



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
Posgrado en Ciencias Biológicas

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FUNCIONAL
DE LOS GENES CrGPDH2 Y CrGPDH3 DE LA
MICROALGA VERDE Chlamydomonas reinhardtii**

**Tesis que presenta
MELISSA LESSEN CASAIS MOLINA**

**En opción al título de
DOCTOR EN CIENCIAS
(Ciencias Biológicas: Opción en Biotecnología)**

**Mérida, Yucatán, México
Enero de 2016**



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "Caracterización molecular y funcional de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*" 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, dentro de la Opción Doctorado después de Maestría, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Manuel", is written over a horizontal line.

Dr. Manuel Martínez Estevez

Director de Docencia

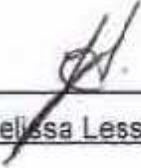
Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México; a 10 de Noviembre de 2015

Mérida, Yucatán, México a 11 de Noviembre de 2015

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 registrarán 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: Melissa Lessen Casais Molina

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento a mi asesora de tesis la Dra. Virginia A. Herrera Valencia, por todo el apoyo tanto académico como personal que me brindó desde la maestría y ahora en el doctorado, así como por sus consejos, comentarios y sugerencias los cuales siempre me fueron de gran ayuda y fueron muy valiosos para mi formación así como para el desarrollo de este trabajo de tesis.

Agradezco al Dr. Santy Peraza Echeverria, ya que, a pesar de no ser mi asesor de tesis, formó una parte importante para el desarrollo de este trabajo de tesis y todos sus comentarios, sugerencias y aportes siempre me fueron de gran ayuda.

A la Dra. Virginia A. Herrera Valencia, Dr. Santy Peraza Echeverria y la Dra. Ileana Echevarría Machado por sus contribuciones y sugerencias, así como por todo el tiempo, paciencia y apoyo brindado para la realización y revisión del artículo de doctorado, todos ustedes formaron una parte muy importante de mi formación de doctorado y por eso les doy las gracias.

Quiero agradecer a mi comité tutorial integrado por la Dra. Virginia A. Herrera Valencia, Dr. Santy Peraza Echeverría, Dra. Luisa López Ochoa y Dr. Octavio Martínez de la Vega por el apoyo brindado, sus valiosos comentarios, sugerencias y aportes durante el desarrollo de este trabajo de tesis.

A mi comité revisor integrado por la Dra. Virginia A. Herrera Valencia, Dr. Santy Peraza Echeverria, Dra. Ileana Echevarría Machado, Dr. Octavio Martínez de la Vega, Dr. Jorge M. Santamaría Fernández, Dr. Luis A. Sáenz Carbonell y Dr. Sergio R. Peraza Sánchez por su apoyo para la revisión de este trabajo de tesis.

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

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca No. 228280 otorgada para los estudios de doctorado, así como al financiamiento del proyecto de ciencia básica No. 169217 otorgado para la realización de este proyecto.

Al laboratorio de “Biotecnología de Microalgas y Cultivos Tropicales” de la Unidad de Biotecnología por las instalaciones brindadas para el desarrollo de esta tesis. A la Unidad de Biotecnología y la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), por las instalaciones y apoyo logístico brindadas para el desarrollo de esta tesis.

A la Q.B.A. Ileana C. Borges Argáez y a la M. en C. Mildred Carrillo Pech por el apoyo técnico brindado a lo largo del desarrollo de esta tesis.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de “Biotecnología de Microalgas y Cultivos Tropicales”: Patricia, Rodrigo, Miguel Ángel, Shirley, Ángeles, Daniela, Maru, Any, Iván, Merly, Alejandra, Ernesto e Ileana por todos los momentos compartidos desde la maestría y ahora en el doctorado, así como por el gran apoyo moral, personal y académico que me han brindado durante todos estos años.

Quiero agradecer a toda mi familia: mi mamá Azurena Molina, mi papá José A. Casais, mi esposo Josué Santiago, mis hermanos Alan y Danahé, mi sobrina Alexandra y mi cuñado Alejandro ya que todo trabajo de investigación es también fruto del reconocimiento y del apoyo vital de aquellas personas que nos aman, sin el cual no tendríamos la fuerza y energía que nos anima día a día a crecer como personas y como profesionales. Sin su apoyo este trabajo nunca se habría escrito y, por eso, este trabajo es también el suyo.

A mi esposo Josué por todo el amor y apoyo que me has brindado, eres mi mejor amigo y confidente...Gracias por motivarme a siempre dar lo mejor de mí...Te amo.

Agradezco a todos mis amigos, y en especial a Isaura, Patricia, Rodrigo y Miguel Ángel quienes siempre me apoyaron y me brindaron su paciencia, comprensión y solidaridad en momentos difíciles y de felicidad durante la maestría y ahora en el doctorado. ¡Gracias por todo su cariño y amistad!

Dedico esta tesis a mi madre Azurena Molina Molas. Gracias por ser mi mejor amiga y estar a mi lado siempre para motivarme a seguir adelante con mis metas aún a pesar de las dificultades que se me presentan o incluso de mí misma. Quiero darte las gracias por todo el amor incondicional y apoyo que siempre me has brindado....te amo.

PRODUCTOS ACADÉMICOS DERIVADOS DE ESTA TESIS DOCTORAL

ARTÍCULOS PUBLICADOS EN REVISTAS INDEXADAS

- 2015** Casais-Molina, M.L., S. Peraza-Echeverría, I. Echevarría-Machado, V.A. Herrera-Valencia (2015). Expression of *Chlamydomonas reinhardtii* CrGPDH2 and CrGPDH3 cDNAs in yeast reveals that they encode functional glycerol-3-phosphate dehydrogenases involved in glycerol production and osmotic stress tolerance. Journal of Applied Phycology, doi: 10.1007/s10811-015-0588-3
- 2012** Herrera-Valencia, V.A., L.A. Macario-González, M.L. Casais-Molina, A.G. Beltran-Aguilar, S. Peraza-Echeverría (2012). In silico cloning and characterization of the glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) gene family in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. Current Microbiology, 64: 477–485, doi 10.1007/s00284-012-0095-6

PARTICIPACIONES EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

- 2013** Presentación del trabajo: “Molecular cloning and functional characterization of the GPDH gene family in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*” en la modalidad de cartel en el XXI Congreso de PAG (Plant & Animal Genome), realizado en San Diego, CA, EEUU del 12 al 16 de enero de 2013
- 2013** Presentación del trabajo titulado: “Caracterización molecular de genes CrGPDH de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* y su relación con la acumulación de triacilglicéridos”, en la modalidad de carteles en el XV Congreso de Estudiantes del CICY, realizado el 22 y 23 de agosto de 2013
- 2012** 1er lugar en el concurso en la modalidad de cartel con el trabajo titulado: “Análisis de la función de genes GPDH de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*” en el VI Congreso de Biotecnología y Bioingeniería del Sureste de la SMBB (Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. Delegación Yucatán), realizado del 24 al 26 de octubre de 2012

INDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES GENERALES	5
1.1. INTRODUCCIÓN	5
1.2. ANTECEDENTES	7
1.2.1 Generalidades de la microalga verde <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	7
1.2.2 <i>C. reinhardtii</i> como modelo de estudio del metabolismo del glicerol y lípidos.....	8
1.2.3 Ventajas de las microalgas como materia prima en la producción de glicerol y biocombustibles.....	12
1.2.4 Estrés osmótico y su relación con la síntesis de glicerol y lípidos.....	15
1.2.5 Función de la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa en la síntesis de glicerol y lípidos en microalgas.....	16
1.2.6 Metabolismo de los lípidos en las microalgas verdes.....	21
1.2.7 Genes que codifican para la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y su relación con el estrés salino.....	26
1.2.8 Genes que codifican para enzimas tipo glicerol-3-fosfato deshidrogenasa en <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	30
1.3 HIPÓTESIS	33
1.4 OBJETIVOS	33
1.4.1 OBJETIVO GENERAL	33
1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
1.5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	34
1.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
CAPÍTULO II. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>CrGPDH2</i> Y <i>CrGPDH3</i> DE <i>C. reinhardtii</i> , MAPEO DE SUS EXTREMOS TERMINALES 5' Y 3' Y CLONACIÓN DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE AMBOS GENES ^{1,2}	45
2.1 INTRODUCCIÓN	45
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
2.2.1 Estrategia experimental.....	47
2.2.2 Cepa y cultivo de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48
2.2.3 Experimentos de estrés osmótico con NaCl	48
2.2.4 Determinación de la concentración celular de cultivos de <i>C. reinhardtii</i>	49
2.2.5 Diseño de oligonucleótidos para el análisis de expresión génica.....	50

