.2 Southern blot 60
3.2.9.3 Marcaje de la sonda de ADN 61
3.2.9.4 Pre-hibridación e hibridación. 62
3.2.9.5 Detección quimio luminiscente. 62
3.2.10 Síntesis de ADN complementario (ADNc) y RT-PCR. 63
3.2.11 Análisis de expresión génica mediante RT-PCR. 64
3.2.12 Extracción de lípidos totales. 64
3.2.13 Cuantificación de triacilglicéridos. 65
3.3 Resultados 66
3.3.1 Obtención del vector de transformación pcGTRE y pcGTCLA. 66
3.2.2. Transformación de *C. reinhardtii* por medio de biobalística. 68
3.2.3. Análisis de las clonas posiblemente transformadas con el vector pcGTRE. 69
3.2.4. Análisis de número de copias integradas en el genoma de las clonas transformadas con el vector pcGTRE por medio de Southern blot. 72
3.2.5 Análisis de expresión de las clonas transformadas con los vectores pcGTRE. 73
3.2.6 Análisis de la cantidad de biomasa, lípidos totales y TAGs presentes las clonas de *C. reinhardtii* transformadas con el vector pcGTRE. 75
3.2.7. Análisis de las clonas posiblemente transformadas con el vector pcGTCLA. 78
3.2.8. Análisis de número de copias integradas en el genoma de las clonas transformadas con el vector pcGTCLA por medio de Southern blot. 80
3.2.9 Análisis de expresión de las clonas transformadas con el vector pcGTCLA. 81
3.2.10 Análisis de la cantidad de biomasa, lípidos totales y TAGs presentes las clonas de *C. reinhardtii* transformadas con el vector pcGTCLA. 83
3.4 Discusión 88
CAPÍTULO IV 93
4.1 DISCUSIÓN GENERAL 93
4.2 CONCLUSIONES GENERALES. 96
4.3 PERSPECTIVAS 97
BIBLIOGRAFÍA 98
ANEXOS 113
Anexo 1 113
Anexo 2 115

Anexo 3 117
Anexo 4 120
Anexo 5 121
Anexo 6 124
Anexo 7 126

LISTADO DE ABREVIATURAS

5 UTR	Región 5’ no traducible
3 UTR	Región 3’ no traducible
ACP	Acil carrier protein
ADNc	ADN complementario
ADNg	ADN genómico
DGAT	Diacilglicerol aciltransferasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
FAMEs	Ésteres metílicos de ácidos grasos (Del inglés: Fatty acid metil ester)
G3P	Glicerol-3- fosfato
GPAT	Glicerol 3-fosfato aciltransferasa
GRAS	Considerada generalmente como segura (Del inglés: Generally Regarded as Save)
Ha	Hectáreas
Kb	Kilo bases
L	Litros
LiAc	acetato de litio
LPAT	Fosfatasa del ácido fosfatídico
LPAAT	Ácido lisofosfatídico aciltransferasa
NaCl	Cloruro de sodio
ORF	Marco de lectura abierto (Del inglés: Open reading Frame)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDAT	Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase
RE	Retículo endoplásmico
RT	Reacción de la reversa transcriptasa
TAG	Triacilglicérido
TAP	Tris Acetato Fosfato
TLC	Cromatografía de capa fina

Índice de Figuras

Figura 1.1 Reacción de transesterificación. (Hu *et al.* 2008). 5

Figura 1.2 Síntesis de triacilglicéridos (TAGs) en general. GPAT. Glicerol 3-Fosfato aciltransferasa, LPAAT. Ácido lisofosfatídico aciltransferasa, LPAT. Fosfatasa del ácido fosfatídico, DGAT. Diacilglicerol aciltransferasa, CoASH. Coenzima A. (Huang *et al.* 2010). 8

Figura 1.3 Esquema generalizado de la síntesis de triacilglicéridos en plantas (modificado de Snyder *et al.* 2009). 9

Figura 1.4 Vista simplificada de la ruta de la biosíntesis de lípidos, siendo lo ácidos grasos sintetizados en el cloroplasto, mientras que los TAGs en el retículo endoplásmico. ACCase, Acetil-CoA carboxilasa, ENR, enoil-ACP reductasa, FAT, acil-ACP tioesterasa grasa, G3PDH, glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, GPAT, glicerol 3-fosfato aciltransferasa, HD, 3-hidroxiacil ACP deshidratasa, KAR, 3-Ketoacil-ACP reductasa, KAS, 3-ketoacil sintasa, LPAAT, ácido lisofosfatídico aciltransferasa, LPAT, lisofosfatidilcolina aciltransferasa, MAT, malonil-CoA:ACP transacilasa, PDH, complejo piruvato deshidrogenasa, TAG, triacilglicéridos. (Radakovits *et al.* 2010).....10

Figura 1.5 Forma de unión de las GPATs a la membrana. A) Forma de unión de la GPAT9 de *A. thaliana* a la membrana del retículo endoplásmico (Gidda *et al.* 2009) B) GPAT del hígado de rata unida a la membrana de la mitocondria (Gonzalez-Baró *et al.* 2001).....17

Figura 1.6 *Chlamydomonas reinhardtii*. En la figura se observan las diferentes partes de esta microalga: flagelos, núcleo, mitocondria, cloroplasto, entre otros (Merchant *et al.* 2007). 19

Figura 1.7 Estrategia experimental para la caracterización funcional de los genes *CrGPATre* y *CrGPATclA* de la microalga *C. reinhardtii.* 24

Figura 2.1 Plásmidos utilizados: A*)* psGC, *B) CrGPAT* en pGEM-T-easy (representativo de los genes *CrGPATre* y *CrGPATclA,* en el caso de este último tiene el sitio de EcoRI en ambos lados)….28

Figura 2.2 Forma en que ocurre la ligación entre psGC y *CrGPAT* para formar el plásmido *pLGTre* o *pLGTclA* (conteniendo al gen *CrGPATre* y *CrGPATclA*, respectivamente). 29

Figura 2.3 Electroforesis de 2 µL de las muestras purificadas para calcular la relación vector: inserto a usar para la ligación. A) Digeridos con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI. B) Digeridos con la enzima de restricción EcoRI. M = Marcador de 1 Kb (NEB), 1 = *CrGPATre* (1.3 Kb), 3 = *CrGPATclA* (1.2 Kb), 2 y 4 = psGC (9 Kb). 37

Figura 2.4 Análisis de restricción con las enzimas BamHI y/o EcoRI de plásmidos producto de la ligación del vector psGC con los genes *CrGPAT*. M = Marcador de 1 Kb (NEB). A) pLGTRE, bandas esperadas de 9 Kb vector y 1.3 gen *CrGPATre.* B) pLGTCLA, bandas esperadas de 9 Kb vector y 1.2 Kb gen *CrGPATclA.* 38

Figura 2.5 Análisis de restricción con la enzima BamHI de plásmidos pLGTclA para verificar sentido de la clonación. M = Marcador de 1 Kb (NEB). 1-6 = clonas pLGTCLA, bandas esperadas de 8.031 Kb y 1.2 Kb sentido correcto o aproximadamente 9 Kb sentido inverso. 39

Figura 2.6 Cajas de Petri representativas del resultado de la transformación de *S. cerevisiae* con los plásmidos pLGTre (que contiene al gen *CrGPATre)*, pLGTclA (continene al gen *CrGPATclA),* psGC (Vector vacío), cultivados en medio SD/-Leu. C+ = cepa *gat1Δ* cultivada en medio YPD, y C- = cepa *gat1Δ* cultivada en medio deficiente (SD/-Leu). 40

Figura 2.7 Visualización de la integridad del ADNg del "pool" de clonas transformadas de *S. cerevisiae (gat1Δ)*. En el gel se adicionaron 5 µL de cada muestra. M = Marcador de 1 Kb (Invitrogen). 1 = "pool" colonias tranformadas con el vector pLGTre, 2 = "pool" de colonias transformadascon el vector pLGTclA. 41

Figura 2.8 Identificación del transgén en el "pool" de colonias de *S. cerevisiae* por medio de PCR utilizando 500 ng de ADNg. 1 = "pool" colonias transformadas con el vector pLGTre, 2 = "pool" colonias transformadas con el vector pLGTclA, 3 = plásmido pLGTre, 4 = plásmido pLGTclA, 5 = agua ultrapura, M = marcador 2 log Invitrogen. 42

Figura 2.9 Integridad de los extractos protéicos. A) extracto total, B) extracto soluble, C) extracto membranal. 1 = "pool" de colonias transformadas con el vector pLGTre, 2 = "pool" de colonias transformado con el vector pLGTclA, 3 = "pool" de colonias transformado con el vector psGC, 4 = *gat1Δ* (cepa mutante) 5 = BY4742 (cepa silvestre), M = Marcador proteínas BioRad. 43

Figura 2.10 Actividad de GPAT de CrGPATre y CrGPATclA medida por la expresión heteróloga en la levadura mutante *gat1Δ*. A) extracto total, B) extracto soluble, C) extracto membranal. 1 = "pool" de colonias transformadas con el vector pLGTre (conteniendo al gen *CrGPATre*), 2 = "pool" de colonias transformado con el vector pLGTclA (conteniendo al gen *CrGPATclA*), 3 = "pool" de colonias transformado con el vector psGC (vector vacío), 4 = *gat1Δ* (cepa mutante) 5 = BY4742 (cepa silvestre). Diferentes letras minúsculas en la gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 6). 45

Figura 3.1 Cuadros de conteo en la cámara de Neubauer. 51

Figura 3.2 Plásmidos utilizados: A*)* pChlamy4 invitrogen, *B) pcCrGPAT* (representativo de los genes *CrGPATre* y *CrGPATclA* contenidos en el vector pSP124S). 52

Figura 3.3 Protocolo para la preparación de las micropartículas de oro con los plásmidos para el bombardeo. 55

Figura 3.4 A) Colocación de las membranas en los portamacroacarreadores. B) Ajuste de las membranas en los portamacroacarreadores usando una tapa de plástico de tubo de ensayo. 55

Figura 3.5 A) Toma de las partículas de oro, B) Secado de las partículas de oro 56

Figura 3.6 A) Distancia de las muestras bombardeadas. B) Cámara de biobalística. 57

Figura 3.7 A) Cajas a baja intensidad de luz, B) Repisa donde se encuentran a baja intensidad de luz 57

Figura 3.8 Lavado de células. 58

Figura 3.9 Electroforesis de las muestras purificadas (2 µL) para calcular la relación vector: inserto a usar para la ligación. M = Marcador de 1 Kb (NEB), 1 = *CrGPATre* (1.3 Kb), 2 = *CrGPATclA* (1.2 Kb), 3 = pChlamy4 (3.6 Kb). 66

Figura 3.10 Análisis por digestión con las enzimas de restricción EcoRI y XbaI de dos plásmidos producto de la ligación del vector pChlamy4 con los genes *CrGPAT*. M = Marcador de Kb (NEB). 1 = pcGTRE, bandas esperadas de 3.6 Kb vector y 1.3 gen *CrGPATre.* 2 = pcGTCLA, bandas esperadas de 3.6 Kb vector y 1.2 Kb gen *CrGPATclA.* 67

Figura 3.11 Cajas representativas de la transformación de *C. reinhardtii* con los plásmidos pcGTRE, pcGTCLA, pChlamy4*;* Control de antibiótico = cepa silvestre cultivada en medio TAP con Zeocina como agente de selección, y Control del cultivo = cepa silvestre cultivada en medio TAP sin agente de selección..... 68

Figura 3.12 Visualización de la integridad de 5 µL del ADNg de las clonas transformadas con el vector pcGTRE y del control. M = Marcador de 1 Kb (Invitrogen). 1-50 = Clonas RE 1-50; VV = Clona transformada con el plásmido pChlamy4; Cs = Cepa silvestre. 71

Figura 3.13 Identificación de clonas transformadas con el plásmido pcGTRE por medio de PCR. 1-50 = Clonas recuperadas que fueron transformadas con el vector pcGTRE. VV = Clona transformada con el plásmido *pChlamy4*. Cs = Cepa silvestre. C+ = Plásmido pcGTRE. C- = Agua ultra pura. 71

Figura 3.14 Identificación del número de copias presentes en las clonas transformadas con el plásmido pcGTRE. No. = clona transformada, A = clona VV transformada con el plásmido pChlamy4; B = cepa silvestre, C = plásmido pcGTRE 72

Figura 3. 15. Calidad del ARN extraído de las clonas transformadas con el vector pcGTRE (1 µg de ARN). No. = Clona transformada con el vector pcGTRE, pC4.1 = clona transformada con el vector pChlamy4; Cs = cepa silvestre de *C. reinhardtii*. Pureza de todas las muestras = 1.8. 73

Figura 3.16 Análisis de expresión mediante RT-PCR del transgén de las clonas transformadas con el vector pcGTRE. No. = Clona transformada con el vector pcGTRE. Se utilizó el gen de la actina como control positivo (RT+ CrActin) y negativo (RT- CrActin). M= Marcador de peso molecular (2 log, NEB). 74

Figura 3.17 Acumulación de biomasa de las diferentes clonas que expresan de forma recombinante el gen *CrGPATre*. A) Concentración celular. B) Biomasa seca. RE # = clona que expresan de forma recombinante el gen *CrGPATre.* VV = Cepa transformada con el vector vacío. Cs =

Cepa silvestre. Diferentes letras minúsculas en la gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3). 76

Figura 3.18 Acumulación de lípidos y triacilglicéridos de las clonas que expresan de forma recombinante el gen *CrGPATre*. A) Lípido total. B) TAGs totales. C) Porcentaje de lípidos totales por biomasa seca. D) Porcentaje de triacilglicéridos por biomasa seca. E) Porcentaje de triacilglicéridos por lípidos totales. RE # = clona que sobre expresa el gen *CrGPATre*. VV = Cepa transformada con el vector vacío. Cs = Cepa silvestre. Diferentes letras minúsculas en la gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3)..... 78

Figura 3.19 Visualización de la integridad de 5 µL del ADNg de las clonas transformadas con el vector pcGTCLA y del control. M = Marcador de 1 Kb (Invitrogen). 1-20 = Clonas CLA 1-20; VV = Clona transformada con el plásmido pChlamy4. 79

Figura 3.20 Identificación de clonas transformadas con el plásmido *pcGTCLA* por medio de PCR. 1-20 = Clonas recuperadas con este plásmido. pC4.2 = Clona 2 transformada con el plásmido *pChlamy4*. Cs = Cepa silvestre. C+ = Plásmido *pcGTCLA*. C- = Agua ultra pura..... 80

Figura 3.21 Identificación del número de copias presentes en las clonas transformadas con el plásmido pcGTCLA. No. = clona transformada, A = clona VV transformada con el plásmido pChlamy4; B = cepa silvestre, C = plásmido pcGTCLA. 81

Figura 3.22 Calidad de 1 µg del ARN total extraído por medio del protocolo basado en el reactivo de TRIzol de Invitrogen. No. = Clona transformada con el vector pcGTCLA, VV = clona transformada con el vector pChlamy4; Cs = cepa silvestre de *C. reinhardtii*. Pureza de todas las muestras = 1.8.... 82

Figura 3.23 Análisis de expresión mediante RT-PCR del transgén de las clonas transformadas con el vector pcGTCLA. No. = Clona transformada con el vector pcGTCLA. Se utilizó el gen de la actina como control positivo (RT+ CrActin) y negativo (RT- CrActin). M= Marcador de peso molecular (2 log, NEB). 83

Figura 3.24 Acumulación de biomasa de las diferentes clonas que expresan de forma recombinante el gen *CrGPATclA*. A) Concentración celular. B) Biomasa seca. CLA # = clona que sobre expresa el gen *CrGPATclA.* VV = Cepa transformada con el vector vacío. Cs = Cepa silvestre. Diferentes letras minúsculas en la gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3)..... 84

Figura 3.25 Acumulación de lípidos y triacilglicéridos de las clonas que expresan de forma recombinante el gen *CrGPATclA*. A) Lípido total. B) TAGs totales. C) Porcentaje de lípidos totales por biomasa seca. D) Porcentaje de triacilglicéridos por biomasa seca. E) Porcentaje de triacilglicéridos por lípidos totales. RE # = clona que sobre expresa el gen *CrGPATclA*. VV = Cepa transformada con el vector vacío. Cs = Cepa silvestre. Diferentes letras minúsculas en la gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3)..... 87

Índice de Cuadros

Cuadro 1.1 Comparación de cultivos para la producción de biodiésel (Schenk *et al.* 2008)..... 4

Cuadro 1.2 Contenido de lípidos de la masa seca de varias especies de microalgas (Singh *et al.* 2011)..... 6

Cuadro 1.3 Modificaciones genéticas en plantas con genes tipo GPAT para incrementar TAGs o resistencia a factores térmicos..... 15

Cuadro 1.4 Motivos característicos de las GPATs (Lewin *et al.*1999)..... 16

Cuadro 2.1 Oligonucleótidos y temperaturas de alineamiento utilizadas en cada programa de PCR (Duarte, 2013). 33

Cuadro 3.1 Temperaturas de alineamiento utilizadas en cada programa de PCR (Duarte, 2013). 60

Cuadro 3.2 Temperaturas de alineamiento y tamaño de las sondas utilizadas para el Southern blot (Duarte, 2013). 62

Cuadro 3.3 Número de colonias observadas en las placas de la transformación de *C. reinhardtii* con los plásmidos *pcGTRE*, *pcGTCLA* y *pChlamy4* por medio de biobalística..... 69

RESUMEN

Las microalgas han sido propuestas como una fuente alternativa de lípidos, en particular los triacilglicéridos (TAGs) para la producción de biodiésel y bioturbosina, debido a ventajas en su cultivo, y por su capacidad de acumular grandes cantidades de TAGs particularmente bajo condiciones de estrés de nutrientes. Sin embargo, es necesario desarrollar cepas que tengan una mayor productividad de TAGs en condiciones óptimas de cultivo, y para ello es necesario el estudio del metabolismo de los lípidos. En plantas, se sabe que el primer paso de la ruta de síntesis de TAGs es catalizado por la enzima Glicerol 3-fosfato aciltransferasa (GPAT). Sin embargo, el conocimiento respecto a ésta ruta en microalgas aún es incipiente, aunque se considera que es similar al de las plantas.

En estudios previos en nuestro laboratorio, durante mi tesis de maestría, se identificaron y caracterizarón por bioinformática dos genes homólogos a genes que codifican para enzimas GPAT en la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. Un homólogo a la isoenzima AtGPAT9 fue nombrado *CrGPATre,* y un homólogo a la isoenzima ATS1 fue nombrado *CrGPATclA*, y con base en el análisis bioinformático se sugirió que *CrGPATre* correspondía a la isoenzima del retículo endoplásmico, la cual en plantas se encuentra relacionada a la síntesis de TAGs, y *CrGPATclA* correspondía a la isoenzima del cloroplasto, la cual en plantas se encuentra relacionada con la síntesis de lípidos de membrana.

En el presente trabajo se llevó a cabo la expresión heteróloga de *CrGPATre* y *CrGPATclA* en la cepa mutante de *Saccharomynces cerevisiae* ***gat1Δ***, y se realizaron ensayos enzimáticos con tres diferentes extractos (total, soluble y membranal), mediante los cuales se demostró que los genes *CrGPATre* y *CrGPATclA* codifican enzimas con actividad de GPAT. La actividad de CrGPATre fue detectada en el extracto membranal, lo cual concuerda con los diferentes reportes en los cuales caracterizan a las enzimas GPAT microsomales. Por su parte, este estudio se reporta por primera vez una enzima GPAT, en este caso CrGPATclA con actividad tanto en el extracto soluble como en el membranal.

Además, en este trabajo se evaluó el efecto de la expresión recombinante de los genes *CrGPATre* y *CrGPATclA* en *C. reinhardtii* y su relación con la acumulación de lípidos totales

y TAGs en esta microalga. En este trabajo, se obtuvieron 10 líneas transgénicas para el gen *CrGPATre* de las cuales en nueve se pudo detectar la expresión del transgén, y cuatro líneas transgénicas para el gen *CrGPATclA*, de las cuales en tres se pudo detectarse la expresión del transgén. El análisis del porcentaje de lípidos totales por biomasa seca no reveló diferencias significativas entre las líneas transgénicas y la cepa silvestre. Mientras que todas las líneas transgénicas presentaron un menor porcentaje de TAGs por biomasa seca comparado con la cepa silvestre.

Los resultados del presente trabajo, sugieren que si bien los genes *CrGPATre* y *CrGPATclA* pueden estar involucrados en la síntesis de lípidos de membrana y la síntesis de lípidos de almacén, la regulación se encontraría en otro punto de la ruta de síntesis en *C. reinhardtti*.

ABSTRACT

Microalgae are attractive as an alternative source of lipids, in particular triacylglycerides (TAGs) to produce biodiesel and bioturbosine, mainly due to easy culture, as well as their capacity to accumulate high quantities of TAGs, especially under nutrient stress. However, it is necessary to develop strains with higher TAG productivities under optimum culture conditions, therefore, it is necessary the study of the TAG biosynthesis pathway. In plants, it is known that the first step of this pathway is catalyzed by the enzyme Glycerol-3-phosphate Acyltrasferase (GPAT). However, knowledge about this route in microalgae is still incipient, although it is consider to be similar that of plants.

In previous studies in our laboratory, two homologous of GPAT genes in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* were identified and characterized by bioinformatics. One homologue to the isozyme AtGPAT9 named *CrGPATre*, and one homologue to the isozyme ATS1 named *CrGPATclA,* where the bioinformatic analysis suggests that *CrGPATre* corresponds to the endoplasmic reticulum isozyme, which in plants is related to the synthesis of TAGs, and *CrGPATclA* corresponds to the chloroplast isozyme, which in plants is related to the synthesis of membrane lipids.

The acyltransferase activity of *CrGPATre* and *CrGPATclA* genes was evidenced by heterologous expression in the *Sacharomynces cerevisiae* mutant ***gat1Δ***, and the enzymatic essay of the tree diferent extracts (total, soluble and membranal), by means of which it was demonstrated that *CrGPATre* and *CrGPATclA* encode enzymes with GPAT activity. The CrGPATre activity was detected in the membranal extract, which agrees with the repots where the microsomal GPAT enzymes are characterized. For its part, this study reports for the first time a GPAT enzyme, in this case CrGPATclA with activity in both the soluble and membrane extracts. We also report the recombinant expresion of *CrGPATre* and *CrGPATclA* genes in *C. reinhardtii* to evaluate their relation to the production of total lipids and TAGs in this microalgae. In this work, 10 transgenic lines carrying the CrGPATre gene were obtain, out of which nine showed transgene expression. Four transgenic lines transformed with the CrGPATclA gene were also obtained, in tree of them transgene expression was detected. In those lines, the analysis of the percentaje of total lipid per dry biomas did not reveal any

significative diference compared to the wild type. While all transgenic lines presented a lower percentaje of TAGs for dry biomas compared to the wild type.

The results in this work sugest that *CrGPATre* and *CrGPATclA* could be involved in the membrane lipids pathway as well as the storage lipid pathway, however the regulation occurs in other point of the pathway in *C. reinhardtii*.

INTRODUCCIÓN

La producción de los biocombustibles utilizados para los medios de transporte, como el biodiésel, son obtenidos principalmente a partir de los aceites presentes en las semillas de las plantas, siendo de todas ellas la de mayor rendimiento la palma aceitera (5,950 L/ha por año), pero éstas necesitan de tierras cultivables por lo que compiten con las tierras dirigidas a la alimentación (Ahmad *et al.* 2011; Widjaja *et al.* 2009; Schenk *et al.* 2008; Xiong *et al.* 2008). En los últimos años se han visto a las microalgas como alternativa para producción de biocombustibles debido a que son capaces de producir una mayor cantidad de aceite (12,000 – 98,500 L/ha por año en el caso de microalgas con una producción del 30 al 50% de triacilglicéridos de su peso seco), pueden ser cultivadas en tierras marginales, por lo que no entrarían en conflicto con la producción de alimentos como en el caso de las plantas (Ahmad *et al.* 2011; Widjaja *et al.* 2009; Schenk *et al.* 2008; Xiong *et al.* 2008; Xu *et al.* 2006), y presentan diferentes usos como: suplementos alimenticios, descontaminación de aguas residuales (Jonsson *et al.* 2001), producción de proteínas recombinantes (Rivera-Solís *et al*. 2011), secuestro del CO_2 producido por grandes empresas, y fertilizante en la agricultura (Sheehan *et al.* 1998; Sun *et al.* 1998), entre otras cosas, observándose, en la producción de productos de alto valor agregado, que su cultivo y escalamiento es relativamente fácil, rápido y económico (Widjaja *et al.* 2009; Xiong *et al.* 2008).

De los aceites obtenidos de microalgas, los triacilglicéridos (TAGs) pueden ser utilizados para la producción de biodiésel por medio de una reacción de transesterificación (Khozin-Goldberg and Cohen, 2011; Mata *et al.* 2010; Snyder *et al.* 2009; Wendel *et al.* 2009; Riekhof *et al.* 2007).

Aunque las microalgas han sido propuestas como la mejor opción para la producción de biocombustibles, aún es necesaria una mayor producción de aceites para este fin, pero sin incrementar las extensiones de tierra destinadas para su cultivo. Por lo tanto, se han realizado diferentes estudios para incrementar la producción de TAGs en microalgas, como por ejemplo mediante la aplicación de diferentes tipos de estrés como el osmótico (ej. por NaCl) o la deficiencia de algún nutriente (ej. fósforo o nitrógeno), observándose que bajo estas condiciones se incrementa la cantidad de TAGs (Khozin-Goldberg y Cohen, 2011; Li *et*

al. 2011; Siaut *et al.* 2011; Moellering y Benning, 2010). Debido a que uno de los efectos de la adición o remoción de compuestos al medio de cultivo es la disminución de la biomasa varios estudios buscan otras opciones en lugar del estrés. Uno de éstos estudios es la modificación de la ruta de síntesis de TAGs (ruta de Kennedy en plantas), ya que en se han identificado secuencias homólogas a las enzimas de dicha ruta en microalgas (Nakamura y Li-Beninson, 2016). Según la ruta de Kennedy, existen cuatro enzimas que se encargan de la síntesis de los TAGs, siendo la Glicerol 3-fosfato Aciltransferasa (GPAT) la que realiza el primer paso de esta ruta uniendo un ácido graso a la posición uno del glicerol 3-fosfato (G3P). En plantas se ha demostrado que la sobreexpresión de la GPAT es capaz de incrementar la producción de lípidos en las semillas de plantas como *Arabidopsis thaliana* (Jain *et al.* 2000).

Chlamydomonas reinhardtii es una microalga verde considerada como un modelo de estudio debido a su cultivo bien establecido, fácil y económico (Khan *et al.* 2009), su genoma nuclear y del cloroplasto han sido completamente secuenciados (Merchant *et al.* 2007) y, presenta diferentes métodos de transformación (Kindle y Sodeide, 1993). Recientemente, como parte de la tesis de maestría de una servidora, se identificaron y se caracterizaron *in silico* dos genes homólogos a GPAT en esta microalga, un homólogo al gen que codifica para la isoenzima AtGPAT9 correspondiente al retículo endoplásmico (*CrGPATre*) y uno para el gen que codifica para isoenzima ATS1 correspondiente al cloroplasto (*CrGPATcl*), observándose la presencia de dos isoformas en esta última nombrados *CrGPATclA* y *CrGPATclB* (Duarte, 2013).

El objetivo de este trabajo fue la caracterización funcional de los genes *CrGPATre* y *CrGPATclA* de *C. reinhardtii* y su relación con la acumulación de lípidos totales y triacilglicéridos. Se espera que este conocimiento contribuya a sentar las bases para que en estudios posteriores sea posible dilucidar la ruta de síntesis de TAGs en microalgas, y posteriormente incrementar la acumulación de lípidos en *C. reinhardtti* u otra microalga.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Lípidos para la producción de biocombustibles

Desde la época de la industrialización el petróleo ha sido la mayor fuente de obtención de energía debido a los motores de combustión interna, esto ha ocasionado el consumo masivo de éste originando un deterioro importante del ambiente, ya que el uso de estos combustibles no renovables provocan efectos negativos que pueden ser de gran magnitud como el calentamiento global, el cual es provocado por las emisiones de gases de efecto invernadero, contaminantes que se originan cuando los combustibles fósiles son quemados, así como se ha calculado su agotamiento en aproximadamente 50 años (Rodolfi *et al.* 2009; Bravo, 2007). Debido a esto, muchas investigaciones se han enfocado en la búsqueda de nuevas fuentes de energía que sean capaces de sustituir a la que se genera por el petróleo, tales como la energía eólica, la solar, la térmica, entre otras, donde se observó que los biocombustibles como el biogás, bioetanol, biodiésel y bioturbosina utilizan los mismos equipos con ninguna o mínimas modificaciones (Claassen *et al.* 1999), siendo el biodiésel el que se presenta como una alternativa muy atractiva, ya que es un biocombustible derivado de aceites vegetales o grasas animales que puede ser utilizado como sustituto total o parcial del gasóleo en motores de diesel convencionales.

Actualmente, el biodiésel se produce a partir de los aceites que se extraen principalmente de semillas de plantas, entre éstas se encuentran el girasol (*Helianthus annuus L*.), el cocotero (*Cocos nucifera Linneo*), *Jatropha curcas* Linneo, la palmera aceitera (*Elaeis guieensis* Jacq.), entre otras (Schenk *et al.* 2008) siendo ésta última es la que presenta la mayor producción de aceite como se observa en el Cuadro 1.1. En éste cuadro también se presenta el porcentaje de área global y de tierras arables que serían necesarias para satisfacer la demanda mundial de biodiesel para el 2008; lo cual en la mayoría de los cultivos antes mencionados sobrepasarían la cantidad de tierra existente (Araujo *et al.* 2011; Mutanda *et al.* 2011; Singh *et al.* 2011; Radakovits *et al.* 2010; Widjaja *et al.* 2009; Hu *et al.* 2008; Chisti, 2007; Riekhof *et al.* 2007).

De igual forma, en el Cuadro 1.1; basado en el estudio de Schenk y colaboradores (2008), se observa que cuando estos autores añaden a las microalgas al cuadro éstas se presentan como la mejor opción para la producción de biocombustibles, debido a que éstas fácilmente pueden duplicar la producción de la palma aceitera en la mitad del área que ésta necesita, basándose en microalgas con un 30% de triacilglicéridos (TAGs), y como las microalgas pueden ser cultivadas en tierras no arables, no competirían con la producción de alimentos de uso humano o animal como ocurre con las plantas.

Cuadro 1.1 Comparación de cultivos para la producción de biodiésel (Schenk *et al.* 2008)**.**

Cultivo	Biodiésel (L/ha/año)	Porcentaje del área global requerida para satisfacer la demanda mundial	Porcentaje necesario del área global de tierra arable
Algodón	325	100.7	756.9
Soya	446	73.4	551.6
Semilla de mostaza	572	57.2	430.1
Girasol	952	34.4	258.4
Canola	1190	27.5	206.7
Jatropha curcas	1892	17.3	130 (0*)
Palma aceitera	5950	5.5	41.3
Microalgas (30% de TAGs)	12000	2.7	20.5 (0*)
Microalgas (50% de TAGs)	98500	0.3	2.5 (0*)

*Si el cultivo de las microalgas se encuentra en tierras no cultivables, *Jatropha curcas* es principalmente cultivada en tierras marginales.

De los lípidos presentes en las semillas de las plantas o en los cuerpos lipídicos presentes en las microalgas, sólo los TAGs son los que reaccionan para la obtención de estos biocombustibles.

1.1.1 Generalidades de biocombustibles a partir de lípidos

La producción de biocombustibles a partir de los TAGs presentes en las semillas y en los cuerpos lipídicos de las microalgas, se obtienen a partir de diferentes reacciones, dependiendo del tipo de biocombustible que se quiera producir (ej. hidrocraqueo para bioturbosina, alcohólisis para biodiesel). La producción de biodiésel se obtiene a partir de un proceso de transesterificación (alcohólisis). Este proceso se basa en la reacción de una molécula de TAG con tres moléculas de un alcohol (generalmente metanol), produciendo una molécula de glicerol y tres de ácidos grasos (ésteres metílicos), los cuales son utilizados como biodiésel (Figura 1.1) (Hu *et al.*, 2008; Chisti, 2007).

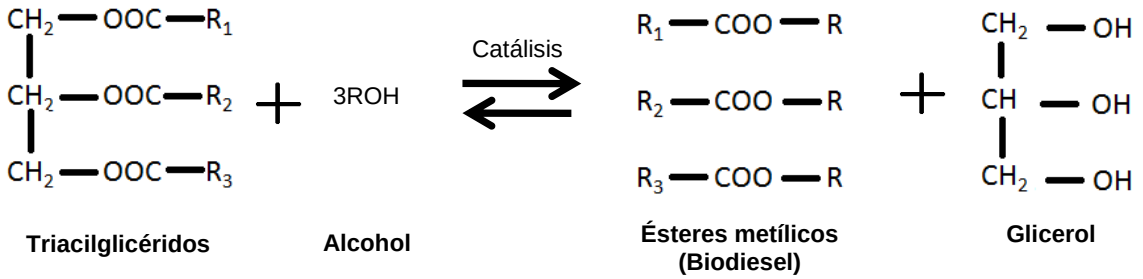


Figura 1.1 Reacción de transesterificación. (Hu *et al.* 2008).

En la producción de biodiésel hay que tener en cuenta los ácidos grasos que se encuentran unidos a la cadena del glicerol de los TAGs, ya que de ellos dependerá la calidad del biodiésel producido, esto se debe a las propiedades estructurales de los ácidos grasos, siendo la longitud, número de insaturaciones y ramificaciones de la cadena, las que determinan las propiedades físicas del combustible. Generalmente, el número de cetano y viscosidad aumentan conforme se hace más larga la cadena de carbonos que conforma al ácido graso y disminuye conforme al número de insaturaciones, de igual forma, un alto número de insaturaciones en la cadena hace inestable al biocombustible (de rápida degradación), lo cual no es deseable si se desea almacenar por un largo período de tiempo (Hu *et al.* 2008; Chisti, 2007; Ban-Weiss *et al.* 2007). Schenk y colaboradores (2008)

propusieron una mezcla de ácidos grasos de C16:1; C18:1; C14:1 (Número de carbonos: insaturaciones) con una proporción de 5:4:1 para que el biodiésel tenga las mismas propiedades que el diésel.

Por lo anterior, es importante conocer las características de los lípidos presentes en las microalgas, las cuales varían entre cada una de las especies (Chisti, 2007). Otros autores han estado tratando de encontrar una microalga que pueda ser capaz de producir una gran cantidad de aceite con una mayor proporción de TAGs para la producción de biodiésel (Misra *et al.* 2013; Amaro *et al.* 2011; Scott *et al.* 2010; Mata *et al.* 2010). La variación del contenido lipídico en algunas microalgas se presenta en el Cuadro 1.2.

Cuadro 1.2 Contenido de lípidos de la masa seca de varias especies de microalgas (Singh *et al.* 2011).

Especie	Contenido de lípidos (% peso seco)
Botyococcus braunii	25-80
Chlamydomonas reinhardtii	21
Chlorella emersonii	28-32
Chlorella protothecoides	57.9
Chlerella pyreinoidosa	46.7
Chlorella vulgaris	14-22
Dunaliella tertiolecta	35.6
***Hormidium* sp.**	38
***Isochrysis* sp.**	25-33
***Nannochloris* sp.**	30-50
***Nannochloropsis* sp.**	31-68
Neochloris oleoabundans	35-54
***Nitzchia* sp.**	45-47
Pleurochrysis carterae	30-50
***Schizochytruim* sp.**	50-77

Debido a que muchas microalgas tienen un nivel de producción de TAGs variable, y en condiciones óptimas de cultivo estos niveles pueden ser relativamente bajos para una explotación comercial, varios estudios se han enfocado en diferentes formas para incrementar su producción, siendo una de estas las modificaciones al medio o las condiciones de cultivo, tales como la remoción de algún compuesto al medio, como el azufre o nitrógeno, o con la adición de algún estrés osmótico, tal como la adición de NaCl (Cakmak *et al.* 2012; Contreras, 2011; Siaut *et al.* 2011; Miao y Wu, 2006; Illman *et al.* 2000), pero este cambio en el medio de cultivo implicaría una mayor inversión durante el escalamiento para la producción masiva de aceites para producir biodiesel (Cakmak *et al.* 2012; Contreras *et al.* 2011), así como la afectación en la biomasa obtenida de cada cultivo de microalgas, tal como lo presenta el estudio realizado por Conteras *et al* 2011.

Por tanto, estudios recientes han puesto su atención en las modificaciones genéticas mediante las cuales se podría no sólo mejorar los rendimientos de producción de aceites en las microalgas, sino que también se podría obtener los aceites con las características deseadas para un biodiésel de alta calidad, así como una forma más sencilla de extracción de estos (ej. la excreción de los TAGs al medio de cultivo), así como la aproximación por medio de las genómica, proteómica o metabolómica (Misra *et al.* 2013; Khozin-Goldberg and Cohen, 2011; Radakovits *et al.* 2010; Snyder *et al.* 2009).

1.2 Metabolismo de lípidos en microalgas

1.2.1 Comparación del metabolismo de triacilglicéridos entre plantas vasculares y microalgas

La producción de triacilglicéridos se lleva a cabo por medio de la ruta de Kennedy en el retículo endoplásmico, el primer paso lo realiza la glicerol 3-fosfato aciltransferasa (GPAT), la cual une un ácido graso libre al primer carbono del glicerol 3-fosfato (G3P) formando al ácido lisofosfatídico, posteriormente, la ácido lisofosfatídico aciltransferasa (LPAAT) une un ácido graso en la segunda posición del G3P formando al ácido fosfatídico, del cual es removido el fosfato por medio de la fosfatasa del ácido fosfatídico (LPAT) para convertirse en

diacilglicerol, y asi dar paso a el último paso de ésta ruta que está a cargo de la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT), la cual une un ácido graso libre a la tercera posición de G3P dando lugar al triacilglicérido (Figura 1.2) (Liu *et al.* 2013; Huang *et al.* 2010; Radakovits *et al.* 2010; Murata and Tasaka, 1997). De igual forma las moléculas obtenidas durante cada paso de la síntesis de TAGs pueden servir como sustrato para diferentes enzimas para la producción de otros lípidos, principalmente lípidos de membrana como la lisofosfatidilcolina obtenida por la acción de la fosfatidilcolina aciltransferasa en el diacilglicérido, la fosfatidilcolina obtenida por la aciltransferasa fosfolipídica del diacilglicerol sobre el ácido fosfatídico (Figura 1.3), dándose principalmente estas reacciones enzimáticas en el cloroplasto y mitocondria (Huang *et al.* 2010; Snyder *et al.* 2009; Murata y Tasaka, 1997).

Aunque en general la ruta de síntesis de lípidos y ácidos grasos es similar en las plantas y en las microalgas, existen diferencias de cómo ocurre este metabolismo en cada una de ellas. Por ejemplo en el caso de las microalgas todo ocurre dentro de su célula, mientras que en las plantas ocurre en tejidos o sitios específicos como pueden ser en las semillas o en los frutos (Hu *et al.* 2008).

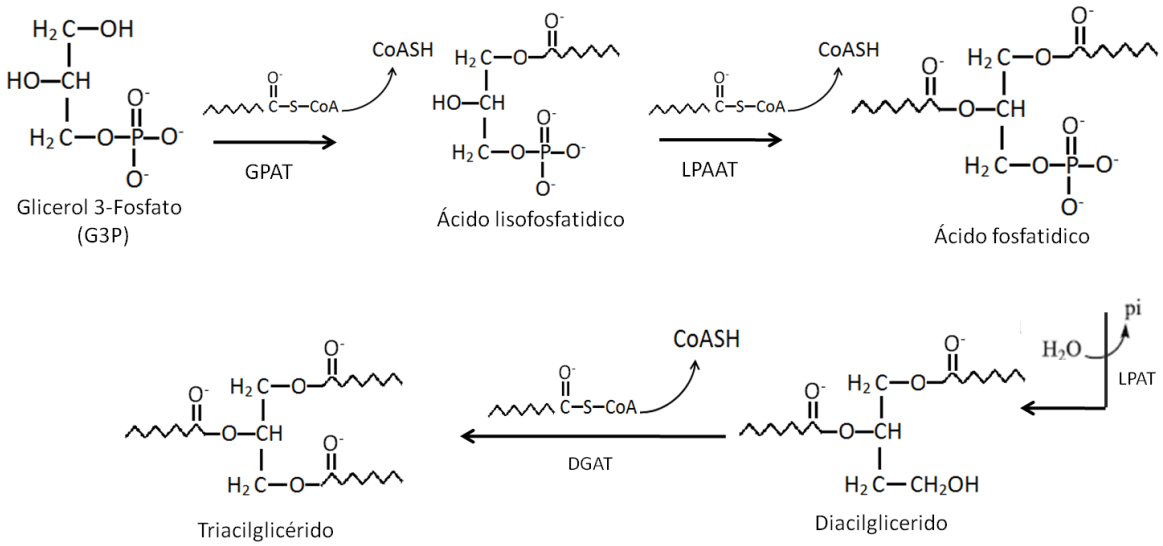


Figura 1.2 Síntesis de triacilglicéridos (TAGs) en general. GPAT. Glicerol 3-Fosfato aciltransferasa, LPAAT. Ácido lisofosfatídico aciltransferasa, LPAT. Fosfatasa del ácido fosfatídico, DGAT. Diacilglicerol aciltransferasa, CoASH. Coenzima A. (Huang *et al.* 2010).

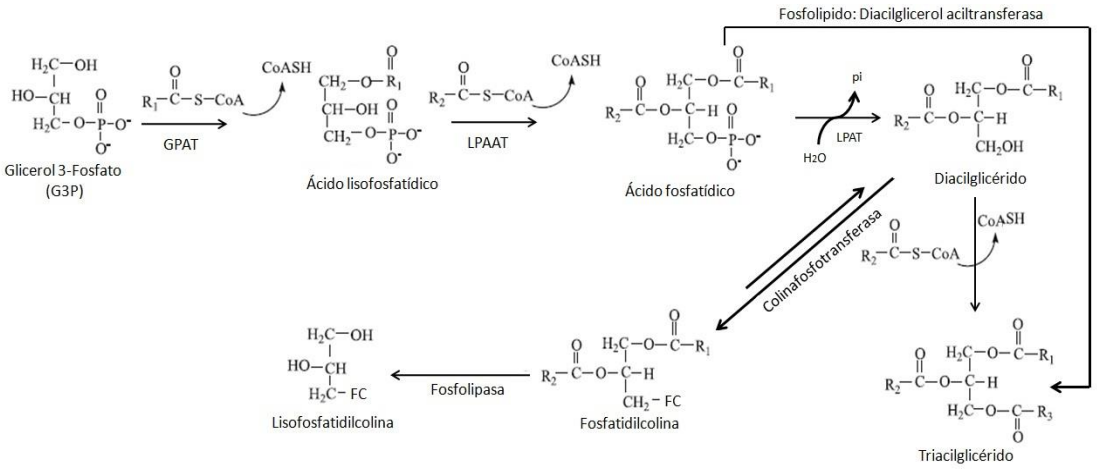


Figura 1.3 Esquema generalizado de la síntesis de triacilglicéridos en plantas (modificado de Snyder *et al.* 2009).

1.2.2 Síntesis de lípidos, ácidos grasos y triacilglicéridos en microalgas en general

A diferencia de la plantas la síntesis de lípidos, ácidos grasos y triacilglicéridos en microalgas no ha sido completamente elucidada, aunque en las microalgas cuyos genomas han sido secuenciados, se han encontrado homólogos a los genes que codifican para las enzimas que participan en esta ruta (Misra y Panda, 2013; Nguyen *et al.* 2011; Khozin-Goldberg y Cohen, 2011; Radakovits *et al.* 2010), por lo que se puede considerar que esta ruta de síntesis de TAGs es muy parecida a la de las plantas superiores.

De igual forma, existen diferentes estudios en donde se han caracterizado enzimas correspondientes a las de la ruta de síntesis de TAGs, como el realizado por Xu y colaboradores (2009) en donde se caracterizó un gen que codifica para la enzima GPAT en la microalga *Thalassiosira pseudonana*, en los estudios realizados por Duarte (2013) se identificaron y caracterizaron dos genes homólogos a GPAT en *Chlamydomonas reinhardtii*, uno homólogo a AtGPAT9 nombrado *CrGPATre* y uno homólogo a ATS1 nombrado *CrGPATcl*, observándose la presencia de dos isoformas en esta último (*CrGPATclA* y *CrGPATclB)*. De igual forma el estudio realizado por Misra y Panda (2013) mencionan la caracterización *in silico* de las GPATs de siete microalgas, identificando entre ellas los motivos característicos de la enzima y su estructura tridimensional, entre ellas la isoforma A

del cloroplasto de *C. reinhardtii* identificada por Duarte (2013). El aislamiento y caracterización molecular de DGAT en O*streococcus tauri* y en *Chlorella sacharophilla* (Wagner *et al.* 2010; Osuna, 2013), la DGAT y PDAT (Phospholipid: diacilgycerol aciltransferase) de *C. reinhardtii*, entre otras.

En la Figura 1.4 se puede observar una predicción de cómo es que se podría estar llevando a cabo la síntesis de TAGs en las microalgas, basándose en el conocimiento que se tiene de plantas superiores, donde la síntesis de los ácidos grasos se lleva a cabo en el cloroplasto, los cuales son exportados al retículo endoplásmico en donde son unidos a la cadena de glicerol 3-fosfato para la formación de los TAGs.

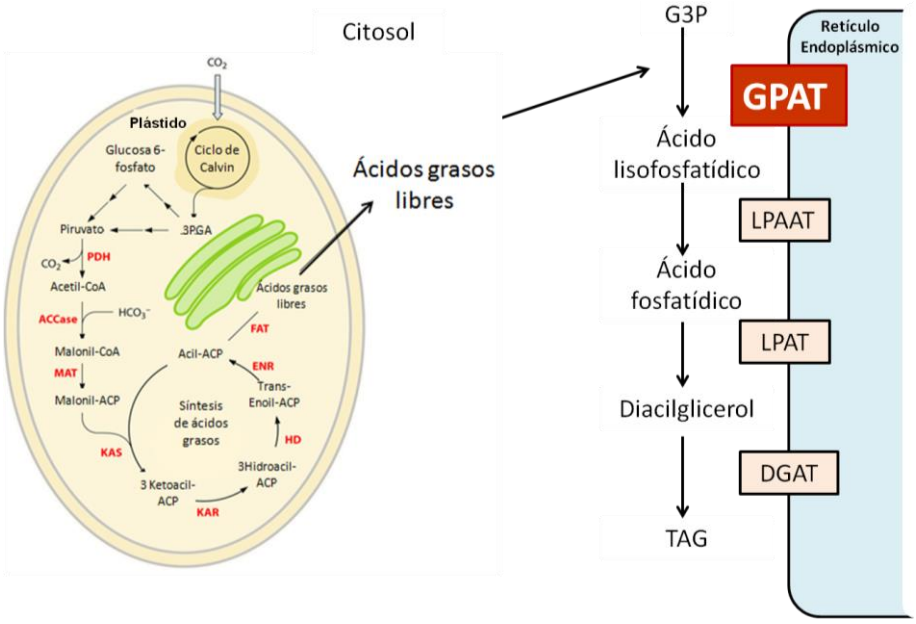


Figura 1.4 Vista simplificada de la ruta de la biosíntesis de lípidos, siendo lo ácidos grasos sintetizados en el cloroplasto, mientras que los TAGs en el retículo endoplásmico. ACCase, Acetil-CoA carboxilasa, ENR, enoil-ACP reductasa, FAT, acil-ACP tioesterasa grasa, G3PDH, glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, GPAT, glicerol 3-fosfato aciltransferasa, HD, 3-hidroxiacil ACP deshidratasa, KAR, 3-Ketoacil-ACP reductasa, KAS, 3-ketoacil sintasa, LPAAT, ácido lisofosfatídico aciltransferasa, LPAT, lisofosfatidilcolina aciltransferasa, MAT, malonil-CoA:ACP transacilasa, PDH, complejo piruvato deshidrogenasa, TAG, triacilglicéridos. (Radakovits *et al.* 2010).

Varias enzimas forman parte de la ruta de síntesis de TAGs y se ha observado que la que se presenta como el punto limitante de esta ruta es la glicerol 3-fosfato aciltransferasa (GPAT), debido a la baja afinidad que tiene ésta con el ácido graso, haciendo que la acción de esta enzima tome más tiempo comparado con las demás de la ruta (Liu *et al.* 2013; Chen *et al.* 2011; Snyder *et al.* 2009).

1.3 La enzima Glicerol 3 fosfato aciltransferasa

La enzima glicerol 3-fosfato aciltransferasa, también conocida como GPAT (EC 2.2.1.15), es una enzima esencial para la ruta de los TAGs ya que es la encargada de dar el primer paso en esta ruta, con la adición de un ácido graso, usualmente de una longitud de 16 y 18 carbonos, en la posición uno al glicerol 3-fosfato (Musrata y Tasaka, 1997). Existen diferentes lugares en la célula en las cuales se encuentran isoenzimas de ésta, como puede ser el cloroplasto, el retículo endoplásmico y la mitocondria (Chen *et al.* 2011). La isoenzima que se encuentra en el cloroplasto es hidrofílica, y se le relaciona con la producción de lípidos de membrana (ácidos grasos de 16 carbonos) tomando como grupo donador de acilos (ácidos grasos) al acyl-ACP (Misra y Panda, 2013; Murata y Tasaka, 1997). Las otras dos isoenzimas son hidrofóbicas, unidas a membrana, las cuales toman como grupo donador de acilos al acyl-CoA, siendo la del retículo endoplásmico la que se encuentra relacionada a la producción de TAGs y une principalmente ácidos grasos de 18 carbonos a la cadena de glicerol 3-fosfato, mientras que la de la mitocondria se encuentra relacionada a la producción de lípidos de membrana al igual que la isoenzima del cloroplasto (Bratschi *et al.* 2009; Xu et al. 2009; Lewin *et al.* 1999; Murata and Tasaka, 1997).

Muchos de los estudios realizados en plantas han demostrado a qué tipo de ruta están ligadas cada una de estas isoenzimas (síntesis de lípidos de membrana o de TAGs) (Shokey *et al.* 2016; Chen *et al.* 2011). En microalgas no se han realizado muchos estudios al respecto, sin embargo, Fan y colaboradores (2011) observaron la presencia de cuerpos lipídicos dentro del cloroplasto de *C. reinhardtii* así como que la conformación de éstos (presencia de ácidos grasos con 16 carbonos en la segunda posición del glicerol 3-fosfato) corresponde a los encontrados en el cloroplasto, esto es debido a que de las tres

aciltransferasas presentes en la ruta de Kennedy la segunda, la ácido lisofosfatídico aciltransferasa (LPAAT), es la más específica de las tres la cual une ácidos grasos de 16 carbonos en el cloroplasto y de 18 en el retículo endoplásmico (Fan *et al.* 2011; Snyder *et al.* 2009), por lo que con este análisis aseveran que es posible que se esté llevando a cabo la síntesis de TAGs en el cloroplasto de esta microalga y no sólo en el retículo endoplásmico. Resultados similares han sido encontrados por Goold y colaboradores (2015) y Goodson y colaboradores (2011), en donde estos autores de igual forma identificaron cuerpos lipídicos dentro del cloroplasto de *C. reinhardtii*.

Existen diferentes estudios enfocados al aislamiento de enzimas GPAT en plantas, tales como: aguacate (*Persea americana*) (Eccleston y Harwood, 1995), espinaca (*Spinacia oleacea*) (Frentzen *et al.* 1983), calabaza (*Cucurbita moschata*) (Turnbull *et al.* 2001), entre otras, enfocados principalmente a la función de éstas (que tipo de ácido graso unen a la cadena de glicerol 3-fosfato) para relacionarla a la resistencia al frío de las plantas, aunque muy pocas de ellas han sido molecularmente caracterizadas (Murata y Tasaka, 1997). En *A. thaliana* han sido identificadas diez isoenzimas GPAT, una perteneciente al cloroplasto (ATS1) (Nishida *et al.* 1993), tres en mitocondria (AtGPAT 1-3), y siete en el retículo endoplásmico (AtGPAT 4-9) (Chen *et al.* 2011), siendo la AtGPAT9 la única que se encuentra relacionada a la síntesis de TAGs además de la ruta de síntesis de lípidos de membrana (Shokey *et al.* 2016; Singer *et al.* 2016).

En animales (ej. *Xenopus*, *Mus musculus*, *Homo Sapiens*), se han identificado hasta cuatro isoformas de GPAT. En humanos se han identificado cuatro isoformas, dos pertenecientes a la mitocondria (HsGPAT1 y 2) y dos al retículo endoplásmico (HsGPAT 3 y 4), las cuales han sido muy estudiadas debido a su relación con las enfermedades que aumentan y/o disminuyen la concentración de los TAGs en el organismo (ej. hígado graso) (Wendel *et al.* 2009, Cao *et al.* 2006; Muoio *et al.* 1999). Debido a la relación que se ha observado en animales mutantes a una isoforma de GPAT y diferentes enfermedades, se ha identificado el tipo de regulación de la expresión de estos genes, en animales, la cual es por medio de metilaciones en el ADN y por factores de transcripción de la familia de los SREB1 (sterol regulatory element binding protein), los cuales responden a la estimulación por insulina, los cuales se unen a los sitios SER (sterol regulatory element) en el ADN, no

obstante, no se ha detectado en otros organismos algún tipo de regulación como se presenta en animales (Novák et al. 2014; Xu *et al.* 2013; Song *et al.* 2013; Angulo *et al.* 2012; Ehara *et al.* 2012; Athenstaedt y Daum, 2006).

Por otra parte, en levaduras el aislamiento y caracterización de esta enzima se enfoca a la sobreproducción de fosfatidilcolina y fosfolípidos, los cuales se usan en humanos para la disminución de la enfermedad del hígado graso no alcohólico y para tratamientos de belleza sin cirugía, así como para la caracterización de la ruta y su influencia en la levadura (Marr *et al.* 2012; Loguercio *et al.* 2007, Kolodney *et al.* 2005).

En insectos y hongos se han identificado genes homólogos a los genes que codifican para las enzimas presentes en la ruta de síntesis de TAGs (ruta de Kennedy) lo cual sugiere que la ruta se realiza como se presenta en animales (Gao *et al.* 2013; Alves-Bazerra *et al.* 2012; Pillai *et al.* 1998).

En microalgas la ruta de síntesis de lípidos de almacén no ha sido completamente elucidada, mas existen reportes donde se han identificado, aislado y caracterizado genes que codifican para enzimas de la ruta (Nakamura y Li-Beisson, 2016). En cuanto a la enzima GPAT en microalgas se presentan diferentes reportes tal como el de Xu y colaboradores (2009) en donde estos autores reportaron el aislamiento y caracterización funcional de la GPAT microsomal de la diatomea *T. pseudonana,* la cual presentaba una preferencia hacia ácidos grasos de cadena larga. El estudio realizado por Baral y colaboradores (2012) en donde identificaron y caracterizaron *in silico* a la isoenzima GPAT del cloroplasto de la microalga *Ostreococcus lucimarinus*. En cuanto a la microalga verde *C. reinhardtii* se han clonaron y caracterizaron molecularmente dos isoenzimas tipo GPAT, un gen homólogo al gen que codifica para la isoenzima AtGPAT9 nombrada *CrGPATre* y otro gen homólogo al gen que codifica para la isoenzima ATS1 de *A. thaliana* nombrada *CrGPATcl*, identificando dos isoformas en esta última (*CrGPATclA* y *CrGPATclB*) (Duarte, 2013). De igual forma, Misra y Panda (2013) identificaron y caracterizaron *in silico* la GPAT del cloroplasto de siete microalgas, entre ellas se encuentra la isoforma A de *C. reinhardtii* identificada en el estudio de Duarte (2013). En estudios recientes, Iskandarov y colaboradores (2016) identificaron en la microalga verde *Lobosphaera incisa* un gen tipo GPAT (*LiGPAT*), homólogo a la secuencia *AtGPAT9*; y lo sobreexpresaron en la microalga verde *C. reinhardtii* en donde los autores

observaron un incremento de hasta 1.5 veces más TAGs en las líneas transfromadas comparadas con la cepa silvestre (Iskandarov *et al.* 2016). De igual forma Niu y colaboradores (2016) identificaron y caracterizaron molecularmente la isoenzima GPAT del cloroplasto de la diatomea *Phaeodactilum tricornutum* (*PtGPAT*) y la sobreexpresaron en *P. tricornutum* en donde observaron un incremento de hasta dos veces en la producción de lípidos neutros (Niu *et al.* 2016).

Por otro lado, se han sintetizado diferentes compuestos para estudiar la forma de inhibición de la enzima GPAT en humanos para en un futuro reducir la cantidad de TAGs en sangre, en donde Wydysh y colaboradores (2010) realizaron análisis por medio de programas bioinformáticos en donde evaluaron la forma de unión de estas sulfamidas alquílicas de cadena larga a la enzima GPAT de *C. moschata* (la única caracterizada cristalográficamente), donde observaron que éste compuesto se unía a dos loops de la enzima, mimetizándose con el glicerol 3-fosfato (Wydysh *et al.* 2010).

En los estudios antes mencionados en plantas, en donde se realizó la sobreexpresión de los genes, estaban encaminados a la mejora de dichos cultivos como se observa en el Cuadro 1.3. Uno de éstos estudios es el realizado por Yan y colaboradores (2008) en donde dichos autores transformaron a *A. thaliana* con la GPAT de chile dulce y observaron que ésta adquirió tolerncia al frío. Posteriores estudios de esta enzima también encontraron que su sobreexpresión incrementaba la cantidad de aceites presentes en sus semillas (ej. GPAT de girasol en *A. thaliana*), así como los posibles efectos que ocasionan las mutaciones de este gen en los órganos reproductores (Chen *et al.* 2014; Shiromoto *et al.* 2013; Yan *et al.* 2008; Jain *et al.* 2000; Yokoi *et al.* 1998).

Cuadro 1.3 Modificaciones genéticas en plantas con genes tipo GPAT para incrementar TAGs o resistencia a factores térmicos.

Organismo	Gen modificado	Sobreproducción	Referencia
Oryza sativa	GPAT de *A. thaliana*	Resistencia a frío	Yokoi *et al.* 1998
A. thaliana	GPAT de girasol y *E. coli*	TAGs	Jain *et al.* 2000
Nicotiana tabacum	GPAT de Chile dulce	Termotolerancia	Yan *et al.* 2008

1.4 Características de las isoenzimas GPAT

Como ya se mencionó anteriormente la enzima GPAT presenta diferentes isoenzimas en diferentes organelos de la célula, pero todas ellas presentan los mismos cuatro motivos característicos (Lewin *et al.* 1999). Estos motivos son importantes ya que son los que le confieren la función de GPAT: el motivo II y III son sitios de unión al glicerol 3-fosfato, mientras que el motivo IV es el sitio de reconocimiento a ácido graso y el motivo I es el que lleva a cabo la unión entre el glicerol 3-fosfato y el ácido graso (dominio PlsB) (Xu *et al.* 2009; Lewin *et al.* 1999).

Estos cuatro motivos se caracterizan por la presencia de diferentes aminoácidos conservados en todas las GPATs (Cuadro 1.4). El motivo I se caracteriza por los residuos de histidina y ácido aspártico separados por cuatro aminoácidos (HXXXXD), en el motivo II la arginina es el aminoácido más conservado (XXXR), en el motivo III los aminoácidos: ácido glutámico, glicina, treonina y arginina son los que se encuentran más conservados (XEGTR), y en el motivo IV la prolina es el aminoácido más conservado (XPXX), de igual forma los aminoácidos que se encuentran alrededor de estos motivos tienden a variar entre los diferentes organismos (Lewin *et al.* 1999).

Cuadro 1.4 Motivos característicos de las GPATs (Lewin *et al.*1999)

	Bloque I	**Bloque II**	**Bloque III**	**Bloque IV**	**Acceso**
E. coli	VPC**H**R**S**HM**D**YLLL	**G**AF**FI**R**R**	Y**F**V**EG**G**R**SRT**G**R	ITLI**P**IYI	130326
H. influenzae	VPC**H**R**S**HI**D**YLLL	**G**AF**FI**R**R**	Y**FIEG**G**R**SRT**G**R	ISIV**P**VYV	1172533
M. tuberculosis	AFS**H**R**S**YL**D**GMLL	**G**AI**FI**R**R**	WSI**EG**G**R**TRT**G**K	VYLV**P**TSI	2791522
C. elegans	ACL**H**R**S**HL**D**ILSM	NTI**FI**R**R**	F**FLEGTR**SRF**G**K	ISII**P**VVF	1458332
M. musculus	LPV**H**R**S**HI**D**YLL	**G**GF**FI**R**R**	I**F**L**EGTR**SRS**G**K	ILVI**P**VGI	2498786
R. norvegicus	LPV**H**R**S**HI**D**YLL	**G**GF**FI**R**R**	I**F**L**EGTR**SRS**G**K	ILVI**P**VGI	2444459
GPAT consenso	Φ—**H**R**S**-φ**D**φφ--	**G**-φ**FI**R**R**	Φ**F**φ**EGTR**SR-**G**K	φφφφ**P**φφφ	

Como se mencionó anteriormente existen dos isoenzimas que presentan unión a membrana (retículo endoplásmico y mitocondria). Estas isoenzimas también se diferencian por la forma en que se unen a su correspondiente membrana. La del retículo endoplásmico se caracteriza por su dominio dilisina (KKXXX o KXKXX) y el pentapéptido (-ϕ-X-X-K/R/D/E-ϕ- siendo ϕ cualquier aminoácido hidrofóbico) que se encuentran en su extremo N-terminal uniendo firmemente a la enzima a la membrana y dejando el sitio activo en el extremo C-terminal en el citoplasma (Figura 1.5 A) (Guidda *et al.* 2009). Por su parte, la isoenzima de la mitocondria sólo está asociada a la membrana en el extremo C terminal dejando al sitio activo en el extremo N terminal en el citoplasma (Figura 1.5 B) (Gonzalez-Baró *et al.* 2001). Al presentarse los motivos en el citoplasma hace que la GPAT no tenga mucha especificidad al sustrato, por lo que toma el ácido graso que se encuentre en el medio (Snyder *et al.* 2009).

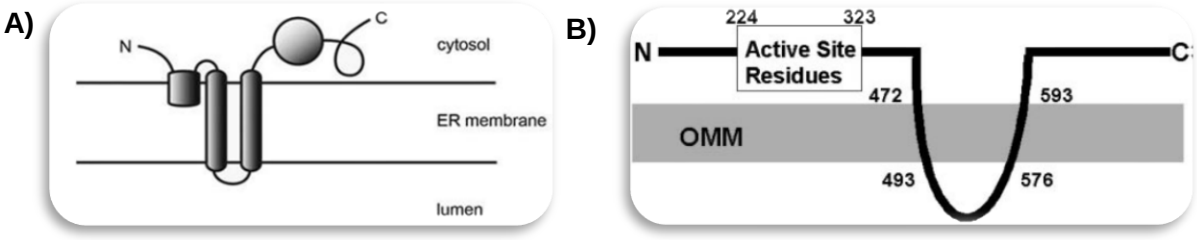


Figura 1.5 Forma de unión de las GPATs a la membrana. A) Forma de unión de la GPAT9 de *A. thaliana* a la membrana del retículo endoplásmico (Gidda *et al.* 2009) B) GPAT del hígado de rata unida a la membrana de la mitocondria (Gonzalez-Baró *et al.* 2001).

Existen diferentes formas para corroborar la funcionalidad de estos genes, tal como la expresión heteróloga de estos genes en una cepa levadura mutante.

1.5 Levaduras mutantes de GPAT para expresión heteróloga.

Existen diferentes mutantes de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas para los ensayos de complementariedad de diferentes enzimas, entre la que se encuentran las de la enzima GPAT.

Baker y colaboradores (1998) realizaron una serie de mutaciones en el genoma de la cepa S288C de *S. cerevisiae* de donde se obtuvieron una serie de mutantes de esta levadura deficientes de diferentes genes las cuales fueron caracterizadas posteriormente por diferentes autores. Entre estas mutantes se encuentra la cepa *gat1Δ* (BY4742 Matα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*)* caracterizada por Zheng y Zue (2001) la cual presenta una mutación en el gen que codifica para la GPAT que se encuentra en mayor proporción unida al retículo endoplásmico, haciendo que ésta presente una muy baja actividad de GPAT, de hasta 87% menos que la cepa silvestre, de igual forma la mutación total de esta enzima es letal (Zufferey *et al.* 2005; Zheng y Zue, 2001). Debido a esto ésta cepa ha sido utilizada en muchos estudios para la caracterización funcional de genes que codifican para enzimas tipo GPAT de plantas, mamíferos, levaduras y la microalga *T. pseudonana,* por medio de la expresión heteróloga del gen de interés, la producción de la enzima, la posterior extracción

de las proteínas totales (para la isoenzima del cloroplasto) o extracto membranal (para isoenzimas del retículo endoplásmico o mitocondrial), y la realización del ensayo enzimático a partir de dichos extractos (Chen *et al.* 2014; Gupta *et al.* 2013; Ruiz-Lopez *et al.* 2010; Zhu *et al.* 2009; Zheng *et al.* 2003; Muoio *et al.* 1999).

1.6 Patentes relacionadas con la enzima Glicerol 3 fosfato aciltransferasa.

Debido a lo mostrado anteriormente se observa el interés biotecnológico existente en la enzima GPAT, ya sea para el mejoramiento de plantas para la resistencia al frío, el incremento en la cantidad de aceites presentes en sus semillas o el mejorar la composición de ácidos grasos presentes en los triacilglicéridos que contienen las semillas de la planta (Zhu *et al.* 2009; Jain *et al.* 2000; Yokoi *et al.* 1998).

Existen varias patentes relacionadas a la enzima Glicerol 3-fosfato aciltransferasa en plantas, animales y levaduras, pero sólo una solicitud de patente que está relacionada al uso y aislamiento de esta enzima en microalgas (en *T. pseudonana*). Zou y colaboradores (2009), aislaron esta enzima de la microalga *T. pseudonana* (TpGPAT), poniendo entre las reivindicaciones el uso de la secuencia que aislaron y caracterizaron para la sobreproducción de TAGs en esta u otras microalgas y en plantas.

Entre las microalgas, *C. reinhardtii* es la mejor opción para realizar estos estudios de caracterización de enzimas relacionadas a la producción de TAGs así como la identificación de dos isoformas de genes tipo GPAT en ella (Duarte, 2013; Misra y Panda, 2013).

1.7 Generalidades de *C. reinhardtii*

1.7.1 Características morfológicas

C. reinhardtii es una microalga verde unicelular biflagelada considerada generalmente como segura (GRAS, generally regarded as save) (Mayfield *et al.* 2007), mide 10 µm de diámetro y sus flagelos miden 10 µm de largo, los cuales le confieren movilidad y parten de

una pequeña protuberancia cutánea. Es una célula haploide, tiene una membrana delicada que puede estar algo separada del borde del citoplasma, y presenta una mancha ocular en el centro de la célula. Su cloroplasto puede llegar a ocupar hasta las 2/3 partes de la célula, rodeando principalmente al núcleo, conteniendo hasta aproximadamente 80 copias del genoma de éste (Figura 1.6). Son fáciles de ver en el microscopio, ya que son células grandes y tienen un sencillo protocolo de inmunofluorescencia (Harris, 2001).

La primera cepa de *C. reinhardtii* que se aisló se cree que proviene de los aislamientos de GM Smith en 1945; de la recolección de tierra cerca de Amherst, Massachusetts. Pero se piensa que todas derivan de Norte América, al este de las montañas rocosas (Harris, 2001). *C. reinhardtii* ha sido un modelo de estudio para diversas investigaciones, tales como el mecanismo de fotosíntesis, flagelos, entre otras (Harris, 2001), esto debido a que se ha logrado secuenciar en su totalidad el genoma nuclear, mitocondrial y del cloroplasto (www.chlamy.org).

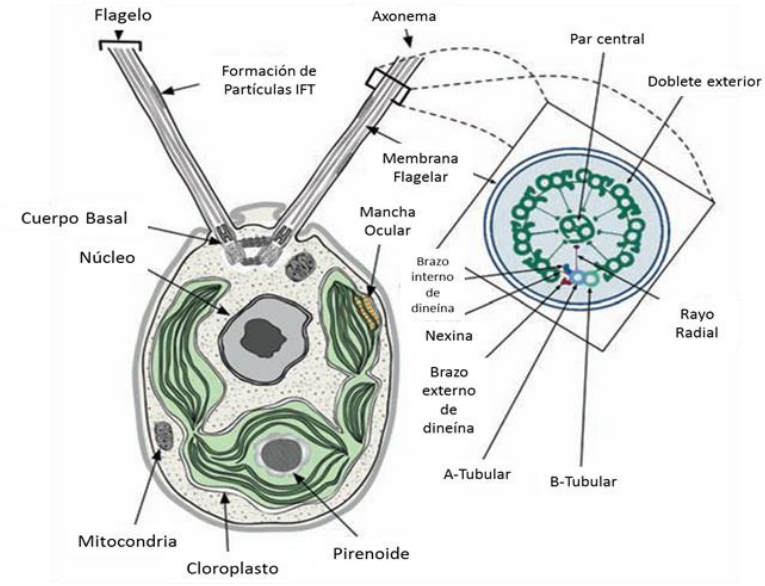


Figura 1.6 *Chlamydomonas reinhardtii*. En la figura se observan las diferentes partes de esta microalga: flagelos, núcleo, mitocondria, cloroplasto, entre otros (Merchant *et al.* 2007).

1.7.2 Clasificación taxonómica

La microalgas de la especie *C. reinhardtii* se clasifican de la siguiente manera (www.algaebase.org):

Dominio: Eucariota

Reino: Plantae

Subreino: Viridaeplantae

División: Chlorophycophyta

Clase: Chlorophyceae

Orden: Volvocales

Familia: Chlamydomonadaceae

Género: *Chlamydomonas*

Especie: *Chlamydomonas reinhardtii*

1.7.3 *C. reinhardtii* como modelo de estudio

C. reinhardtii ha sido muy estudiada y ha sido considerada un modelo de estudio debido a la capacidad que tiene de crecer heterotróficamente utilizando acetato como fuente de carbono, y así poder conocer mejor la forma en que se da la fotosíntesis (Terauchi *et al.* 2010; Ozawa *et al.* 2009). Otros estudios en los últimos años han sido para la producción de biodiésel (Ibáñez-Salazar *et al.* 2014; Park *et al.* 2013; Khan *et al.* 2009), hidrógeno, la acumulación de metales pesados (Han *et al.* 2008), la producción de proteínas recombinantes en el cloroplasto y en el núcleo, entre otros (Rasala *et al.* 2012; Muto *et al.* 2009; Wang *et al.* 2009; Han *et al.* 2008; Manuell *et al.* 2007; Vain, 2006; Kindle y Sodeinde 1993).

En el estudio realizado por Singh y colaboradores (2011) se mencionan los retos a sobrellevar para la producción de biocombustibles a partir de microalgas en donde se

menciona *C. reinhardtii* la cual tiene un porcentaje de lípidos a partir de su peso seco de 21%, de los cuales el 37% son TAGs (Tatsuzawa y Takizawa, 1996), y su perfil de ésteres metílicos obtenidos a partir de los TAGs, siendo los más abundantes los de 16:0; 18:1 y 18:3 (No. de carbonos: insaturaciones) (Contreras, 2010; Tatsuzawa y Takizawa, 1996), por lo que recientemente se ha mencionado como la candidata ideal para el estudio de la acumulación de triacilglicéridos (Misra *et al.* 2013; Merchant *et al.* 2012) sin embargo, es necesario el incremento de la producción de TAGs presentes en esta microalga.

1.8 Justificación

Con lo mencionado anteriormente se puede apreciar la necesidad de encontrar nuevas formas de producción de aceites para la obtención de biocombustibles, siendo el cultivo de microalgas una de las mejores alternativas para este fin. Aunque se han identificado en microalgas genes homólogos que codifican las enzimas relacionadas con la ruta de síntesis de TAGs de plantas, ésta todavía no ha sido completamente elucidada en estos microorganismos, por lo que se requieren estudios que permitan conocer y posiblemente controlar esta ruta.

Estudios previos en plantas como *A. thaliana* y *B. napus*, han demostrado que la enzima glicerol 3-fosfato aciltransferasa (GPAT) es una pieza clave para la síntesis de TAGs, así como que la sobreexpresión de los genes, que la codifican se ha logrado el incremento de los aceites en las semillas de plantas como girasol y *A. thaliana*, por lo que se espera obtener resultados similares en microalgas. En un estudio previo realizado en nuestro grupo de trabajo se identificaron y caracterizaron molecularmente dos genes que codifican para enzimas tipo GPAT, del retículo endoplásmico (*CrGPATre*) y cloroplasto (*CrGPATclA*), en *C. reinhardtii*. Por lo tanto, es necesaria la caracterización funcional de estos genes para identificar los correspondientes a esta ruta, y así poder más delante, elucidar la ruta completa de síntesis de TAGs en microalgas. Y una vez comprobado su papel en la síntesis de TAGs su uso potencial en la sobreproducción de lípidos en especial los TAGs en *C. reinhardtii*.

1.9 Hipótesis

Los genes *CrGPATre* y *CrGPATclA* codifican proteínas que presentan actividad de glicerol 3-fosfato aciltransferasa y que están relacionadas con la acumulación de lípidos totales y triacilglicéridos en *C. reinhardtii.*

1.10 Objetivos

1.10.1 Objetivo General

Caracterizar funcionalmente los genes *CrGPATre* y *CrGPATclA* de la microalga verde *C. reinhardtii* y establecer su relación con la síntesis de lípidos totales y de triacilglicéridos.

1.10.2 Objetivos Específicos

1. Determinar si los genes *CrGPATre* y *CrGPATclA* de *C. reinhardtii* codifican para enzimas con actividad de glicerol 3-fosfato aciltransferasa.

2. Evaluar el efecto de la expresión recombinante de los genes *CrGPATre* y *CrGPATclA* en la producción de lípidos totales y triacilglicéridos en *C. reinhardtii*.