2.2.6 Extracción de ARN	51
2.2.7 Síntesis de ADNc	53
2.2.8 Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR	54
2.2.9 Mapeo de los extremos terminales del ADNc de <i>CrGPDH2</i> y <i>CrGPDH3</i> mediante la técnica de RLM-RACE	54
2.2.10 Clonación de los genes <i>CrGPDH2</i> y <i>CrGPDH3</i> de <i>C. reinhardtii</i>	59
2.2.11 Obtención del plásmido pCrGPDH2c.....	62
2.3 RESULTADOS	63
2.3.1 Extracción de ARN y síntesis de ADNc	63
2.3.2 Análisis de la expresión de los tres genes <i>CrGPDH</i> en respuesta al tratamiento de 200 mM de NaCl por 2 h	65
2.3.3 Análisis de la expresión de los genes <i>CrGPDH2</i> y <i>CrGPDH3</i> en respuesta a diferentes tratamientos de NaCl.....	66
2.3.4 Clonación del ADNc del gen <i>CrGPDH2</i> de <i>C. reinhardtii</i>	68
2.3.4.1 Mapeo de los extremos terminales 5' y 3' UTR del ADNc del gen <i>CrGPDH2</i>	68
2.3.4.2 Clonación del marco de lectura abierto del gen <i>CrGPDH2</i> de <i>C. reinhardtii</i>	71
2.3.5 Clonación del ADNc del gen <i>CrGPDH3</i> de <i>C. reinhardtii</i>	79
2.3.5.1 Mapeo de los extremos terminales 5' y 3' UTR del ADNc del gen <i>CrGPDH3</i>	79
2.3.5.2 Clonación del marco de lectura abierto del gen <i>CrGPDH3</i> de <i>C. reinhardtii</i>	82
2.3.6 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del dominio GPDH de los genes <i>CrGPDH2</i> y <i>CrGPDH3</i> de <i>C. reinhardtii</i>	89
2.3.7 Obtención del plásmido de transformación pCrGPDH2c.....	90
2.4 DISCUSIÓN.....	91
2.5 CONCLUSIONES.....	98
2.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
CAPÍTULO III. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS GENES <i>CrGPDH2</i> Y <i>CrGPDH3</i> DE LA MICROALGA VERDE <i>C. reinhardtii</i> '	103
3.1 INTRODUCCIÓN	103
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	105
3.2.1 Estrategia experimental.....	105
3.2.2 Cepa y cultivo de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	106
3.2.3 Obtención de los plásmidos de transformación psGPDH2 y psGPDH3.....	106
3.2.3.1 Clonación del fragmento GMC en el vector pGADT7 AD	106
3.2.3.2 Clonación del ADNc de los genes <i>CrGPDH2</i> y <i>CrGPDH3</i> en el vector psGC ...	107
3.2.4 Transformación de la cepa mutante <i>gpd1 gpd2</i> de <i>S. cerevisiae</i> con los plásmidos psGPDH2 y psGPDH3	108
3.2.5 Extracción de proteínas totales	108

3.2.6 Cuantificación de proteínas totales	109
3.2.7 SDS-PAGE	109
3.2.8 Evaluación de la actividad enzimática	109
3.2.9 Determinación de glicerol total.....	110
3.3 RESULTADOS	110
3.3.1 Obtención de los plásmidos de transformación psGPDH2 y psGPDH3.....	110
3.3.1.1 Clonación del fragmento GMC en el vector pGADT7 AD	110
3.3.1.2 Clonación del ADNc de CrGPDH2 y CrGPDH3 en el vector psGC.....	111
3.3.2 Transformación de la cepa mutante <i>gpd1 gpd2</i> de <i>S. cerevisiae</i> con los plásmidos psGPDH2 y psGPDH3	113
3.3.3 Perfil electroforético de las proteínas obtenidas de las células de la mutante <i>gpd1 gpd2</i> de <i>S. cerevisiae</i> transformada con psGPDH2, psGPDH3 ó psGPDH2-3.....	114
3.3.4 Evaluación de la actividad de GPDH de las enzimas CrGPDH2 y CrGPDH3 de <i>C. reinhardtii</i> mediante cultivos de levadura	115
3.3.5 Función de los genes <i>CrGPDH2</i> y <i>CrGPDH3</i> en la producción de glicerol y la tolerancia al estrés osmótico.....	116
3.4 DISCUSIÓN.....	118
3.5 CONCLUSIONES.....	121
3.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122
CAPÍTULO IV.	127
4.1 DISCUSIÓN GENERAL	127
4.2 CONCLUSIONES GENERALES	132
4.3 PERSPECTIVAS.....	133
4.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	135

LISTADO DE ABREVIATURAS

3' UTR	Región 3' no traducible
5' UTR	Región 5' no traducible
ADNc	ADN complementario
ADNg	ADN genómico
ARNm	ARN mensajero
DHAK	Dihidroxiacetona cinasa
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DTT	Ditiotreitol
G3P	Glicerol-3- fosfato
GPDH	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
GPP	Glicerol fosfatasa
H	Horas
Kpb	Kilo pares de bases
Mb	Mega pares de bases
Min	Minutos
NaCl	Cloruro de sodio
NAD ⁺	Forma oxidada del dinucleótido de nicotinamina
NADH	Forma reducida del dinucleótido de nicotinamina
NADP ⁺	Forma oxidada de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCBI	Centro Nacional de Información biotecnológica (Del inglés: National Center for Biotechnology Information)
Oligo-dT	Oligo deoxitimidina
ORF	Marco de lectura abierto (Del inglés: Open reading Frame)
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Q-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RACE	Amplificación rápida de los extremos terminales del ADNc
RLM-RACE	Amplificación rápida de los extremos terminales del ADNc mediada por ligasa
RT	Reacción de la reversa transcriptasa
S	Segundos
TAG	Triacilglicérido
TAP	Tris-Acetato-Fosfato

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Clasificación taxonómica de la microalga verde <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (Tomado del Sistema Integrado de Información Taxonómica, ITIS por sus siglas en inglés, http://www.itis.gov/index.html). Fotografía: Dr. Rodrigo Rivera Solís.	7
Figura 1.2. Esquema general de la estructura celular de la microalga verde <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (Tomado de Merchant <i>et al.</i> , 2007).	8
Figura 1.3. Ruta de síntesis hipotética de triacilglicéridos en <i>C. reinhardtii</i> y supuestas localizaciones (modificado de Greenwell <i>et al.</i> , 2010). Donde: TAG = Triacilglicérido, DAG = Diacilglicérido, PA = Ácido fosfatídico, LPA = Ácido lisofosfatídico, G3P = Glicerol-3-fosfato, CoA = Coenzima A, FFA = Ácidos grasos libres, ACP = Proteína acarreadora de grupos acilo y PEP = Fosfoenolpiruvato.	11
Figura 1.4. Reacción de hidrocraqueo selectivo (Beginner's Guide to Aviation Biofuels, 2009).	13
Figura 1.5. Reacción de transesterificación de lípidos para la formación de biodiésel (Chisti, 2007).	13
Figura 1.6. Reacción catalizada por la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH).	17
Figura 1.7. Representación esquemática del metabolismo del glicerol en la microalga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (León, 1997).	20
Figura 1.8. Ruta de biosíntesis de los ácidos grasos en el cloroplasto y de la ruta de biosíntesis de triacilglicéridos propuesta para microalgas (Radakovits <i>et al.</i> , 2010).	21
Figura 1.9. Ruta de síntesis de los ácidos grasos en el cloroplasto. Enzimas: (1) Acetil-CoA carboxilasa; (2) Malonil-CoA; ACP transferasa; (3) Ketoacil-ACP reductasa; (4) Ketobutiril-ACP reductasa; (5) 3- Hidroxiacil-ACP deshidrasa; (6) Enoil-ACP reductasa (Hu <i>et al.</i> , 2008).	22
Figura 1. 10. Esquema simplificado de la ruta propuesta de biosíntesis de triacilglicéridos en microalgas. Enzimas: (1) Glicerol-3-fosfato acil transferasa citosolica; (2) Ácido lisofosfatídico acil transferasa; (3) Ácido fosfatídico fosfatasa; (4) Diacilglicerol acil transferasa (Hu <i>et al.</i> , 2008).	23
Figura 1.11. Estructura de genes tipo <i>GPDH</i> de la microalga <i>D. salina</i> (e.g. <i>DsGPDH2</i>) (He <i>et al.</i> 2007).	28
Figura 1. 12. Representación esquemática de la estructura de las proteínas CrGPDH1, CrGPDH2, CrGPDH3 de <i>C. reinhardtii</i> . El dominio SerB (fosfoserina fosfatasa) se marca en color anaranjado, el dominio GPDH (glicerol 3-fosfato deshidrogenasa) dependiente de NAD ⁺ se marca en color rojo y el cTP (péptido de tránsito al cloroplasto) se marca de color azul (Macario-González, 2011).	30
Figura 1.13. Análisis filogenético de la secuencia de genes <i>GPDH</i> de <i>C. reinhardtii</i> y otros organismos (Macario-González, 2011).	31
Figura 1.14. Análisis de la expresión del gen <i>CrGPDH2</i> mediante RT-PCR en muestras sin tratamiento (ST) y muestras tratadas con 200 mM de NaCl por 2 h (200 mM NaCl). Se utilizó el gen de la actina como control positivo (Actina) en una reacción más reversa transcriptasa	