1.11 Estrategia experimental

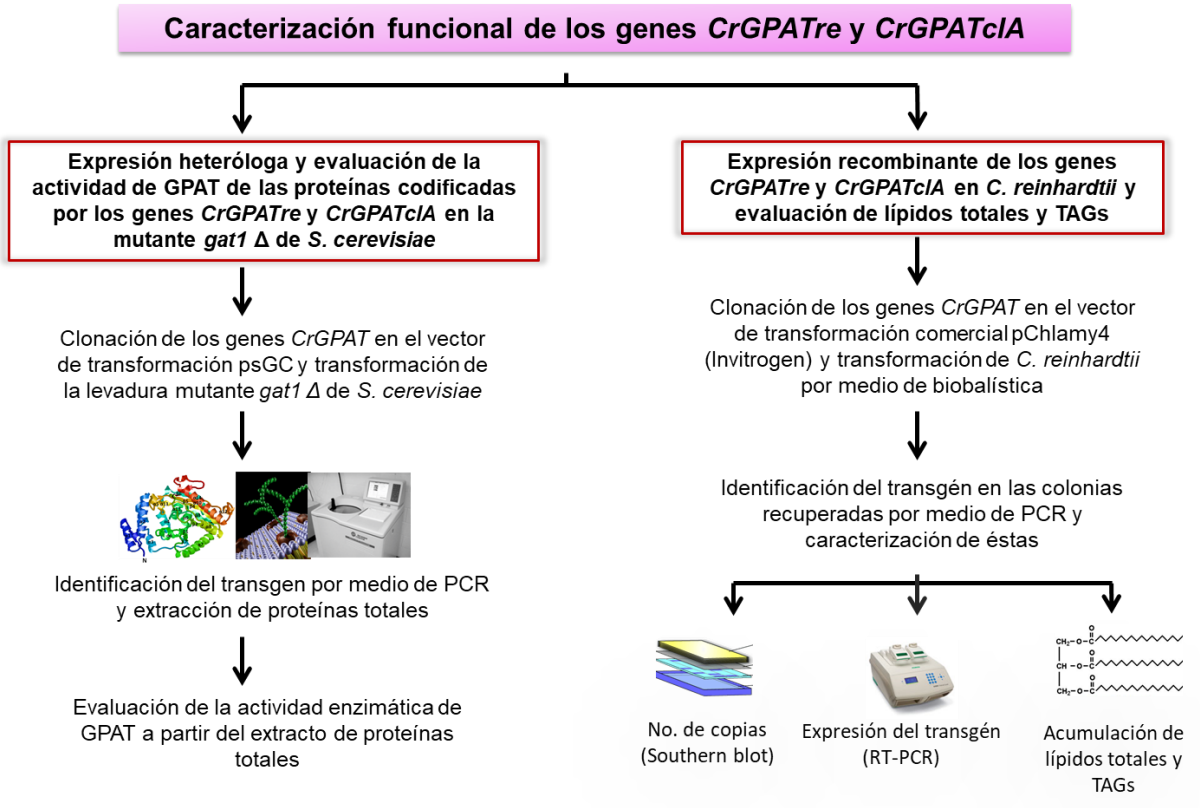


Figura 1.7 Estrategia experimental para la caracterización funcional de los genes *CrGPATre* y *CrGPATclA* de la microalga *C. reinhardtii.*

CAPÍTULO 2

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GLICEROL 3-FOSFATO ACILTRANSFERASA DE LAS PROTEÍNAS CODIFICADAS POR LOS GENES *CrGPATre* Y *CrGPATclA.*

2.1 Introducción

En la literatura se presentan diferentes secuencias homólogas a los genes que codifican para enzimas glicerol 3-fosfato aciltransferasa (GPAT). Tal es el caso de las identificadas en la planta modelo *A. thaliana*, de la cual se identificaron 8 secuencias tipo GPAT (At*GPAT1-8*) a partir de las secuencias identificadas en levadura (Yang *et al.* 2012), y al ser analizadas se observó que algunas de ellas que no presentaban actividad, correspondían a otra enzima o presentaba actividad adicional a la GPAT, así como que la preferencia hacia el ácido graso de cada enzima variaba (Chen *et al.* 2011). Dichos análisis se han llevado a cabo en la cepa mutante de *S. cerevisiae gat1 Δ (BY4742 Matα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*; YKR067w::kanMX4), la cual se encuentra mutada en el gen que codifica para la izoenzima GPAT unida al retículo endoplásmico, la cual se presenta en mayor porporción en ésta levadura, por lo cual presenta una baja actividad de GPAT (87% menos) comparado con la cepa silvestre (Zufferey *et al.* 2005; Zheng *et al.* 2003; Zheng y Zou, 2001). Por lo anterior, se ha hecho un uso amplio de esta cepa de levadura para la caracterización de genes que codifican para enzimas GPAT de plantas (Gupta *et al.* 2013; Chen *et al.* 2011; Ruiz-Lopez *et al.* 2010; Na *et al.* 2005), mamíferos (Wendel *et al.* 2009; Cao *et al.* 2006; Muoio *et al.* 1999), levaduras (Zhu *et al.* 2009; Zheng *et al.* 2003) y la diatomea *T. pseudonana* (Xu *et al.* 2009).

En estudios previos en nuestro laboratorio se identificaron dos genes que codifican enzimas GPAT en la microalga modelo *C. reinhardtii,* un homólogo al gen de la isoenzima AtGPAT9 nombrado *CrGPATre* y un homólogo al gen de la isoenzima ATS1 nombrado *CrGPATcl*, pero hasta el día de hoy no se ha realizado la carcterización funcional de estos genes (Duarte, 2013). Debido a ésto, en este capítulo se realizó la expresión heteróloga de los genes *CrGPATre* y *CrGPATclA* en la levadura mutante *gat1Δ* y se evaluaron diferentes

extractos proteícos de las levaduras transformadas, con el fin de determinar si estos genes codifican para enzimas con actividad de GPAT.

Los resultados de este capítulo fueron publicados como parte del artículo:

Duarte-Coello, M.E., V.A. Herrera-Valencia, I. Echevarría-Machado, M.L. Casais-Molina, S. Peraza-Echeverría (2018). Molecular cloning and functional characterization of two glycerol 3-phosphate acyltransferase from the green microalgae C*hlamydomonas reinhardtii.* Phycological Research.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Cepa de *Escherichia coli*

Se utilizó la cepa bacteriana de *E. coli DH10B* para la multiplicación de los vectores de transformación para levadura, para lo cual fueron preparadas células competentes de acuerdo al protocolo de Inoue y colaboradores (1990) como se indica en el Anexo 5. Para el cultivo de las bacterias se utilizó medio LB (Sigma) semisólido o líquido, así como medio SOC según fue necesario. La preparación de estos medios se describe en el Anexo 5.

2.2.2 Cepa de *Saccharomyces cerevisiae*

Se utilizarón dos cepas de levadura: la BY4742 (Matα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*)*, la cual es la cepa parental de la cepa mutante utilizada, y la cepa mutante *gat1 Δ* (BY4742; Matα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0; YKR067w::kanMX4) caracterizada por Zheng y Zue (2001), la cual presenta una mutación en el gen que codifica para la GPAT de mayor proporción que se encuentra unida al retículo endoplásmico, haciendo que ésta cepa de levadura tenga muy baja actividad de GPAT, de hasta 87% menos comparado con la cepa silvestre (Zufferey *et al.* 2005; Zheng y Zou, 2001). Estas cepas fueron cultivadas en medio YPD a 30°C y en medio deficiente de leucina (SD/-Leu) según fue necesario, la preparación de estos medios se describe en el Anexo 1.

2.2.3 Clonación de los genes *CrGPAT* en el vector de transformación

El vector utilizado fue el psGC (Figura 2.1 A), previamente obtenido en el laboratorio por la Dra. Melissa L. Casais Molina durante sus estudios de doctorado, el cual contiene al promotor del gen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GPD) y el terminador del gen citocromo-C oxidasa (CYC1) de *S. cerevisiae* contenido en el plásmido pGADT7 AD (Clontech), el cual confiere resistencia a ampicilina (bacteria) y a la deficiencia de lisina en el medio (levadura). Los genes *CrGPATre* y *CrGPATcl*A se encontraban clonados dentro del

vector pGEM-T-easy (Figura 2.1 B), y fueron clonados posteriormente en psGC para obtener los plásmidos de transformación *pLGTre* y *pLGTclA.*

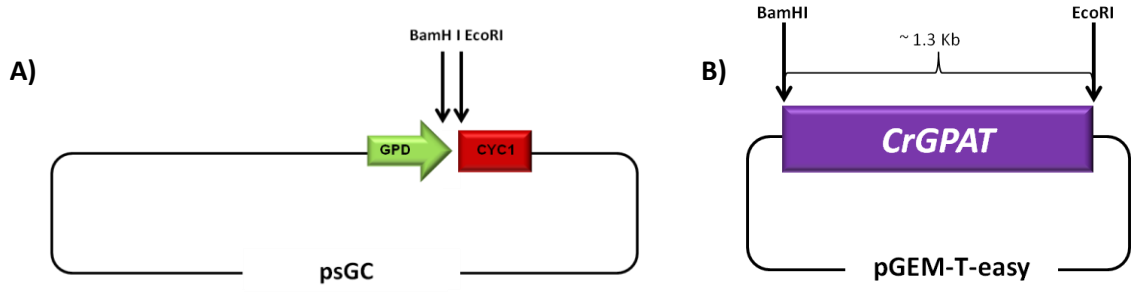


Figura 2.1 Plásmidos utilizados: A*)* psGC, *B) CrGPAT* en pGEM-T-easy (representativo de los genes *CrGPATre* y *CrGPATclA,* en el caso de este último tiene el sitio de EcoRI en ambos lados).

La obtención de los plásmidos de transformación *pLGTre* y *pLGTclA* se realizó de la siguiente forma: una muestra del vector psGC fue incubado a 85°C durante 5 minutos y digerido posteriormente con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI para la clonación con el gen *CrGPATre*, y digerido con EcoRI y la fosfatasa antártica (AnP) para la clonación con el gen *CrGPATclA* (New England Biolabs, NEB). Para la remoción de los genes CrGPAT del vector que los contiene se realizó el mismo proceso que con del vector psGC respectivamente, excepto que en el caso de *CrGPATclA* no se utilizó la CIB. Las reaccines de digestión se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL con los siguientes componentes: 5 µL del plásmido, 5 µL de amortiguador 3 10X (NEB), 0.5 µL de la enzima EcoRI (20000 U/µL, NEB) y 0.5 µL de la enzima BamHI (20000 U/mL, NEB), en el caso del *CrGPATclA* sólo con EcoRI, y completando la reacción con agua ultra pura, esta mezcla fue incubada por 2 horas a 37°C. Se verificó la correcta digestión de las muestras en un gel de agarosa al 1.2% y se escindieron del gel las bandas correspondientes al vector psGC y los genes *CrGPAT* para su posterior purificación por medio del protocolo del estuche comercial: QIAquick Gel Extraction (QIAGEN, C.A) el cual se describe en el Anexo 4. Para verificar si las muestras fueron purificadas sin ninguna contaminación se realizó una electroforesis con 2 µL de las mismas en un gel de agarosa al 1.2%. Una vez observadas las bandas

esperadas en cada carril, se comparó la intensidad de las bandas y se calculó la tasa de ligación 3:1 (Vector: Inserto), y se procedió a realizar la ligación de ambos fragmentos (Figura 2.2). Se calculó la tasa de ligación entre ambos fragmentos por medio de la intensidad de las bandas purificadas llevándose a cabo la reacción en un volumen final de 20 µL, conteniendo 2 µL de amortiguador T4 ligasa y 1 µL de T4 ADN Ligasa Invitrogen, incubando la reacción por 16 horas a 16°C y con una posterior inactivación de la ligasa por medio de una incubación de 10 minutos a 65°C.

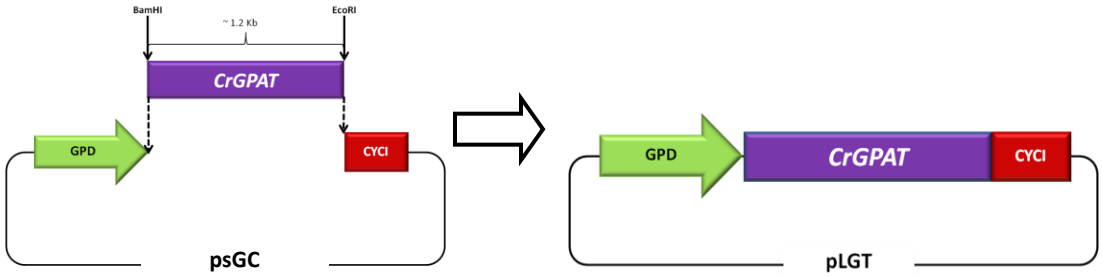


Figura 2.2 Forma en que ocurre la ligación entre psGC y *CrGPAT* para formar el plásmido *pLGTre* o *pLGTclA* (conteniendo al gen *CrGPATre* y *CrGPATclA*, respectivamente).

Posterior a la ligación se realizó la transformación de las células competentes tomando los 20 µL de la reacción de ligación y 200 µL de células competentes de *E. coli* cepa DH10B. La mezcla fue incubada en hielo durante 30 minutos y posteriormente sometida a un choque térmico de 42°C durante 45 segundos e inmediatamente enfriada en hielo por 2 minutos. Seguidamente se adicionaron 900 µL de medio SOC (Triptona, Extracto de levadura, NaCl, Glucosa) y se incubaron a 37°C por 90 minutos a 225 rpm. Posteriormente, la mezcla fue centrifugada a 3,000 rpm por 5 minutos de donde se eliminaron 900 µL de sobrenadante, se resuspendió la pastilla en los 100 µL restantes y las células se plaquearon en cajas de Petri con medio LB (Luria-Bertani) + 100 mg/L de ampicilina. Las cajas fueron incubadas a 37°C por 16 horas. Las colonias transformadas se picaron con palillos estériles, se colocaron en tubos de ensaye con 4 mL de medio LB líquido + ampicilina (100 mg/µL), y se incubaron a 37°C en agitación a 220 rpm durante 16 horas. Una vez terminada la incubación se les

extrajo el ADN plasmídico mediante el protocolo comercial “High Pure Plasmid Purification Kit” (ROCHE) de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

Se tomó 4 mL del cultivo bacteriano (cultivado por 16 horas en medio LB líquido + ampicilina) y se concentró en un tubo eppendorf centrifugando a 13,500 rpm por 1 minuto. Una vez concentrado el cultivo, la pastilla se resuspendió con 250 µL de la disolución fría del amortiguador con ARNsa A, posteriormente se le adicionó 250 µL del amortiguador de lisis homogeneizando por inmersión (6 veces) incubando a temperatura ambiente por 5 minutos, una vez terminada la incubación se le adicionó 360 µL del amortiguador de unión (Binding amortiguador) homogeneizando por inmersión (6 veces) e incubando posteriormente en hielo por 5 minutos. Pasada la incubación se centrifugaron las muestras a 13,500 rpm por 10 minutos, una vez terminada la centrifugación se tomó el sobrenadante y se colocó en las columnas las cuales se centrifugaron a 13,500 rpm por un minuto, se desechó el sobrenadante y se adicionó 500 µL del amortiguador de lavado I a cada columna centrifugando posteriormente a 13;500 rpm por 1 minuto, para lavar la columna se adicionó 700 µL del amortiguador de lavado II a la columna y se centrifugó por 1 minuto a 13,500 rpm, para secar completamente la columna se centrifugo en seco a 13,500 rpm por 30 segundos. Una vez seca la columna se colocó esta en un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL y se le adicionó 40 µL de Tris HCl 10 mM pH 7.5 para eluir la muestra incubándose a temperatura ambiente por 5 minutos, una vez terminada la incubación se centrifugaron las muestras a 13;500 rpm por un minuto. Para evitar la posible contaminación por fibras de la columna, se centrifugó la muestra en el tubo eppendorf a 13,500 rpm por un minuto de donde se tomó el sobrenadante y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 nuevo el cual se almacenó a -20°C.

Para verificar la presencia del inserto en el plásmido se realizó una digestión con la enzima de restricción EcoRI y BamHI o sólo EcoRI (para los genes *CrGPATre* y *CrGPATclA*, respectivamente), cuyos sitios de corte flanquean al inserto (Figura 2.1 y 2.2). La reacción de digestión se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL con los siguientes componentes: 2 µL del plásmido, 2.5 µL de amortiguador #3 10X (NEB), 0.5 µL de la enzima EcoRI (20,000 U/µL, NEB) y 0.5 µL de la enzima BamHI (20,000 U/mL, NEB), en el caso del pLGTCLA sólo con EcoRI, y completando la reacción con agua ultra pura, esta mezcla fue incubada por 2 horas a 37°C y visualizando posteriormente el resultado en un gen de agarosa al 1.2%. En el

caso de la construcción pLGTCLA debido a que se realizó una ligación no direccional y una vez verificada la clonación en el vector psGC, se verificó el sentido del gen en el vector con ayuda de una digestión utilizando la enzima BamHI utilizando las condiciones antes mencionadas, esperando dos bandas de 1,214 y 8,031 pb si el sentido en el que se clonó el gen es el correcto o una banda de aproximadamente 9 Kb si se clonó en sentido inverso.

Una vez obtenido el vector de transformación se procedió a la transformación de *S. cerevisiae.*

2.2.4. Electroforesis en gel de agarosa

La integridad de cada digestión se valoró cualitativamente en un gel de agarosa (1.2%) –TAE 1X (Tris-acetato 0.04M, EDTA 1mM, pH 8.0) teñido con 0.5 µL de bromuro de etidio (10 mg/ml). El gel se corrió en el amortiguador TAE 1X a un voltaje constante de 85V durante 30 minutos. El marcador de peso molecular que se utilizó en todos los ensayos de electroforesis fue de 1 Kb (NEB). La concentración y pureza del ADN plasmídico se estimó por espectrofotometría SmartSpect plus de BioRad, de donde se tomaron 5 µL de muestra más 95 µL de agua (dilución 1:20) (QIAGEN, 2001).

2.2.5 Transformación de *S. cerevisiae* por medio de PEG

La transformación se realizó basándose en el protocolo descrito en el manual del proveedor (Clontech), Yeastmaker^{TM} Yeast transformation system 2 como se describe a continuación.

2.2.5.1 Preparación de las células de *S. cerevisiae*

Se cultivó la cepa de *S. cerevisiae gat1Δ* en medio YPD durante 8-12 h a 30°C y 250 rpm. De este cultivo se tomaron 5 µL los cuales fueron inoculados en medio YPD hasta

obtener una OD_{600} de 0.15 a 0.3; una vez con la absorbancia deseada, las células fueron colectadas a 700g por 5 minutos, resuspendidas en 100 mL de YPD e incubadas a 30°C y 250 rpm hasta obtener una OD_{600} de 0.4-0.5; este cultivo fue colectado en dos partes y lavado con agua estéril. Posteriormente las células fueron colectadas y resuspendidas en 1.5 mL de 1.1 TE/LiAc, colectando las células a máxima velocidad por 30 segundos y resuspendidas en 600 µL de 1.1 TE/LiAc. Posteriormente fueron almacenadas hasta su uso.

2.2.5.2 Transformación de las células de *S. cerevisiae*

Se tomaron 50 µL de las células competentes del apartado anterior y se les adicionó 10 µL de mezcla de plasmido (5 µL de plásmido aprox. 1.5 µg, y 5 µg de Yeastmaker carrier), y 500 µL de PEG/LiAc, se agitó gentilmente e incubaron a 30°C por 30 minutos, posteriormente de adicionó 20 µL de DMSO e incubaron las células a 42°C por 15 minutos. Las células son colectadas a máxima velocidad por 15 segundos y son resuspendidas en 1 mL de medio YPD plus medium e incubadas por 30 minutos a 30°C, posteriormente fueron colectadas las células a máxima velocidad por 15 segundos y resuspenddidas en 0.9% (w/v) de la disolución de NaCl. Una vez transformadas 100 µL de las células fueron inoculadas en un medio deficiente de leucina (SD/-Leu) e incubadas a 30°C hasta obtener colonias.

Una vez obtenidas las colonias transformadas con los respectivos vectores se lavó cada caja con 1 mL de medio SD/-Leu líquido y fueron inoculadas en un tubo falcón de 50 mL con 4 mL de medio SD/-Leu respectivamente (“pool” de colonias), incubadas a 30°C y 250 rpm por 16 horas. Posteriormente fue almacenada una parte de este cultivo (500 µL) en 500 µL de glicerol al 50% y 50 µL fueron inoculados en medio SD/-Leu sólido, de donde fueron tomadas las colonias para su cultivo en medio líquido y posterior extracción de proteínas totales.

2.2.6 Extracción de ADN genómico

Para verificar la presencia del transgén en la levadura se procedió a la extracción de ADN y posterior análisis por PCR. Se tomó una colonia de la levadura transformada e inoculada en 5 mL de medio YPD e incubada por 16 horas a 30°C y 250 rpm, tomando 2 mL de células para la extracción. Se utilizó el protocolo comercial de Illustra Nucleon Phytopure Genomic DNA Extraction Kit (GE Healthcare) (Anexo 3).

2.2.7 Identificación del transgén por medio de PCR

Se realizó una reacción de PCR para la identificación de las clonas transformadas por medio de biobalística, la cual se realizó en un volumen final de 50 µL, conteniendo 5 µL de ADNg (500 ng), 1 µL de cada oligonucleótido Cuadro 2.1 (10 µM) (Duarte, 2013), 1 µL de dNTP's (0.2 µM), 0.2 µL de Taq-polimerasa (Invitrogen, 1U), 1.5 µL de MgCl2 (1.5 µM), 5 µL de amortiguador de reacción 10X (1X) y agua ultra pura. Utilizando el siguiente programa: 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72°C por 10 minutos.

Cuadro 2.1 Oligonucleótidos y temperaturas de alineamiento utilizadas en cada programa de PCR (Duarte, 2013).

Secuencia Amplificada	Oligonucleótidos	Temperatura	Tamaño Amplicón Esperado (pb)
Gen CrGPATre	gpatreF2/gpatreR2	60°C	349
CrGPATclA	GPATchF1/GPATchR1	60°C	413

2.2.8 Cultivo y extracción de proteínas totales de *S. cerevisiae*

El cultivo y extracción de las proteínas totales se realizó basándose en el protocolo dado por Zheng y colaboradores (2003) y en el caso de la proteína codificada por el gen *CrGPATre*, el cual corresponde a la GPAT del retículo endoplásmico, se le adicionó al

protocolo de extracción de proteínas totales la modificación hecha por Chen y colaboradores (2011).

Aunque el análisis bioinformático señaló que el gen *CrGPATre* se encuentraba unido a la membrana del retículo endoplásmico no podemos descartar que este pueda quedar en la parte soluble del extracto, por lo que se realizó la colecta de tres extractos (total, soluble y de membrana) para que pudieramos identificar en que porción se encuentra cada enzima.

2.2.8.1 Cultivo de *S. cerevisiae* para extracción de proteínas

De las placas de SD/-Leu conteniendo el "pool" de colonias transformadas con cada uno de los vectores (psGC, pLGTre y pLGTclA) y de las cepas *gat1Δ* y BY4742 de no más de 3 semanas de edad, se tomó una población por medio una asa de siembra la cual fué inoculada en un tubo falcón con 5 mL de medio YPD e incubadas por ocho horas a 30°C y 250rpm. Pasadas las ocho horas se inocularón 100 µL de este cultivo en un matraz de 1,000 mL con 500 mL de medio YPD, incubando los matraces a 250 rpm y 30°C hasta que se obtuvo una densidad óptica de OD_{600} = 1 a 1.2 (~17-20h). Una vez obtenida la densidad deseada las células fueron colectadas en tubos falcón de 50 mL centrifugando a 3,300g por 10 minutos a 4°C, colectando de 50 en 50 mL el cultivo. Una vez colectado todo el matraz, se desechó el sobrenadante y fue resuspendido en 3 mL de 50 mM de HEPES pH 7.0 + 2 mM de EDTA. Se centrifugó el cultivo a 3300g por 10 minutos a 4°C. Repitiendo este proceso una vez más.

Una vez terminados los lavados se resuspendió el pellet en 2 mL de 50 mM de HEPES pH 7.0 + 2 mM de EDTA, y se transfirierón las células a un tubo eppendorf de 2.0 mL. Se sedimentaron por centrifugación a 14,000 g durante 5 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se congeló el pellet en Nitrógeno líquido mientras se preparaba el amortiguador de extracción de proteínas. Se almacenarón las células a – 80°C hasta su uso.

2.2.8.2 Extracción de proteínas de *S. cerevisiae*

Las células congeladas fueron ligeramente descongeladas en hielo y posteriormente resuspendidas de poco en poco en 2 mL del amortiguador de lisis (50 mM de HEPES pH 7.0; 2 mM de EDTA, 10% de glicerol, 1 mM de DTT y 5µL de inhibidor de proteasas por cada mL de mezcla de amortiguador de lisis (sigma, No. de catálogo P9599)) e se fué pasando lo resuspendido a un vial limpio y seco (previamente enfriado). Se homogenizó la muestra por medio de un politrón (IKA® T25 digital ULTRA TURRAX ®) durante 1 minuto en hielo a 14500 rpm de velocidad (sonda S25-N-8G). Recuperando todo lo homogenizado por medio del politrón en tubos eppendorf de 2 mL previamente enfriados, y centrifugados posteriormente a 2,500g por 5 minutos a 4°C.

Se recuperó el sobrenadante en un tubo eppendorf de 2 mL y homogenizo bien. Se tomaron 500 µL en un tubo eppendorf de 1.5 mL (**extracto total**), tomando 50 µL de estos en otro tubo para la cuantificación y verificación de la integridad de las proteínas en un gel de poliacrilamida, ambos tubos ependorf fueron previamente enfriados en hielo, y congelados con ayuda de nitrógeno líquido. Los 1.5 mL restantes del extracto proteínico total fueron colocados en tubos sorval® ultla bottles de 10 mL (Thermo electron corporation) previamente enfriados y transportados en hielo y obscuridad para ser ultracentrifugados a 100,000g por 1 hora a 4°C (33,000 rpm, Beckman coulter optima XPN-100 ultracentrifuge). Pasado este tiempo se recuperaron el sobrenadante en un tubo eppendorf de 2 mL nuevo y previamente enfriado, se homogenizó bien y separó en alícuotas de 100; 700 y 700 µL en tubos eppendorf de 1.5 mL previamente enfriados (**extracto soluble**) y congelados en nitrógeno líquido, donde los 100 µL fueron utilizados para la cuantificación y verificación de la integridad de las proteínas en un gel de poliacrilamida. Se escurrió muy bien el tubo golpeándolo contra un papel kleenex limpio, para eliminar cualquier resto del extracto soluble e inmediatamente se colocó en hielo.

Se lavó la pastilla con 500 µL del amortiguador de lisis con una micropipeta o con pequeños golpecitos al tubo, para eliminar los posibles restos de proteínas solubles en el pellet. Se centrifugó nuevamente a 100,000g por 1 hora a 4°C en una ultracentrífuga Beckman coulter óptima XPN-100. Recuperando los 500 µL en un tubo eppendorf de 1.5 mL previamente enfriado (extracto proteínico soluble), el cual fué congelado con ayuda de

nitrógeno líquido. Se escurrio muy bien el tubo golpeándolo contra un papel kleenex limpio, para eliminar cualquier resto del extracto soluble e inmediatamente se colocó en hielo. Se resuspendió la pastilla obtenida de la ultracentrifugación en 500 µL del amortiguador de lisis (**extracto membranal**) y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL, homogenizando bien y tomando una alícuota de 50µL en un tubo eppendorf de 1.5 mL nuevo previamente enfriado para la cuantificación y verificación de integridad de las proteínas en un gel de poliacrilamida.

En el caso de no utilizar el extracto al momento, se congeló en nitrógeno líquido y almacenó a -80°C (NO MÁS DE 2 DÍAS).

Se realizó la medición de la concentración de las proteínas totales por medio del protocolo del reactivo de Bradford (BioRad) y se visualizó la integridad de las proteínas por medio de una electroforesis en un gel de poliacrilamida (Anexo 6).

2.2.9 Ensayo enzimático

El ensayo enzimático se realizó basándose en el protocolo de Mañaz-Fernandez y colaboradores (2010), realizando la medición de este por medio del reactivo DTNB (5,5'-DITHIO-BIS (2-NITROBENZOIC ACID)).

2.2.9.1 Reacción enzimática

Se adicionó en una celda desechable 2 mL de la mezcla de reactivos: 100 mM de Amortiguador de fosfatos de sodio pH 7.5; 5 mM de EDTA, 1 mg/mL de BSA, 0.12 mM de DTNB, 62.5 µM oleoyl CoA, 1 mM G3P y agua desionizada estéril para el blanco. Una vez adicionando todos los reactivos se adicionó de 10 a 60 µg de proteína total, ya que es lo que inicia la reacción. El incremento de la coenzima A (CoA) fué monitoreado por medio del cambio de la absorbancia de la muestra a 412 nm durante cuatro minutos utilizando un espectrofotómetro DU 650 Spectrophotometer (Beckman Coulter, Inc., USA). Una unidad de actividad de la enzima (U) fué definido como la cantidad de enzíma que produce 1 µmol CoA por segundo, el cual fue calculado con el coeficiente de extinción del DTNB de 14,150 M^{-1} cm^{-1} (Ellman, 1959). La actividad específica fue calculada en Unidades por miligramo de proteína (U mg^{-1} proteína). La actividad fue calculada de las fases lineales del periodo de inicio de la reacción.

2.3 Resultados

2.3.1 Obtención del vector de transformación pLGTre y pLGTclA

El vector de transformación se construyó como se describe en el apartado de materiales y métodos de este capítulo. Primeramente se realizó la digestión con las enzimas de restricción de EcoRI y BamHI, en el caso de la construcción que contiene al gen *CrGPATre* (pLGTre) y solo EcoRI para la que lleva al gen *CrGPATclA* (pLGTclA), siendo las bandas con los pesos esperados escindidas del gel, purificadas y eluídas en un volumen final de 40 µL cada una. En la Figura 2.3 se puede observar la integridad de las bandas purificadas (pesos esperados de 9 Kb para psGC, 1.2 Kb para *CrGPATclA* y 1.3 Kb para *CrGPATre*). Posteriormente, se realizó la ligación de cada gen con su correspondiente vector, tomando 10 µL de la elución del gen (Inserto) y 1µL del vector psGC.

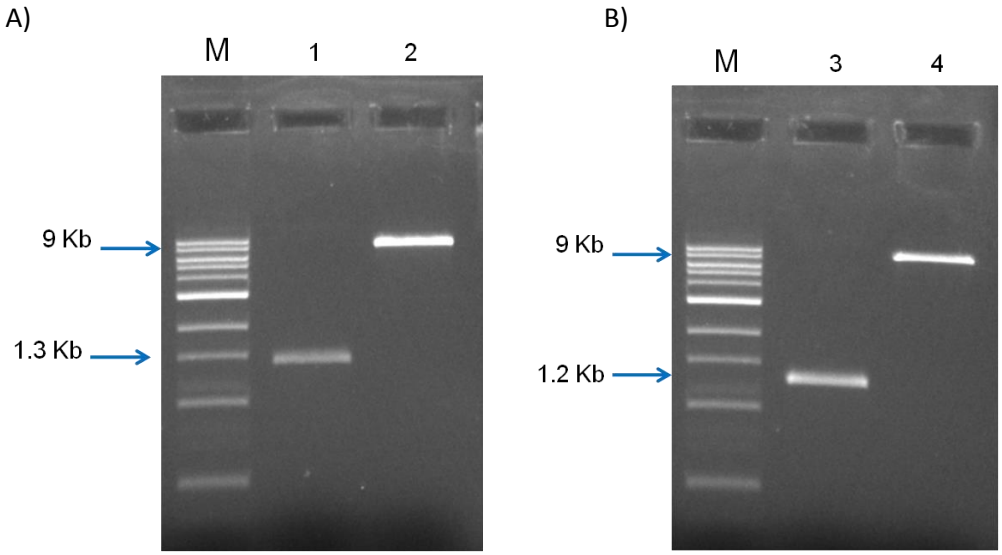


Figura 2.3 Electroforesis de 2 µL de las muestras purificadas para calcular la relación vector: inserto a usar para la ligación. A) Digeridos con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI. B) Digeridos con la enzima de restricción EcoRI. M = Marcador de 1 Kb (NEB), 1 = *CrGPATre* (1.3 Kb), 3 = *CrGPATclA* (1.2 Kb), 2 y 4 = psGC (9 Kb).

Cada reacción de ligación se utilizó para la transformación de células competentes de *E. coli* DH10B, como se mencionó en el apartado anterior, con el fin de multiplicar el plásmido resultante. Se obtuvo una y seis muestras de plásmido purificado de cada construcción, pLGTre y pLGTclA, respectivamente, de los cuales 5 µL de cada muestra fue analizada por medio de la misma digestión de la cual se partió para determinar la correcta clonación de cada uno.

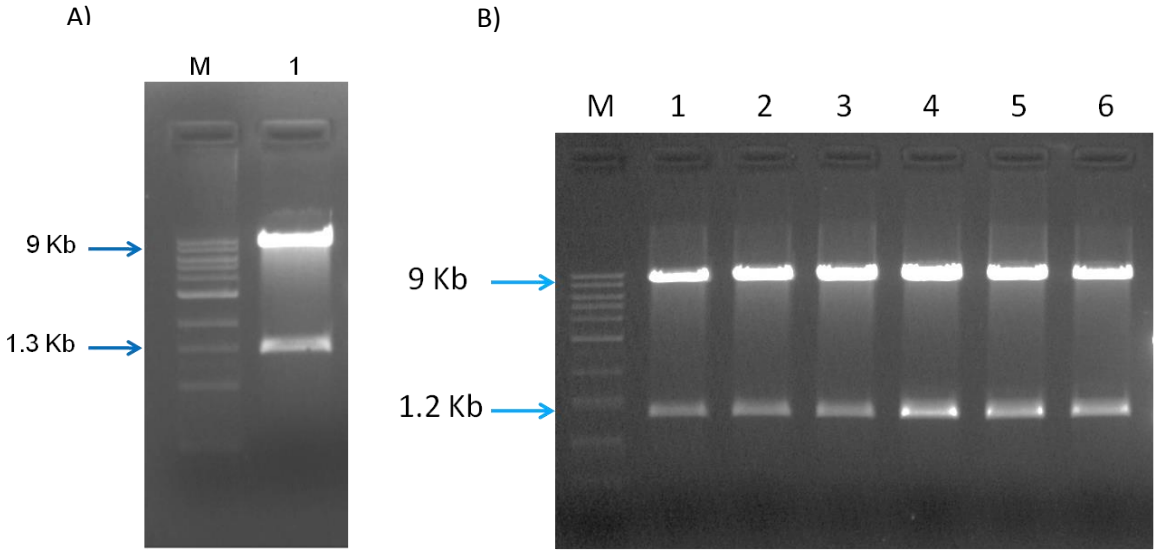


Figura 2.4 Análisis de restricción con las enzimas BamHI y/o EcoRI de plásmidos producto de la ligación del vector psGC con los genes *CrGPAT*. M = Marcador de 1 Kb (NEB). A) pLGTRE, bandas esperadas de 9 Kb vector y 1.3 gen *CrGPATre.* B) pLGTCLA, bandas esperadas de 9 Kb vector y 1.2 Kb gen *CrGPATclA.*

Como se observa en la Figura 2.4 se obtuvo la correcta clonación de éstos genes en el vector psGC, por lo que se procedió a la verificación de que el sentido en el que se clonó el plásmido pLGTclA sea el correcto. Esto se realizó con la ayuda de una digestión con la enzima BamHI, si el gen CrGPATclA se clonó en el sentido deseado nos daría dos bandas: una de 8.031 Kb y 1.2 Kb (sentido correcto), y si el gen CrGPATclA se clonó en el sentido inverso nos daría una banda de aproximadamente 9 Kb (sentido inverso). Como se observa

en la Figura 2.5 las clonas 1; 3; 4; 5 y 6 contienen al gen *CrGPATclA* en el sentido correcto. Una vez verificado la correcta clonación de ambas construcciones se procedió a la transformación de la levadura *S. cerevisiae* siguiendo el protocolo descrito en el apartado de materiales y métodos de este capítulo.

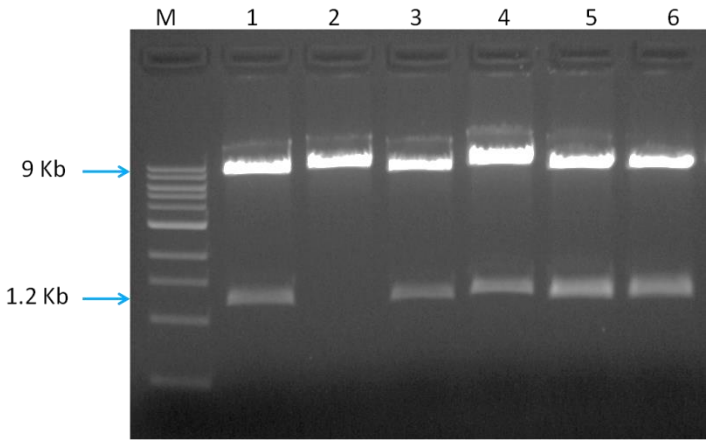


Figura 2.5 Análisis de restricción con la enzima BamHI de plásmidos pLGTclA para verificar sentido de la clonación. M = Marcador de 1 Kb (NEB). 1-6 = clonas pLGTCLA, bandas esperadas de 8.031 Kb y 1.2 Kb sentido correcto o aproximadamente 9 Kb sentido inverso.

2.3.2 Transformación de *S. cerevisiae*

Se realizó la transformación del cultivo de *S. cerevisiae* siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2.5.2 de materiales y métodos de este capítulo, con una concentración de 10 µg de cada plásmido (10 µL de cada vector, pLGTre, pLGTclA y pcGC). En la figura 2.6 se puede observar una caja representativa de cada construcción y de los controles, observándose el crecimiento esperado de cada uno de estos, en el caso del control de la línea un crecimiento del cultivo (cepa *gat1Δ* en medio YPD) sin contaminación y del control del medio deficiente (cepa *gat1Δ* en medio SD/-Leu) sin crecimiento alguno. Se obtuvo un total de 20, 15 y 3 colonias correspondientes a los vectores pLGTre, pLGTclA y psGC, respectivamente.

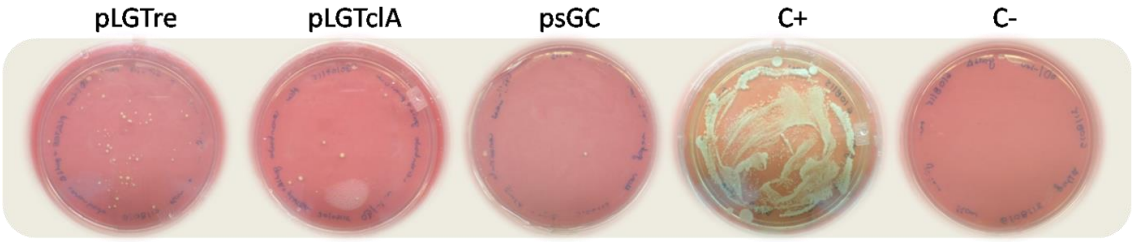


Figura 2.6 Cajas de Petri representativas del resultado de la transformación de *S. cerevisiae* con los plásmidos pLGTre (que contiene al gen *CrGPATre)*, pLGTclA (continene al gen *CrGPATclA),* psGC (Vector vacío), cultivados en medio SD/-Leu. C+ = cepa *gat1Δ* cultivada en medio YPD, y C- = cepa *gat1Δ* cultivada en medio deficiente (SD/-Leu).

Las colonias obtenidas de cada uno de los vectores fueron lavadas con medio SD/-Leu e inoculadas en 5 mL de este mismo medio para realizar un "pool" de colonias de la cepa de *S. cerevisiae gat1Δ*, como se específica en el apartado de materiales y métodos de éste capítulo, inoculando 200 µL del cultivo en placas de medio SD/-Leu sólido y colectando 2 mL para extracción de ADNg y análisis.

2.3.4 Análisis del "pool" de colonias de *S. cerevisiae* transformados con los vectores pLGTre y pLGTclA

Se realizó la extracción de ADN de 2 mL del cultivo donde fueron cultivadas las clonas transformadas (SD/-Leu) por medio del protocolo comercial de Illustra Nucleon Phytopure Genomic DNA Extraction Kit (GE Healthcare), observándose en la Figura 2.7 la integridad del ADN extraído de estas colonias.

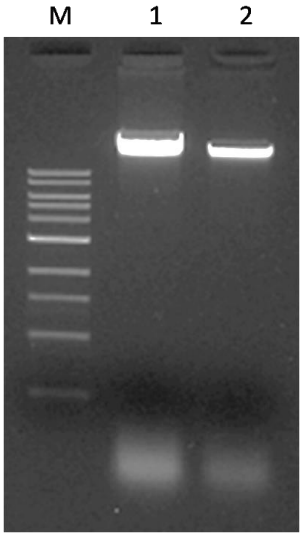


Figura 2.7 Visualización de la integridad del ADNg del "pool" de clonas transformadas de *S. cerevisiae (gat1Δ)*. En el gel se adicionaron 5 µL de cada muestra. M = Marcador de 1 Kb (Invitrogen). 1 = "pool" colonias tranformadas con el vector pLGTre, 2 = "pool" de colonias transformadascon el vector pLGTclA.

Una vez verificada la integridad del ADNg extraído se procedió a la identificación del gen de interés por medio de PCR, el gen *CrGPATre* para el "pool" transformado con pLGTre y al gen *CrGPATclA* en el "pool" transformado con pLGTclA.

En la Figura 2.8 se observa el resultado del análisis por PCR del "pool" de colonias obtenido de cada vector, siendo el amplicón esperado de 349 y 413 correspondientes a la parte interna del gen *CrGPATre* y *CrGPATclA*, respectivamente. Con esto se observa la correcta integración del plásmido en cada "pool" de colonias de *S. cerevisiae*. En el caso del "pool" transformado con el vector vacio (psGC) se puede observar su integración ya que las este pudo crecer en medio deficiente de leucina (SD/-Leu), mientras que la cepa sin transformar de *gat1Δ* no creció en este medio (Figura 2.6).

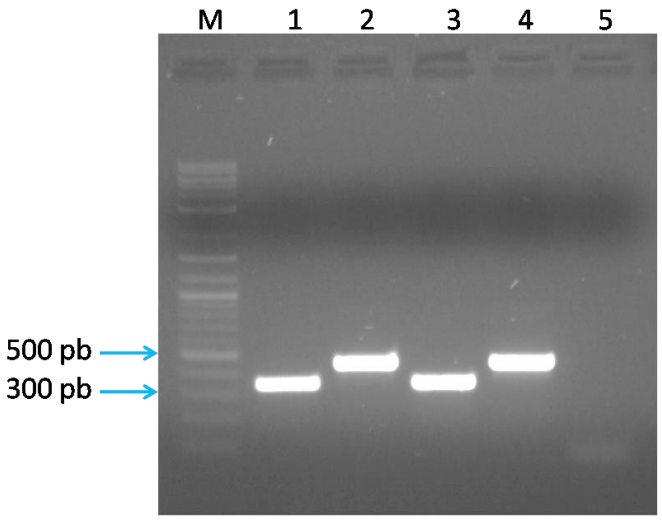


Figura 2.8 Identificación del transgén en el "pool" de colonias de *S. cerevisiae* por medio de PCR utilizando 500 ng de ADNg. 1 = "pool" colonias transformadas con el vector pLGTre, 2 = "pool" colonias transformadas con el vector pLGTclA, 3 = plásmido pLGTre, 4 = plásmido pLGTclA, 5 = agua ultrapura, M = marcador 2 log Invitrogen.

2.3.5 Extracción de proteínas totales y verificación de integridad

Una vez verificada la integración del transgén en el "pool" de colonias obtenido, se realizó el cultivo, colecta y extracción de proteínas (totales, solubles y membranales) de las cepas silvestre (WT) BY4742; la mutante de *S. cerevisiae* ***gat1Δ*** (*gat1⊿*), el "pool" de colonias transformadas con el vector pLGTre (RE), el "pool" de colonias transformadas con el vector pLGTclA, y el "pool" de colonias transformadas con el vector vacío (psGC), siguiendo el protocolo descrito en el apartado de materiales y métodos de este capítulo. En la Figura 2.9 se puede observar la integridad de estas proteínas con una concentración 11.5, 10 y 7 µg en un gel de poliacrilamida al 15% conteniendo extracto total, soluble y membranal, respectivamente.

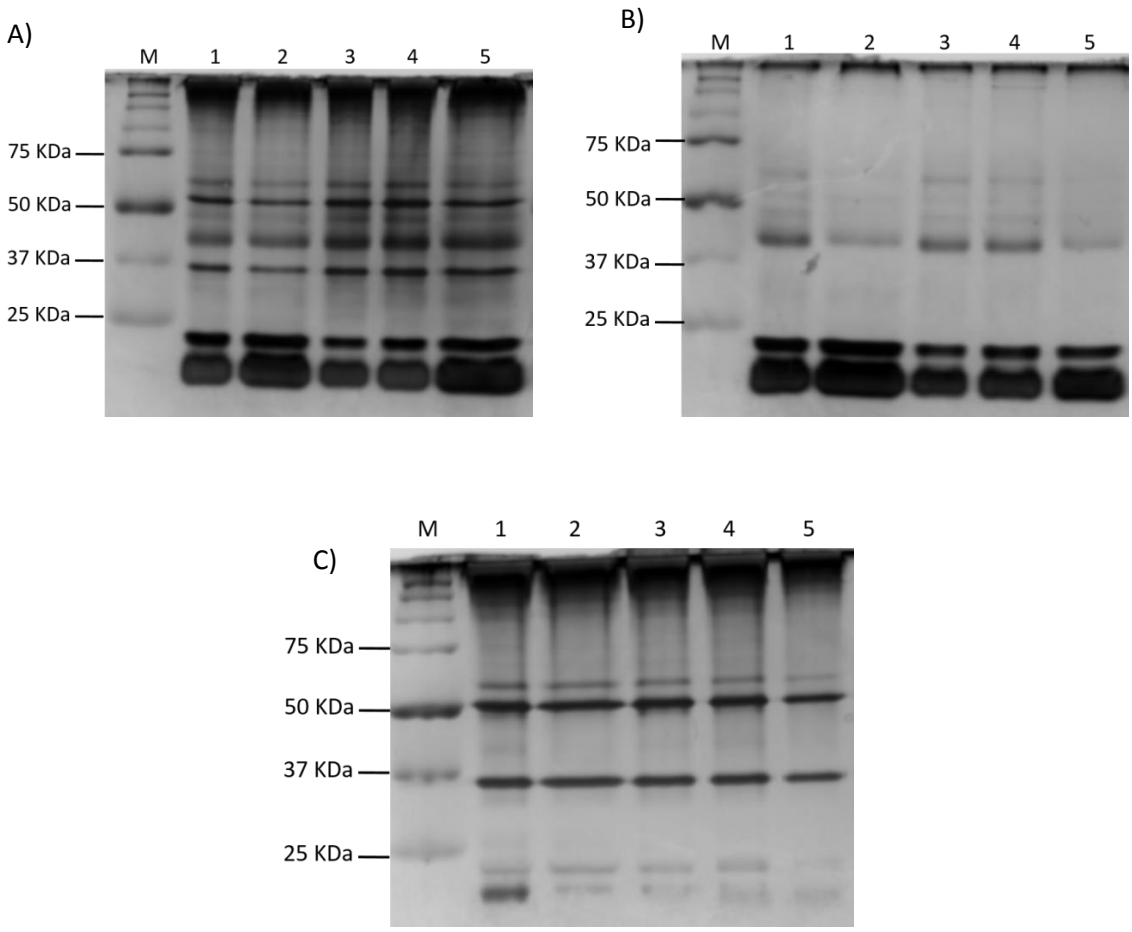


Figura 2.9 Integridad de los extractos protéicos. A) extracto total, B) extracto soluble, C) extracto membranal. 1 = "pool" de colonias transformadas con el vector pLGTre, 2 = "pool" de colonias transformado con el vector pLGTclA, 3 = "pool" de colonias transformado con el vector psGC, 4 = *gat1Δ* (cepa mutante) 5 = BY4742 (cepa silvestre), M = Marcador proteínas BioRad.

2.3.6 Ensayo enzimático

Una vez verificada la integridad de las proteínas extraídas se procedió a la realización del ensayo enzimático (Figura 2.10), siguiendo las especificaciones señaladas en materiales y métodos de este capítulo. En la Figura 2.10 A se observa la actividad específica de GPAT presente en el extracto total, donde la cepa silvestre de levadura BY4742 presentó la mayor actividad de GPAT con aprox. 56.42 $mU \cdot mg^{-1}$ de proteína, seguido de la cepa mutante *gat1Δ* transformada con el vector pLGTcl con aprox. 35.6 $mU \cdot mg^{-1}$ de proteína. Ambas cepas obtuvieron actividades específicas de GPAT significativamente más altas a las presentes en la cepa mutante *gat1Δ* (aprox. 15.66 $mU \cdot mg^{-1}$ de proteína), la cepa *gat1Δ* transformada con psGC (aprox. 7.63 $mU \cdot mg^{-1}$ de proteína). En el caso de la actividad de GPAT observada en la mutante *gat1Δ* transformada con el vector pLGTre fue de aprox. 6.5 $mU \cdot mg^{-1}$ de proteína, similar a las actividades observadas en la cepa mutante *gat1Δ* y la cepa *gat1Δ* transformada con psGC.

En el extracto soluble (Figura 2.10 B), la actividad específica de GPAT en la cepa mutante *gat1Δ* transformada con pLGTcl fue de aproximadamente de 31 $mU \cdot mg^{-1}$ de proteína, similar a la actividad presente en cepa silvestre BY4742 (aprox. 30.8 $mU \cdot mg^{-1}$ de proteína) y significativamente más alta que la encontrada en la cepa mutante *gat1Δ* (aprox. 7.87 $mU \cdot mg^{-1}$ de proteína) y en la mutante transformada con psGC (aprox. 5.5 $mU \cdot mg^{-1}$ de proteína). En el caso de la actividad de GPAT observada en la mutante *gat1Δ* transformada con el vector pLGTre fue de aprox. 6.5 $mU \cdot mg^{-1}$ de proteína, similar a las actividades observadas en la cepa mutante *gat1Δ* y la cepa *gat1Δ* transformada con psGC.

Cuando se evaluó el extracto membranal (Figura 2.10 C) la actividad específica de GPAT en la cepa mutante transformada con pLGTcl (aprox. 30.43 $mU \cdot mg^{-1}$ de proteína) fue significativamente más alta que la actividad observada con la cepa mutante transformada con pLGTre (aprox. 20.61 $mU \cdot mg^{-1}$ de proteína) y sin embargo, ambas actividades fueron significativamente más altas que las detectadas en la cepa mutante *gat1Δ* (aprox. 7.7 $mU \cdot mg^{-1}$ de proteína) y en la cepa mutante transformada con psGC (aprox. 6.7 $mU \cdot mg^{-1}$ de proteína). Como se esperaba, la actividad expecífica de GPAT más alta fue detectada en la cepa silvestre BY4742 (aprox. 57.97 $mU \cdot mg^{-1}$ de proteína).

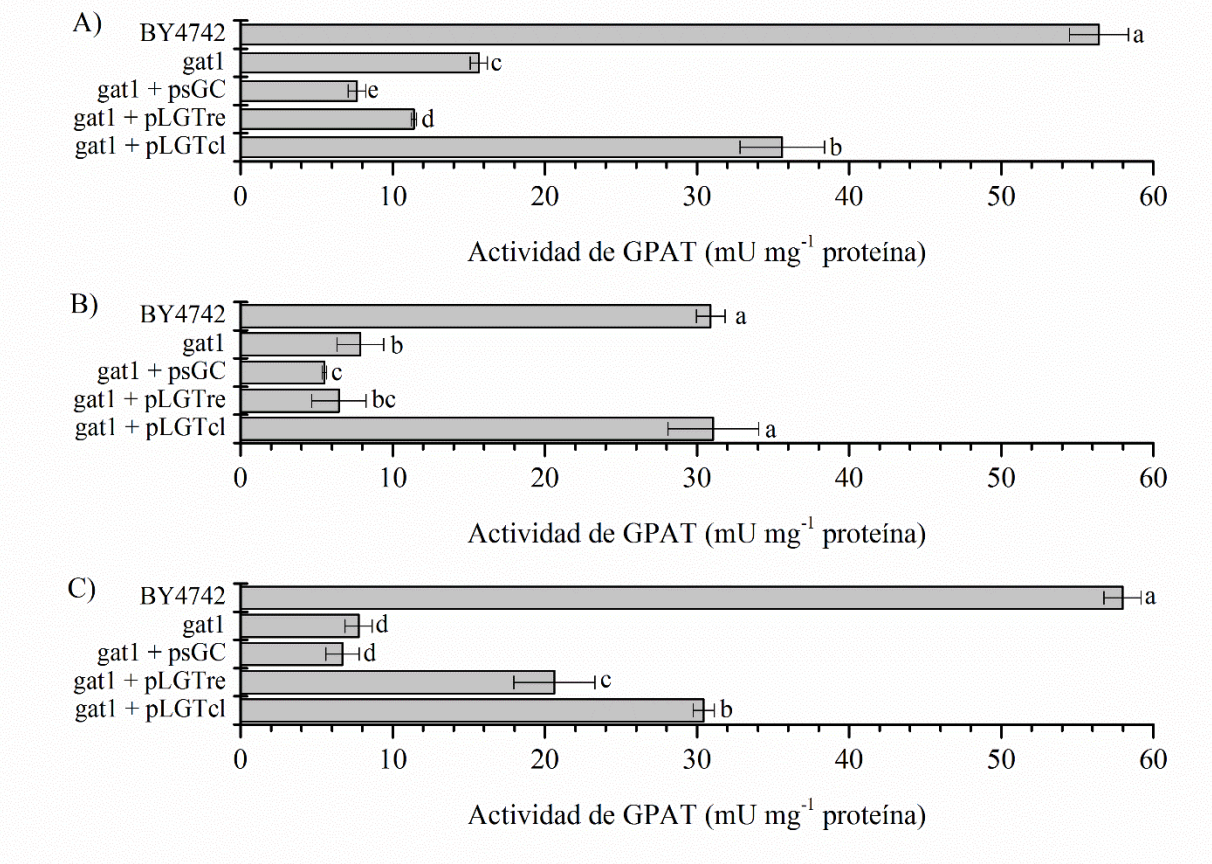


Figura 2.10 Actividad de GPAT de CrGPATre y CrGPATclA medida por la expresión heteróloga en la levadura mutante *gat1Δ*. A) extracto total, B) extracto soluble, C) extracto membranal. 1 = "pool" de colonias transformadas con el vector pLGTre (conteniendo al gen *CrGPATre*), 2 = "pool" de colonias transformado con el vector pLGTclA (conteniendo al gen *CrGPATclA*), 3 = "pool" de colonias transformado con el vector psGC (vector vacío), 4 = *gat1Δ* (cepa mutante) 5 = BY4742 (cepa silvestre). Diferentes letras minúsculas en la gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 6).

2.4 Discusión

Existen diversos estudios en donde se ha identificado y caracterizado la enzima GPAT de diferentes organismos entre los que se encuentran: bacterias (Wilkinson y Bell, 1997), levaduras (Bratschi *et al.* 2009), animales (Cao *et al.* 2006), plantas (Iscandarov *et al.* 2016; Misra y Panda, 2013; Chen *et al.* 2011) y microalgas (Baral *et al.* 2012; Xu *et al.* 2009), siendo éstas últimas las menos estudiadas. En nuestro laboratorio, en un estudio previo, se identificaron y caracterizaron molecularmente dos genes tipo GPAT en la microalga verde *C. reinhardtii*, un homólogo del gen que codifica para la isoenzima AtGPAT9, llamado *CrGPATre*, y un homólogo del gen que codifica para la izoenzima ATS1, llamado *CrGPATclA*, (Duarte, 2013). Estos análisis sugirieron que: *CrGPATre* corresponde a la isoenzima GPAT del retículo endoplásmico, mientras que *CrGPATclA* corresponde a la isoenzima GPAT del cloroplasto.

En el presente capítulo de investigación se reporta el análisis de la actividad de las proteínas codificadas por los dos genes *CrGPATre* y *CrGPATclA*, previamente identificados en *C. reinhardtii* (Duarte, 2013). Los ensayos de actividad de GPAT se llevaron a cabo a partir de tres extractos proteicos (total, soluble y membranal), a diferencia de los estudios presentados en la literatura donde solo analizan el extracto total en el caso de las isoenzimas del cloroplasto (Ruiz-López *et al.* 2010) y solo el extracto membranal en el caso de las isoenzimas del retículo endoplásmico o mitocondrial (Mañaz-Fernandez *et al.* 2010; Xu *et al.* 2009; Cao *et al.* 2006). Ésto fue debido a lo observado en los análisis bioinformáticos presentados por Duarte (2013), en donde se observaron sitios hidrofóbicos en la enzima CrGPATclA sugiriendo una posible unión a membrana.

La actividad presente en cada uno de los extractos, tal como se observa en el apartado de resultados, fue diferente. En el extracto total se detectó la mayor actividad en la cepa silvestre BY4742 y la cepa mutante transformada con el vector pLGTclA las cuales fueron mayores a la actividad detectada en cepa la mutante de levadura *gat1⊿* y la cepa mutante transformada con el vector psGC. Éstos resultados corresponden a los presentados en la literatura en donde se observa que la GPAT de la cepa silvestre es la que presenta la mayor actividad comparado con las isoenzimas GPAT evaluadas (Mañaz-Fernandez *et al.* 2010;

Ruiz-Lopez *et al.* 2010; Xu *et al.* 2009; Cao *et al.* 2006). En cuanto a la cepa mutante transformada con el vector pLGTre presento menor actividad comparada con la cepa mutante de ***gat1Δ***. Esto puede deberse a que la presencia de la proteína correspondiente al gen *CrGPATre* se encontraba en tan baja proporción en el extracto total que no fue posible detectar la actividad. Es quizá por esta razón que, en diferentes estudios donde es evaluada la actividad de las isoenzimas GPAT que se encuentran unidas a membrana, solo analizan la actividad en el extracto membranal (Mañaz-Fernandez *et al.* 2010; Xu *et al.* 2009).

El extracto soluble presento un patrón similar al observado en el extracto total. La mayor actividad fue observada en la cepa mutante transformada con el vector pLGTclA y de la cepa silvestre BY4742, las cuales no presentaron una diferencia significativa entre ellas. Mientras que las cepas que presentaron la menor actividad fueron la cepa mutante de levadura *gat1Δ*, la cepa mutante transformada con el vector psGC y la cepa mutante transformada con el vector pLGTre. Éstos resultados son muy interesantes debido a que en la literatura no se había reportado el análisis del ensayo enzimático de enzimas tipo GPAT en el extracto soluble, por lo que éste sería el primer reporte en el cual se realiza éste análisis. La falta de este estudio en la literatura puede deberse a que diferentes autores solo analizaban a la isoenzima del cloroplasto de plantas debido a su facilidad de purificación (Murata y Tasaka, 1997), y por lo tanto, con el análisis del extracto total es suficiente para observar la presencia o ausencia de actividad de la isoenzima GPAT que se encuentra de forma soluble en plantas (Murata y Tasaka, 1997), así como la actividad presente en la cepa silvestre de levaduras, la cual se encuentra en mayor proporción en la parte soluble (Mañaz-Fernandez *et al.* 2010, Xu *et al.* 2009).

Por otro lado, en el extracto membranal, se observó un incremento de la actividad en la cepa mutante transformada con el vector pLGTre comparado con la cepa mutante de levadura *gat1Δ* y la cepa mutante transformada con el vector vacío. En éste mismo extracto se ha identificado la actividad de las isoenzimas GPAT unidas a membrana (Chen *et al.* 2014; Mañaz-Fernandez *et al.* 2010; Ruiz-Lopez *et al.* 2010; Xu *et al.* 2009; Zhu *et al.* 2009; Cao *et al.* 2006; Zheng *et al.* 2003). Esto es debido a que en éste extracto la proporción de nuestra enzima es mayor comparado con el extracto total, por lo que es posible detectar la actividad (Mañaz-Fernandez *et al.* 2010).

Los resultados obtenidos de los tres extractos apoyan las predicciones hechas por los análisis bioinformáticos presentados en Duarte (2013), y se corrobora que *CrGPATre* codifica para una enzima GPAT que se encuentra unida a membrana.

Por otro lado, y de forma interesante, se detectó actividad la cepa mutante transformada con el vector pLGTclA en el extracto membranal, lo cual no se había observado previamente en la literatura, lo cual sugiere que ésta enzima también se puede comportar como una enzima unida a membrana. En el estudio realizado por Duarte (2013) se pudo observar durante el análisis bioinformático que la predicción de la proteína de CrGPATclA no presentaba ningún sitio transmembranal, pero si un sitio hidrofóbico, sugiriendo que la unión de ésta proteína a la membrana pueda darse con ayuda de otro factores, como por ejemplo proteínas integradas a membrana o con las cabezas polares de grupos lípidicos (Nelson y Cox, 2004; Lodish *et al.* 2000).

Estudios previos han sugerido que los plástidos, así como el retículo endoplásmico, podrían estar relacionados a la síntesis de cuerpos lípidicos, los cuales son sitios de almacén de lípidos (usualmente TAGs) en microalgas (Goodson *et al.* 2011, Fan *et al.* 2011). Además, recientemente se ha propuesto un modelo en el cual se sugiere que la ruta completa, desde la producción del glicerol-3-fosfato hasta los TAGs, se pueda estar llevando en el cloroplasto (Goold *et al.* 2015). En general éstos resultados apoyan el modelo en donde la síntesis de TAGs que involucre a las enzimas presentes tanto en el retículo endoplásmico como en el cloroplasto.

En resumen, *CrGPATre* y *CrGPATclA* codifican para enzimas con actividad de GPAT, y se sugiere que CrGPATre es una proteína unida a membrana mientras que CrGPATclA es una proteína que puede encontrarse tanto de forma soluble como unida a membrana.

Basándose en todos estos resultados, una de las perspectivas de este trabajo podría ser la identificación de la ruta de síntesis de lípidos que se encuentra relacionada con cada una de las isoenzimas caracterizadas en el presente capítulo.

CAPÍTULO 3

ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE LOS GENES *CrGPATre* Y *CrGPATclA* Y LA PRODUCCIÓN DE LÍPIDOS TOTALES Y TRIACILGLICÉRIDOS EN *C. reinhardtii.*

3.1 Introducción

La enzima Glicerol-3-fosfato aciltransferasa se encuentra relacionada a la síntesis de lípidos en plantas (Murata y Tasaka, 1997). En plantas se han identificado diez isoenzimas GPAT en *A. thaliana*, de las cuales la AtGPAT9 se encuentra relacionada a la síntesis de lípidos de membrana, además de la síntesis de TAGs (Singer *et al.* 2016), mientras que las demás se encuentran relacionadas a la producción de lípidos de membrana (Chen *et al.* 2011). En microalgas existen muy pocos estudios sobre la identificación de genes homólogos a GPAT que participen en la síntesis de lípidos (Nakamura y Li-Beisson, 2016). Entre estos se encuentra el de Iskandarov y colaboradores (2016), quienes identificaron un homólogo al gen *AtGPAT9* de *L. Incisa*, y lo expresaron de forma recombinante en *C. reinhardtti*, en donde observaron un incremento de TAGs de hasta 1.5 veces en esta microalga.

En un estudio previo de nuestro laboratorio se identificaron dos genes homólogos a *AtGPAT9* y *ATS1*, que codifican para las enzimas GPAT en la microalga verde *C. reinhardtii. CrGPATre* que codifica para un homólogo a la isoenzima AtGPAT9, y *CrGPATclA* que codifica para un homólogo a la isoenzima ATS1 (Duarte, 2013). Además, en el capítulo 2 de esta tesis se encontró que las enzimas codificadas por estos genes presentan actividad de GPAT. Sin embargo no se había realizado la expresión recombinante de estos genes para identificar de qué forma afectan la producción de lípidos en esta microalga.

Por lo tanto, en este capítulo se obtuvieron líneas transgénicas de *C. reinhardtii*, ya sea con el cDNA de *CrGPATre* o de *CrGPATclA* cuya expresión fue dirigida por el promotor

constitutivo fuerte del HSP70A/RbcS2 y se evaluó la producción de lípidos totales y TAGs en estas líneas transgénicas.

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Cepa de *C. reinhardtii* y cultivo

El cultivo utilizado para los experimentos fue la cepa silvestre 137c (mt+) de *C. reinhardtii* donada por la Dra. Elizabeth Harris del Centro de *Chlamydomonas* (Universidad de Duke, Durham, Carolina del Norte. USA. www.chlamy.org) y actualmente depositada en el laboratorio BTD04 de la Unidad de Biotecnología del CICY.

Esta clona se cultivó en medio TAP (Harris, 1989) (Anexo 1), bajo condiciones de fotoperíodo (16h luz/ 8h oscuridad) a una temperatura de 25 ºC. Cuando se cultivó en medio líquido, se utilizó una agitación de 140 rpm (Lilly *et al.* 2002) en un agitador orbital Thermo Scientific, modelo MAXQ 4450.

3.2.2 Cepa de *Escherichia coli*

Se utilizó la cepa bacteriana de *E. coli DH10B* para la multiplicación de los vectores de transformación para *C. reinhardtii*, para la cual fueron preparadas células competentes de acuerdo al protocolo de Inoue y colaboradores (1990) como se indica en el Anexo 5. Para el cultivo de las bacterias se utilizó medio LB (Sigma) semisólido o líquido, así como medio SOC según fue necesario. La preparación de estos medios se describe en el Anexo 5.

3.2.3 Cálculo de la concentración celular en el cultivo de *C. reinhardtii*

Para calcular el número de células por mililitro (cel/mL) se utilizó una cámara de Neubauer (hemocitómetro) siguiendo el siguiente procedimiento:

Se colectaron 900 µL del cultivo de células, el que se le aplicó 100 µL de una disolución de yoduro de lugol (Anexo 2) y después se agitó por cinco minutos en el orbitador

a 100 rpm, de la muestra fijada se tomaron 15 µL para llenar la cámara y realizar el conteo (Figura 3.1). Se contaron todas las células contenidas en los 5 campos visuales señalados en la cuadrícula pequeña (Figura 3.1), siguiendo siempre las manecillas del reloj. Posteriormente se realizaron dos conteos por muestra (uno por sección de la cámara) y se obtuvo el promedio, de donde se obtuvo el número de células por mL de cultivo, aplicando la siguiente fórmula (Hansen, 2000):

Fórmula:

C= (N) (50,000) (F)

C = Cantidad de cel/mL

N = Promedio de número de células contadas

F = Factor de dilución

50,000 = Factor de conversión

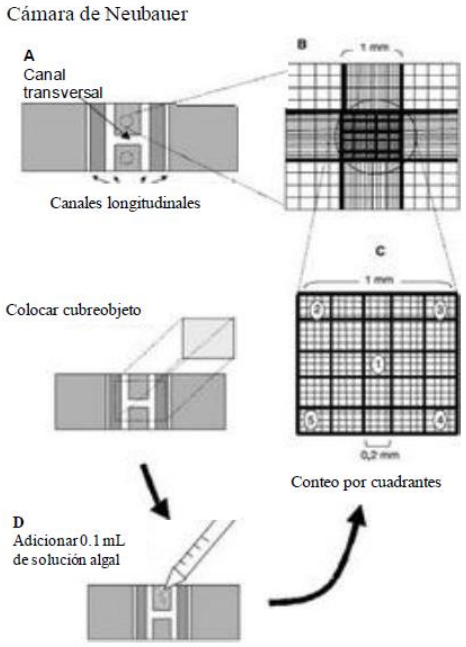


Figura 3.1 Cuadros de conteo en la cámara de Neubauer.

3.2.4 Clonación de los genes *CrGPAT* en el vector de transformación

El vector comercial utilizado fue el pChlamy4 de Invitrogen, el cual contiene a un promotor de alta expresión (Hsp70A/RbcS2), al gen de selección Ble para *C. reinhardtii* (codifica para el gen de resistencia de la Zeocina) y el gen para la resistencia a ampicilina para bacterias. Los genes *CrGPATre* y *CrGPATcl*A se encontraban previamente clonados dentro del vector pSP124S (Duarte, 2013).

En la Figura 3.2 se puede observar al vector pChlamy4 y el plásmido pcCrGPAT (representativo de los genes *CrGPATre* y *CrGPATclA* contenidos en el vector pSP124S) con sus respectivos sitios de restricción, de donde se partió para la formación de los vectores transformación *pcGTRE* y *pcGTCLA*.

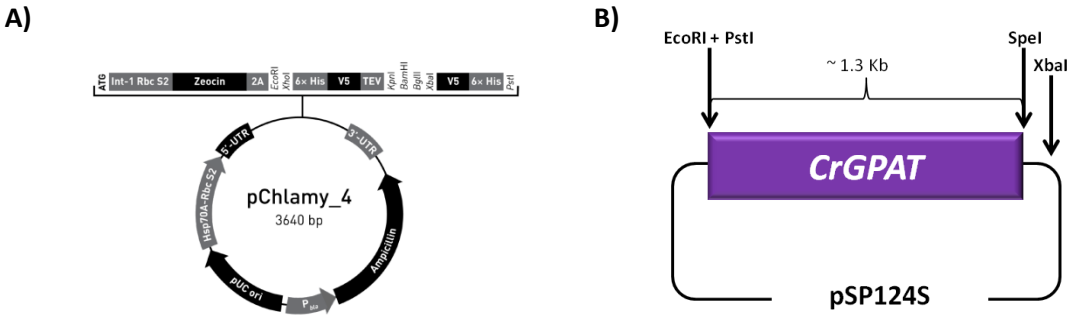


Figura 3.2 Plásmidos utilizados: A*)* pChlamy4 invitrogen, *B) pcCrGPAT* (representativo de los genes *CrGPATre* y *CrGPATclA* contenidos en el vector pSP124S).

Para la construcción de estos vectores de transformación, se partió de una muestra del vector pChlamy4 y del plásmido pcCrGPAT los cuales fueron incubados a 85°C durante 5 minutos y digeridos posteriormente para la apertura del vector y la remoción del gen *CrGPAT* del vector que lo contiene. La reacción de digestión se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL con los siguientes componentes: 5 µL del plásmido, 5 µL de amortiguador 4 10X (NEB), 0.5 µL de la enzima EcoRI (20000 U/µL, NEB) y 0.5 µL de la enzima XbaI (20000 U/mL, NEB) y completando la reacción con agua ultra pura, esta mezcla fue incubada por 16

horas a 37°C. Posteriormente se verificó la correcta digestión de las muestras en un gel de agarosa al 1.2% y se escindieron del gel las bandas correspondientes al vector pChlamy4 y los genes *CrGPAT* para su purificación por medio del protocolo del estuche comercial: QIAquick Gel Extraction (QIAGEN, C.A.) el cual se describe en el Anexo 4. Para verificar si las muestras fueron purificadas sin ninguna contaminación se realizó una electroforesis con 2 µL de las mismas en un gel de agarosa al 1.2%. Una vez observadas las bandas esperadas en cada carril, se comparó la intensidad de las bandas y se calculó la tasa de ligación 3:1 (Vector: Inserto) de donde se procedió para realizar la ligación de ambos fragmentos. La reacción de ligación se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL, conteniendo 2 µL de amortiguador T4 ligasa y 1 µL de ADN Ligasa T4 (Invitrogen), incubando la reacción por 16 horas a 16°C y con una posterior inactivación de la enzima por 10 minutos a 65°C.

Posterior a la ligación se realizó la transformación de las células competentes tomando los 20 µL de la reacción de ligación y 200 µL de células competentes de *E. coli* cepa DH10B como se describe en el apartado de materiales y métodos del capítulo II, así como el picado de colonias y verificación de la correcta clonación, pero utilizando las enzimas de restricción con las cuales fue clonado (EcoRI y XbaI), visualizando el resultado en un gel de agarosa al 1.2%. Una vez obtenido el vector de transformación se procedió a la transformación de *C. reinhardtii.*

3.2.5. Electroforesis en gel de agarosa

La integridad de los plásmidos de transformación, el ADN y el ARN total se visualizó en un gel de agarosa (1.2%) –TAE 1X (Tris-acetato 0.04M, EDTA 1mM, pH 8.0) teñido con 0.5 µL de bromuro de etidio (10 mg/mL). La electroforesis se realizó en el amortiguador TAE 1X a un voltaje constante de 85V durante 30 minutos. El marcador de peso molecular que se utilizó en los ensayos de electroforesis fue de 1 Kb y 2 log ADN ladder (New England BioLabs) conforme fue necesario. La concentración de los plásmidos se calculó por medio de un espectrofotómetro SmartSpect plus de BioRad, tomando 5 µL de muestra más 95 µL de agua ultra pura (dilución 1:20) (QIAGEN, 2001).

3.2.6 Transformación de *C. reinhardtii* por medio de biobalística

3.2.6.1 Preparación de las células

Se tomó una colonia del cultivo de *C. reinhardtii* y fue inoculada en 50 mL de medio TAP en un matraz de 250 mL con agitación en un orbitador a 100 rpm por 7 días.

A los 7 días del cultivo, se recolectaron 900 µL del cultivo para conteo celular y en un tubo Falcón se recolectaron los 49 mL restantes, los cuales fueron centrifugados a 3220g por 5 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en el volumen necesario para obtener 40 millones de células en 250 µL. Esta cantidad se inoculó en cada caja de Petri con 30 mL de medio TAP sólido y se dejó secar en la campana de flujo laminar para eliminar el exceso de medio líquido.

3.2.6.2 Esterilización de las membranas

La esterilización de las membranas macroacarreadoras y de ruptura de 1100 psi (Bio-Rad) se realizó en etanol al 95% grado comercial por 10 minutos, se removieron del etanol y se dejaron secar en cajas Petri sobre pañuelos desechables (Kleenex) estériles.

3.2.6.3 Protocolo de transformación por biobalística

Antes de empezar el protocolo de transformación se verificó que todas las disoluciones a utilizar: cloruro de calcio, la disolución de oro, espermidina y plásmidos (de este último fue tomado el volumen necesario para una concentración de 10 µg de cada plásmido) estuvieran descongeladas y se mantuvieran en hielo hasta su uso.

Se colocó el vórtex a la velocidad 9; en la campana de flujo laminar, para resuspender la disolución con las partículas de oro y prepararlas para el bombardeo como se describe en la Figura 3.3.

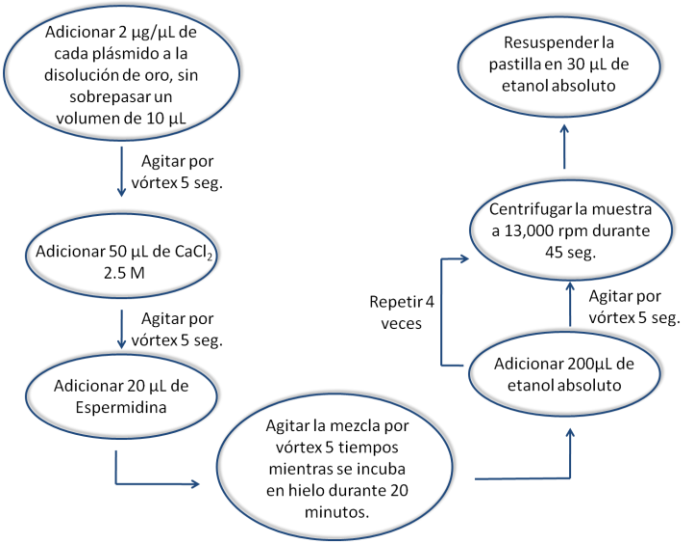


Figura 3.3 Protocolo para la preparación de las micropartículas de oro con los plásmidos para el bombardeo.

Una vez preparadas las micropartículas de oro, se colocaron las membranas macroacarreadoras secas en los portamacroacarreadores secos con ayuda de una tapa de tubo de ensaye estéril, cuidando que la parte cóncava estuviera hacia arriba (Figura 3.4).

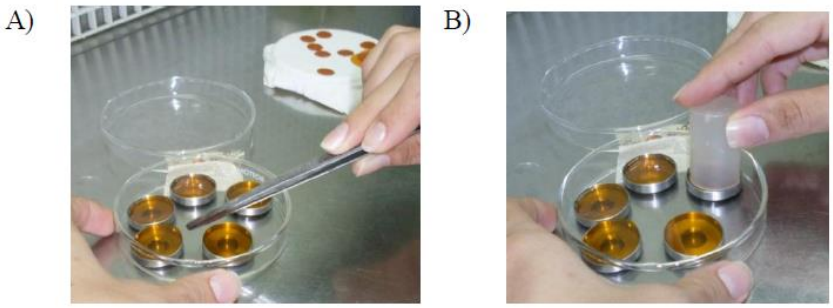


Figura 3.4 A) Colocación de las membranas en los portamacroacarreadores. B) Ajuste de las membranas en los portamacroacarreadores usando una tapa de plástico de tubo de ensayo.