(RT), y negativo (C-) sin RT. M = marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen) (Macario-González, 2011).	32
Figura 1.15. Estrategia experimental general para la caracterización molecular y funcional de los genes <i>CrGPDH2</i> y <i>CrGPDH3</i> de la microalga verde <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	34
Figura 2.1. Estrategia experimental general para la clonación y el análisis de la expresión de los genes <i>CrGPDH2</i> y <i>CrGPDH3</i> de la microalga verde <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	47
Figura 2.2. Esquema del área de conteo en la cámara de Neubauer para la medición de la densidad celular. Los números indican el orden en el cual se realizó el conteo celular.	49
Figura 2.3. Representación esquemática del proceso de desfosforilación con la enzima fosfatasa intestinal de ternera (CIP). Esta enzima sólo actúa sobre los ARN's que no contengan la estructura "CAP".	55
Figura 2.4. Representación esquemática del proceso de decapitación en aquellos ARN mensajeros que contienen la estructura "CAP".	55
Figura 2.5. Representación gráfica del proceso de ligación del oligonucleótido Gene Racer y el ARN mensajero decapitado.	56
Figura 2.6. Calidad del ARN total extraído a partir de células de <i>C. reinhardtii</i> empleando el Protocolo GE Healthcare Illustra RNAspin Mini. 0 mM NaCl: Muestra sin tratamiento, 200 mM NaCl: Muestra tratada a 200 mM de NaCl por 2 h. En cada carril se depositaron 2 µg de ARN de la muestra correspondiente.	63
Figura 2.7. Calidad del ARN total extraído a partir de células de <i>C. reinhardtii</i> empleando el reactivo de TRIZOL. 0 mM NaCl: Muestra sin tratamiento, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150 y 200 mM de NaCl: Muestra tratada a 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150 y 200 mM de NaCl por 2 h, respectivamente. En cada carril se depositaron 2 µg del ARN de cada muestra.	63
Figura 2.8. Calidad del ARN total extraído a partir de células de <i>C. reinhardtii</i> empleando el reactivo de TRIZOL. 5 y 200 mM NaCl: Muestras tratadas a 5 y 200 mM de NaCl, 200 mM de NaCl: Muestra tratada a 200 mM de NaCl por 5, 30, 60 y 120 min, respectivamente. 0 min: Muestra control sin tratamiento de NaCl. En cada carril se depositó 2 µg del ARN de cada muestra.	64
Figura 2.9. Análisis de la expresión de los genes <i>CrGPDH1</i> , <i>CrGPDH2</i> y <i>CrGPDH3</i> de <i>C. reinhardtii</i> mediante RT-PCR en muestras sin tratamiento con NaCl (0 mM de NaCl) y muestras tratadas 2 h a 200 mM de NaCl (200 mM NaCl). <i>CrActina</i> : actina de <i>C. reinhardtii</i> . M: Marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen).	66
Figura 2.10. Análisis de la expresión de los genes <i>CrGPDH2</i> y <i>CrGPDH3</i> mediante RT-PCR a diferentes tratamientos de NaCl. Las células de <i>C. reinhardtii</i> fueron colectadas para su análisis después de los siguientes tratamientos: a) 2 h con 0, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150 y 200 mM de NaCl; b) 5, 30, 60 y 120 min a 5 mM de NaCl, las células sin tratamiento de NaCl fueron usadas como control (tiempo cero); y c) 5, 30, 60 y 120 min a 200 mM de NaCl, las células sin tratamiento de NaCl fueron usadas como control (tiempo cero). <i>CrActina</i> : actina de <i>C. reinhardtii</i> . M: Marcador de peso molecular 2-log (NEB).	67
Figura 2.11. Amplificación de los extremos 5' y 3' terminales del gen <i>CrGPDH2</i> de <i>C. reinhardtii</i> mediante la técnica del RLM-RACE, en donde: a) Extremo 5' terminal de <i>CrGPDH2</i>	

(5'CrGPDH2) y b) Extremo 3' terminal de <i>CrGPDH2</i> (3'CrGPDH2). M: Marcador de peso molecular 2-log (NEB); C+: Control positivo de la reacción (<i>CrActin</i>); C-: Control negativo de la reacción.....	69
Figura 2.12. Verificación de la clonación de los extremos 5' y 3' RACE de <i>CrGPDH2</i> en pGEM®-T Easy. Patrón de electroforesis generado por la enzima <i>EcoRI</i> para a) pGEM®-T Easy (~3.0 Kb) y 5'CrGPDH2 (~350 pb) y b) pGEM®-T Easy (~3.0 Kb) y 3'CrGPDH2 (~942 pb). M: Marcador de peso molecular 2-log (NEB); 1 al 4: clonas analizadas.....	69
Figura 2.13. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos del extremo 5' del gen <i>CrGPDH2</i> de la predicción <i>in silico</i> con respecto a la secuencia obtenida del producto secuenciado. La flecha hacia abajo indica el inicio de la región 5' UTR de <i>CrGPDH2</i> , el triángulo indica el final de la región 5' UTR de <i>CrGPDH2</i> y la flecha que apunta hacia la derecha indica el inicio de la ORF de dicho gen.	70
Figura 2.14. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos del extremo 3' del gen <i>CrGPDH2</i> de la predicción <i>in silico</i> con respecto a la secuencia obtenida del producto secuenciado. El asterisco indica el final de la ORF, la flecha hacia abajo el inicio de la región 3' UTR y el triángulo las diferentes longitudes de la región 3' UTR de dicho gen.....	71
Figura 2.15. Amplificación del marco de lectura abierto del gen <i>CrGPDH2</i> de <i>C. reinhardtii</i> mediante RT-PCR. M: Marcador de peso molecular 2-log (NEB); C+: Control positivo de la reacción (<i>CrActin</i>); C-: Control negativo de la reacción.....	72
Figura 2.16. Verificación de la clonación del marco de lectura abierto del gen <i>CrGPDH2</i> en pGEM®-T Easy. Patrón de electroforesis generado por la enzima <i>EcoRI</i> para pGEM®-T Easy (~3.0 Kb) y ORFCrGPDH2 (~2,172 pb). M: Marcador de peso molecular 2-log (NEB); 1 al 4: clonas analizadas.....	72
Figura 2.17. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos del gen <i>CrGPDH2</i> obtenida de la predicción <i>in silico</i> del Phytozome con respecto a la secuencia obtenida del producto secuenciado. La posición de las mutaciones en la secuencia de nucleótidos de la ORF gen <i>CrGPDH2</i> se indica con triángulos.....	75
Figura 2.18. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del gen <i>CrGPDH2</i> obtenida de la predicción <i>in silico</i> del Phytozome con respecto a la secuencia obtenida del producto secuenciado. La posición de la mutación en la secuencia de aminoácidos de la ORF del gen <i>CrGPDH2</i> se indica con un triángulo.	75
Figura 2.19. Verificación de la clonación del marco de lectura abierto con la reversión de la mutación del gen <i>CrGPDH2</i> en pGEM®-T Easy. Patrón de electroforesis generado por la enzima <i>EcoRI</i> para pGEM®-T Easy (~3.0 Kb) y ORFCrGPDH2Mut (~2,172 pb). M: Marcador de peso molecular 2-log (NEB); 1 al 3: clonas analizadas.	76
Figura 2.20. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del gen <i>CrGPDH2</i> obtenida de la predicción <i>in silico</i> con respecto a la secuencia obtenida del producto secuenciado de la reversión de la mutación del plásmido pCrGPDH2Mut. La posición de la mutación revertida en la secuencia de aminoácidos de <i>CrGPDH2</i> se indica con una flecha.	77
Figura 2.21. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen <i>CrGPDH2</i> de <i>C. reinhardtii</i> . La secuencia de nucleótidos de 2873 pb del ADNc de <i>CrGPDH2</i> incluye las regiones 5' y 3' UTR. El codón de inicio (ATG) y codón de paro (TAA) del marco de lectura de abierto de <i>CrGPDH2</i> se encuentran subrayados. La secuencia putativa de la señal de poliadenilación TGTAAT en la	