Una vez que las membranas estaban colocadas en los portamacroacarreadores, se apagó la campana de flujo laminar y se agitó por vórtex la mezcla de micropartículas de oro a la velocidad 9; una vez bien resuspendidas las partículas de oro se bajó la velocidad del vórtex a 4.

Se abrió el tubo eppendorf que contenía el oro, y ya con la punta de la pipeta lista, se agitó por vórtex la mezcla y antes de dejar de agitar se tomaron 5 µL de la muestra (Figura 3.5 A) y se esparció ésta en el centro de la membrana macroacarreadora, tratando de que todo quedara de forma homogénea. Se dejaron secar las muestras (Figura 3.5 B).

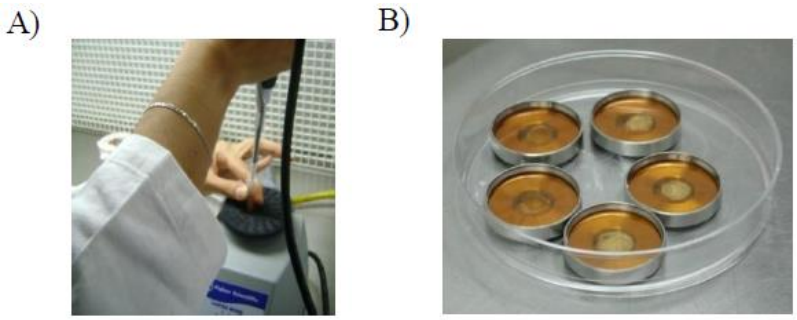
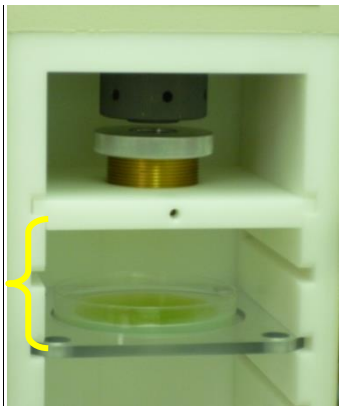


Figura 3.5 A) Toma de las partículas de oro, B) Secado de las partículas de oro

Mientras se secaba la muestra, se limpiaron todas las partes de la cámara de biobalística (Figura 3.6 B) con etanol al 70%, se marcaron las cajas inoculadas, señalando los controles de la línea, la cual sirvió para mantener la línea de *C. reinhardtii* y verificar que no hubiera contaminación (hongos o bacterias) en el inoculo inicial, y los controles del antibiótico, para verificar la correcta función de éste donde se esperaba la muerte de todas las células, ya que no contenían la resistencia al agente de selección y verificar en dado caso que hubiera crecimiento o “escapes”, es decir, colonias que presenten resistencia al medio de selección sin haber sido transformadas.

Las cajas bombardeadas fueron colocadas a 6 cm del cañón (nivel 2) de la cámara de biobalística (Figura 3.6 A).

A)



B)

Figura 3.6 A) Distancia de las muestras bombardeadas. B) Cámara de biobalística.

Las cajas bombardeadas y los controles se dejaron a baja intensidad de luz, en una repisa que no les diera la luz directa, por 24 horas aproximadamente (Figura 3.7).

A)

B)

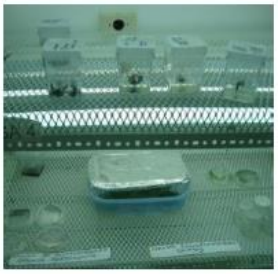


Figura 3.7 A) Cajas a baja intensidad de luz, B) Repisa donde se encuentran a baja intensidad de luz

Pasadas las 24 horas las células transformadas fueron recuperadas lavando cada caja con 750 µL de medio de selección TAP líquido. Las cajas se lavaron de forma tal que el medio llegara a todas las partes de las mismas y se recuperará la mayor cantidad de células posibles (Figura 3.8).

Figura 3.8 Lavado de células.

De los 750 µL de medio TAP líquido usados para lavar la caja, se recuperaron aproximadamente 300 µL los cuales se inocularon en las cajas correspondientes (bombardeadas y controles de antibiótico en cajas con TAP + 10 µg/mL de zeocina, y los controles de la cepa en medio TAP) con asa de siembra esparciendo todo el recuperado sin topar las orillas de la caja, dejándolas secar en la campana de flujo laminar.

Las cajas se dejaron en el cuarto de cultivo por aproximadamente 10 días donde se observó la aparición de colonias posiblemente transformadas. Estas colonias se picaron e inocularon en 20 mL de medio TAP líquido. A estas colonias se les extrajo el ADNg y fueron analizadas por medio de la técnica de PCR para identificar la presencia de la construcción.

Para el mantenimiento de las clonas transformadas se inocularon en medio TAP sólido + 10 µg/mL de zeocina. Siendo cultivadas en medio TAP una vez que se hubiera comprobado la transformación nuclear.

3.2.7. Extracción de ácidos nucléicos

3.2.7.1. Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo comercial de Illustra Nucleon Phytopure Genomic DNA Extraction Kit (GE Healthcare), siguiendo las indicaciones del proveedor (Anexo 3), a partir de una concentración de 60 millones de células.

3.2.7.2. Extracción de ARN

Para la extracción de ARN de células de *C. reinhardtii* se utilizó el protocolo basado en el reactivo de Trizol (Anexo 3), utilizando una concentración celular de 100 millones de células.

3.2.8. Detección de clonas transformadas por medio de PCR

Se realizó una reacción de PCR para la identificación de las clonas transformadas por medio de biobalística, la cual se realizó en un volumen final de 50 µL, conteniendo 5 µL de ADNg (500 ng), 1 µL de cada oligonucleótido (10 µM), 1 µL de dNTP's (0.2 µM), 0.2 µL de Taq-polimerasa (Invitrogen, 1U), 1.5 µL de $MgCl_2$ (1.5 µM), 5 µL de amortiguador de reacción 10X (1X) y agua ultra pura. Para el programa de PCR fue necesario realizar ensayos preliminares para encontrar el programa adecuado para cada uno de los pares de oligonucleótidos específicos para cada secuencia, los cuales se anclan a una sección del gen endógeno (*CrGPATre* o *CrGPATclA*, oligo Forward) y a una sección correspondiente al vector de transformación (3'RbcS2, oligo Reverse) (Duarte, 2013), siendo las temperaturas de alineamiento utilizadas las que se observan en el Cuadro 3.1; siendo el programa base de 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, temperatura de alineamiento por 30 segundos, 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72°C por 10 minutos.

Con la finalidad de evaluar la extracción de ADNg se utilizó en la PCR a un gen cuya expresión sea constitutiva, en este caso el gen de la actina de *C. reinhardtii*, *c*uya proteína forma parte del citoesqueleto de la célula.

Cuadro 3.1 Temperaturas de alineamiento utilizadas en cada programa de PCR (Duarte, 2013).

Secuencia amplificada	Oligonucleótidos	Temperatura	Tamaño esperado del amplicón (ADNg/ADNc)
CrGPATclA/3'RbcS2	FGTCLA/Rv3UTRb	60°C	270 pb
CrGPATre/3'RbcS2	FGTRE/Rv3UTRb	60°C	279 pb
Ble	FwBle/RvBle	55°C	(466/321)
ActinaF/ActinaR	Act F/Act R	60°C	201 pb

3.2.9 Análisis de clonas transformadas mediante Southern blot

El Southern blot se realizó siguiendo el protocolo de DIG application Manual for Filter Hybridization (Roche)

3.2.9.1 Digestión con la enzima SacII y BamHI

La extracción de ADN se llevó a cabo como se mencionó en el apartado 3.2.7; tanto de las líneas transgénicas como de la silvestre, utilizando las enzimas de restricción SacII y BamHI. Se digirieron 22.5 µg de ADN empleando 1U de enzima por cada µg de ADN en un volumen de 30 µL con el amortiguador adecuado para la enzima. Las digestiones se llevaron a cabo a 37ºC durante 12 horas. Para visualizar el producto de la digestión, se corrió una electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% a un voltaje de 85 durante 90 minutos.

3.2.9.2 Southern blot

Tras la electroforesis, se introdujo el gel de agarosa en una disolución de depurinación (1.1% HCl) durante 10 minutos, a continuación se trató en una disolución de desnaturalización (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) por 30 minutos y después en una disolución de neutralización (1.5 M NaCl, 0.5 M Trizma base) por 30 minutos. La transferencia del ADN a la membrana de nailon (Roche) se realizó con citrato de tri-sodio 0.3M y 3M NaCl (20x SSC)

toda la noche. A continuación se lavó la membrana con 2x SSC y el ADN se fijó a ésta adicionándola de carga positiva con ayuda de luz ultravioleta en un equipo CL-1000 crosslinker (UVP).

3.2.9.3 Marcaje de la sonda de ADN

La sonda se marcó con digoxigenina mediante PCR, para esto fue necesario introducir en la reacción de PCR un desoxirribonucleótido precursore marcado, en este caso se utilizó dUTP unido a digoxigenina (Dig-dUTP) (Roche). Para el marcaje de la sonda del gen *CrGPATre* o *CrGPATclA* se utilizó como templete el plásmido pcGTRE y pcGTCLA, respectivamente. El volumen de la reacción fue de 20 µL y la proporción de precursor marcado a no marcado (Dig-dUTP: dTTP) fue 1:3. Los componentes de la reacción fueron los siguientes 100 pg de ADN, amortiguador de reacción de Expand 1x, 0.2 mM de una mezcla de dATP, dGTP y dCTP, 130 µM de dTTP, 70 µM de Dig-dUTP, 0.5 µM de cada oligo y 1U de Expand long template.

La reacción de PCR se efectuó con el siguiente programa: 1. Desnaturalización inicial de 95ºC por 3 min, 2. Desnaturalización: 95°C por 30 segundos, 3. Alineamiento: 50°C por 30 segundos, 4. Extensión: 68°C durante 1 minuto, 5. Repetición del paso 2-4 30 veces, 6. Extensión final: 68°C por 10 minutos. El producto de PCR fue separado en un gel de agarosa al 1.2%, posteriormente se procedió a escindir la banda correspondiente de la sonda y fue purificado con el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN), ya que la presencia de nucleótidos DIG-dUTP no incorporados en el ADN podría generar un exceso de señal de fondo tras las hibridaciones.

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación y marcaje de la sonda se presentan en el Cuadro 3.2.

Cuadro 3.2 Temperaturas de alineamiento y tamaño de las sondas utilizadas para el Southern blot (Duarte, 2013).

Secuencia Amplificada	Oligonucleótidos	Temperatura	Tamaño Amplicón Esperado (pb)
Parte interna *CrGPATclA*	GPATchF1/GPATchR1	55°C	453
Parte interna *CrGPATre*	gpatreF2/gpatreR2	60°C	349

3.2.9.4 Pre-hibridación e hibridación

Se realizó una pre-hibridación de la membrana en 20 mL de una disolución DIG Easy Hyb (Roche) a 42 ºC durante al menos 1 hora. Tras la pre-hibridación se retiró la disolución utilizada y se reemplazó por una nueva añadiéndose 10-15 ng de la sonda marcada previamente desnaturalizada a 100 ºC durante 10 minutos y enfriada rápidamente en hielo. La hibridación se realizó a 42 ºC durante toda la noche.

3.2.9.5 Detección quimio luminiscente

Tras la hibridación se sacó la membrana de la botella y se colocó en una cubeta de tamaño similar a la membrana. La membrana se sometió a los siguientes lavados de post-hibridación: 2 lavados de 5 min en disolución lavado de baja astringencia (2× SSC + SDS al 0.1%) a temperatura ambiente, y 2 lavados de 15 min en la disolución de lavado de alta astringencia a 68ºC (SSC 0.1 X, SDS 0.1%). A continuación se sumergió la membrana en disolución de lavado (ácido maleico 0.1 M + NaCl 0.15 M, pH 7.5; 0.3% Tween 20) durante 5 minutos para equilibrarla. Posteriormente se sumergió la membrana en la disolución de bloqueo (dilución 10× disolución de bloqueo 1:10 con la disolución de ácido maleico) durante 30 min, bloqueándose así los sitios inespecíficos de unión al anticuerpo. Después se preparó una disolución del anticuerpo (anti-digoxigenina-AP) (Roche) a una dilución 1:10 en la disolución de bloqueo y se sumergió la membrana durante 30 min con agitación suave.

La eliminación del anticuerpo no unido al ADN se realizó mediante 2 lavados en amortiguador de lavado durante 15 min. A continuación, se sumergió la membrana en

disolución de detección (Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M, pH 9.5) durante 5 min. Se preparó una disolución 1:100 del sustrato CDP-star (Roche) en la disolución de detección y se puso en contacto con la membrana durante 5 min. Finalmente, se eliminó el exceso de disolución y se selló la membrana en una bolsa de plástico y se colocó en un casete con una película sensible a la luz visible por diferentes tiempos, posteriormente se reveló y fijó con RP X-OMAT y RP X-OMAT (Carestream® Kodak®).

3.2.10 Síntesis de ADN complementario (ADNc) y RT-PCR

El ADNc fue sintetizado con la enzima Superscript III siguiendo las especificaciones del fabricante (Invitrogen). Se utilizaron 5µg de ARN total y 50 µM de oligo dT. Esta mezcla se incubó a 75°C por 5 minutos e inmediatamente se enfrió en hielo por 3 minutos. Posteriormente, la muestra se dividió en dos tubos (2.5 µg de ARN total por tubo), uno se etiquetó como RT+ y al otro RT−, éste último es un control negativo que no lleva transcriptasa reversa y permite determinar contaminación con ADN genómico. La reacción de síntesis de ADNc consistió de 2 µL de DTT 0.1M, 2 µL de dNTP´s 10mM, 1 µL de inhibidor de RNasa 40 U/µL (ROCHE), 1 µL de Superscript III 200U/ µL (Invitrogen), 4 µL de 5X amortiguador first strand en una volumen final de 20 µL. Se incubó a 50°C por 90 minutos en un termoblock (ThermoStat Plus eppendorf) y seguidamente se colocó en hielo. Posteriormente se inactivó la reacción aumentando la temperatura a 75°C por 15 minutos e inmediatamente se colocó en hielo. Posteriormente, se agregó 4 µL de ARNsa A (1 mg/mL) y se incubó a 37°C por 30 minutos. Seguidamente se realizó una dilución 1:5 con agua ultra pura y los tubos se almacenaron a −20°C hasta su uso.

Con la finalidad de evaluar la correcta síntesis de ADNc a partir del ARN total, se procedió a realizar una RT-PCR con un gen cuya expresión sea constitutiva, en este caso el gen de la actina de *C. reinhardtii*, *c*uya proteína forma parte del citoesqueleto de la célula, como se menciona en el apartado 3.2.8.

3.2.11 Análisis de expresión génica mediante RT-PCR

Se utilizó la reacción de PCR descrita en el apartado 3.2.8 pero en vez de ADNg como templete se utilizó ADNc, los oligonucleótidos correspondientes para la amplificación de cada uno de los genes descrito en el cuadro 3.1, así como el programa de amplificación antes mencionado.

3.2.12 Extracción de lípidos totales

La extracción de lípidos totales contenidos en la biomasa seca de las microalgas fue extraído por medio del protocolo reportado en Widjaja y colaboradores (2009).

Las células colectadas y congeladas en nitrógeno líquido fueron liofilizadas, y almacenadas en sílica hasta su uso. Antes de realizar la extracción se pesó la biomasa seca de las células liofilizadas en un matraz de 50 mL completamente seco, posteriormente se maceró la biomasa con ayuda de una espátula y se realizó la extracción de los lípidos totales de las muestras con la adición de una mezcla de cloroformo/metanol 2:1 v/v por cada 38 mg de biomasa seca, utilizando 0.395 mL de solvente por mg de biomasa seca, incubándose en a 38°C y 150 rpm durante 3 horas. Una vez terminada la incubación se precipitó la biomasa en un tubo cónico falcón de 50 mL por centrifugación a 3000g durante 5 minutos a 37°C, y para precipitar los fragmentos más finos se dejaron los tubos de pie durante toda la noche. Una vez precipitada la biomasa se colocó el producto de la extracción en viales con peso constante (previamente pesados) y se dejó evaporar el solvente. A la biomasa restante se le realizó una segunda extracción con las mismas condiciones antes mencionadas y se colocó el extracto en el mismo vial previamente utilizado. Una vez evaporados por completo los solventes se realizó el repesado de los viales y el cálculo de la diferencia de los pesos, lo cual equivale a la cantidad de lípidos totales presentes en las muestras.

3.2.13 Cuantificación de triacilglicéridos

La cuantificación de triacilglicéridos se realizó con ayuda del kit “Triacilglycerids” de BioSystems. Este se basa en una transesterificación ocasionada por una lipasa, posteriormente con ayuda de la glicerol cinasa el glicerol es fosforilado por el adenosin-5’-trifosfato (ATP) para producir glicerol 3-fosfato (G3P) y adenosin-5’-difosfato (ADP), el G3P es oxidado por la glicerolfosfato oxidasa (GPO) produciendo dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno, este último reacciona con la 4-aminoantipurina y 4-clorofenol bajo la influencia catalítica de la peroxidasa (POD) para formar una quinonaimina de color rosa.

Para la realización del ensayo, los lípidos totales fueron resuspendidos en 5 mL de cloroformo puro (grado comercial). En un tubo eppy de 1.5 mL estéril se coloca 1 mL de la solución de reacción y se le adiciona 10 µL de la muestra a analizar, de igual forma se prepara un blanco (sólo el reactivo) y una muestra estándar (1 mL solución + 10 µL estándar), se homogeniza gentilmente tres veces y se incuba por 5 minutos a 37°C. Una vez terminada la incubación se coloca la mezcla en cubetas desechables, se deja terminar de reaccionar la mezcla con ligera agitación hasta que la solución se vea transparente y posteriormente se lee su absorbancia a 500 nm. Una vez obtenida la medición se procedió a hacer los cálculos.

$$\text{TAGs (mg/dL)} = \frac{AM}{AE} \times 200$$

Donde AM es la absorbancia de la muestra y AE la absorbancia del estándar. Para pasarlo a mg el resultado de la operación se divide entre 100 para obtener mg/mL y posteriormente por 5 (volumen en que se resuspendió la muestra) para que nos dé el valor en mg de los TAGs obtenidos.

3.3 Resultados

3.3.1 Obtención del vector de transformación pcGTRE y pcGTCLA

La construcción del vector de transformación se realizó como se describe en el apartado de materiales y métodos de este capítulo. Primeramente se realizó la digestión con las enzimas de restricción de EcoRI y XbaI, siendo las bandas con los pesos esperados escindidas del gel, purificadas y eluídas en un volumen final de 40 µL cada una. En la Figura 3.15 se puede observar la integridad de las bandas purificadas, con pesos esperados de 3.6 Kb para el vector pChlamy4; 1.2 Kb para el gen *CrGPATclA* y 1.3 Kb para el gen *CrGPATre*, respectivamente. Posteriormente, se realizó la ligación tomando 10 µL del incerto eluido y 1µL del vector.

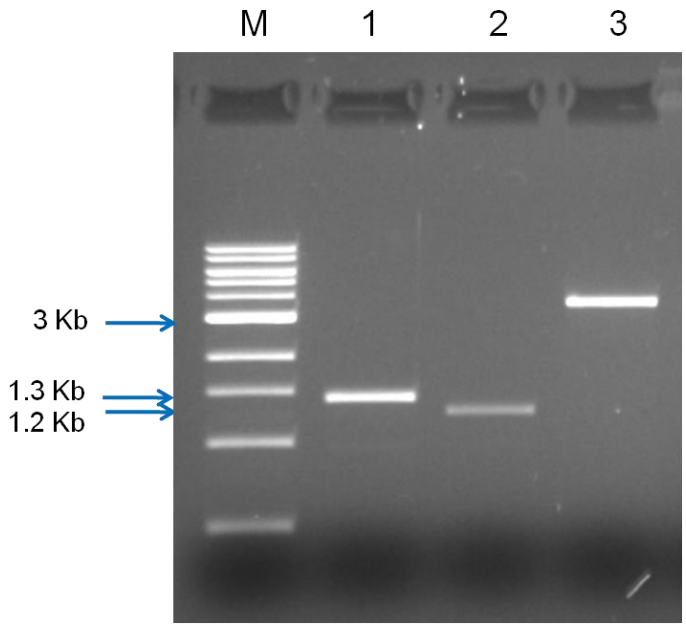


Figura 3.9 Electroforesis de las muestras purificadas (2 µL) para calcular la relación vector: inserto a usar para la ligación. M = Marcador de 1 Kb (NEB), 1 = *CrGPATre* (1.3 Kb), 2 = *CrGPATclA* (1.2 Kb), 3 = pChlamy4 (3.6 Kb).

Cada reacción de ligación se utilizó para la transformación de células competentes de *E. coli* DH10B, como se menciona en el apartado de materiales y métodos, con el fin de multiplicar el plásmido resultante. Se obtuvó de plásmido purificado de dos colonias para cada construcción, las cuales fueron analizadas por medio de la misma digestión de la cual se partió, para determinar si el vector comercial pChlamy4 contenía al gen *CrGPATre* y *CrGPATclA*, formando a los vectores pcGTRE y pcGTCLA, respectivamente. Como se observa en la Figura 3.16 se muestra que se obtuvo la correcta clonación de éstos genes, por lo que se procedió a la transformación de *C. reinhardtii* por medio de biobalística utilizando estos plásmidos.

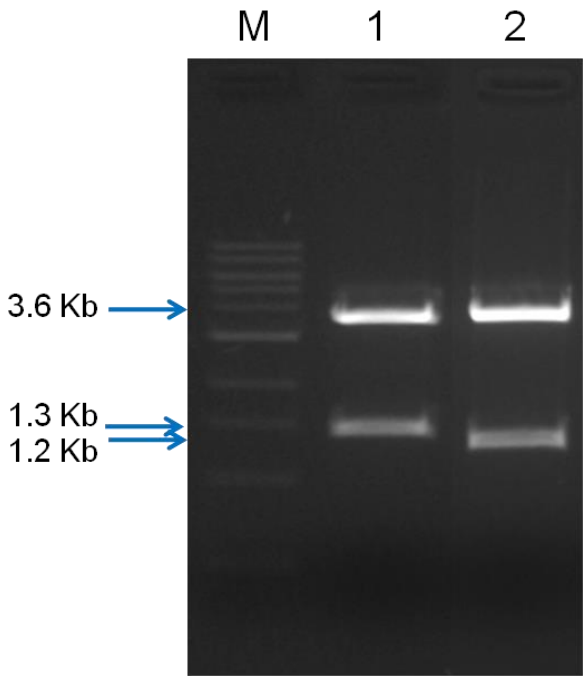


Figura 3.10 Análisis por digestión con las enzimas de restricción EcoRI y XbaI de dos plásmidos producto de la ligación del vector pChlamy4 con los genes *CrGPAT*. M = Marcador de Kb (NEB). 1 = pcGTRE, bandas esperadas de 3.6 Kb vector y 1.3 gen *CrGPATre.* 2 = pcGTCLA, bandas esperadas de 3.6 Kb vector y 1.2 Kb gen *CrGPATclA.*

3.2.2. Transformación de *C. reinhardtii* por medio de biobalística

Se realizó la transformación de un cultivo de *C. reinhardtii,* siguiendo el protocolo descrito en el apartado de materiales y métodos de éste capítulo, con una concentración de 10 µg de cada plásmido, pcGTRE (5 µL), pcGTCLA (5 µL) y el vector vacío (sin ninguna construcción dentro, solo gen de resistencia) llamado pChlamy4 (5 µL). Pasadas las 24 horas del bombardeo las células fueron lavadas, plaqueadas al medio de selección (TAP+10 µg/mL de zeocina) e incubadas a baja intensidad de luz por aproximadamente 7 días o hasta observar colonias posiblemente transformadas.

En la Figura 3.11 se encuentra una caja representativa de las cinco cajas bombardeadas (tres en el caso del vector pChlamy4) y de los controles, observándose el crecimiento esperado de cada uno de estos, en el caso del control de la línea un crecimiento del cultivo (cepa silvestre en medio TAP sin agente de selección) sin contaminación y del control del antibiótico (cepa silvestre cultivada en medio TAP con Zeocina como agente de selección) sin crecimiento alguno. De igual forma, en el Cuadro 3.3 se presentan los resultados obtenidos de cada una de las cajas bombardeadas con los plásmidos antes mencionados.

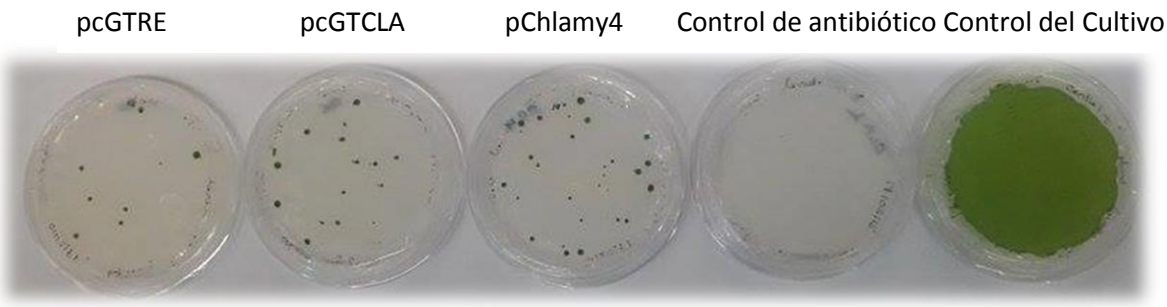


Figura 3.11 Cajas representativas de la transformación de *C. reinhardtii* con los plásmidos pcGTRE, pcGTCLA, pChlamy4*;* Control de antibiótico = cepa silvestre cultivada en medio TAP con Zeocina como agente de selección, y Control del cultivo = cepa silvestre cultivada en medio TAP sin agente de selección.

Cuadro 3.3 Número de colonias observadas en las placas de la transformación de *C. reinhardtii* con los plásmidos *pcGTRE*, *pcGTCLA* y *pChlamy4* por medio de biobalística.

No. de Caja / Plásmido	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**Total**
pcGTRE	21	14	13	10	7	65
pcGTCLA	2	5	4	6	8	25
pChlamy4	30	14	34	NA	NA	78

NA = No aplica.

De todas las colonias obtenidas del evento de transformación se seleccionaron al azar grupos de a veinte colonias bombardeadas con el plásmido pcGTRE y de diez colonias bombardeadas con el plásmido pcGTCLA, las cuales fueron nombradas con la abreviatura RE, CLA o pC4 (RE = *pcGTRE*, CLA = *pcGTCLA* y pC4 = *pChlamy4*) seguidas de un número asignado a cada colonia (CLA1, CLA2, CLA3, etc…). Las colonias fueron inoculadas en matraces de 50 mL con 10 mL de medio TAP y una vez que llegaron a su etapa exponencial (7 días), las microalgas fueron inoculadas en medio TAP sólido adicionado con 5 µg/mL de zeocina y almacenadas a luz continua, el resto del cultivo fue colectado (3 mL) y congelado para su posterior extracción de ADNg y análisis.

3.2.3. Análisis de las clonas posiblemente transformadas con el vector pcGTRE

En total se analizaron 50 colonias de las cuales se obtuvieron 13 clonas que resultaron transformadas con la construcción de expresión recombinante de CrGPATre. Para esto, se realizó la extracción de ADN de la colecta 3 mL del cultivo de cada clona transformada, por medio del protocolo comercial de Illustra Nucleon Phytopure Genomic DNA Extraction Kit (GE Healthcare). En la Figura 3.12 se presenta el resultado de la integridad del ADN extraído

de 50 colonias de las 65 obtenidas de la transformación con el vector pcGTRE, y el ADN de una colonia obtenida de las que fueron bombardeadas con el plásmido *pChlamy4* llamada pC4.2 (VV). De igual forma se analizó la cepa silvestre (Cs).

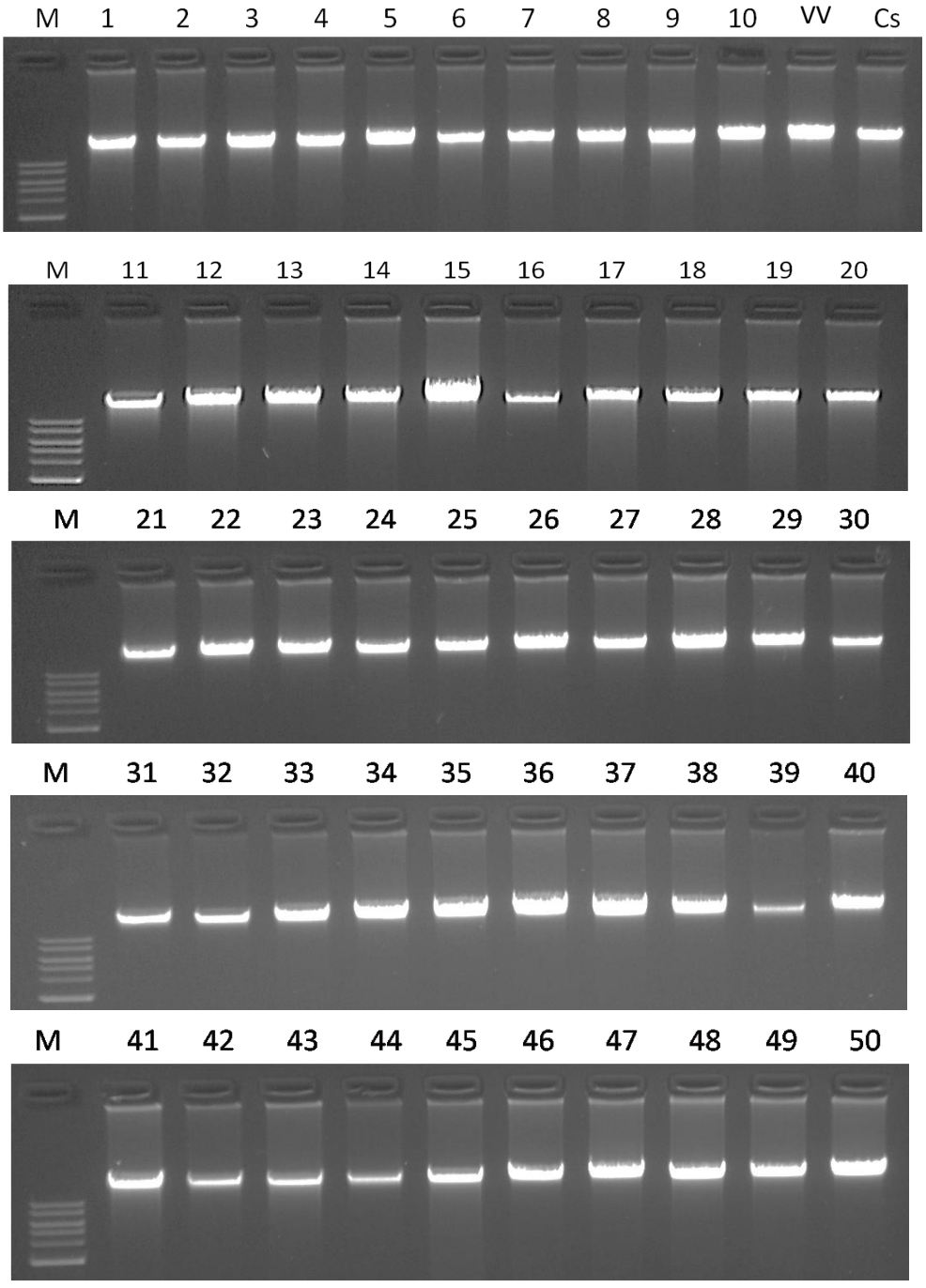


Figura 3.12 Visualización de la integridad de 5 µL del ADNg de las clonas transformadas con el vector pcGTRE y del control. M = Marcador de 1 Kb (Invitrogen). 1-50 = Clonas RE 1-50; VV = Clona transformada con el plásmido pChlamy4; Cs = Cepa silvestre.

Una vez observada la integridad del ADNg extraído se procedió a la identificación del gen de interés por medio de PCR, detectando la integración del gen de interés respectivo. En la Figura 3.13 se observa el resultado del análisis por PCR de clonas de *C. reinhardtii* bombardeadas con el plásmido pcGTRE, siendo el amplicón esperado correspondiente a una región que comprende al gen *CrGPATre* y al 3'UTR del *RbcS2* (descrito en materiales y métodos). Se encontró la presencia del amplicón esperado de 279 pb en las clonas RE2, RE6, RE7, RE11, RE15, RE16, RE22, RE23, RE31, RE35, RE41, RE45 y RE49. Con esto se observa la correcta integración del plásmido, por lo que se continuó con estas muestras para la determinación de número de copias integradas al genoma por medio de Southern blot.

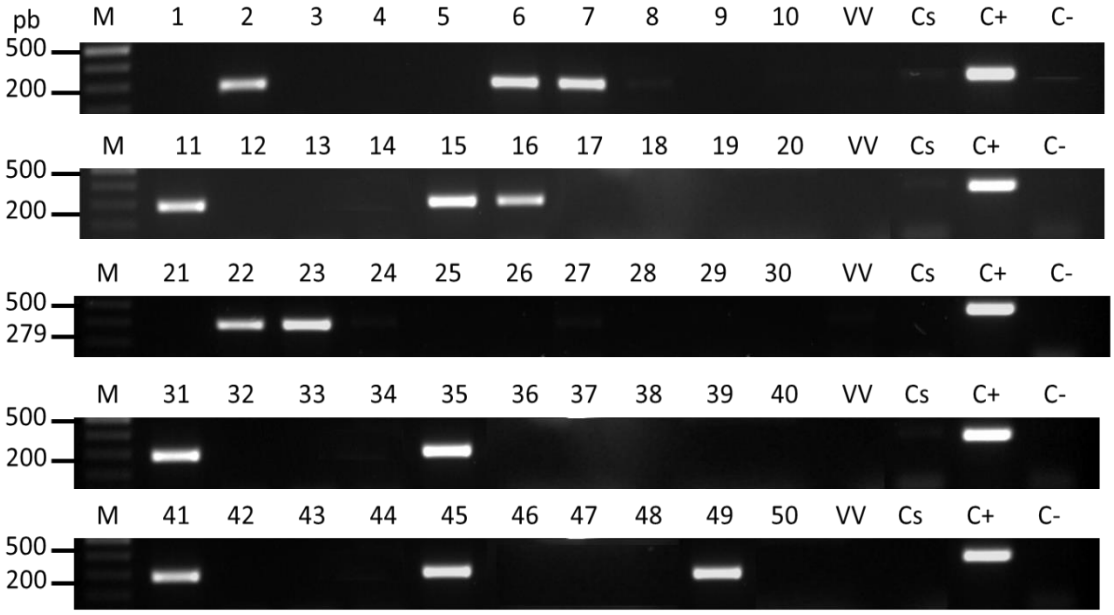


Figura 3.13 Identificación de clonas transformadas con el plásmido pcGTRE por medio de PCR. 1-50 = Clonas recuperadas que fueron transformadas con el vector pcGTRE. VV = Clona transformada con el plásmido *pChlamy4*. Cs = Cepa silvestre. C+ = Plásmido pcGTRE. C- = Agua ultra pura.

3.2.4. Análisis de número de copias integradas en el genoma de las clonas transformadas con el vector pcGTRE por medio de Southern blot

Se realizó el Southern blot de las clonas previamente identificadas por PCR y se identificaron 10 líneas transgénicas con patrones de bandeo diferentes cada una (Figura 3.14). En la Figura 3.14 se observa que las clonas RE2, RE11, RE16, RE22, RE23, RE31, RE35, RE41, RE45 y RE49 presentan diferente patrón de bandeo. En la Figura 3.14 también se puede observar que la clona RE2, RE23, RE31, RE41 y RE49 presentan al menos una copia del transgén, la clona RE45 presenta dos copias, las clonas RE11; RE16 y RE22 tres copias, y la clona RE35 cuatro copias. Las clonas RE6 y RE7 presentaron el mismo patrón de bandeo que la clona RE2; por lo que fueron omitidas en la Figura 3.14; al igual que la clona RE15 que presento el mismo patrón que la clona RE11 (datos no presentados).

En la Figura 3.14 se puede observar tres bandas en común entre la cepa silvestre, el vector vacío (VV) y las clonas transformadas con el vector pcGTRE. En un análisis bioinformático se pudó observar que la sonda utilizada en el Southern blot presenta un pegado inespecífico con el gen endógeno de *C. reinhardtii*, correspondiente a las bandas observadas.

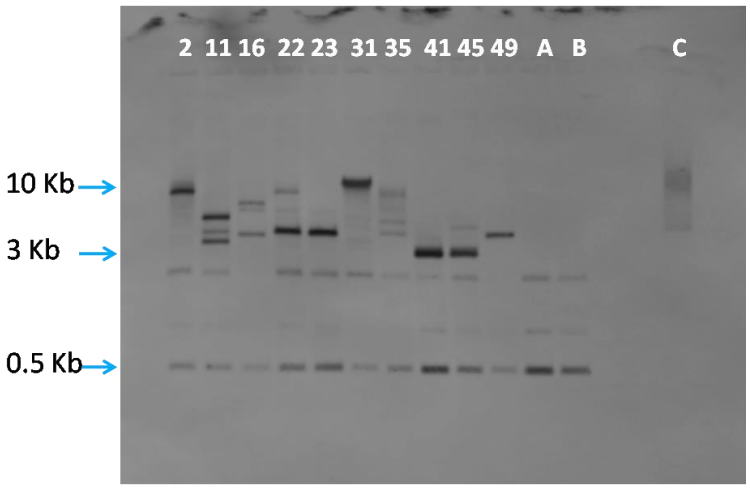


Figura 3.14 Identificación del número de copias presentes en las clonas transformadas con el plásmido pcGTRE. No. = clona transformada, A = clona VV transformada con el plásmido pChlamy4; B = cepa silvestre, C = plásmido pcGTRE

3.2.5 Análisis de expresión de las clonas transformadas con los vectores pcGTRE

Se realizó la extracción de ARN de las clonas transformadas con el vector de transformación pcGTRE y que presentaron la correcta integración del transgén de interés en su genoma (apartado 3.2.4). En la Figura 3.15 se observa la integridad de 1 µg ARN extraído de las clonas transformadas con el vector pcGTRE, por lo que se procedió a la síntesis del cDNA siguiendo el protocolo presentado en el apartado de materiales y métodos.