región 3' UTR se señala con un recuadro y los triángulos en esta misma región indican los diferentes sitios de inicio de poliadenilación identificados.	78
Figura 2.22. Amplificación de los extremos 5' y 3' terminales del gen <i>CrGPDH3</i> de <i>C. reinhardtii</i> mediante la técnica de RLM-RACE, en donde: a) Extremo 5' terminal de <i>CrGPDH3</i> (5' <i>CrGPDH3</i>) y b) Extremo 3' terminal de <i>CrGPDH3</i> (3' <i>CrGPDH3</i>). M: Marcador de peso molecular 2-log (NEB); C+: Control positivo de la reacción (<i>CrActin</i>); C-: Control negativo de la reacción.	79
Figura 2.23. Verificación de la clonación de los extremos 5' y 3' RACE de <i>CrGPDH3</i> en pGEM®-T Easy. Patrón de electroforesis generado por la enzima <i>EcoRI</i> para a) pGEM®-T Easy (~3.0 Kb) y 5' <i>CrGPDH3</i> (~433 pb) y b) pGEM®-T Easy (~3.0 Kb) y 3' <i>CrGPDH3</i> (~1,212 pb). M: Marcador de peso molecular 2-log (NEB); 1 al 4: clonas analizadas.	79
Figura 2.24. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos del extremo 5' del gen <i>CrGPDH3</i> de la predicción <i>in silico</i> con respecto a la secuencia obtenida del producto secuenciado. La flecha hacia abajo indica el inicio de la región 5' UTR de <i>CrGPDH2</i> , el asterisco el final de la región 5' UTR obtenida de forma <i>in silico</i> , el triángulo el final de la región 5' UTR obtenida de forma experimental y la flecha que apunta hacia la derecha el inicio de la ORF de dicho gen, en donde, la flecha con línea punteada representa el sitio probable de inicio de la ORF y la flecha con línea continua el sitio de inicio de la ORF obtenida de forma <i>in silico</i>	80
Figura 2.25. Alineamiento de nucleótidos del extremo 3' del gen <i>CrGPDH3</i> de la predicción <i>in silico</i> con respecto a la secuencia obtenida del producto secuenciado. El asterisco indica el final de la ORF y la flecha hacia abajo el inicio de la región 3' UTR de dicho gen.	82
Figura 2.26. Amplificación del marco de lectura abierto del gen <i>CrGPDH3</i> de <i>C. reinhardtii</i> mediante RT-PCR. M: Marcador de peso molecular 2-log (NEB); C+: Control positivo de la reacción (<i>CrActin</i>); C-: Control negativo de la reacción.	82
Figura 2.27. Verificación de la clonación del marco de lectura abierto del gen <i>CrGPDH3</i> en pGEM®-T Easy. Patrón de electroforesis generado por la enzima <i>EcoRI</i> para pGEM®-T Easy (~3.0 Kb) y ORFCrGPDH3 (~2,200 pb). M: Marcador de peso molecular 2-log (NEB); 1 al 4: clonas analizadas.	83
Figura 2.28. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos del gen <i>CrGPDH3</i> obtenida de la predicción <i>in silico</i> del Phytozome con respecto a la secuencia obtenida del producto secuenciado. La posición de las mutaciones en la secuencia de nucleótidos de la ORF gen <i>CrGPDH3</i> se indica con triángulos.	85
Figura 2.29. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del gen <i>CrGPDH3</i> obtenida de la predicción <i>in silico</i> del Phytozome con respecto a la secuencia obtenida del producto secuenciado. La posición de la mutación en la secuencia de aminoácidos de la ORF del gen <i>CrGPDH3</i> se indica con un triángulo.	86
Figura 2.30. Verificación de la clonación del marco de lectura abierto con la reversión de la mutación del gen <i>CrGPDH3</i> en pGEM®-T Easy. Patrón de electroforesis generado por la enzima <i>EcoRI</i> para pGEM®-T Easy (~3.0 Kb) y ORFCrGPDH3Mut (~2,200 pb). M: Marcador de peso molecular 2-log (NEB); 1 al 3: clonas analizadas.	86
Figura 2.31. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del gen <i>CrGPDH3</i> obtenida de la predicción <i>in silico</i> con respecto a la secuencia obtenida del producto secuenciado de la	

reversión de la mutación del plásmido pCrGPDH3Mut. La posición de la mutación revertida en la secuencia de aminoácidos de *CrGPDH3* se indica con una flecha. 87

Figura 2.32. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen *CrGPDH3* de *C. reinhardtii*. La secuencia de nucleótidos de 3252 pb del ADNc de *CrGPDH3* incluye las regiones 5' y 3' UTR. El codón de inicio (ATG) y codón de paro (TAA) del marco de lectura abierto de *CrGPDH2* se encuentran subrayados. Las secuencias putativas de la señal de poliadenilación TGTAG y TGTA en la región 3' UTR se señalan con un recuadro y los triángulos en esta misma región indican los diferentes sitios de inicio de poliadenilación identificados. La flecha indica la posición del intrón de 24 pb mal predicho en la ORF del gen *CrGPDH3*. 88

Figura 2.33. Comparación de la secuencia de aminoácidos del dominio GPDH de CrGPDH2 (KM923898), CrGPDH3 (KM923899), DvGPDH1 (EU624406) y DvGPDH2 (EU624407) de *Dunaliella viridis* y GPD1 de *Saccharomyces cerevisiae* (ScGPD1: X76859.1). Las líneas sobre la secuencia de aminoácidos indican el dominio GPDH. El sitio putativo de unión de la NADH está señalado en la secuencia con un paréntesis (GXGXXA). Los aminoácidos similares están sombreados de gris y los aminoácidos idénticos de negro. Las flechas indican los aminoácidos que varían entre la secuencia de CrGPDH2 y CrGPDH3 y el número la posición del aminoácido que es idéntico en CrGPDH2 y ScGPD1 pero diferente en CrGPDH3. 89

Figura 2.34. Clonación del fragmento ORFCrGPDH2Mut en el vector p424GPD: a) Relación vector:inserto (p424GPD:ORFCrGPDH2Mut) y b) Verificación de la integridad del vector p424GPDH2. Patrón de electroforesis generado por *EcoRI* y *SpeI* (NEB) V: Vector p424GPD (~6,527 pb); I: Inserto ORFCrGPDH2Mut (~2,172 pb); M: Marcador 2-Log (NEB); 1 y 2: clonas analizadas. 90

Figura 2.35. Clonación del fragmento ORFCrGPDH2Mut en el vector pChlamy_4: a) Relación vector:inserto (pChlamy_4:ORFCrGPDH2Mut) y b) Verificación de la integridad del vector pCrGPDH2c. Patrón de electroforesis generado por *BamHI* y *XbaI*. V: Vector pChlamy_4 (~3,640 pb); I: Inserto ORFCrGPDH2Mut (~2,172 pb); M: Marcador 1 Kb (NEB); 1 y 2: clonas analizadas. 91

Figura 2.36. Diagrama del vector pCrGPDH2c.ORFCrGPDH2Mut: ADNc del gen *CrGPDH2*. 91

Figura 3.1. Esquema experimental general para la caracterización funcional de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de la microalga verde *C. reinhardtii*. GMC = Región que incluye desde el promotor del gen *GPD* hasta la región 3' UTR del gen *CYC1* contenida en el vector p424GPD; Prom GPD = Promotor del gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; Ter *CYC1*: 3' UTR del gen *CYC1* (citocromo C-1); MCS = sitio de clonación múltiple. 105

Figura 3.2. Clonación del fragmento GMC en el plásmido pGADT7: a) Relación vector:inserto (pGADT7 AD:GMC) y b) Verificación de la integridad del vector psGC. Digestión del plásmido psGC con las enzimas *SacI* y *KpnI* (NEB). V: vector pGADT7 AD (~7,987 pb); I: inserto GMC (~1,005 pb); M: Marcador de peso molecular 2-log (NEB); 1-3: clonas analizadas. 111

Figura 3.3. Diagrama del vector psGC para la transformación de la cepa mutante *gpd1 gpd2* de la levadura *S. cerevisiae*. 111

Figura 3.4. Clonación del ADNc del gen *CrGPDH2* en el plásmido psGC: a) Relación vector:inserto (psGC:ORFCrGPDH2Mut) y b) Verificación de la integridad del vector psGPDH2. Digestión del plásmido psGPDH2 con las enzimas *BamHI* y *EcoRI* (NEB). V: vector psGC (~8,992 pb); I: inserto ORFCrGPDH2Mut (~2,172 pb); M: Marcador de peso molecular 1 Kb (NEB); 1-3: clonas analizadas. 112