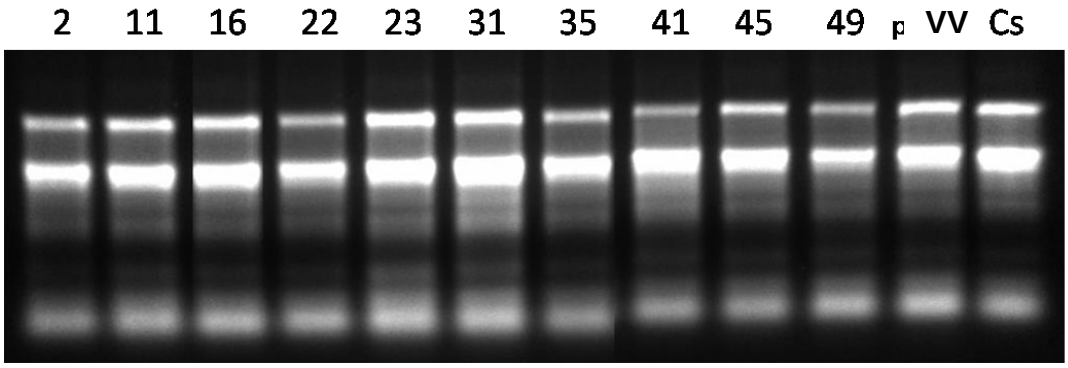


Figura 3. 15. Calidad del ARN extraído de las clonas transformadas con el vector pcGTRE (1 µg de ARN). No. = Clona transformada con el vector pcGTRE, pC4.1 = clona transformada con el vector pChlamy4; Cs = cepa silvestre de *C. reinhardtii*. Pureza de todas las muestras = 1.8.

Con la finalidad de evaluar la correcta síntesis de ADNc a partir del ARN total, se procedió a realizar una RT-PCR con un gen cuya expresión sea constitutiva, en este caso el gen de la Actina de *C. reinhardtii*, cuya proteína forma parte del citoesqueleto de la célula. Ésta se utilizó para verificar que las muestras de la RT no estuvieran contaminadas con ADNg, para lo cual se emplearon oligonucleótidos que flanquean un intrón de 220pb, lo que permitió distinguir amplificaciones que provienen del ADNg o ADNc (Figura 3.16). Una vez verificada la integridad del ADNc se realizó la amplificación mediante RT-PCR de cada transgén.

En la Figura 3.16 se puede observar los resultados del análisis de expresión del transgén de las clonas transformadas con el vector pcGTRE, en donde nueve de las diez clonas identificadas por medio de Southern blot (apartado 3.2.4) presentaron expresión del transgén. Las clonas que presentaron una mayor intensidad de la banda son las clonas RE2, RE35, RE45 y RE49; mientras que las clonas RE11, RE22, RE23, RE31, RE35, RE41, RE45 y RE49 presentan una intensidad de banda más baja comparada con las anteriores, lo que sugiere una menor expresión del transgén en éstas clonas. De igual forma se observa la ausencia de amplificación en el vector vacío (VV) y la cepa silvestre (Cs), los cuales no debían presentar amplificación debido a la falta de éste transgén, al igual que la clona RE16 lo cual sugiere que ésta clona no presenta expresión del transgén.

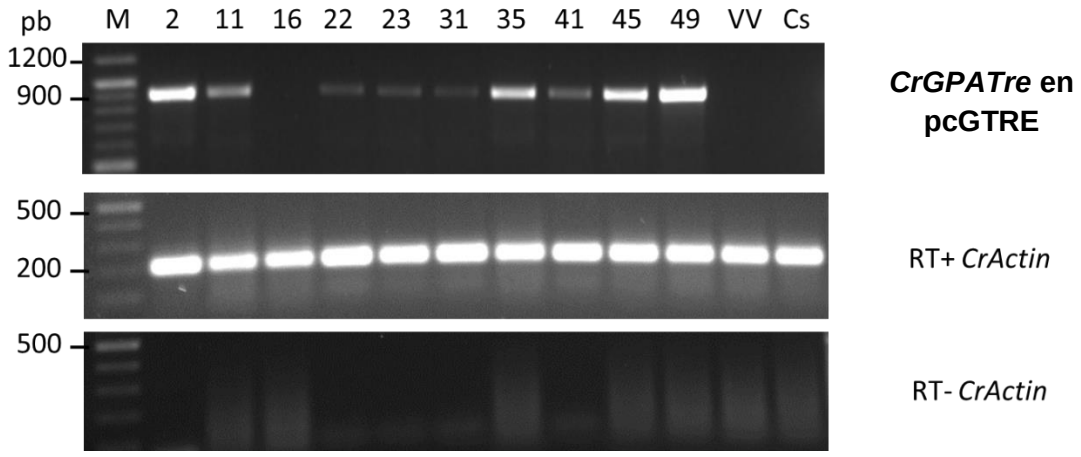


Figura 3.16 Análisis de expresión mediante RT-PCR del transgén de las clonas transformadas con el vector pcGTRE. No. = Clona transformada con el vector pcGTRE. Se utilizó el gen de la actina como control positivo (RT+ CrActin) y negativo (RT- CrActin). M= Marcador de peso molecular (2 log, NEB).

3.2.6 Análisis de la cantidad de biomasa, lípidos totales y TAGs presentes las clonas de *C. reinhardtii* transformadas con el vector pcGTRE

En la Figura 3.17 A se presenta la concentración celular de los cultivos de cada una las clonas transformadas con el vector pcGTRE que expresan el transgén, siendo las clonas RE41 (11.74 x 10^6 cel/mL) y RE45 (12.08 x 10^6 cel/mL) las que presentaron el mayor número de células comparado con la cepa silvestre (Cs, 9.06 x 10^6 cel/mL), mientras que las demás clonas no presentaron una diferencia significativa comparado con la cepa silvestre (Cs) (Anexo 7). El cultivo que presentó el menor conteo del número de células comparado con la Cs fue el vector vacío con 7.17 x 10^6 cel /mL.

De igual forma en la Figura 3.17 B se puede observar la acumulación de biomasa seca de cada una de los cultivos de las clonas que expresan de forma recombinante el gen *CrGPATre*, las clonas no presentan diferencia significativa comparadas con la cepa silvestre (Cs), siendo las clonas RE23 (36.57 mg), RE31 (36.6 mg) y RE35 (36.4 mg) las que acumularon la mayor cantidad de, mientras que las que acumularon una menor cantidad de biomasa seca fueron las clonas RE49 (33.2 mg) y VV (33.53 mg) (Anexo 7).

Posteriormente se realizó la extracción de lípidos totales de cada una de las clonas previamente mencionadas. Como se observa en la Figura 3.18 las clonas transgénicas correspondientes a *CrGPATre* no presentaron una diferencia significativa en su porcentaje de lípidos totales por biomasa seca comparado con la cepa silvestre (Anexo 7), donde la clona RE41 (49.89%) fue la que presento el mayor porcentaje de lípidos por biomasa seca comparado con la Cs (46.99%), mientras que las más bajas fueron las clonas RE22 (44.61%) y RE45 (44.81%), así como el VV (38.18%).

A estas muestras de lípidos totales se les analizó su cantidad de triacilglicéridos presentes. En la Figura 3.18 B se presenta el porcentaje de TAGs por biomasa seca y en la Figura 3.18 C el porcentaje de TAGs por lípido total. En ambas figuras se puede observar que las clonas transgénicas correspondientes a *CrGPATre* presentan significativamente menor cantidad de TAGs comparado con la cepa silvestre, siendo la clona RE45 la que presenta los valores más parecidos a la cepa silvestre (Anexo 7). Esta disminución es de un

0.7-9% menos en el porcentaje de TAGs por biomasa seca y de 7-24% menos en el porcentaje de TAGs por lípido total.

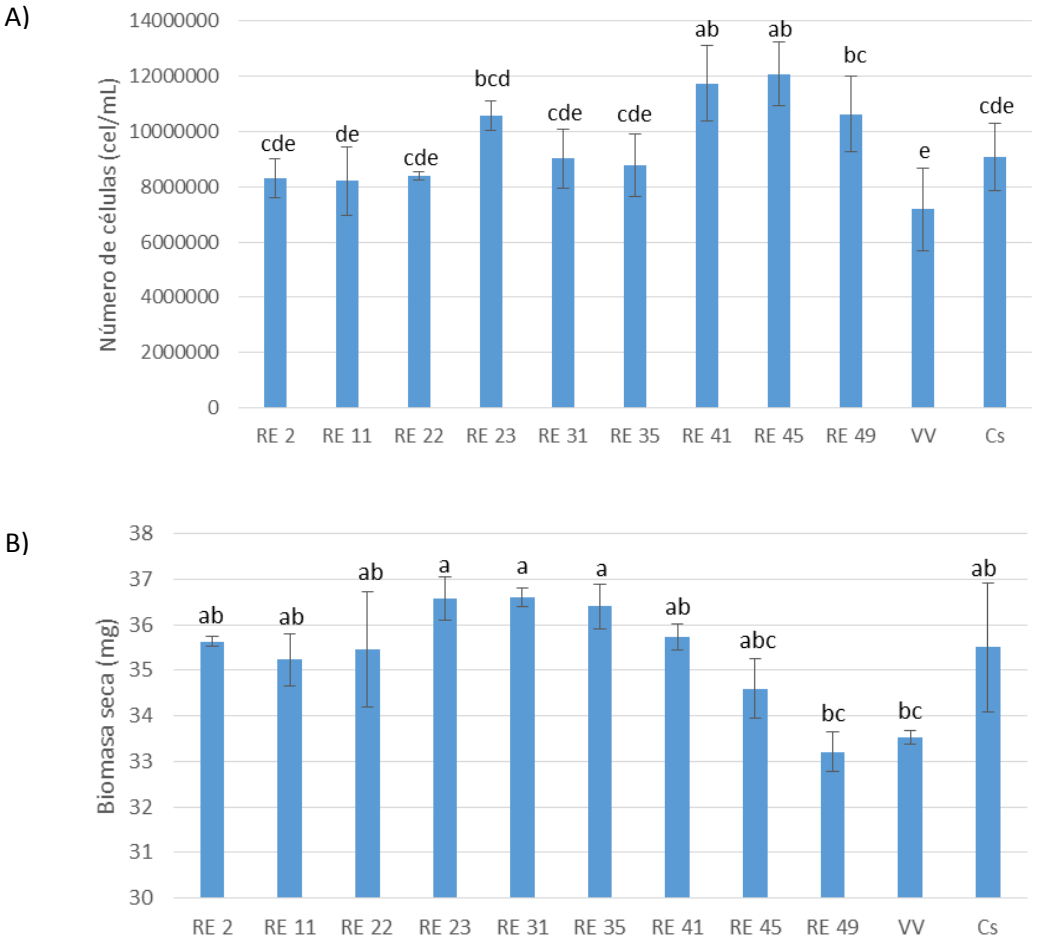
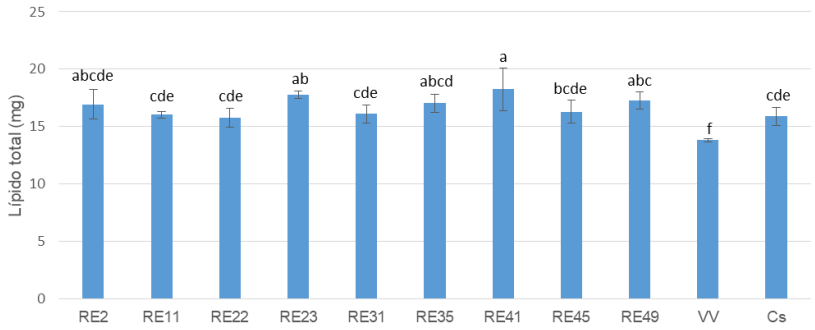
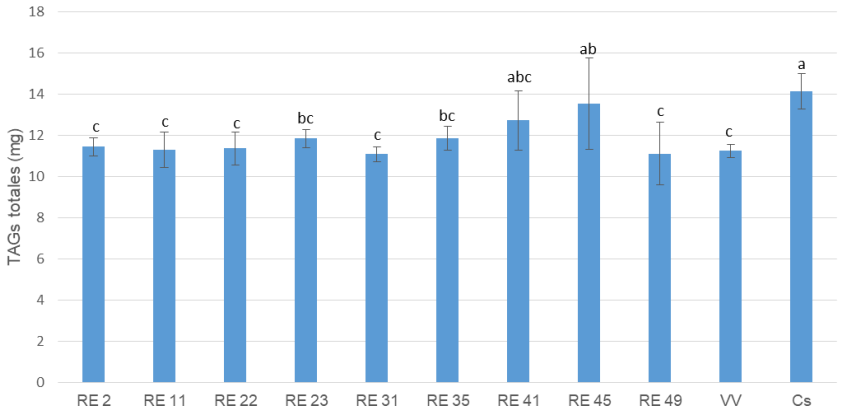


Figura 3.17 Acumulación de biomasa de las diferentes clonas que expresan de forma recombinante el gen *CrGPATre*. A) Concentración celular. B) Biomasa seca. RE # = clona que expresan de forma recombinante el gen *CrGPATre.* VV = Cepa transformada con el vector vacío. Cs = Cepa silvestre. Diferentes letras minúsculas en la gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).

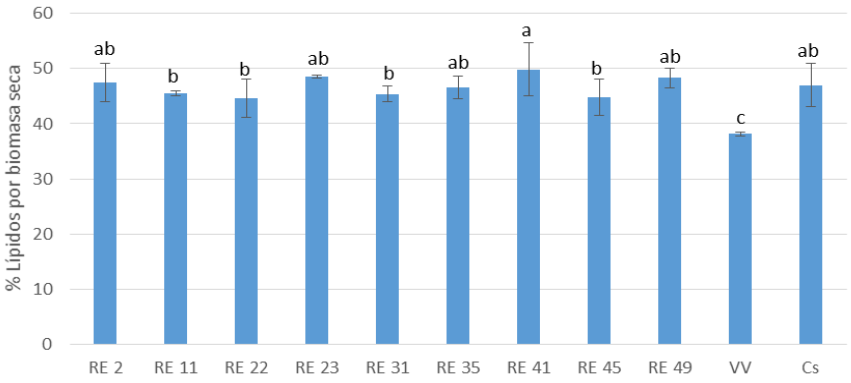
A)


Lípido total (mg)
25
20
15
10
5
0
abcde
cde
cde
ab
cde
abcd
a
bcde
abc
f
cde
RE2
RE11
RE22
RE23
RE31
RE35
RE41
RE45
RE49
VV
Cs

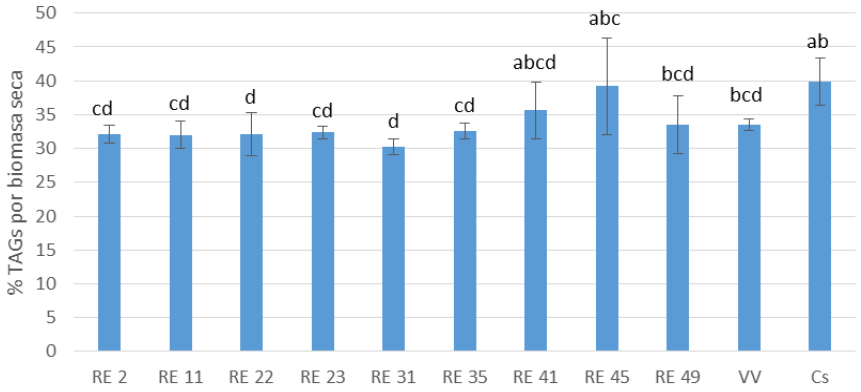
B)


TAGs totales (mg)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
c
c
c
bc
c
bc
abc
ab
c
c
a
RE 2
RE 11
RE 22
RE 23
RE 31
RE 35
RE 41
RE 45
RE 49
VV
Cs

C)


% Lípidos por biomasa seca
60
50
40
30
20
10
0
ab
b
b
ab
b
ab
a
b
ab
c
ab
RE 2
RE 11
RE 22
RE 23
RE 31
RE 35
RE 41
RE 45
RE 49
VV
Cs

D)



E)

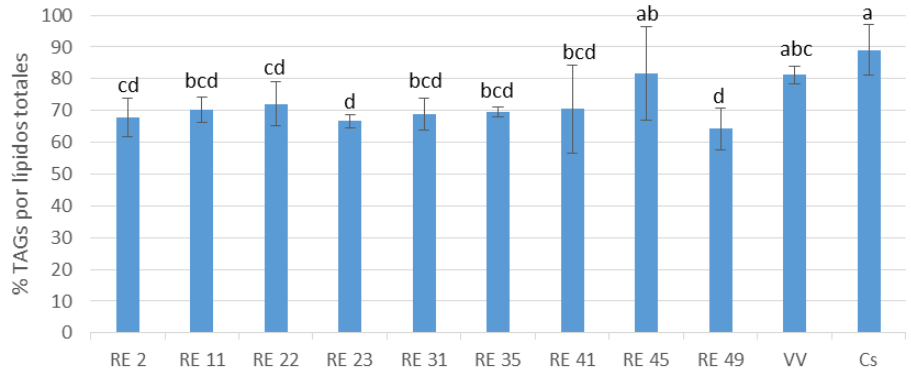


Figura 3.18 Acumulación de lípidos y triacilglicéridos de las clonas que expresan de forma recombinante el gen *CrGPATre*. A) Lípido total. B) TAGs totales. C) Porcentaje de lípidos totales por biomasa seca. D) Porcentaje de triacilglicéridos por biomasa seca. E) Porcentaje de triacilglicéridos por lípidos totales. RE # = clona que sobre expresa el gen *CrGPATre*. VV = Cepa transformada con el vector vacío. Cs = Cepa silvestre. Diferentes letras minúsculas en la gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).

3.2.7. Análisis de las clonas posiblemente transformadas con el vector pcGTCLA

Se realizó la extracción de ADN de 3 mL del cultivo donde fueron cultivadas las clonas transformadas (10 ml TAP) por medio del protocolo comercial de Illustra Nucleon Phytopure

Genomic DNA Extraction Kit (GE Healthcare) observándose en la Figura 3.19 la integridad del ADN extraído de las clonas CLA, y el ADN de una colonia obtenida de las que fueron bombardeadas con el plásmido *pChlamy4* llamada pC4.2 (VV). De igual forma se analizó a la cepa silvestre (Cs).

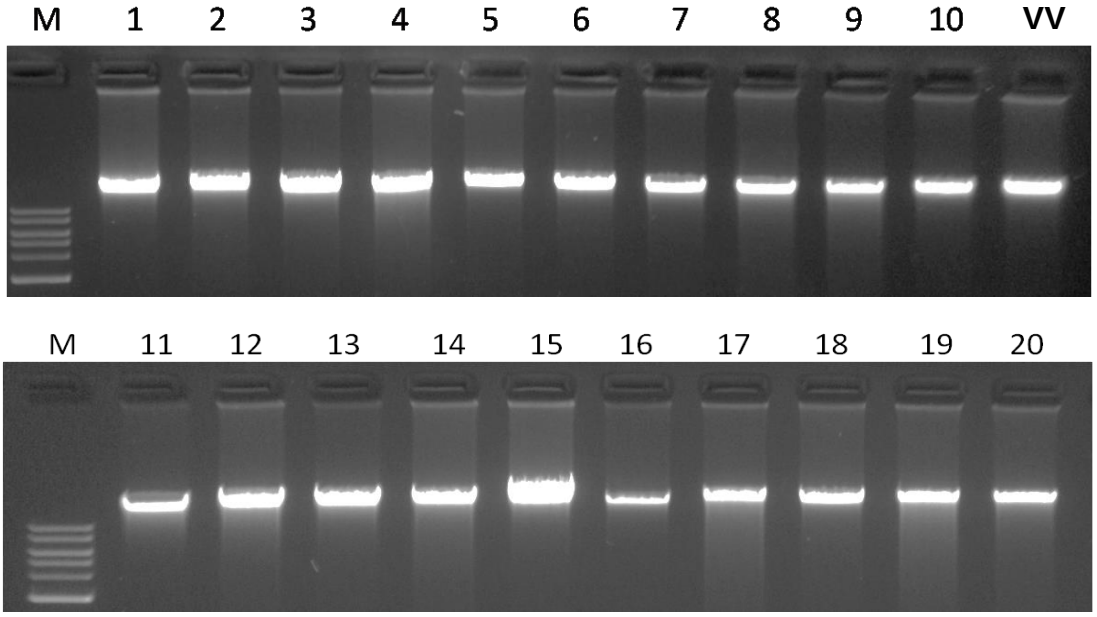


Figura 3.19 Visualización de la integridad de 5 µL del ADNg de las clonas transformadas con el vector pcGTCLA y del control. M = Marcador de 1 Kb (Invitrogen). 1-20 = Clonas CLA 1-20; VV = Clona transformada con el plásmido pChlamy4.

Una vez observada la integridad del ADNg extraído se procedió a la identificación del gen de interés por medio de PCR, en la Figura 3.20 se observa el resultado del análisis por PCR de clonas de *C. reinhardtii* bombardeadas con el plásmido pcGTCLA. El amplicón esperado corresponde a una región que comprende el gen *CrGPATclA* y el 3'UTR del *RbcS2* (descrito en materiales y métodos). Se observa la presencia del amplicón esperado de 270 pb en las clonas CLA2, CLA3, CLA4, CLA9, CLA10 y CLA20 por lo que se seleccionó éstas

muestras para determinar el número de copias integradas en su genoma por medio de Southern blot.

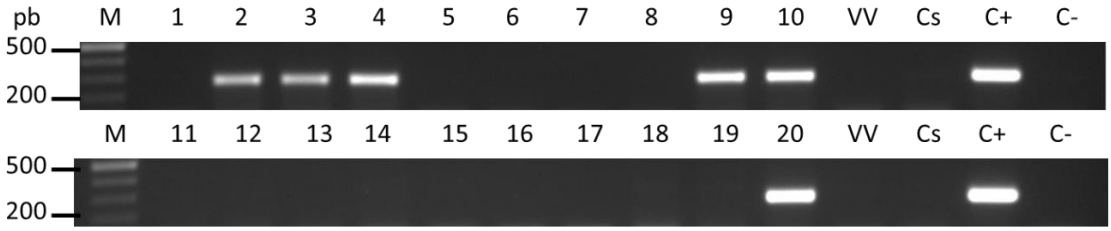


Figura 3.20 Identificación de clonas transformadas con el plásmido *pcGTCLA* por medio de PCR. 1-20 = Clonas recuperadas con este plásmido. pC4.2 = Clona 2 transformada con el plásmido *pChlamy4*. Cs = Cepa silvestre. C+ = Plásmido *pcGTCLA*. C- = Agua ultra pura.

3.2.8. Análisis de número de copias integradas en el genoma de las clonas transformadas con el vector pcGTCLA por medio de Southern blot

Se realizó el Southern blot de las clonas previamente identificadas, siguiendo el protocolo mencionado en materiales y métodos. En la Figura 3.21 se puede observar el film correspondiente al Southern blot de las clonas transformadas con el vector pcGTCLA, previamente identificadas, en donde se observa que las clonas CLA2, CLA9, CLA10 y CLA20 presentan un diferente patrón de bandeo. Las clonas que presentan al menos tres copias del transgén son CLA2, CLA9 y CLA 20; mientras que la clona CLA10 presenta al menos cinco copias del transgén (las clonas CLA3 y CLA4 presentaron el mismo patrón de bandeo que la clona CLA2 por lo que fueron omitidas en la Figura 3.21; datos no presentados). De igual forma se observa que todas las clonas analizadas presentan una banda en común con la cepa silvestre y el vector vacío (VV), la cual corresponde al un pegado inespecífico de la sonda utilizada con el gen endógeno de *C. reinhardtii*, lo cual se observó con ayuda de un análisis bioinformático de la sonda utilizada.

Con estos resultados se puede observar que la clonas obtenidas en la Figura 3.21 se encuentran transformadas con el gen de interés y son diferentes entre sí, por lo que se procedió al análisis de expresión del transgén en cada una de estas clonas.

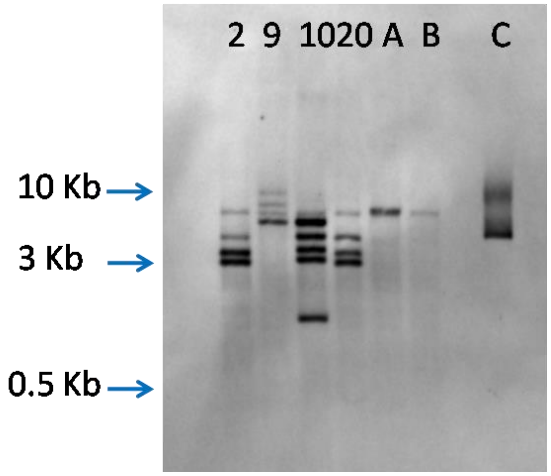


Figura 3.21 Identificación del número de copias presentes en las clonas transformadas con el plásmido pcGTCLA. No. = clona transformada, A = clona VV transformada con el plásmido pChlamy4; B = cepa silvestre, C = plásmido pcGTCLA.

3.2.9 Análisis de expresión de las clonas transformadas con el vector pcGTCLA

Se realizó la extracción de ARN de las clonas transformadas con el vector de transformación pcGTCLA, y que presentaron la correcta integración del transgén de interés en su genoma (apartado 3.2.8). En la Figura 3.22 se observa la integridad del ARN extraído de las clonas transformadas con el vector pcGTCLA, por lo que se procedió a la síntesis del cDNA correspondiente siguiendo el protocolo presentado en el apartado de materiales y métodos. Con la finalidad de evaluar la correcta síntesis de ADNc a partir del ARN total, se procedió a realizar una RT-PCR con el gen de la Actina de *C. reinhardtii*, cuya proteína forma parte del citoesqueleto de la célula. Ésta se utilizó para verificar que las muestras de la RT no estuvieran contaminadas con ADNg, para lo cual se emplearon oligonucleótidos que flanquean un intrón de 220pb, lo que permitió distinguir amplificaciones que provienen del ADNg o ADNc (Figura 3.23).

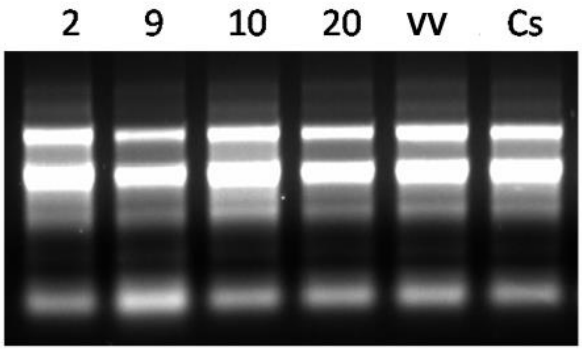


Figura 3.22 Calidad de 1 µg del ARN total extraído por medio del protocolo basado en el reactivo de TRIzol de Invitrogen. No. = Clona transformada con el vector pcGTCLA, VV = clona transformada con el vector pChlamy4; Cs = cepa silvestre de *C. reinhardtii*. Pureza de todas las muestras = 1.8.

Una vez verificada la integridad del ADNc se realizó la amplificación mediante RT-PCR del transgén, como se detalla en el apartado de materiales y métodos. En las Figura 3.23 se puede observar los resultados del análisis de expresión del transgén de las clonas transformadas con el vector pcGTCLA, en donde solo tres de las cuatro clonas identificadas por medio del Southern blot (apartado 3.2.8) presentaron expresión del transgén de interés. Siendo las que presentan una mayor intensidad de la banda las clonas CLA2 y CLA20; mientras que la clona CLA10 presenta una menor intensidad de banda, sugiriendo una menor expresión del transgén. De igual forma se observa la ausencia de amplificación en el vector vacío (VV) y la cepa silvestre (Cs), los cuales no debían presentar amplificación, al igual que la clona CLA9 lo cual sugiere que ésta clona no presenta expresión del transgén. A las clonas que presentaron la expresión del transgén se les realizó el análisis de acumulación número de células, biomasa seca, lípidos y TAGs.

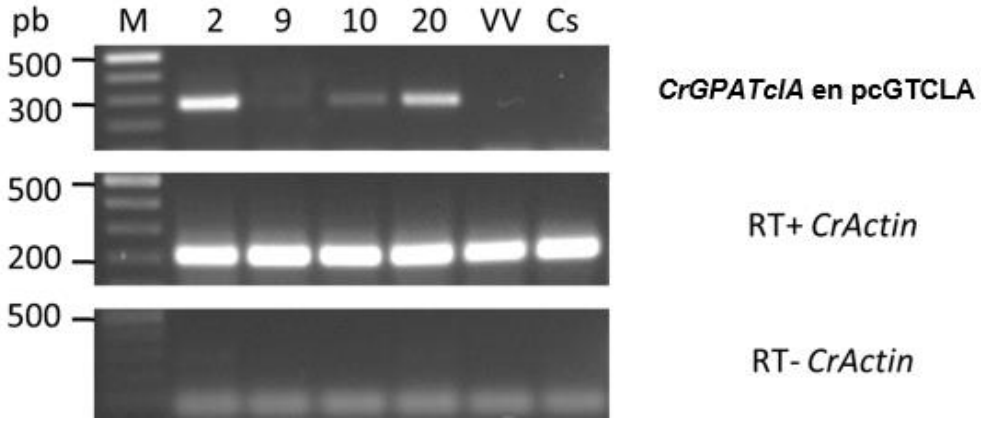


Figura 3.23 Análisis de expresión mediante RT-PCR del transgén de las clonas transformadas con el vector pcGTCLA. No. = Clona transformada con el vector pcGTCLA. Se utilizó el gen de la actina como control positivo (RT+ CrActin) y negativo (RT- CrActin). M= Marcador de peso molecular (2 log, NEB).

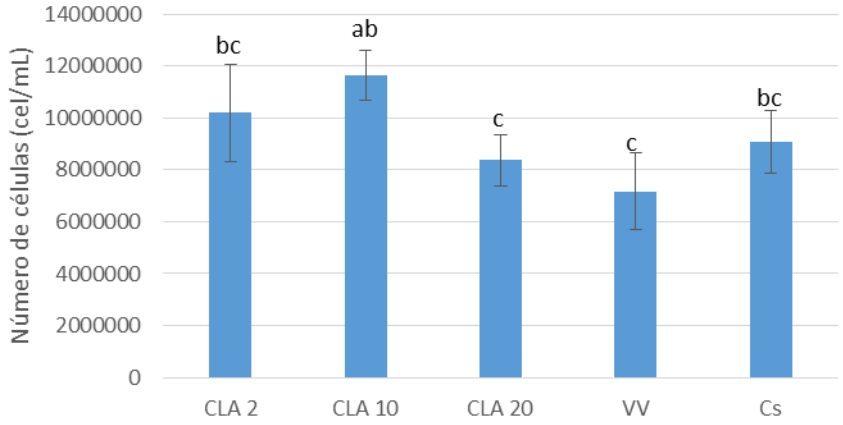
3.2.10 Análisis de la cantidad de biomasa, lípidos totales y TAGs presentes las clonas de *C. reinhardtii* transformadas con el vector pcGTCLA

En la Figura 3.24 A se presenta la concentración celular de los cultivos de cada una las clonas transformadas con el vector pcGTCLA que expresan el transgén, siendo las clonas CLA2 (10.19 x 10^6 cel/mL) y CLA10 (11.63 x 10^6 cel/mL) las que presentaron el mayor número de células comparado con la cepa silvestre (Cs, 9.06 x 10^6 cel/mL), mientras que las demás clonas no presentaron una diferencia significativa comparado con Cs (Anexo 7). El cultivo que presento el menor conteo del número de células comparado con la cepa silvestre fue el vector vacío con 7.17 x 10^6 cel /mL.

De igual forma en la Figura 3.24 B se puede observar la acumulación de biomasa seca de cada uno de los cultivos de las clonas que expresan de forma recombinante el gen *CrGPATclA*, las cuales no presentan diferencia significativa comparadas con la cepa silvestre (Cs), siendo la clona CLA10 (36.26 mg) la que presento una mayor cantidad de biomasa seca comparado con la cepa silvestre (35.5 mg), mientras que las que acumularon

una menor cantidad de biomasa seca fueron las clonas CLA2 (32.5 mg) y CLA20 (33.06 mg) (Anexo 7).

A)



B)

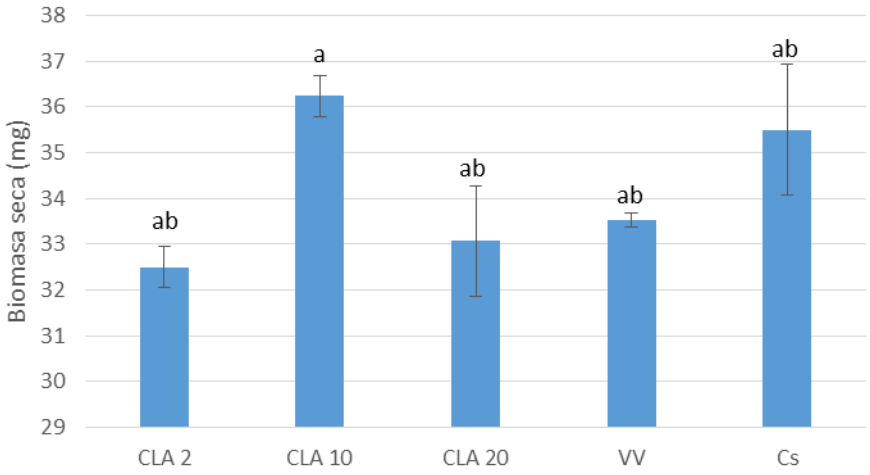
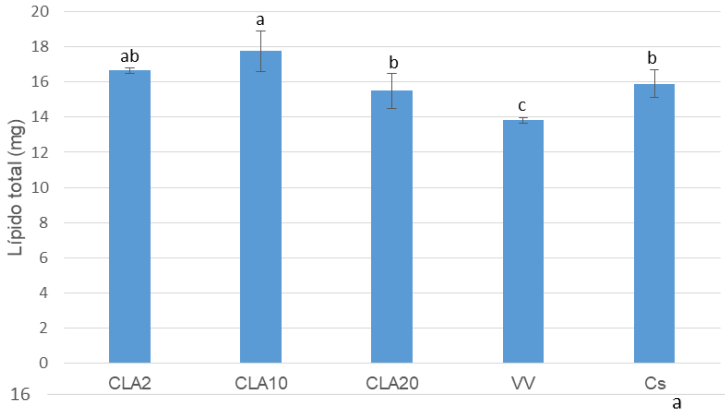


Figura 3.24 Acumulación de biomasa de las diferentes clonas que expresan de forma recombinante el gen *CrGPATclA*. A) Concentración celular. B) Biomasa seca. CLA # = clona que sobre expresa el gen *CrGPATclA.* VV = Cepa transformada con el vector vacío. Cs = Cepa silvestre. Diferentes letras minúsculas en la gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).

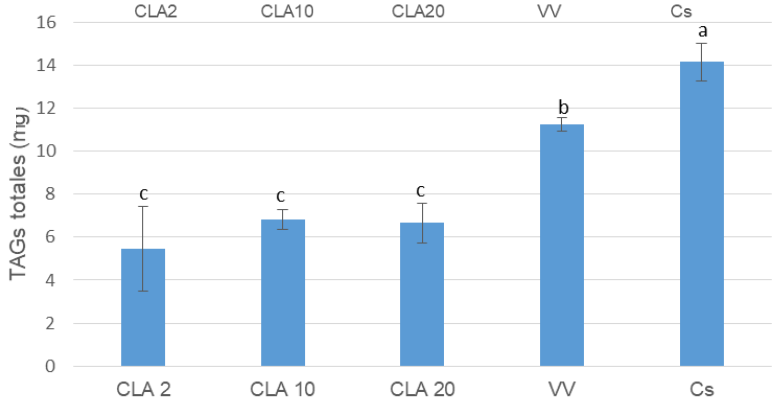
Posteriormente se realizó la extracción de lípidos totales de cada una de las clonas previamente mencionadas, en la Figura 3.25 A se presentan las clonas que expresan de forma recombinante el gen *CrGPATclA* observando que las clonas CLA2 (48.18%) y CLA20 (47072%) no presentaron una diferencia significativa en su porcentaje de lípidos totales por biomasa seca comparado con la cepa silvestre (46.99%), solo la clona CLA10 (53.49%) y la clona VV (38.17%) presentaron una diferencia significativa en el porcentaje de lípidos por biomasa seca comparado con la cepa silvestre (Cs).

A estas muestras de lípidos totales se les analizó su cantidad de triacilglicéridos presentes, en la Figura 3.25 B se presenta el porcentaje de TAGs por biomasa seca y en la Figura 3.25 C el porcentaje de TAGs por lípidos totales. En ambas figuras se puede observar que las clonas transgénicas correspondientes a *CrGPATclA* presentan significativamente menor cantidad de TAGs comparado con la cepa silvestre (Anexo 7). Esta disminución corresponde a un 19-23% menos en el porcentaje de TAGs por biomasa seca y de un 45-56% menos en el porcentaje de TAGs por lípido total. Mientras que entre la clona transformada con el vector vacío (VV) y la cepa silvestre no se observó diferencia significativa en su acumulación de TAGs por lípido total y TAGs por biomasa seca.

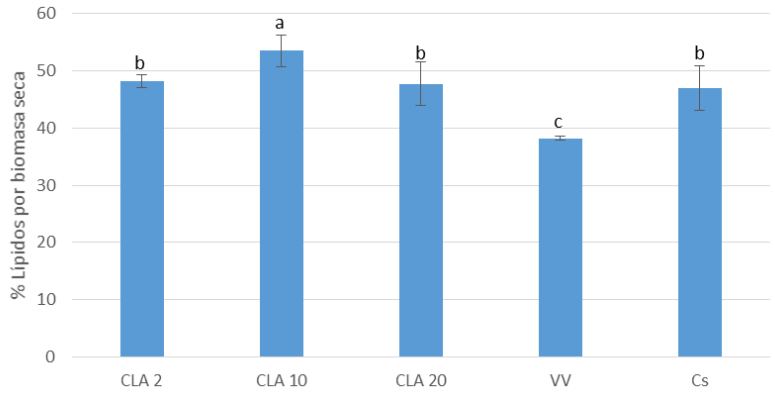
A)


Lípido total (mg)
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
ab
a
b
c
b
CLA2
CLA10
CLA20
VV
Cs

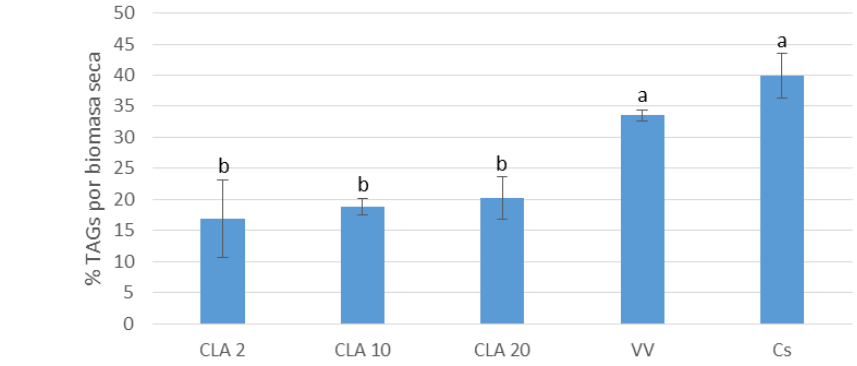
B)


TAGs totales (mg)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
c
c
c
b
a
CLA 2
CLA 10
CLA 20
VV
Cs

C)


% Lípidos por biomasa seca
60
50
40
30
20
10
0
b
a
b
c
b
CLA 2
CLA 10
CLA 20
VV
Cs

D)



E)

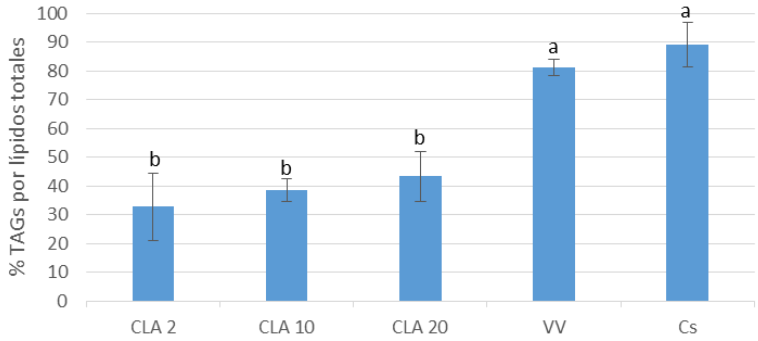


Figura 3.25 Acumulación de lípidos y triacilglicéridos de las clonas que expresan de forma recombinante el gen *CrGPATclA*. A) Lípido total. B) TAGs totales. C) Porcentaje de lípidos totales por biomasa seca. D) Porcentaje de triacilglicéridos por biomasa seca. E) Porcentaje de triacilglicéridos por lípidos totales. RE # = clona que sobre expresa el gen *CrGPATclA*. VV = Cepa transformada con el vector vacío. Cs = Cepa silvestre. Diferentes letras minúsculas en la gráfica indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, n = 3).

3.4 Discusión

En la literatura existen pocos reportes en los que se haya documentado la expresión de forma recombinante de genes tipo GPAT en microalgas. Recientemente se describió la cuantificación de los lípidos totales en clonas transformadas de *C. reinhardtii* que expresaban de forma heterologa los genes tipo GPAT de ésta misma microalga, bajo la dirección del promotor HSP70A/RbcS2 de alta expresión presente en el vector pSP124S. En donde se observó un incremento entre el 1% a un 9% de lípidos totales comparados con la cepa silvestre (Duarte, 2013). Iskandarov y colaboradores (2016) expresaron de forma heteróloga la GPAT del cloroplasto de *L. incisa* (*LiGPAT*) en *C. reinhardtii* y observaron un incremento de hasta 1.5 veces más de TAGs en las clonas transformadas con *LiGPAT* (Iskandarov *et al.* 2016).

En el presente trabajo se realizó la transformación nuclear de *C. reinhardtii* con un vector comercial de alta expresión (pChlamy4, Invitrogen) para *C. reinhardtii* conteniendo a los genes *CrGPAT*: *pcGTRE* (plásmido que contiene al gen *CrGPATre*)*, pcGTCLA* (plásmido que contiene al gen *CrGPATclA*). Éste vector es diferente a los utilizados por Iskandarov y colaboradores (2016) y Niu y colaboradores (2016), quienes utilizaron vectores diseñados para otros organismos, los cuales pueden llegar a afectar la expresión de los genes utilizados (Rasala *et al.* 2012, Schroda *et al.* 2000, Barnes *et al.* 2005), mientras que el vector utilizado en esta tesis (pChlamy4) es el más similar al utilizado por Duarte (2013).

En este trabajo se obtuvieron 65, 23 y 78 colonias posiblemente transformadas de cada plásmido utilizado (pcGTRE, pcGTCLA y pChlamy4 vacío; respectivamente), un número menor al reportado por Duarte (2013), en donde se obtuvieron alrededor de 200 colonias posiblemente transformadas por cada plásmido utilizado, pero los datos presentados por el distribuidor del plásmido comercial (pChlamy4) son de aproximadamente 30 colonias posiblemente transformadas por evento de transformación (GeneArt® *Chlamydomonas* Protein Expression Kit, user guide). Con éstos resultados lo que se puede observar es que se obtuvieron más colonias posiblemente transformadas, en el caso de los plásmidos pcGTRE y pChlamy4; comparadas con lo reportado por el proveedor.

De las colonias obtenidas transformadas con el plásmido pcGTRE se analizaron cincuenta, de las cuales trece presentaron la construcción de interés integrada en su genoma. El análisis del número copias reveló que tres de las trece colonias presentaron el mismo patrón de bandeo (una copia del transgén). Éste fenómeno se puede deber a que después de la transformación las cajas de Petri se lavan para recuperar las células transformadas y son plaqueadas en un medio de selección, como se especifica en el apartado de materiales y métodos, posiblemente una célula se encontraba en división y durante el plaqueo ésta se disgregó generando de ésta forma varias colonias. En el caso de las clonas obtenidas transformadas con el vector pcGTCLA fueron analizadas veinte de ellas, en donde se observó que únicamente seis de ellas presentaron el amplicón esperado, las cuales al igual que el caso anterior, también presenaron el mismo patrón de bandeo (cuatro bandas), por lo que se escogió una de las colonias para continuar, en ambos set de colonias transformadas.

Posteriormente se realizó el análisis de la expresión del transgén en las líneas transformadas, observándose que una de las diez colonias analizadas transformadas con el vector pcGTRE, y una de las cuatro colonias transformadas con el vector pcGTCLA, no presentaron expresión del transgén de interés. Lo anterior pudo deberse a un fenómeno que se le conoce como silenciamiento génico y se puede deber a diferentes razones, como son: el sitio en dónde fue integrado el transgén, la correcta integración de todo el casete de transformación, o a la maquinaría de regulación de célula, tal como se ha observado en diferentes estudios (Singer *et al.* 2016; Lewin, 2004), por lo que no es rara la visualización de este fenómeno.

Debido a lo anterior solo nueve clonas transformadas con el vector pcGTRE que expresaban el transgén, de las 10 identificadas por medio de Southern blot, y tres clonas que presentaron expresión del transgén transformadas con el vector pcGTCLA, de las cuatro identificadas por Southern blot se utilizaron en ensayos subsecuentes. Estas clonas fueron analizadas para determinar su número de células, biomasa seca, porcentaje de lípidos totales por biomasa seca, porcentaje de TAGs por biomasa seca y porcentaje de TAGs por lípidos totales. En cuanto al número de células, se observó que los cultivos de las clonas transformadas solo dos clonas (RE41 y RE45) presentaron significativamente una mayor

número de células comparado con el control, mas al momento del análisis de la biomasa seca de estos cultivos no presentaron diferencia significativa. Ésto se puede deber a que las clonas que se encuentran expresando de forma recombinante el gen *CrGPATre* o *CrGPATclA* pueden haber sido afectadas por la expresión de dicho transgén pudiendo afectar la replicación de la célula, tal como se ha observado en otros estudios de expresión recombinante (Iskandarov *et al.* 2016; Duarte, 2013), pero al obtener la biomasa seca éstas diferencias no son significativas comparadas con el control, incluso para las líneas RE 41 y RE 45 que presentaron un mayor número de células. Estos resultados han sido observados previamente en otros estudios, en los cuales se sugiere que para el caso de aumento de biomasa posiblemente la célula se dedicó a la producción algún métabolito secundario en vez de dividirse. Por el contrario, las colonias con mayor división celular, no produjeron la misma cantidad de otros metabolitos (Herrera-Valencia *et al.* 2011). El uso de parámetros como biomasa seca o el número de células, varía entre los estudios dependiendo de la pregunta de investigación. Debido a que los genes expresados de forma heteróloga o los medios de cultivo diferentes pueden llegar a afectar la división celular, muchos autores prefieren tomar como referencia a la biomasa seca y no el número de células al momento de realizar comparaciones (Contreras-Pool *et al.* 2016; Siaut *et al.* 2011).

En el caso de *CrGPATre*, se han identificado y caracterizado diez isoenzimas GPAT (ATS y AtGPAT1-9) en la planta modelo *A. thaliana*, siendo AtGPAT4-9 las que se encuentran en el retículo endoplásmico (Li-Beisson *et al.* 2013; Chen *et al.* 2011). De estas isoenzimas, aunque todas se encuentran en el mismo organelo, solo la AtGPAT9 es la que se encuentra relacionada a la síntesis de TAGs, además de la síntesis de lípidos de membrana (Shokey *et al.* 2016; Singer *et al.* 2016), mientras que las demás se encuentran relacionadas a la síntesis de otro tipo de lípidos tales como la cutina y la suberina (Chen *et al.* 2011). Con respecto al gen *CrGPATclA*, es posible que esté relacionado con la síntesis de lípidos de membrana, lo cual es acorde a lo reportado en la literatura, donde se menciona que la isoenzima GPAT del cloroplasto esta relacionada con la síntesis de lípidos de membrana y no lípidos de almacén (Nakamura y Li-Beninson, 2016; Duarte, 2013; Li-Beninson *et al.* 2013; Chen *et al.* 2011). Aunque algunos autores sugieren que la isoenzima del cloroplasto también podría estar relacionada a la síntesis de TAGs en *C. reinhardtii* (li-Beninson *et al.* 2013; Fan *et al.* 2011), y que bajo condiciones de estrés se podría estar

llevando a cabo el señalamiento para que la síntesis ocurra en este organelo, esto debido a que los estudios que sugieren esta ruta tratan a sus células con algún tipo de estrés abiótico (Ej. deficiencia de nitrógeno) lo cual se ha visto que incrementa la cantidad de TAGs presentes en *C. reinhardtii* (Li-Benindon *et al.* 2013; Fan *et al.* 2011).

En el presente trabajo se encontró que en cuanto al porcentaje de lípidos totales por biomasa seca se puede observar que no hubo diferencia significativa entre las clonas que expresaron de forma recombinante el gen *CrGPATre* y la Cs, y en el caso de las clonas que expresan de forma recombinante al gen *CrGPATclA* solo la clona CLA10 fue la que presento de forma significativa una mayor cantidad de lípido total por biomasa seca comparado con la Cs. Mas al momento de realizar el análisis de TAGs se pudo observar que hubo un decremento en la cantidad de TAGs presentes en las clonas transformadas, el cual fue más evidente en las clonas transformadas con el vector pcGTCLA (de un 19 a 23% menos porcentaje de TAGs por biomasa seca y de un 45 a 56% menos en el porcentaje de TAGs por lípidos totales) que con las transformadas con el vector pcGTRE (de un 0.7 a 9% menos porcentaje de TAGs por biomasa seca y de un 7.5 a 25% menos en el porcentaje de TAGs por lípidos totales). Lo anterior podría deberse a que si bien los genes *CrGPATre* y *CrGPATclA* pueden estar involucrados en la síntesis de lípidos y TAGs por su participación en una ruta similar a la ruta de Kennedy en plantas, tal vez sus niveles de expresión no contribuyan al aumento de estos lípidos y la regulación se encontraría en otro punto de la ruta de síntesis. Anteriormente en nuestro grupo de trabajo se había observado una expresión constitutiva de los genes nativos *CrGPATre* y *CrGPATclA* en *C. reinhardtii* (Duarte, 2013). Por lo tanto, sería interesante que en posteriores estudios se lograra silenciar a cada uno de estos genes y evaluar su efecto en la síntesis de los diferentes tipos de lípidos en esta microalga.

CAPÍTULO IV

4.1 Discusión general

Existen diferentes estudios que señalan a la enzima glicerol 3-fosfato aciltransferasa (GPAT) como uno de los pasos claves para síntesis de lípidos (Chen *et al.* 2011). En microalgas existen diferentes reportes sobre la identificación *in silico* y la caracterización de la isoenzima GPAT del cloroplasto (Misra y Panda, 2013; Baral *et al.* 2012), pero únicamente existe un reporte sobre la caracterización funcional a la isoenzima GPAT de mitocondria de la diatomea *T. pseudonana* (TpGPAT) la cual presentó una preferencia hacia un ácido graso (16:0-CoA) que une a la cadena de G3P (Xu *et al.* 2009). Recientemente Iskandarov y colaboradores (2016) identificaron en la microalaga verde *Lobosphaera incisa* un gen tipo GPAT (*LiGPAT*), homólogo a AtGPAT9, cuya expresión de forma recombinante en la micralga modelo *C. reinhardtii* produce un incremento de hasta 1.5 veces en la producción de TAGs en las líneas transformadas comparadas a la cepa silvestre (Iskandarov *et al.* 2016).

En nuestro grupo de trabajo, en un estudio previo, se identificaron y caracterizaron molecularmente dos genes tipo GPAT en la microalga verde *C. reinhardtii*; *CrGPATre* un homólogo al gen *AtGPAT9*, y *CrGPATclA* homólogo al gen *ATS1* (Duarte, 2013), cuya caracterización funcional se presenta en el presente trabajo.

Gen *CrGPATre*.

En el trabajo realizado previamente en el laboratorio se pudo observar que el gen *CrGPATre*, homólogo al gen *AtGPAT9;* muy probablemente codifica la isoenzima GPAT del retículo endoplásmico de *C. reinhardtii*, debido a la similaridad de estructuras de unión a membrana con AtGPAT9 (Duarte, 2013). En el presente trabajo se realizó el análisis del ensayo enzimático en donde se pudo observar que de los tres extractos evaluados (total, soluble y membranal), solo el extracto membranal presento un incremento en la actividad de la cepa mutante de levadura *gat1Δ* transformado con el vector pLGTre, el cual contiene a

CrGPATre, comparado con el la cepa mutante transformada con el vector vacío (psGC) y la cepa mutante de *S. cerevisiae gat1Δ*. Mientras que en los extractos total y soluble no se observó diferencia significativa entre las cepas mutantes antes mencionadas, lo cual puede deberse a que la presencia de la proteína correspondiente al gen *CrGPATre* se encontraba en tan baja proporción en éstos extractos que no fue posible visualizarlo. Por esta razón, en diferentes estudios, las isoenzimas GPAT que se encuentran unidas a membrana solo es analizada la actividad en el extracto membranal (Mañaz-Fernandez *et al.* 2010; Xu *et al.* 2009). Estos resultados corroboran que la enzima CrGPATre se encuentra unida a membrana y posiblemente sea la isoenzima GPAT correspondiente al retículo endoplásmico. Posteriormente, se realizó la expresión recombinante de este gen en la microalga verde *C. reinhardtti*. Del evento de transformación y análisis de las colonias transformadas, se obtuvieron en total nueve líneas diferentes que expresaban el transgén de interés. A éstas líneas se le analizó su porcentaje de lípidos y TAGs por biomasa seca donde se observó que no presentaron una diferencia significativa en su porcentaje de lípidos totales por biomasa seca comparadas con la cepa silvestre, pero al realizar el análisis de TAGs se observó que las líneas transformadas que expresaban al transgén *CrGPATre*, presentaron un menor porcentaje de TAGs por biomasa seca de -0.7% a 9% menos- así como un menor porcentaje de TAGs por lípidos total de -7.5% a 25% menos-. Éste fenómeno se ha observado en la planta *A. thaliana* en donde de las diez diferentes isoenzimas identificadas seis se encuentran en el retículo endoplásmico (AtGPAT4-9) (Chen *et al.* 2011), y de estas solo la enzima AtGPAT9 es al que se encuentra relacionada a la producción de TAGs además de a la síntesis de lípidos de membrana (Shockey *et al.* 2016; Singer *et al.* 2016).

Estos resultados sugieren que el gen *CrGPATre* no influye de manera directa en la síntesis de lípidos y que la regulación puede estarse llevando en algún otro punto de la ruta de síntesis. Por lo tanto, sería interesante que en posteriores estudios se lograra sinlenciar a cada uno de estos genes y evaluar su efecto en la síntesis de los diferentes tipos de lípidos en esta microalga.

Gen *CrGPATclA*.

En el trabajo realizado previamente en el laboratorio se pudo observar que el gen *CrGPATclA*, homólogo al gen *ATS1*, muy probablemente corresponde a la isoenzima GPAT

del cloroplasto de *C. reinhardtii,* debido a la similaridad de estructuras con ATS1 (Duarte, 2013). Durante el análisis del ensayo enzimático realizado en este trabajo, se observó la presencia de actividad de CrGPATclA en el extracto total, soluble e interesantemente en el membranal. La presencia de actividad en los primeros dos extractos concuerdan con lo que se observa en la literatura, donde se menciona que en el caso de la isoenzima del cloroplasto ésta se encuentra de forma soluble (Chen *et al.* 2011; Ruiz-Lopez *et al.* 2010; Murata y Tasaka, 1997). Debido a éstas características los autores de diferentes artículos que caracterizan la isoenzima GPAT del cloroplasto en diferentes plantas solo analizan el extracto total (Chen *et al.* 2011), por lo que éste es el primer reporte en donde se analizó la actividad de la isoenzima GPAT del cloroplasto en el extracto soluble y membranal. Debido a la presencia de actividad en el extracto membranal y a los datos obtenidos en el trabajo previo de Duarte (2013), en donde se observó que la predicción de la proteína de CrGPATclA presentaba un sitio de unión a la membrana en el extremo N-terminal, es posible que una fracción de las enzimas codificadas por el gen *CrGPATclA* en la levadura mutante *gat1Δ* se estén uniendo a membrana, posiblemente con la ayuda de otros factores (ej. interacción con proteínas de integradas a membrana o la interacción con las cabezas polares de grupos lipídicos) (Nelson and Cox, 2004, Lodish *et al.* 2000), sería necesario realizar más estudios para determinar el tipo de unión.

Posteriormente se realizó la expresión recombinante del gen *CrGPATclA* en la microalga verde *C. reinhardtii*, en donde se observó que las colonias obtenidas de la transformación, solo tres clonas diferentes presentaron la expresión del transgén de interés. A éstas clonas se le realizó el análisis de porcentaje de lípidos y TAGs por biomasa seca, en donde no se observó un incremento significativo en el porcentaje de lípidos totales por biomasa seca, pero si un decremento significativo en su porcentaje de TAGs por biomasa seca (19 a 23 % menos) y TAGs por lípido total (45 a 56 % menos). Estos resultados apoyan a la teoría de que CrGPATclA corresponde a la isoenzima GPAT que se encuentra soluble en el cloroplasto que podría estar relacionada a la síntesis de lípidos de membrana, como se ha observado en otros organismos (Nakamura y Li-Beisson, 2016).

4.2 Conclusiones Generales.

El gen *CrGPATre* de la microalga verde *C. reinhardtii* codifica para una enzima con actividad de glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) que muy probablemente esté localizada en el retículo endoplásmico de esta microalga.

El gen *CrGPATclA* de la microalga verde *C. reinhardtii* codifica para una enzima con actividad de glicerol 3-fosfato aciltransferasa (GPAT) que muy probablemente este localizada en el cloroplasto de esta microalga.

Si bien el gen *CrGPATre* puede estar relacionado con la síntesis de lípidos, su expresión parece no contribuir al aumento de lípidos en general, y TAGs en particular, y se sugiere que la regulación de esta síntesis se encuentra en otro punto de la ruta.

El gen CrGPATclA podría estar relacionado con la síntesis de lípidos de membrana, y sus expresión parece no contribuir al aumento de lípidos en general, y TAGs en particular, por lo uqe se sugiere que la regulación de esta síntesis se encuentra en otro punto de la ruta.

Chlamydomonas reinhardtii es la primera microalga de agua dulce en donde se han caracterizado funcionalmente genes homólogos a los que codifican para las isoenzimas del retículo endoplásmico [AtGPAT9 (CrGPATre)] y del cloroplasto [ATS1 (CrGPATclA)].

4.3 Perspectivas

En éste trabajo se demostró por primera vez que la microalga verde *C. reinhardtii* posee dos enzimas con actividad de glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) involucradas en la síntesis de lípidos. Por tanto sería interesante realizar el estudio de localización subcelular. También sería determinar de forma *in vitro* si la enzima CrGPATre de *C. reinhardtii* se encuentra unida a la membrana del retículo endoplásmico, y si la enzima CrGPATclA se encuentra en el cloroplasto. Con esto se confirmaría la predicción *in silico* realizada en un trabajo previo en el laboratorio (Duarte, 2013), y los resultados del ensayo de la actividad enzimática de este trabajo, en donde se encontró la actividad de la enzima CrGPATre en el extracto membranal, mientras que la actividad de la enzima CrGPATclA se presentó en los tres diferentes extractos (total, soluble y membranal).

De igual forma en el estudio de Duarte (2013) se identificó un splicing alternativo en donde el ARNm más pequeño del gen *CrGPATcl* fue nombrado *CrGPATclB*. Sería interesante realizar la clonación y caracterización funcional de esta isoforma de ARNm para poder identificar si CrGPATclB se encuentra relacionada a la síntesis de TAGs o a la síntesis de lípidos de membrana como el caso de CrGPATclA. En dado caso de pertenecer a rutas de síntesis diferentes, sería interesante identificar cual es el factor que induce a la síntesis de cada isoforma y la posible interacción de ambas en el cloroplasto.

Finalmente, y no menos importante, se ha observado en diferentes estudios en plantas en donde se sobreexpresa un gen que codifica para una enzima GPAT, éstas presentan una tolerancia a frío (Yan *et al.* 2008; Yokoi *et al.* 1998), basándonos en esto sería interesante analizar la tolerancia a un estrés abiótico (ej, frío, calor, etc.) de las clonas que expresan de forma recombinante al gen *CrGPATre* o *CrGPATclA*, tomando como base los análisis realizados por Hema y colaboradores (2007), quienes analizaron diferentes tipos de estrés en *C. reinhardtii*.

Bibliografía

Ahmad, A.L., N.H.M. Yasin, C.J.C. Derek y J.K. Lim (2011). Microalgae as a sustainable energy source for biodiésel production: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 15, 584-593.

Alves-Bezerra, M. y K.C. Gondim (2012). Triacylglycerol biosynthesis occurs via the glycerol-3-phosphate pathway in the insect *Rhodnius prolixus*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Molecular and Cell Biology of Lipids 1821, 1462-1471.

Amaro, H.M., A.C. Guedes y F.X. Malcata (2011). Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiésel. Applied Energy 88, 3402-3410.

Angulo, J., L. Mahecha, K. Nuernberg, G. Nuernberg, D. Dannenberger, M. Olivera, M. Boutinaud, C. Leroux, E. Albrecht y L. Bernard (2012). Effects of polyunsaturated fatty acids from plant oils and algae on milk fat yield and composition are associated with mammary lipogenic and SREBF1 gene expression. Animal, 6, pp 1961-1972.

Araujo, G.S., L.J.B.L Matos, L.R.B. Gonçalves, F.A.N. Fernandes y W.R.L. Farias (2011). Bioprospecting for oil producing microalgal strains: Evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains. Bioresource Technology 102, 5248-5250.

Athenstaedt, K. y G. Daum (2006). The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. Cell. Mol. Life Sci. 63, 1355-1369.

Baker Brachmann, C., A. Davies, G.J. Cost, E. Caputo, J. Li, P. Hieter y J.D. Boeke (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. Yeast 14, 115-132.

Ban-Weiss, G.A., J.Y. Chen, B.A. Buchholz y R.W. Dibble (2007). A numerical investigation into the anomalous slight NOx increase when burning biodiésel, A new (old) theory. Fuel Processing Technology 88, 659-667.

Baral M., N. Misra, P.K. Panda y M. Thirunavoukkarasu (2011). *in silico* structural determination of gpat enzyme from O*streococcus lucimarinus* for biotechnological application of microalgal biofuel production. Biotechnology & Biotechnological Equipment 26, 1, pp. 2794-2800.

Barnes, D., S. Franklin, J. Schultz, R. Henry, E. Brown, A. Coragliotti y S.P. Mayfield (2005). Contribution of 5'- and 3'-untranslated regions of plastid mRNAs to the expression of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast genes. Mol Gen Genomics, 274: 625–636.

Bratschi, M.W., D.P. Burrowes, A. Kulaga, J.F. Cheung, A.L. Alvarez, J. Kearley y V. Zaremberg (2009). Glycerol-3-Phosphate Acyltransferases Gat1p and Gat2p are microsomal phosphoproteins with differential contributions to polarized cell growth. Eukaryotic Cell 8, 1184-1196.

Bravo E. (2007). Biocombustibles, Cultivos energéticos y soberanía alimentaria en Latino América. Encendiendo el debate sobre los biocombustibles. Manthra Editores. Quito Ecuador Vol. 1, 1-151.

Boyle, N.R., M.D. Page, B. Liu, I.K. Blaby, D. Casero, J. Kropat, S.J. Cokus, A. Hong-Hermesdorf, J. Shaw, S.J. Karpowicz, S.D. Gallaher, S. Johnson, C. Benning, M. Pellegrini, A. Grossman y S.S. Merchant (2012). Three acyltransferases and nitrogen-responsive regulator are implicated in nitrogen starvation-induced triacylglycerol accumulation in Chlamydomonas. Journal of Biological Chemistry 287, 15811-15825.

Cao, J., J-L. Li, D. Li, J.F. Tobin y R.E. Gimeno (2006). Molecular identification of microsomal acyl-CoA:glycerol-3-phosphate acyltransferase, a key enzyme in de novo triacylglycerol synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences 103, 19695-19700.

Cakmak, T., P. Angun, Y.E. Demiray, A.D. Ozkan, Z. Elibol y T. Tekinay (2012). Differential effects of nitrogen and sulfur deprivation on growth and biodiésel feedstock production of Chlamydomonas reinhardtii. Biotechnology and Bioengineering 109, 1947-1957.

Chen, X., G. Chen, M. Truksa, C.L. Snyder, S. Shah y R.J. Weselake (2014). Glycerol-3-phosphate acyltransferase 4 is essential for the normal development of reproductive organs and the embryo in *Brassica napus*. Journal of Experimental Botany, 65:15, pp. 4201–4215

Chen, X., C.L. Snyder, M. Truksa, S. Shah y R.J Weselake (2011). *sn*-Glycerol-3-phosphate acyltransferases in plants. Plant Signaling & Behavior 6:11, 1695-1699.

Chisti, Y. (2007) Biodiésel from microalgae. Biotechnology Advances 25; 294-306.

Claassen, P.A.M., J.B van Lier, A.M. Lopez Contreras, E.W.J. van Niel, L. Sijtsma, A.J.M Stams, S.S de Vries y R.A.Weusthuis (1999). Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. Applied Microbiology and Biotechnology 52, 741-755.

Contreras Pool, P.Y. (2011). Análisis del perfil de los ésteres metílicos obtenidos de dos microalgas verdes: *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella saccharophila*, y su variación en respuesta a condiciones de estrés. Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.

Contreras Pool, P.Y., S. Peraza-Echeverría, A.F. Ku-González y V.A. Herrera-Valencia (2016). The phytohormone abscisic acid increases triacylglycerol content in the green microalga *Chlorella saccharophila* (Chlorophyta). Algae, 31(3): 267-276.

Duarte Coello, M.E. (2013). Clonación y caracterización molecular de dos genes homólogos a glicerol 3-fosfato aciltransferasa (GPAT) en la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii.* Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.

Eccleston V. S. y J.L Hardwood (1995). Solubilisation, partial purification and properties of acyl-CoA: glycerol-3-phosphate acyltransferase from avocado (*Persea americana*) fruit mesocarp. Biochim Biophys Acta 27, 1257(1):1-10.

Ehara, T., Y. Kamei, M. Takahashi, X. Yuan, S. Kanai, E. Tamura, M. Tanaka, T. Yamazaki, S. Miura, O. Ezaki, T. Suganami, M. Okano y Y. Ogawa (2012). Role of DNA

Methylation in the Regulation of Lipogenic Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase 1 Gene Expression in the Mouse Neonatal Liver. Diabetes, Vol. 61: 2442–2450.

Ellman, G.L. (1959). Tissue Sulfhydryl Groups. Archives of Biochemistry and Biophisics, 82, 70-77.

Fan, J., C. Andre y C. Xu (2011). A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*. FEBS Letters 585, 1985-1991.

Frentzen, M., E. Heinz, T.A. McKeon y P.K. Stumpf (1983). Specificities and selectivities of glycerol-3-phosphate acyltransferase and monoacylglycerol-3-phosphate acyltransferase from pea and spinach chloroplasts. European Journal of Biochemistry 129, 629-636.

Gao, Q., Y. Shang, W. Huang y C. Wang (2013). Glycerol-3-phosphate acyltransferase contributes to triacylglycerol biosynthesis, lipid droplet formation, and host invasion in *Metarhizium robertsii*. Applied and Environmental Microbiology 79, 7646-7653.

Gidda, S.K., J.M. Shockey, S.J. Rothstein, J.M. Dyer y R.T. Mullen (2009). Arabidopsis thaliana GPAT8 and GPAT9 are localized to the ER and possess distinct ER retrieval signals: Functional divergence of the dilysine ER retrieval motif in plant cells. Plant Physiology and Biochemistry 47, 867-879.

Goodson C., R. Roth, Z.T. Wang y U. Goodenough (2011). Structural Correlates of Cytoplasmic and Chloroplast Lipid Body Synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* and Stimulation of Lipid Body Production with Acetate Boost. Eukaryotic cell, vol. 10, No. 12, p. 1592–1606.

Goold H., F. Beisson, G. Peltier y Y. Li-Beisson (2015). Microalgal lipid droplets: composition, diversity, biogenesis and functions. Plant Cell Rep 34:545–555.

Gonzalez-Baró, M.R., D.A. Granger y R.A. Coleman (2001). Mitochondrial Glycerol Phosphate Acyltransferase Contains Two Transmembrane Domains with the Active Site in the N-terminal Domain Facing the Cytosol. Journal of Biological Chemistry 276, 43182-43188.

Gupta, S., P. Pandey, A. Grover, V. Patade, S. Singh y Z. Ahmed (2013). Cloning and characterization of GPAT gene from Lepidium latifolium L.: a step towards translational research in agri-genomics for food and fuel. Mol Biol Rep 40, 4235-4240.

Han, S., Z. Hu y A. Lei (2008). Expression and function analysis of the metallothionein-like (MT-like) gene from *Festuca rubra*, in *Chlamydomonas reinhardtii*, chloroplast. Science in China Series C: Life Sciences 51, 1076-1081.

Hansen, T.J., M. Hondzo, M.T. Mashek, D.G. Mashek y P.A. Lefebvre (2013). Algal swimming velocities signal fatty acid accumulation. Biotechnology and Bioengineering 110, 143-152.

Harris, E. (2001) *Chlamydomonas* as a model organism. Annual Revew Plant Physol. Plant Mol. Biol. 52:363-406.

Harris E., (1989). The *Chlamydomonas* sourcebook. A comprenhensive Guide to Biology and Laboratory Use. (ed.) Academic Press, Inc. San Diego California. pp. 25-27.

Hema, R., M. Senthil-Kumar, S. Shivakumar, P. Chandrasekhara-Reddy y M. Udayakumar (2007). *Chlamydomonas reinhardtii*, a model system for functional validation of abiotic stress responsive genes. Planta, 226:655–670.

Hu, Q., M. Sommerfeld, E. Jarvis, M. Ghirardi, M. Posewitz, M. Seibert y A. Darzins (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. The Plant Journal 54, 621-639.

Huang, G., F. Chen, D. Wei, X. Zhang y G. Chen (2010). Biodiésel production by microalgal biotechnology. Applied Energy 87, 38-46.

Ibáñez-Salazar, A., S. Rosales-Mendoza, A. Rocha-Uribe, J.I. Ramírez-Alonso, I. Lara-Hernández, A. Hernández-Torres, L.M.T. Paz-Maldonado, A.S. Silva-Ramírez, B. Bañuelos-Hernández, J.L. Martínez-Salgado y R.E. Soria-Guerra (2014). Over-expression of Dof-type transcription factor increases lipid production in Chlamydomonas reinhardtii. Journal of Biotechnology 184, 27-38.

Illman, A., A. Scragg y S. Shales (2000) Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium. Enzyme and Microbial Technology. 27, 631–635.

Inoue H., H. Nojima y H. Okayama (1990). High effiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene 96:23-28.

Iskandarov, U., S. Sitnik, N. Shtaida, S. Didi-Cohen, S. Leu, I. Khozin-Goldberg, Z. Cohen y S. Boussiba (2015). "Cloning and characterization of a GPAT-like gene from the microalga Lobosphaera incisa (Trebouxiophyceae): overexpression in Chlamydomonas reinhardtii enhances TAG production." Journal of Applied Phycology: 1-13.

Jain, R. K., M. Coffey, K. Lai, A. Kumar y S.L. MacKenzie (2000). Enhancement of seed oil content by expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase genes. *Biochemical Society Transactions*, *28*(6), 958-961.

Jonsson, C.M., L.C. Paraiba, M.T. Mendoza, C. Sabater y J.M. Carrasco (2001). Bioconcentration of the insecticide pyridaphenthion by the green algae Chlorella saccharophila. Chemosphere 43, 321-325.

Khan, S.A., Rashmi, M.Z. Hussain, S. Prasad y U.C. Banerjee (2009). Prospects of biodiésel production from microalgae in India. Renewable and Sustainable Energy Reviews 13, 2361-2372.

Khozin-Goldberg, I. y Z. Cohen (2011). Unraveling algal lipid metabolism: Recent advances in gene identification. Biochimie 93, 91-100.

Kindle, K. y O. Sodeinde (1994). Nuclear and chloroplast transformation in C*hlamydomonas reinhardtii* strategies for genetic manipulation and gene expression. Journal of Applied Phycology 6, 231-238.

Kolodney M. S. y A.M. Rotunda (2005) Method and composition for the non-surgical removal of fat. US 2005/0261258.

Lewin, B. (2004). Genes VIII. Pearson Prentice Hall, Pearson Education, Inc. pp. 113.

Lewin, T.M., P. Wang y R.A. Coleman (1999). Analysis of Amino Acid Motifs Diagnostic for the sn-Glycerol-3-phosphate Acyltransferase Reaction†. Biochemistry 38, 5764-5771.

Li, Y.G., L. Xu, Y.M. Huang, F. Wang, C. Guo y C.Z. Liu (2011). Microalgal biodiésel in China: Opportunities and challenges. Applied Energy 88, 3432-3437.

Lilly, Jason W., J.E. Maul y D.B. Stern (2002). The *Chlamydomonas reinhardtii* Organellar Genomes Respond Transcriptionally and Post-Transcriptionally to Abiotic Stimuli. The Plant Cell, Vol. 14, 2681–2706.

Liu C., D.W. Xiao, C.L. Shi, X.F. Hu, K.B. Wu, C.Y. Guan y X.H. Xiong (2013). sn-glycerol-3-phosphate acyltransferases (GPATs) in plants. Hereditas 35(12): 1352—1359.

Lodish, H., A. Berk, P. Matsudaira, C.A. Kaiser, M. Krieger, M.P. Scott, L. Zipursky y J. Darnell (2000). Molecular Cell Biology. 5th ed., Panamericana, 549 pp.

Loguercio, C., A. Federico, M. Trappoliere, C. Tuccillo, I. Sio, A. Leva, M. Niosi, M. D'Auria, R. Capasso y C. Blanco (2007). The Effect of a Silybin-Vitamin E-Phospholipid Complex on Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Pilot Study. Digestive Diseases and Sciences 52, 2387-2395.

Manuell, A.L., M.V. Beligni, J.H. Elder, D.T. Siefker, M. Tran, A. Weber, T.L. McDonald y S.P. Mayfield (2007). Robust expression of a bioactive mammalian protein in Chlamydomonas chloroplast. Plant Biotechnology Journal 5, 402-412.

Mañas-Fernández, A., Y. Li-Beisson, D. Alonso y F. García-Maroto (2010). Cloning and molecular characterization of a glycerol-3-phosphate O-acyltransferase (GPAT) gene from Echium (Boraginaceae) involved in the biosynthesis of cutin polyesters. Planta 232, 987-997.