- Figura 3.5. Clonación del ADNC del gen *CrGPDH3* en el plásmido psGC: a) Relación vector:inserto (psGC:ORFCrGPDH3Mut) y b) Verificación de la integridad del vector psGPDH3. Digestión del plásmido psGPDH3 con las enzimas *BamHI* y *EcoRI* (NEB). V: vector psGC (~8,992 pb); I: inserto ORFCrGPDH3Mut (~2,200 pb); M: Marcador de peso molecular 1 Kb (NEB); 1-3: clonas analizadas..... 112
- Figura 3.6. Diagrama de los vectores para la transformación de la cepa mutante *gpd1 gpd2* de la levadura *S. cerevisiae*: a) psGPDH2 y b) psGPDH3. 113
- Figura 3.7. Resultado de la transformación mediante PEG de la mutante *gpd1 gpd2* de *S. cerevisiae* con los plásmidos correspondientes: a) psGPDH2, b) psGPDH3, c) psGPDH2-3 y d) psGC, e) control negativo (células de *gpd1 gpd2* cultivadas en medio SD-Leu) y f) control positivo (células de *gpd1 gpd2* cultivadas en medio YPD). 114
- Figura 3.8. Perfil electroforético de proteínas de cultivos de la levadura *S. cerevisiae* cultivados en medio YPD de la cepa: 1) *W303-1A*, 2) Mutante *gpd1 gpd2*, 3) Mutante transformada con psGC, 4) Mutante transformada con psGPDH2, 5) Mutante transformada con psGPDH3 y 6) Mutante transformada con psGPDH2-3. En cada carril se depositaron ~20 µg de extracto proteico..... 115
- Figura 3.9. Incremento en la actividad de GPDH en la doble mutante *gpd1 gpd2* de la levadura *S. cerevisiae* transformada con el ADNc de *CrGPDH2* y *CrGPDH3*. La actividad de GPDH fue determinada en la doble mutante de levadura *gpd1 gpd2* transformada con el plásmido que contiene a *CrGPDH2* (psGPDH2), *CrGPDH3* (psGPDH3) o con ambos plásmidos (psGPDH2-3). La cepa parental *W303-1A* y la doble mutante transformada con el plásmido vacío (psGC) fueron incluidos como controles. Los datos son las medias (±SD) de tres experimentos independientes, cada uno llevado a cabo por duplicado. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entra las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza)..... 116
- Figura 3.10. Complementación funcional de la doble mutante *gpd1 gpd2* de *S. cerevisiae* con el ADNc de *CrGPDH2* y *CrGPDH3*. El contenido de glicerol fue determinado en la doble mutante de levadura *gpd1 gpd2* transformada con el plásmido que contiene a *CrGPDH2* (psGPDH2), *CrGPDH3* (psGPDH3) o con ambos plásmidos (psGPDH2-3). La cepa parental *W303-1A* y la doble mutante transformada con el plásmido vacío (psGC) fueron incluidos como controles. El glicerol total fue cuantificado en cultivos incubados en medio YPD sin NaCl o después del tratamiento a 200 mM de NaCl por a) 4 h y b) 12 h. Los datos son las medias (±SD) de tres experimentos independientes. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entra las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza)..... 117
- Figura 3.11. Incremento en la tolerancia al estrés osmótico de la doble mutante *gpd1 gpd2* de *S. cerevisiae* transformada con el ADNc de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3*. La doble mutante de levadura *gpd1 gpd2* fue transformada con el plásmido que contiene a *CrGPDH2* (psGPDH2), *CrGPDH3* (psGPDH3) o con ambos plásmidos (psGPDH2-3). La cepa parental *W303-1A* y la doble mutante transformada con el plásmido vacío (psGC) fueron incluidos como controles. Las células de los cultivos experimentales y controles fueron diluidos serialmente 1:10 y después adicionados sobre platos con medio YPD sólido sin tratamiento de NaCl o suplementado con las concentraciones indicadas de NaCl y se incubaron a 30 °C por 4 días..... 118

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Comparación de algunas materias primas para la elaboración de biodiésel.....	14
Cuadro 2.1. Oligonucleótidos específicos empleados para el análisis de expresión génica de la microalga verde <i>C. reinhardtii</i>	50
Cuadro 2.2. Oligonucleótidos específicos utilizados para la amplificación de las secuencias flanqueantes de los extremos terminales 5' y 3' del ADNc de <i>CrGPDH2</i> y <i>CrGPDH3</i> mediante la técnica de RLM-RACE.	57
Cuadro 2.3. Oligonucleótidos específicos empleados para la amplificación del marco de lectura abierto de los genes <i>CrGPDH2</i> y <i>CrGPDH3</i> de <i>C. reinhardtii</i>	59
Cuadro 2.4. Oligonucleótidos específicos utilizados para la corrección de la mutación del marco de lectura abierto de los genes <i>CrGPDH2</i> y <i>CrGPDH3</i> de <i>C. reinhardtii</i>	61
Cuadro 2.5. Concentración y pureza del ARN extraído a partir de células de <i>C. reinhardtii</i> cultivadas a 0 y 200 mM de NaCl por 2 h.	63
Cuadro 2.6. Concentración y pureza del ARN extraído a partir de células de <i>C. reinhardtii</i> cultivadas a 0, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150 y 200 mM de NaCl por 2 h.	64
Cuadro 2.7. Concentración y pureza del ARN extraído a partir de células de <i>C. reinhardtii</i> cultivadas a 5 y 200 mM de NaCl por 5, 30, 60 y 120 min.	65

RESUMEN

Chlamydomonas reinhardtii es una microalga verde de agua dulce que tiene la habilidad de acumular y secretar glicerol, así como de acumular triacilglicéridos (TAGs) en respuesta a estrés osmótico. Se sabe que la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) es una enzima clave en el metabolismo del glicerol y los lípidos (TAGs). La enzima GPDH cataliza la conversión de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a glicerol-3-fosfato (G3P), usando NADH como donador de electrones, en donde el G3P es el componente limitante en la producción de glicerol y TAGs. El papel de la enzima GPDH ha sido ampliamente estudiado en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en donde los genes *gpd1* y *gpd2*, que codifican para diferentes enzimas GPDH, son responsables de la síntesis de glicerol en esta levadura. En las microalgas verdes también se ha estudiado el papel de la enzima GPDH, principalmente en las microalgas del género *Dunaliella*, en donde se han clonado y caracterizado genes *GPDH*. Además, se ha observado que la expresión de estos genes *GPDH*, a altas concentraciones salinas, está asociada a la biosíntesis del glicerol. En un estudio previo en nuestro laboratorio, se identificaron tres genes homólogos a *GPDH* (*CrGPDH1*, *CrGPDH2* y *CrGPDH3*) en la microalga verde *C. reinhardtii*, y se observó que la expresión de *CrGPDH2* se indujo en respuesta a un tratamiento de 200 mM de NaCl por 2 h. Con base en estos resultados y dada la alta identidad entre *CrGPDH2* y *CrGPDH3*, en el presente trabajo se realizó la caracterización molecular y funcional de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de *C. reinhardtii*.

Como resultado, se encontró que la expresión tanto de *CrGPDH2* como de *CrGPDH3* se induce en respuesta al tratamiento de 200 mM de NaCl por 2 h, sugiriendo que ambos genes podrían estar involucrados en la síntesis de glicerol y TAGs, así como en la tolerancia al estrés osmótico en esta microalga. Además, se analizó la expresión de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* a diferentes concentraciones de NaCl, y se encontró que una concentración tan baja como 5 mM de NaCl durante 5 min fue suficiente para inducir la expresión de ambos genes. Como parte de la caracterización molecular, se mapearon los extremos del ADNc de *CrGPDH2* y *CrGPDH3* utilizando la técnica de RLM-RACE y se clonó la secuencia completa de sus ADNcs. Para la caracterización funcional, se realizó la expresión heteróloga del ADNc de estos dos genes en la doble mutante *gpd1 gpd2* de *S. cerevisiae* y se confirmó que tanto *CrGPDH2* como *CrGPDH3* presentan actividad

de GPDH. Por su parte, el estudio de complementación genética reveló que los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* fueron capaces de restaurar la producción de glicerol y aumentar su tolerancia a la salinidad de esta mutante. Comparado con *CrGPDH3*, el gen *CrGPDH2* confirió una mayor producción de glicerol y tolerancia a la salinidad cuando se expresó en la doble mutante *gpd1 gpd2* . En conjunto, estos resultados demostraron que los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* codifican para homólogos funcionales del gen *gpd1* de *S. cerevisiae*, que está involucrado en la síntesis de glicerol y tolerancia al estrés osmótico. Para finalizar, se obtuvo un plásmido de transformación para el núcleo de *C. reinhardtii*: pCrGPDH2c. Dicho plásmido contiene al gen *CrGPDH2* de *C. reinhardtii*, que como se demostró en el presente trabajo codifica para una enzima funcional GPDH. Este plásmido servirá en futuros estudios para investigar la sobre expresión de *CrGPDH2* y su efecto en la síntesis y acumulación de glicerol y TAGs en esta microalga, con la perspectiva biotecnológica de utilizar a *C. reinhardtii* como un biorreactor para la acumulación de glicerol o TAGs como una materia prima renovable de numerosos procesos industriales y biocombustibles.

ABSTRACT

Chlamydomonas reinhardtii is a green microalga that has the ability to accumulate and secrete glycerol and to accumulate triacylglycerols (TAGs) in response to osmotic stress. In this regard, it has been shown that the enzyme glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) is a key enzyme in lipids and glycerol metabolism. GPDH catalyzes the conversion of dihydroxyacetone phosphate (DHAP) to glycerol-3-phosphate (G3P), using NADH as an electron donor, where G3P is a limiting component in the glycerol and TAGs synthesis. The role of GPDH enzyme has been extensively studied in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, where *gpd1* and *gpd2* genes, encoding different GPDH enzymes, are responsible for glycerol synthesis in this yeast. The role of the GPDH enzyme has also been studied in green microalga, mainly in microalga of the genus *Dunaliella*, where *GPDH* genes has been cloned and characterized. Moreover, it has been observed that the expression of these *GPDH* genes, at high salt concentrations, is associated with glycerol biosynthesis. In a previous study in our laboratory, three *GPDH* homologs genes (*CrGPDH1*, *CrGPDH2* and *CrGPDH3*) were identified in the green microalga *C. reinhardtii*, and it was observed that the expression of *CrGPDH2* was induced in response to 200 mM NaCl treatment for 2 hours. Based on these results, and given the high identity between *CrGPDH2* and *CrGPDH3*, in the present study we performed a molecular and functional characterization of *CrGPDH2* and *CrGPDH3* genes of *C. reinhardtii*.

We found that the expression of both *CrGPDH2* and *CrGPDH3* is induced in response to 200 mM NaCl treatment for 2 h, suggesting that both genes could be involved in glycerol and TAGs synthesis, as well as in osmotic stress tolerance in this microalga. In addition, the expression of *CrGPDH2* and *CrGPDH3* genes at different NaCl concentrations was analyzed, finding that a concentration of NaCl as low as 5 mM for 5 minutes was sufficient to induce the expression of both genes. Therefore, we mapped the cDNA ends of *CrGPDH2* and *CrGPDH3* using RLM-RACE technique and cloned their full-length cDNAs. For functional characterization, we performed the heterologous expression of these two cDNAs in *S. cerevisiae gpd1 gpd2* double mutant and GPDH activity was confirmed for both *CrGPDH2* and *CrGPDH3*. Additionally, the genetic complementation analysis revealed that *CrGPDH2* and *CrGPDH3* were able to restore glycerol production and

restore the salinity tolerance of this mutant. Compared with *CrGPDH3*, *CrGPDH2* gene conferred higher glycerol production and greater salt tolerance when expressed in the *gpd1 gpd2* double mutant. Together, these findings show that both *CrGPDH2* and *CrGPDH3* genes encode functional homologs of the *S. cerevisiae gpd1* gene that is involved in glycerol synthesis and osmotic stress tolerance. Finally, a plasmid for the nuclear transformation of *C. reinhardtii* was obtained: pCrGPDH2c. This plasmid contains the *CrGPDH2* gene of *C. reinhardtii* which, as demonstrated in the present study, encodes a functional GPDH enzyme. This plasmid will be used in future studies to investigate its effect on the synthesis and accumulation of glycerol and TAGs in this microalga, with the biotechnological prospect of using *C. reinhardtii* as a biorreactor for glycerol and TAGs accumulation as a renewable feedstock for numerous industrial products and biofuels.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES GENERALES

1.1. INTRODUCCIÓN

Chlamydomonas reinhardtii es una microalga verde de agua dulce capaz de sintetizar glicerol como un metabolito osmorregulador en respuesta a estrés osmótico, y tolera una concentración de hasta 200 mM de NaCl (León y Galván, 1994). *C. reinhardtii* también es capaz de acumular triacilglicéridos (TAGs) en respuesta a concentraciones que van de 20 a 100 mM de NaCl (Siaut *et al.*, 2011). El glicerol es un importante soluto osmorregulador y se ha reportado que su acumulación se induce por condiciones de estrés osmótico en microalgas verdes no halófilas, como *C. reinhardtii* (León y Galván, 1994), y en algunas microalgas verdes halófilas, incluyendo algunas especies marinas de *Chlamydomonas* y *Dunaliella*, así como casi todas las especies de levaduras estudiadas hasta la fecha (Ben-Amotz y Avron, 1983; Avron, 1986; Hohmann, 2002). Sin embargo, los genes de microalgas involucrados en la biosíntesis de glicerol y lípidos (TAGs) aún no han sido completamente caracterizados. Y, debido al creciente interés en utilizar a las microalgas como biorreactores para la producción de glicerol y/o TAGs, surge la necesidad de identificar y caracterizar genes que puedan ser utilizados para este propósito. Se sabe que la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH, EC 1.1.1.8) cataliza la reducción de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a glicerol-3-fosfato (G3P), usando NADH como donador de electrones. Posteriormente, el G3P es desfosforilado a glicerol mediante la acción de la enzima glicerol fosfatasa (GPP) (Gancedo *et al.*, 1968; Ghoshal *et al.*, 2002). El G3P juega un papel importante en la adaptación al estrés osmótico y es un metabolito clave en la síntesis de glicerol y TAGs (Albertyn *et al.*, 1994; Vigeolas *et al.*, 2007).

Los genes *GPDH* fueron estudiados inicialmente en la levadura *S. cerevisiae*, donde los genes *gpd1* y *gpd2*, que codifican para diferentes enzimas GPDH, son responsables de la síntesis de glicerol (Ansell *et al.*, 1997). Los estudios han demostrado que el producto del gen *gpd1* es la isoforma más relevante bajo condiciones de estrés osmótico, mientras que la transcripción del gen *gpd2* se induce en condiciones anaerobias (Ansell *et al.*, 1997). Además, se observó que la sobre expresión del gen *gpd1* de *S. cerevisiae* incrementó en un 40% el contenido de lípidos en las semillas maduras del cultivo comercial de la planta oleaginosa *Brassica napus* L. (Vigeolas *et al.*, 2007), y recientemente, se observó que la sobre expresión del gen *GPDH* de la diatomea marina *P. tricornutum* incrementó 6.8

veces la concentración del glicerol y hasta en un 60% el contenido de lípidos en esta diatomea (Yao *et al.*, 2014). En las microalgas *D. salina* y *D. viridis* se han clonado y caracterizado genes que codifican para enzimas GPDH (He *et al.*, 2007; 2009; Cai *et al.*, 2013), y se ha observado que la expresión de estos genes aumenta cuando se encuentran sujetos a altas concentraciones salinas (He *et al.*, 2007; 2009). Además, se ha estudiado la relación entre la biosíntesis de glicerol y la expresión de los genes *GPDH* de estas microalgas (He *et al.*, 2007; 2009; Chen *et al.*, 2011). Recientemente, Macario-González (2011), como parte de sus estudios de maestría en nuestro grupo de investigación, reportó la caracterización *in silico* y el análisis de la expresión del gen *CrGPDH2*, cuya expresión fue inducida en respuesta al tratamiento con 200 mM de NaCl por 2 h, sugiriendo que este gen podría estar involucrado en la producción de glicerol y tolerancia a estrés osmótico, así como en la síntesis de TAGs en esta microalga. En este estudio se encontró que el porcentaje de identidad entre la secuencia de aminoácidos de *CrGPDH2* y *CrGPDH3* fue de 97.9%, a diferencia de *CrGPDH1* cuya secuencia de aminoácidos presentó un porcentaje de identidad de 77.5 y 76.8% con *CrGPDH2* y *CrGPDH3*, respectivamente. Lo anterior sugiere que no sólo *CrGPDH2* sino que también *CrGPDH3* podría estar asociado al metabolismo del glicerol y TAGs en *C. reinhardtii*.

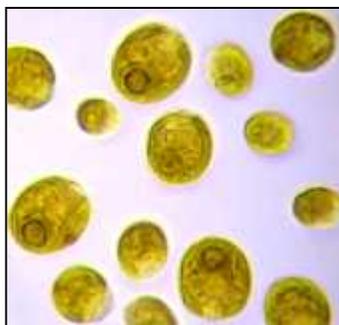
Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue caracterizar molecular y funcionalmente a los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de *C. reinhardtii*. Como parte de esta caracterización, se propuso analizar la expresión de *CrGPDH2* y *CrGPDH3* en respuesta a diferentes concentraciones de NaCl partiendo de 200 hasta 5 mM de NaCl y variando el tiempo del tratamiento. Además, se realizó por primera vez la clonación y caracterización funcional del ADNc de *CrGPDH2* y *CrGPDH3*. El ADNc de ambos genes fue expresado en la doble mutante *gpd1 gpd2* de *S. cerevisiae* con el objetivo de determinar si el producto de ambos genes presentaba actividad de GPDH, y por otra parte si el ADNc de *CrGPDH2* y *CrGPDH3* era capaz de restaurar la tolerancia a la salinidad en la doble mutante, que es susceptible a la salinidad. Finalmente, y con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis, se propuso obtener un plásmido recombinante para la expresión de *CrGPDH2*, con la perspectiva de usarlo en un trabajo posterior para la transformación del núcleo de *C. reinhardtii* e investigar la relación de este gen con la síntesis de glicerol y el contenido de lípidos en esta microalga, y sentar las bases para que en estudios posteriores se pueda manipular la acumulación de lípidos en esta u otra microalga.

1.2. ANTECEDENTES

1.2.1 Generalidades de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*

Las microalgas del género *Chlamydomonas* están clasificadas taxonómicamente dentro de la clase de algas verdes Chlorophyceae. Estas microalgas verdes pueden encontrarse en agua salada, dulce, en el suelo e incluso en la nieve. Se han descrito más de 500 especies de *Chlamydomonas* aunque científicamente sólo se trabaja con unas cuantas especies, siendo *Chlamydomonas reinhardtii* la más empleada en el laboratorio.

Chlamydomonas reinhardtii es un microalga verde eucariota unicelular de agua dulce, que presenta una estructura polar y forma elipsoide, mide cerca de 10 μm de diámetro (con variaciones significativas a través del ciclo celular) (Figuras 1.1 y 1.2), está rodeada por una pared celular rica en hidroxiprolina que se asemeja a las glicoproteínas encontradas ampliamente en las plantas. La pared celular de *C. reinhardtii* no contiene celulosa (Harris, 2001).