Marr, N., J. Foglia, M. Terebiznik, K. Athenstaedt y V. Zaremberg (2012) Controlling Lipid Fluxes at Glycerol-3-phosphate Acyltransferase Step in Yeast. The Journal Of Biological Chemistry, Vol. 287, No. 13, pp. 10251–10264.

Mata, T.M., A.A Martins y N.S. Caetano (2010). Microalgae for biodiésel production and other applications: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 14, 217-232.

Mayfield, S.P., A.L. Manuell, S. Chen, J. Wu, M. Tran, D. Siefker, M. Muto y J. Marin-Navarro (2007). Chlamydomonas reinhardtii chloroplasts as protein factories. Current Opinion in Biotechnology 18, 126-133.

Merchant, S.S., J. Kropat, B. Liu, J. Shaw y J. Warakanont (2012). TAG, You're it! Chlamydomonas as a reference organism for understanding algal triacylglycerol accumulation. Current Opinion in Biotechnology 23, 352-363.

Merchat S. S, S.E. Prochnik, O. Vallon, E.H. Harris, S.J. Karpowicz, G.B. Witman, A. Terry, A. Salmo, L. Fritz-Laylin, L. Maréchal-Drouard, W.F. Marshall, L. Qu, D.R. Nelson, A.A. Sanderfoot, M.H. Spalding, V.V. Kapitonov, Q. Ren, P. Ferris, E. Lindquist, H. Shapiro, S.M Lucas, J. Grimwood y J. Schmutz (2007) The *Chlamydomonas* Genome Reveals The Evolution Key Animal and Plant Functions. Science 318, 125.

Miao, X. y Q. Wu (2006). Biodiésel production from heterotrophic microalgal oil. Bioresource Technology 97, 841-846.

Misra, N. y P.K. Panda (2013) **I**n Search of Actionable Targets for Agrigenomics and Microalgal Biofuel Production: Sequence-Structural Diversity Studies on Algal and Higher Plants with a Focus on GPAT Protein. OMICS: A Journal of Integrative Biology. April 2013, 17(4): 173-186.

Misra N., P.K. Panda y B.K. Parida (2013). Agrigenomics for Microalgal Biofuel Production: An Overview of Various Bioinformatics Resources and Recent Studies to Link OMICS to Bioenergy and Bioeconomy. OMICS: A Journal of Integrative Biology. -Not available-, ahead of print. doi:10.1089/omi.2013.0025.

Moellering, E.R. y C. Benning (2010). RNA Interference Silencing of a Major Lipid Droplet Protein Affects Lipid Droplet Size in Chlamydomonas reinhardtii. Eukaryotic Cell 9, 97-106.

Muoio, Deborah M., K. Seefeld, L.A. Witters y R.A. Coleman (1999) AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. Biochem. J. *338:* 783±791.

Murata, N. y Y. Tasaka (1997). Glycerol-3-phosphate acyltransferase in plants. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism 1348, 10-16.

Mutanda, T., D. Ramesh, S. Karthikeyan, S. Kumari, A. Anandraj y F. Bux (2011). Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. Bioresource Technology 102, 57-70.

Muto, M., R. Henry y S. Mayfield (2009). Accumulation and processing of a recombinant protein designed as a cleavable fusion to the endogenous Rubisco LSU protein in *Chlamydomonas* chloroplast. BMC Biotechnology 9, 1-11.

Na, C., G. Shangjing, Y. Kun, D. Xinchun y M. Qingwei (2005). Cloning and Expression Analysis of Glycerol-3-phosphate AcyltransferaseGene from Sweet Pepper. Acta *Horticulturae* Sinica 32, 823-827.

Nakamura, Y. y Y. Li-Beisson (2016). Lipids in Plant and Algae Development. Subcellular Biochemistry**,** Springer, pp. 179.

Nelson, D.L., y Cox M.M. 2004. Lehninger, Principles of Biochemystry. 4th ed. H. Freeman & Co., New York, 373 pp.

Nguyen H. M., M. Baudet, S. Cuine, J.M. Adriano, D. Barthe, E. Billon, C. Bruley, F. Beisson,G. Peltier, M. Ferro y Y. Li-Beisson (2011). Proteomic profiling of oil bodies isolated from the unicellular green microalga Chlamydomonas reinhardtii: With focus on proteins involved in lipid metabolism. Proteomics 11, 1-8.

Nishida, I., Y. Tasaka, H. Shiraishi y N. Murata (1993). The gene and the RNA for the precursor to the plastid-located glyceroi-3-phosphate acyltransferase *of Arabidopsis* thaliana. Plant Mololecular Biology 21, 2:267-277.

Niu, Y.F., X. Wang, D.X., Hu, S. Balamurugan, W.D. Li, W.D. Yang, J.S. Liu y H.Y. Li (2016). Molecular characterization of a glycerol‐3‐phosphate acyltransferase reveals key features essential for triacylglycerol production in *Phaeodactylum tricornutum*. Biotechnol Biofuels 9, 60.

Novák, J., J. Bienertová-Vasku, T. Kára y M. Novák (2014). MicroRNAs Involved in the Lipid Metabolism and Their Possible Implications for Atherosclerosis Development and Treatment. Mediators of Inflammation 2014, 14.

Ozawa, S., J. Nield, A. Terao, E.J. Stauber, M. Hippler, H. Koike, J.D. Rochaix e Y. Takahashi (2009) Biochemical and Structural Studies of the Large Ycf4-Photosystem I Assembly Complex of the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii. The Plant Cell* 21:2424-2442.

Osuna-Rosales, L.E. (2013). Tesis de Maestria, Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.

Park, W.K., G. Yoo, M. Moon, C. Kim, Y.E. Choi y J.W. Yang (2013). Phytohormone Supplementation Significantly Increases Growth of Chlamydomonas reinhardtii Cultivated for Biodiésel Production. Appl Biochem Biotechnol 171, 1128-1142.

Pillai, M.G., M. Certik, T. Nakahara y Y. Kamisaka (1998). Characterization of triacylglycerol biosynthesis in subcellular fractions of an oleaginous fungus, Mortierella ramanniana var. angulispora. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Lipids and Lipid Metabolism 1393, 128-136.

QIAGEN (2001). The Bench Guide. Protocols, hints, and tips for molecular biology labs. Disponible en: http.//www.qiagen.com/literature/benchguide/default.aspx. Acceso: 300113.

Radakovits, R., R.E. Jinkerson, A. Darzins y M.C. Posewitz (2010). Genetic Engineering of Algae for Enhanced Biofuel Production. Eukaryotic Cell 9, 486-501.

Rasala B.A., P.A. Lee, Z. Shen, S.P. Briggs, M. Mendez y S.P. Mayfield (2012). Robust Expression and Secretion of Xylanase1 in *Chlamydomonas reinhardtii* by Fusion to a Selection Gene and Processing with the FMDV 2A Peptide. PLoS ONE 7(8): e43349. doi:10.1371/journal.pone.0043349.

Riekhof, W.R., J. Wu, J.L. Jones y D.R. Voelker (2007). Identification and Characterization of the Major Lysophosphatidylethanolamine Acyltransferase in Saccharomyces cerevisiae. Journal of Biological Chemistry 282, 28344-28352.

Rivera-Solís, R.A., S. Peraza-Echeverría y V.A. Herrera-Valencia (2011). La microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*: nueva alternativa para la producción de proteínas recombinantes de interés médico. Comunicados libres, revista Ciencia, Oct.-Dic. pp. 1-9.

Rodolfi, L., G. Chini Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini y M.R. Tredici (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. Biotechnology and Bioengineering 102, 100-112.

Ruiz-López, N., R. Garcés, J.L. Harwood y E. Martínez-Force (2010). Characterization and partial purification of acyl-CoA:glycerol 3-phosphate acyltransferase from sunflower (Helianthus annuus L.) developing seeds. Plant Physiology and Biochemistry 48, 73-80.

Schenk, P., S. Thomas-Hall, E. Stephens, U. Marx, J. Mussgnug, C. Posten, O. Kruse y B. Hankamer (2008). Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiésel Production. BioEnergy Research 1, 20-43.

Scott, S.A., M.P. Davey, J.S. Dennis, I. Horst, C.J. Howe, D.J. Lea-Smith y A.G. Smith (2010). Biodiésel from algae: challenges and prospects. Current Opinion in Biotechnology 21, 277-286.

Schroda, M. D. Blöcker y C.F. Beck (2000). The *HSP70A* promoter as a tool for the improved expression of transgénes in *Chlamydomonas*. The Plant Journal. 21(2), 121-131.

Sheehan J., T. Dunahay, J. Benemann y P.G. Roessler (1998). US Department of Energy"s Office of Fuels Development. 1998.

Shiromoto, Y., S. Kuramochi-Miyagawa, A. Daiba, S. Chuma, A. Katanaya, A. Katsumata, K. Nishimura, M. Ohtaka, M. Nakanishi, T. Nakamura, K. Yoshinaga, N. Asada, S. Nakamura, T. Yasunaga, K. Kojima-Kita, D. Itou, T. Kimura y T. Nakano (2013). GPAT2; a mitochondrial outer membrane protein, in piRNA biogenesis in germline stem cells. RNA 19, 803-810.

Shockey, J., A. Regmi, K. Cotton, N. Adhikari, J. Browse y P.D. Bates (2016). Identification of Arabidopsis GPAT9 (At5g60620) as an Essential Gene Involved in Triacylglycerol Biosynthesis. Plant Physiol. Vol. 170, pp. 163–179

Siaut, M., S. Cuine, C. Cagnon, B. Fessler, M. Nguyen, P. Carrier, A. Beyly, F. Beisson, C. Triantaphylides, Y. Li-Beisson y G. Peltier (2011). Oil accumulation in the model green alga Chlamydomonas reinhardtii: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. BMC Biotechnology 11, 7.

Singh, A., P.S. Nigam y J.D. Murphy (2011). Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. Bioresource Technology 102, 10-16.

Singer,S.D., G. Chen1, E. Mietkiewska, P. Tomasi, K. Jayawardhane, J.M. Dyer y R.J. Weselake (2016). Arabidopsis GPAT9 contributes to synthesis of intracellular glycerolipids but not surface lipids. Journal of Experimental Botany, Vol. 67, No. 15 pp. 4627‑4638.

Song, Q.X.,Q.T. Li, Y.F. Liu, F.X. Zhang, B. Ma, W.K. Zhang, W.Q. Man, W.G. Du, G.D. Wang, S.Y. Chen y J.S. Zhang (2013). Soybean GmbZIP123 gene enhances lipid content in the seeds of transgénic Arabidopsis plants. Journal of Experimental Botany 64, 4329-4341.

Snyder, C.L., O.P. Yurchenko, R.M.P. Siloto, X. Chen, Q. Liu, E. Mietkiewska y R.J. Weselake (2009). Acyltransferase action in the modification of seed oil biosynthesis. New Biotechnology 26, 11-16.

Sun, C., Y.Z. Cao y A.H.C. Huang (1988). Acyl Coenzyme A Preference of the Glycerol Phosphate Pathway in the Microsomes from the Maturing Seeds of Palm, Maize, and Rapeseed. Plant Physiology 88, 56-60.

Tatsuzawa, H., E. Takizawa, M. Wada y Y. Yamamoto (1996). Fatty acid and lipid composition of the acidophilic green alga *Chlamydomonas sp.*1. Journal of Phycology 32, 598-601.

Terauchi, A., G. Peers, M. Kobayashi, K. Niyogi y S. Merchant (2010). Trophic status of *Chlamydomonas reinhardtii* influences the impact of iron deficiency on photosynthesis. Photosynthesis Research 105, 39-49.

Turnbull, A.P., J.B. Rafferty, S.E. Sedelnikova, A.R. Slabas, T.P. Schierer, J.T.M. Kroon, J.W. Simon, T. Fawcett, I. Nishida, N. Murata y D.W. Rice (2001). Analysis of the Structure, Substrate Specificity, and Mechanism of Squash Glycerol-3-Phosphate (1)-Acyltransferase. Structure 9, 347-353.

Vain, P. (2007). Thirty years of plant transformation technology development. Plant Biotechnology Journal 5, 221-229.

Wagner, M., K. Hoppe, T. Czabany, M. Heilmann, G. Daum, I. Feussner y M. Fulda (2010). Identification and characterization of an acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2) gene from the microalga O. tauri. Plant Physiology and Biochemistry 48, 407-416.

Wang, Z.T., N. Ullrich, S. Joo, S. Waffenschmidt y U. Goodenough (2009). Algal Lipid Bodies: Stress Induction, Purification, and Biochemical Characterization in Wild-Type and Starchless *Chlamydomonas reinhardti.* Eukaryotic Cell, Vol. 8, No. 12, p. 1856–1868.

Wendel, A.A., T.M. Lewin y R.A. Coleman (2009). Glycerol-3-phosphate acyltransferases: Rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids 1791, 501-506.

Widjaja, A., C.C. Chien y Y.H. Ju (2009). Study of increasing lipid production from fresh water microalgae Chlorella vulgaris. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers 40,13-20.

Wilkison, W.O. y R.M. Bell (1997). *sn*-Glycerol-3-phosphate acyltransferase from *Escherichia coli.* Biochimica et Biophysica Acta 1348, 3–9.

Wydysh, E.A., A. Vadlamudi, S.M. Medghalchi y C.A. Townsend (2010). Design, synthesis, and biological evaluation of conformationally constrained glycerol 3-phosphate acyltransferase inhibitors. Bioorganic &amp, Medicinal Chemistry 18, 6470-6479.

Xiong, W., X. Li, J. Xiang y Q. Wu (2008). High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides*, in bioreactor for microbio-diesel production. Applied Microbiology and Biotechnology 78, 29-36.

Xu, H., X. Miao y Q. Wu (2006). High quality biodiésel production from a microalga Chlorella protothecoides by heterotrophic growth in fermenters. Journal of Biotechnology 126, 499-507.

Xu, X., J.S. So, J.G. Park y A.H. Lee (2013). Transcriptional Control of Hepatic Lipid Metabolism by SREBP and ChREBP. Semin Liver Dis 33, 301-311.

Xu, J., Z. Zheng y J. Zou (2009). A membrane-bound glycerol-3-phosphate acyltransferase from *Thalassiosira pseudonana* regulates acyl composition of glycerolipids. Botany 87: 544–551.

Yan, K., N. Chen, Y.Y. Qu, X.C. Dong, Q.W. Meng y S.J. Zhao (2008). Overexpression of Sweet Pepper Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase Gene Enhanced Thermotolerance of Photosynthetic Apparatus in Transgénic Tobacco. Journal of Integrative Plant Biology 50, 613-621.

Yang W., J.P. Simpson, Y. Li-Beisson, F. Beisson, M. Pollard y J.B. Ohlrogge (2012). A Land-Plant-Specific Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase Family in Arabidopsis: Substrate Specificity, sn-2 Preference, and Evolution. Plant Physiology 160: 638-652.

Yokoi, S., S.I Higashi, S. Kishitani, N. Murata y K. Toriyama (1998). Introduction of the cDNA for shape Arabidopsis glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) confers unsaturation of fatty acids and chilling tolerance of photosynthesis on rice. Molecular Breeding 4, 269-275.

Zheng, Z., Q. Xia, M. Dauk, W. Shen, G. Selvaraj y J. Zou (2003). Arabidopsis AtGPAT1; a Member of the Membrane-Bound Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase Gene Family, Is Essential for Tapetum Differentiation and Male Fertility. The Plant Cell Online 15, 1872-1887.

Zheng, Z. y J. Zou (2001). The Initial Step of the Glycerolipid Pathway. Journal of Biological Chemistry 276, 41710-41716.

Zhu, S.Q., H. Zhao, R. Zhou, B.H. Ji y X.Y. Dan (2009). Substrate Selectivity of Glycerol-3-phosphate Acyl Transferase in Rice. Journal of Integrative Plant Biology 51, 1040-1049.

Zou, J., Z. Zheng y J. Xu (2009). Algal Glycerol 3-phosphate acyltransferase. WO/2009/120366.

Zufferey, R. y C.B. Mamoun (2005). The initial step of glycerolipid metabolism in Leishmania major promastigotes involves a single glycerol-3-phosphate acyltransferase enzyme important for the synthesis of triacylglycerol but not essential for virulence. Molecular Microbiology 56, 800-810.

ANEXOS

Anexo 1

A) Preparación de medio TAP (Tris-Acetato-Fosfato) (Harris, 1989)

Disoluciones stock	Para 1 litro
1M Tris base	20 ml
Amortiguador de Fosfato II	1 ml
Metales traza de Hutner	1 ml
Disolución A	10 ml
Ácido acético glacial	1 ml
Ajustar el pH a 7.0	

Preparación de las disoluciones stock

Amortiguador de Fosfato II	
Componentes	Para 100 ml
K_2HPO_4	10.8 g
KH_2PO_4	5.6 g

Disolución A	
Componentes	Para 500 ml
NH_4Cl	20 g
$MgSO_4.7H_2O$	5 g
$CaCl_2.2H_2O$	2.5 g

Disolución de metales traza de Hutner	
Componentes	Para 500 ml
H_3BO_3	5.7 g
$ZnSO_4.7H_2O$	11 g
$MnCl_2.4H_2O$	2.53 g
$FeSO_4.7H_2O$	2.495 g
$CoCl_2.6H_2O$	0.805 g
$CuSO_4.5H_2O$	0.785 g
$Mo_7O_{24}(NH_4)_6.H_2O$	0.5 g

Para medio TAP semisólido se agregan 15 g de agar bacteriológico (Sigma) por cada 1000 mL de medio, después de ajusta el pH a 7; y se esteriliza por autoclave a 121°C y 15 lb/cm^2 durante 15 minutos.

B) Preparación de medio YPD

Para preparar medio semisólido, se pesan 65 g de YPD Agar (Sigma) por litro de medio semisólido. Se disuelve parte del medio en un poco de agua destilada, una vez disuelto, se afora hasta un volumen deseado. Se esteriliza en autoclave a 121°C y 15 lb/cm^2. Una vez estéril el medio se dosifica 25 ml por plato de Petri.

Para preparar medio líquido se pesan 50 g de YPD Broth (Sigma) por litro de medio líquido. Se disuelve parte del medio en aproximadamente tres cuartos de agua destilada, una vez disuelto, se afora al volumen deseado. Se esteriliza en autoclave a 121°C y 15 lb/cm^2 y se dosifica según la cantidad deseada.

Para el medio deficiente (SD/-Leu), se pesan 6.7 g de Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids (Sigma), 1.62 g de Yeast Synthetic Drop-out médium Supplements (Sigma), 20 g de Glucosa (Sigma) y 20 g de Agar (si es medio sólido) por litro de medio. Se disuelve en agua destilada, una vez disuelto se esteriliza en autoclave a 121°C y 15 lb/cm^2 y se dosifica según la cantidad deseada.

Anexo 2

Preparación de las disoluciones para la extracción de ADN y ARN.

A) Preparación de Yoduro de Lugol.

KI (Yoduro de Potasio)……2.0 g

Cristales de Yodo……..1.0 g

Preparación:

1. Se pesó el Yoduro de Potasio y se disolvió en aproximadamente 35-40 ml de agua destilada.

En campana de extracción:

2. Los cristales de yodo se pesaron utilizando un vaso de precipitado de 250 mL previamente forrado con papel aluminio.

3. Los cristales de yodo se disolvieron en aproximadamente 40 ml de agua destilada utilizando una parrilla de agitación.

4. Cuando la mayor parte de los cristales se disolvieron, se agregó la disolución de KI. Se agitó hasta disolver y se aforó posteriormente hasta un volumen de 100 mL con agua destilada.

5. Se mantuvo la disolución en agitación durante toda la noche. La disolución se filtró finalmente utilizando un embudo de cristal y papel filtro.

La disolución se almacenó a temperatura ambiente en un frasco ámbar.

B) Cloroformo: Alcohol Isoamílico 24:1

48 ml de cloroformo

2 ml alcohol isoamílico

En campana de extracción se tomaron 48 ml de cloroformo y se le añadieron 2 ml de alcohol isoamílico para obtener una disolución con 50 ml de volumen final.

C) Etanol al 70%

Para preparar 100 ml de una disolución de etanol (grado biología molecular) al 70% se tomaron 70 ml etanol y se añadió 30 ml de H_2O ultra pura, se mezcló y se guardó a temperatura ambiente.

D) Preparación de Agarosa 1.2%

Para la preparación de la agarosa al 1.2%, solo es necesario pesar 1.2 g de agarosa (Invitrogen) por cada 100 mL de TAE 1X, y adicionando 5 µL de bromuro de etidio por cada 30 mL agarosa disuelta.

Anexo 3

Extracción de ácidos nucléicos

A) Extracción de ADNg por medio del protocolo comercial de Illustra Nucleon Phytopure Genomic DNA Extraction Kit (GE Healthcare) a partir de 40 millones de cel.

Para tener la concentración deseada se recolectó 1 mL de un cultivo de *C. reinhardtii* de 7 días (saliendo de su fase logarítmica) para hacer el conteo celular y los 49 mL restantes se centrifugaron a 3220 g durante 5 minutos a 4°C, el sobrenadante se desechó y se resuspendió la pastilla en un volumen de medio TAP suficiente como para tener la concentración deseada de células por mililitro.

Del cultivo re suspendido se tomó 1 mL en un tubo eppendorf y se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos, desechando el sobrenadante y obteniendo una pastilla de aproximadamente 0.1 mL, congelando la pastilla inmediatamente en nitrógeno líquido, para posteriormente empezar el proceso de extracción o almacenarlas a -80°C hasta su uso.

La muestra de células congeladas en Nitrógeno líquido, se le adicionó 600 µL del reactivo 1 + 10 µL de β-mercaptoetanol (Sigma). Agitando por vórtex durante 3 minutos. Posteriormente se le adicionó a la mezcla 200 µL de reactivo 2; mezclando por inmersión varias veces hasta obtener una mezcla homogénea. Se incubaron las muestras a 65°C durante 10 minutos, agitando manualmente la disolución cada 1.5-2 minutos, posteriormente incubando en hielo durante 20 minutos. Terminada la incubación en hielo se le adicionó 500 µL de cloroformo (-20°C) y 100 µL de la suspensión de la resina (Nucleon Phytopure resin®), mezclando por inmersión varias veces y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, agitando manualmente para evitar la sedimentación de la resina (aproximadamente cada 1.5-2 minutos).

Una vez finalizada la incubación se centrifugó las muestras a 1300 rcf por 10 minutos y al finalizar se transfirió la fase inorgánica a un tubo nuevo estéril, esto sin perturbar la capa suspendida de la resina nucleon, una vez recuperada la fase inorgánica se le adicionó un volumen igual de isopropanol frío y gentilmente se agitó por inmersión la mezcla varias veces

(~10 veces). Posteriormente se centrifugó la mezcla a 12000 rpm por 5 minutos, para precipitar el ADN, se descartó el sobrenadante y se le adicionó 800 µL de etanol al 70% frío, volviendo a centrifugar a 12000 rpm por 2 minutos.

Se descartó todo el etanol de la muestra y se dejó secar el pellet (~15 minutos), una vez seco se le adicionó 40 µL de 10 mM Tris-HCl pH 7.5 y se incubó a 65°C por 10 minutos, para facilitar la resuspención del pellet se incubó en hielo por 3 minutos. Una vez terminada la incubación se pasó el sobrenadante, agitando gentilmente 2 veces por pipeteo, a un tubo nuevo, al cual se le adicionó 1 µL de RNAsa A y se incubó a 37°C por 30 minutos, para eliminar el RNA. Almacenando la muestra a 4°C hasta su uso.

Nota: Asegurarse que la resina se encuentre bien resuspendida con ayuda de un vórtex antes de su uso. Es importante asegurarse que el contenedor de la resina contenga la mima cantidad de esta con el amortiguador. Dejar que la resina precipite y después adicionarle el amortiguador TE estéril si es necesario (preparar el amortiguador TE con agua libre de DNAsa-RNAsa).

B) Extracción de ARN por medio del protocolo basado en el reactivo de Trizol (Invitrogen), con una concentración celular de 100 millones de cel/mL.

Para tener la concentración deseada se recolectó 1 mL de un cultivo de *C. reinhardtii* de 7 días (saliendo de su fase logarítmica) para hacer el conteo celular y los 49 mL restantes se centrifugaron a 3220 g durante 5 minutos a 4°C, el sobrenadante se desechó y se re suspendió la pastilla en un volumen de medio TAP suficiente como para tener la concentración deseada de células por mililitro.

Del cultivo re-suspendido se tomó 1 mL en un tubo eppendorf y se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos, desechando el sobrenadante y obteniendo una pastilla de aproximadamente 0.1 mL, congelando la pastilla inmediatamente en nitrógeno líquido, para posteriormente empezar el proceso de extracción o almacenarlas a -80°C hasta su uso.

Las muestras se tomaron directamente del nitrógeno líquido para la extracción, en dado caso que se encuentren almacenadas a -80°C, se transportan en N_2 líquido y se mantienen en él hasta el momento de empezar el proceso de extracción.

Tomando las muestras del Nitrógeno líquido y se le adicionó a cada muestra 1000 µL del reactivo TRIZOL (Invitrogen) mezclando por pipeteo hasta desprender completamente el pellet de células y que se obtenga una mezcla homogénea, colocándolas posteriormente en hielo mientras se terminan de re-suspender las demás muestras o se le da el siguiente tratamiento. Posteriormente se le dio a cada muestra los diferentes tratamientos antes mencionados. Se centrifugaron las muestras a 10,700 rpm por 10 minutos, una vez que se terminaron de centrifugar las muestras, se recuperó el sobrenadante evitando tocar el pellet formado en el fondo del tubo, incubando posteriormente a 20°C por 5 minutos, una vez terminada la incubación se le adicionó a cada muestra 200 µL de cloroformo/ alcohol isoamílico (24:1), mezclando las muestras por medio de vórtex por aproximadamente 30 segundos seguido de una incubación a 20°C por 3 minutos.

Se centrifugaron las muestras a 10,700 rpm por 15 minutos, de donde se recuperó el sobrenadante, el cual fue transferido a un tubo nuevo. Posteriormente se le adicionó al sobrenadante recuperado un volumen igual de isopropanol, agitando gentilmente por inmersión unas 20 veces, las cuales fueron incubadas a 20°C por 10 minutos, una vez terminada la incubación, las muestras fueron centrifugadas a 10,700 rpm por 10 minutos. Se desechó el sobrenadante de las muestras procurando dejar el pellet lo más seco posible, después de les adicionó 1000 µL de etanol al 70%, las muestras fueron agitadas gentilmente por inmersión unas 3 veces y centrifugadas a 8400 rpm por 5 minutos.

Se desechó el sobrenadante de las muestras, procurando dejar la pastilla lo más seca posible, para secarla completamente a temperatura ambiente, en la campana de flujo laminar, por aproximadamente 10 minutos. Una vez seca la pastilla, fue re-suspendida en 39 µL de agua ultra pura. Almacenando la muestra a -20°C para su uso inmediato y a -80°C para almacenamiento prolongado.

Anexo 4

A) QIAquick Gel Extraction (QIAGEN,C.A)

El amplicón esperado fue cortado del gel con ayuda de un escalpelo, con la menor exposición al UV, colocándolas en un tubo eppendorf de 1.5 mL. El tubo se pesó y se adicionó el volumen necesario del amortiguador QG, el tubo se incubó a 50°C por 10 minutos agitándose por vórtex (Labnet, No. de catálogo C1301) cada 3 minutos, una vez que disuelto el gel, se le adicionó un volumen calculado de isopropanol, homogenizándose por inversión (1 vez). Posteriormente, se transfirió un volumen de 800µL de muestra una columna y se centrifugó por 1 minutos a 13500 rpm. Este paso se repitió hasta concentrar toda la muestra. Una vez concentrada la muestra, se le adicionó 750 µL del amortiguador PE y se incubó a temperatura ambiente durante 6 minutos. Después se centrifugó durante 1 minuto a 13500 rpm desechando el sobrenadante y centrifugando en seco durante 3 minutos a 13500 rpm. Se colocó la columna en un tubo eppendorf estéril y se le agregó 40 µL del amortiguador Tris HCl pH 7.5 10mM incubando después a temperatura ambiente durante 3 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 13500 rpm durante 1 minuto y el sobrenadante se almacenó -20ºC.

Anexo 5

1. Preparación de disoluciones para el cultivo de bacterias.

A) Medio SOC

Para 100 mL de medio SOC

2.0 g Bacto-tryptone

0.5 g Bacto extracto de levadura

1 mL 1 M NaCl

0.25 mL 1 M KCl

1 ml 2 mM Mg^{2+} (esta disolución es esterilizada por filtración)

1 ml 2 M glucosa (esta disolución es esterilizada por filtración)

Adicionar bacto-tryptone, bacto extracto de levadura, NaCl y KCl a 97 ml de agua destilada. Agitar para disolver, esterilizar y enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente adicionar 2 M Mg^{2+} de la disolución stock y 2 M de glucosa, cada uno hasta una concentración de 20 mM. Llevar a 100 ml con agua estéril. Filtrar el medio completo con un filtro millipore de 0.2 µm. El medio tiene un pH final de 7.0.

B) Medio LB

Para preparar medio semisólido, se pesan 40 g de Luria Agar (Sigma) por litro de medio semisólido. Se disuelve parte del medio en un poco de agua destilada, una vez disuelto, se afora hasta un volumen deseado. Se esteriliza en autoclave a 121°C y 15 lb/cm^2

Una vez estéril el medio, se lleva a una temperatura de 50°C en un baño de agua (baño María) y se adiciona el antibiótico ampicilina (concentración utilizada en el medio 100 mg/L) y se mezcla por agitación gentil. Se dosifican 25 ml por plato de Petri.

Para preparar medio líquido se pesan 25 g de Luria Broth (Sigma) por litro de medio líquido. Se disuelve parte del medio en aproximadamente tres cuartos de agua destilada, una vez disuelto, se afora al volumen deseado. Se esteriliza en autoclave a 121°C y 15 lb/cm^2 y se dosifica según la cantidad deseada, una vez que el medio llega a una temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) se le agrega el antibiótico ampicilina (a una concentración de 100 mg/L).

2. Protocolo para la preparación de Células Competentes según Inoue y colaboradores (1990).

1. Se tomó una alícuota de células competentes de la cepa stock DH10B stock almacenado en el ultra congelador (-80 ° C). Una vez descongeladas las células y con ayuda del asa de siembra se tomó una muestra y se plaqueó por estrías en medio LB semisólido + 100 mg/l de estreptomicina. Las cajas Petri con los cultivos se incubaron a 37°C toda la noche (aprox. 16 horas).

2. Después de la incubación, las cajas de Petri se almacenaron en refrigeración hasta el momento del picado de la colonia. En la tarde se picó una colonia, con ayuda de un palillo de dientes, de la caja con el cultivo y se depositó en 5 ml de medio LB líquido + 100 mg/l de estreptomicina. Se incubó a 37°C durante toda la noche (aprox. 16 horas) con agitación de 225 rpm.

3. Posterior a la incubación se sacó el tubo Falcón de la incubadora y se mantuvo a temperatura ambiente (25°C) hasta su uso. Se tomaron diferentes cantidades de inoculo del cultivo bacteriano y se depositaron en matraces de un litro con 250 mL de medio líquido SOB. Los matraces se incubaron a 18°C durante aproximadamente 16 horas o hasta alcanzar la densidad óptica deseada.

4. Una vez que el cultivo bacteriano alcanzó la Densidad óptica de 0.6; se transportó (en hielo) a la campana de flujo laminar y se dividió en porciones de 50 ml utilizando tubos

Falcón (Los tubos Falcón fueron previamente enfriados en hielo). Todas las manipulaciones de los tubos Falcón con los cultivos bacterianos deben realizarse en frío (utilizando hielo)

5. Los tubos Falcón de incubaron en hielo por 10 minutos.

6. Se centrifugó a 2500 rcf por 10 minutos a 4°C.

7. En campana de flujo laminar, se desechó el sobrenadante y se dejó escurrir las gotas restantes sobre un papel estéril. Este proceso se realizó tubo por tubo teniendo cuidado de mantener a éstos en hielo todo el tiempo.

8. En el cuarto frío (0°C), se agregó a cada Falcón 16 ml de disolución fría de amortiguador de transformación (TB). El pellet se resuspendió subiendo y bajando gentilmente el líquido con la punta de la micro pipeta.

9. Los tubos se incubaron en hielo por 10 minutos y se transportaron de ésta manera a la centrífuga.

10. Se centrifugó a 2500 rcf por 10 minutos a 4°C.

11. En campana de flujo laminar, se desechó el sobrenadante y se escurrieron las gotas restantes sobre un papel estéril.

12. En el cuarto frío, se agregó a cada Falcón 4 ml de disolución fría de TB. Se resuspendió el pellet subiendo y bajando gentilmente el líquido con la punta de la micro pipeta.

13. Se adicionó a cada Falcón 280 µL de DMSO (para tener una concentración final de 7%). La disolución de DMSO se mantuvo a temperatura ambiente hasta el momento de utilizarse ya que tiende a congelarse.

14. Se incubaron los tubos Falcón en hielo por 10 minutos.

15. Posteriormente se hicieron alícuotas de las células competentes utilizando tubos eppendorf de 1.5 mL previamente enfriados. Hechas las alícuotas, se congelaron en Nitrógeno líquido antes de su almacenamiento a -80°C en el ultra congelador

Anexo 6

Cuantificación de proteínas totales por medio de protocolo de Bradford (1976).

La cuantificación de proteínas se realiza de acuerdo al método de Bradford (1976), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (Bio-Rad). Se realiza la curva de calibración en el cual se utiliza albumina sérica bovina (BSA) en un rango de 0 a 10 mg/mL. Se preparan tubos de ensaye de 3 mL con las cantidades de AGUA DESIONIZADA y BSA como se muestra en la Tabla. Se preparan 3 tubos (por triplicado) para cada punto de la curva. Al momento de adicionar el reactivo de Bradford incubar por 5 minutos hasta que muestre una coloración azul y posteriormente cuantificar.

NOTA: Una vez adicionado el reactivo de Bradford se tiene sólo 1 hora para hacer las mediciones espectrofotométricas o si no la coloración no corresponderá con la cantidad de proteína adicionada.

Cuadro de concentraciones de BSA para cuantificación de proteínas.

Puntos de la curva (mg de muestra)	H_2O (µL)	H_2O (µL)	BSA (µL)	Reactivo de Bradford (µL)	Volumen Tota (mL)
0 *	**800**	_	_	**200**	**1**
2	**790**	**8**	**2**	**200**	**1**
4	**790**	**6**	**4**	**200**	**1**
6	**790**	**4**	**6**	**200**	**1**
8	**790**	**2**	**8**	**200**	**1**
10	**790**	_	**10**	**200**	**1**

**Blanco (sin BSA)*

NOTA: Se adiciona el reactivo de Bradford a todas las muestras hasta el final y todas las muestras y el reactivo se manejan en hielo.

Una vez obtenida la curva de calibración se procedió a la preparación de las muestras para su cuantificación tomando 795 µL de agua y 5 µL de cada una de las muestras (cada muestra se realiza su medición por triplicado), adicionando 200 µL del reactivo de Bradford para

obtener un volumen final de 1 mL. De deja incubar por 5 minutos hasta que muestre una coloración azul y posteriormente se cuantifican las muestras.

Anexo 7

Cuadro resultados de los rendimientos de las clonas transgrnicas obtenidas.

Clona	cel/mL	Biomasa seca (mg)	% Lípidos por biomasa seca	% TAGs por biomasa seca	% TAGs por lípido total
RE 2	8075000	35.7	50.98	32.83	64.40
RE 2	7775000	35.5	43.94	32.87	74.81
RE 2	9100000	35.7	47.62	30.62	64.29
RE 11	8775000	35.4	46.05	33.94	73.72
RE 11	9075000	35.7	45.10	32.18	71.37
RE 11	6775000	34.6	45.38	29.93	65.96
RE 22	8475000	36.6	43.72	28.52	65.25
RE 22	8225000	34.1	48.39	34.78	71.88
RE 22	8450000	35.7	41.74	33.05	79.18
RE 23	11150000	36.4	48.63	31.28	64.33
RE 23	10500000	37.1	48.79	33.13	67.90
RE 23	10100000	36.2	48.34	32.71	67.66
RE 31	9800000	36.4	44.54	31.28	69.85
RE 31	9450000	36.6	44.57	30.53	73.52
RE 31	7800000	36.8	47.06	28.99	63.51
RE 35	10100000	35.9	44.23	31.36	69.93
RE 35	8175000	36.4	47.17	32.54	67.69
RE 35	8075000	36.9	48.34	33.69	71.03
RE 41	11950000	35.4	44.51	39.37	86.03
RE 41	13000000	35.9	51.37	31.01	59.22
RE 41	10275000	35.9	53.80	36.49	66.16

RE 45	10775000	35.3	48.47	33.25	67.46
RE 45	12600000	34.5	43.96	37.25	80.31
RE 45	12878000	34	42.01	47.09	96.84
RE 49	9850000	32.9	46.33	28.74	57.66
RE 49	12200000	33.7	49.30	37.05	70.54
RE 49	9825000	33	49.30	34.55	64.41
CLA 2	12300000	32.1	47.31	23.43	45.03
CLA 2	9525000	32.4	47.83	10.99	21.58
CLA 2	8750000	33	49.41	16.06	31.55
CLA 10	12225000	35.8	50.46	19.86	42.83
CLA 10	12175000	36.7	56.08	19.28	37.43
CLA 10	10500000	36.2	53.94	17.35	35.28
CLA 20	7625000	34.2	51.09	16.49	34.39
CLA 20	8000000	33.2	48.46	20.72	43.82
CLA 20	9500000	31.8	43.64	23.43	51.74
VV	8175000	33.7	38.55	34.46	84.16
VV	7875000	33.4	38.15	32.90	78.50
VV	5475000	33.5	37.85	33.16	81.09
Cs	7825000	36	48.04	36.50	82.64
Cs	9100000	36.6	50.30	39.63	86.86
Cs	10250000	33.9	42.66	43.57	97.81