Reino: Plantae
División: Chlorophyta
Clase: Chlorophyceae
Orden: Volvocales
Familia: Chlamydomonadaceae
Genero: Chlamydomonas Ehrenberg, 1835
Especie: *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard, 1899

Figura 1.1. Clasificación taxonómica de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Tomado del Sistema Integrado de Información Taxonómica, ITIS por sus siglas en inglés, <http://www.itis.gov/index.html>). Fotografía: Dr. Rodrigo Rivera Solís.

Chlamydomonas reinhardtii es un organismo fotosintético que contiene dos vacuolas contráctiles localizadas en la parte anterior de la célula, tiene múltiples mitocondrias dispersas en el citosol, dos flagelos anteriores de 10 a 12 μm de longitud que le confieren movilidad y un único cloroplasto en forma de copa que ocupa del 40 al 60% del volumen celular y que rodea al núcleo (Rochaix, 1995). Otra estructura de importancia es la

mancha ocular, rica en carotenos y que se cree que está encargada de percibir y dirigir la luz hacia el fotorreceptor verdadero de la microalga (Figura 1.2) (Merchant *et al.*, 2007).

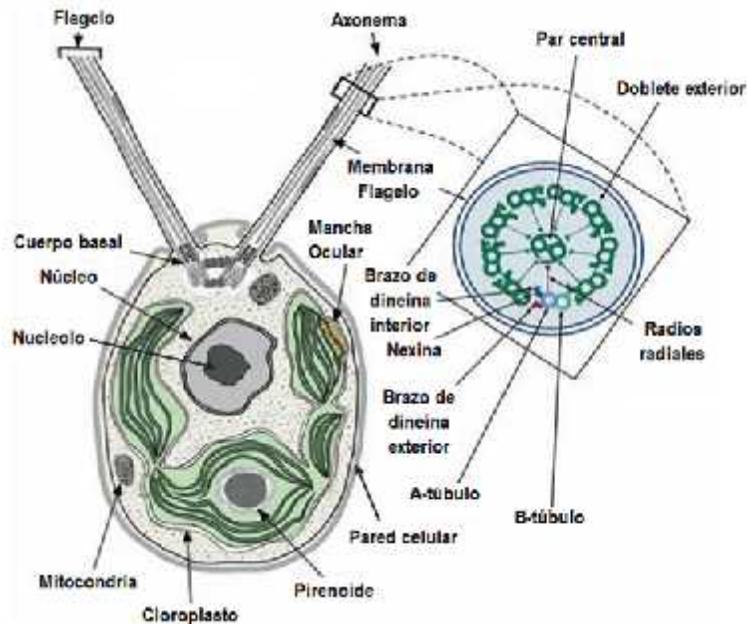


Figura 1.2. Esquema general de la estructura celular de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Tomado de Merchant *et al.*, 2007).

En condiciones de oscuridad y heterotrofia es capaz de ensamblar correctamente sus complejos fotosintéticos y crecer empleando acetato como fuente alternativa de carbono, el cual es asimilado por la ruta del glioxilato (Harris, 2001). Por tanto, esta microalga puede crecer rápidamente fotoautotrófica o heterotróficamente, lo que ha permitido el estudio de numerosas mutantes fotosintéticas y se considera un organismo modelo para el estudio de la fotosíntesis (Nickelsen y Kuck, 2000).

1.2.2 C. reinhardtii como modelo de estudio del metabolismo del glicerol y lípidos

Chlamydomonas reinhardtii es un organismo eucariota fácilmente cultivable a un costo económico, sus células crecen rápidamente presentando un ciclo biológico haplo-diploide. Es una microalga viable para cultivarse a gran escala y es fácil de transformar y manipular por medio de ingeniería genética. Comparadas con las plantas terrestres, las microalgas

como *C. reinhardtii* crecen a velocidades superiores, duplicando su material celular por división vegetativa en tan sólo 8 h a un régimen de 12 h de luz / 12 h de oscuridad. Por ejemplo, en la producción de proteínas recombinantes usando a *C. reinhardtii* como biorreactor, el tiempo necesario desde la transformación genética inicial hasta la evaluación de la proteína recombinante, se reduce significativamente con respecto a las plantas, ya que se requiere de tan sólo seis semanas para evaluar la producción de proteínas *in vitro*, y de unos pocos meses para un escalamiento de hasta 1,000 litros (Fletcher *et al.*, 2007).

Esta microalga constituye un modelo muy usado en el mundo de la biología celular de eucariotas, ha sido utilizada como un organismo modelo experimental para analizar detalladamente procesos fisiológicos, bioquímicos y moleculares tales como la fotosíntesis, la síntesis y movilidad de flagelos, el metabolismo respiratorio, el estrés causado por minerales y el desarrollo del cloroplasto y mitocondrias (Gutman y Niyogi, 2004). También, ha demostrado ser un sistema apropiado para el estudio de sobre expresión de genes (Siripornadulsil *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2004), así como para estudios de inducción génica (Schroda *et al.*, 2002; Shrager *et al.*, 2003). Además, es un organismo adecuado para estudiar los efectos de estrés ante estímulos bióticos y abióticos a nivel transcripcional y post-transcripcional; un ejemplo de esto es el estudio realizado por Lilly *et al.* (2002).

Es el único organismo para el que se han desarrollado técnicas de transformación genética para sus tres genomas (nuclear, cloroplastidial y mitocondrial). De hecho, *C. reinhardtii* fue el primer organismo en el que se logró una transformación estable del genoma del cloroplasto (Boynton *et al.*, 1988) y el primer eucariota fotosintético en el que se transformó el genoma mitocondrial (Randolph-Anderson *et al.*, 1993). La transformación nuclear con la técnica de perlas de vidrio es también bastante efectiva, donde la frecuencia de la transformación obtenida se eleva cuando la pared celular es removida antes de la transformación. En la transformación nuclear, la integración del ADN tiene lugar el 99% de los casos mediante inserción en secuencias aleatorias no homólogas (Lefebvre, 1999; Prieto *et al.*, 1996), esto ha sido aprovechado para el desarrollo de sistemas de mutagénesis insercional y permite la clonación de cualquier gen afectado.

El primer genoma de *C. reinhardtii* en ser secuenciado fue el de la mitocondria, el cual es un genoma lineal y mide aproximadamente 15.8 Kpb (Gray y Boer, 1988; Michaelis *et al.*, 1990). El proyecto del genoma *Chlamydomonas* presenta la secuencia completa del genoma del cloroplasto, el cual mide aproximadamente 204 Kpb (Maul *et al.*, 2002). Recientemente se presentó la totalidad de su genoma nuclear, el cual mide aproximadamente 121 Mb (Merchant *et al.*, 2007; Instituto Conjunto del Genoma, <http://www.jgi.doe.gov/chlamy>), y es rico en guaninas (G) y citocininas (C), aproximadamente 62%; este alto contenido de GC puede producir dificultades en la clonación de genes (Harris, 2001). Así mismo, se encuentra información disponible de la secuencia de sus genomas, lo que nos brinda la posibilidad de analizarlo en busca de genes de interés.

Debido al evidente potencial de la manipulación genética de *C. reinhardtii*, se ha desarrollado recientemente un gran número de técnicas para esta especie (Lefebvre y Silflow, 1999). La disponibilidad de cepas mutantes para ciertos lípidos o ácidos grasos ha demostrado ser una poderosa herramienta para la investigación de la función y fisiología de glicerol y lípidos. Por ello, durante la década pasada, estudios realizados con cepas de *C. reinhardtii* mutantes en el ácido graso Δ^3 -*trans*-hexadecenoico conteniendo fosfatidilglicerol permitieron el progreso para el entendimiento de la función específica de los lípidos en la membrana de los tilacoides (Pineau *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2003). Además, la cepa *hf-9* de *C. reinhardtii*, mutante en la biosíntesis de ácidos grasos insaturados en los lípidos del cloroplasto, ha sido empleada para el estudio de la función de bajos niveles de insaturación en tales lípidos con respecto a la tolerancia a altas temperaturas en esta microalga (Sato *et al.*, 1996). *C. reinhardtii* tiene una composición de lípidos única en comparación con las plantas vasculares (Giroud *et al.*, 1988). En particular, los lípidos fosfatidilcolina y fosfatidilserina no están presentes en las membranas, mientras que el lípido de membrana principal en esta microalga es el lípido betaína (Guschina y Harwood, 2006).

Así mismo, se ha sugerido a esta especie como una excelente candidata para usarse en la producción de biodiésel (Morowvat *et al.*, 2009), ya que en el análisis de la composición de ácidos grasos de una especie del género *Chlamydomonas* (*Chlamydomonas sp.* MCCS 026, aislada del suelo de cultivos de arroz en Irán) se identificaron los ésteres

metílicos de los ácidos grasos siguientes: nonanoico (C-9), dodecanoico (C-12), tetradecanoico (C-14), pentadecanoico (C-15), hexadecanoico (C-16), eicosanoico (C-20), heneicosanoico (C-21), docosanoico (C-22) y tetracosanoico (C-24). Esto convierte a *C. reinhardtii* en un buen modelo para estudios del metabolismo de lípidos.

En cuanto a la síntesis de los lípidos de almacenamiento, los triacilglicéridos (TAGs), es precisamente en *C. reinhardtii* donde se realiza la primera investigación y se propone una ruta hipotética de síntesis de TAGs (Figura 1.3) (Greenwell *et al.*, 2010; Riekhof *et al.*, 2005; Ohlrogge y Jawoieski, 1997). Esta propuesta concuerda con el primer estudio realizado por Fan *et al.* (2011), en donde se supone que la microalga *C. reinhardtii* puede desarrollar, además de la ruta de síntesis de TAGs en el citosol, una ruta de síntesis de TAGs en el cloroplasto.

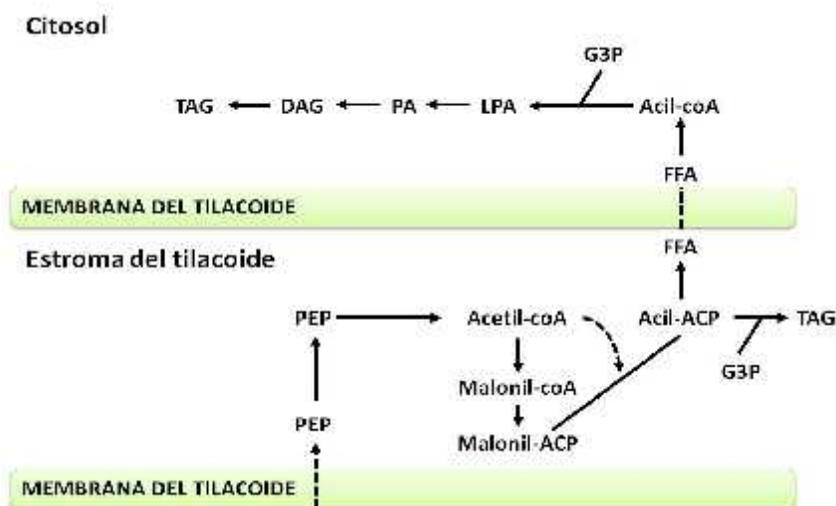


Figura 1.3. Ruta de síntesis hipotética de triacilglicéridos en *C. reinhardtii* y supuestas localizaciones (modificado de Greenwell *et al.*, 2010). Donde: TAG = Triacilglicérido, DAG = Diacilglicérido, PA = Ácido fosfatídico, LPA = Ácido lisofosfatídico, G3P = Glicerol-3-fosfato, CoA = Coenzima A, FFA = Ácidos grasos libres, ACP = Proteína acarreadora de grupos acilo y PEP = Fosfoenolpiruvato.

Los lípidos de microalgas son de gran interés porque contienen triacilglicéridos (TAGs) que pueden ser transesterificados usando tecnología convencional para la producción de estéres metílicos (biodiésel) o procesados mediante la técnica de hidrocrqueo catalítico

para producir bioqueroseno (bioturbosina). En cuanto a esto, se ha mencionado que *C. reinhardtii* contiene el 21% de lípidos del peso seco (Singh *et al.*, 2010). En cuanto a esto, Contreras-Pool (2010), como parte de sus estudios de maestría en nuestro grupo de investigación, encontró que *C. reinhardtii* contiene aproximadamente 57% de lípidos de su peso seco, los cuales están presentes en su mayoría como triacilglicéridos y los ácidos grasos saturados de 16 y 18 carbonos integran una gran parte de estos lípidos en la microalga (Tatsuzawa *et al.*, 1996; Contreras-Pool, 2010).

1.2.3 Ventajas de las microalgas como materia prima en la producción de glicerol y biocombustibles

Las microalgas presentan un gran potencial para la producción de glicerol y biocombustibles, ya que son organismos fotosintéticos capaces de acumular grandes cantidades de lípidos de acuerdo a las condiciones de cultivo, y este cultivo podría realizarse en áreas marginales, evitando competir con el espacio destinado para la producción de alimentos (Schenk *et al.*, 2008; Gouveia y Oliveira, 2009).

La bioturbosina y el biodiésel son biocombustibles obtenidos principalmente a partir de aceites vegetales, tales como las semillas de girasol, palma aceitera, cocotero, soya, canola y *Jatropha curcas*. Sin embargo, estos cultivos requieren de grandes extensiones de tierra, así como grandes cantidades de agua para el riego, y debido a que son cultivos perennes y tienen un ciclo de vida largo, la extracción de lípidos es limitada. Si comparamos estos cultivos con las microalgas, se puede notar que las microalgas presentan varias ventajas sobre los cultivos de plantas superiores como fuente de materia prima para los biocombustibles. Las microalgas, gracias a su simplicidad estructural, tienen una eficacia fotosintética y potencial de crecimiento claramente superior a las plantas. Además, pueden ser cultivadas todo el año y cosechadas continuamente. Se pueden utilizar contenedores cerrados (fotobiorreactores) para su cultivo en tierras marginales (por ejemplo, el desierto y las zonas áridas y semiáridas) que no son aptos para la agricultura. Una ventaja adicional, es que en su cultivo se puede aprovechar el agua de ambientes salinos e hipersalinos, de baja calidad de nutrientes o aguas residuales, que no son buenas para la irrigación agrícola o para el consumo de los seres humanos o animales, lo que aporta un beneficio adicional a la biorremediación de aguas

residuales. Así mismo, tienen la capacidad de secuestrar CO₂, reduciendo de esta forma las emisiones de CO₂, el principal causante del efecto invernadero, de forma rápida y eficiente, ya que por cada Kg de biomasa seca se fijan aproximadamente 1.8 Kg de CO₂ (Khan *et al.*, 2009).

La bioturbosina se obtiene a partir de los TAGs y ácidos grasos libres presentes en las semillas de las plantas o en los cuerpos lipídicos de las microalgas, los cuales son sometidos a un proceso de hidro craqueo selectivo (*selective hydrocracking*) (Figura 1.4).

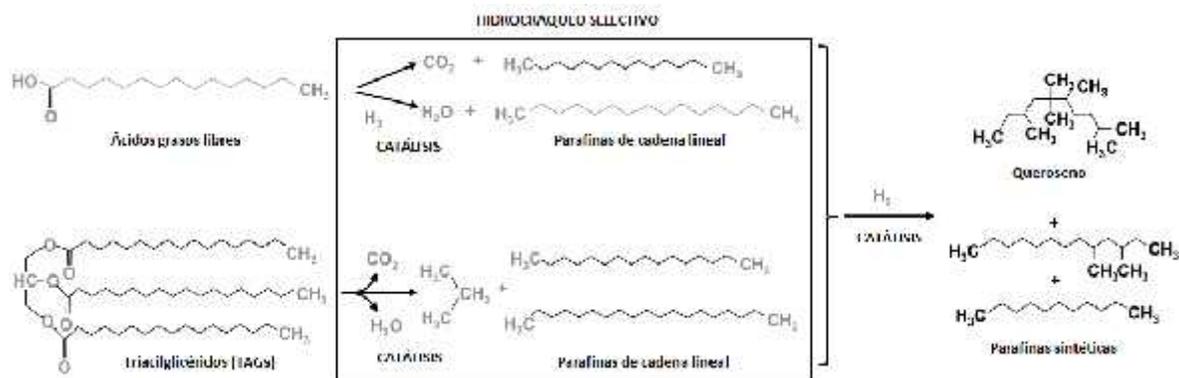


Figura 1.4. Reacción de hidro craqueo selectivo (Beginner's Guide to Aviation Biofuels, 2009).

En cuanto al biodiésel, este puede producirse mediante el proceso químico de transesterificación, también llamado alcoholisis, que es la reacción de una grasa, triacilglicérido o un aceite con un alcohol produciendo los correspondientes ésteres metílicos de ácidos grasos y glicerol (Figura 1.5) (Durret *et al.*, 2008).

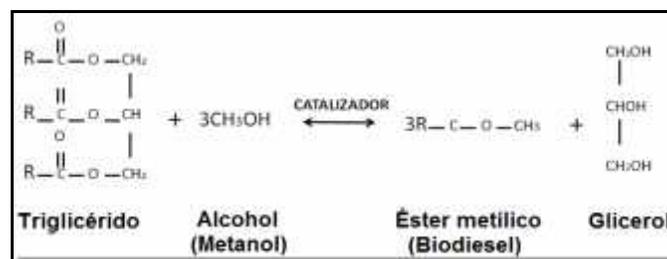


Figura 1.5. Reacción de transesterificación de lípidos para la formación de biodiésel (Chisti, 2007).

Las microalgas pueden sintetizar y acumular grandes cantidades de lípidos/aceites neutros (20-50% del peso seco celular), principalmente en forma de TAGs, bajo condiciones ambientales desfavorables o de estrés; además, presentan altos índices de crecimiento (1-3 duplicaciones por día) lo que se traduce en mayor biomasa (Khan *et al.*, 2009). Si se utilizaran microalgas capaces de acumular grandes cantidades de lípidos para cubrir la demanda mundial anual de petróleo, en teoría, se necesitaría solamente el 0.1% del área mundial (Cuadro 1.1) (Chisti, 2007). Es por ello que actualmente existen esfuerzos en investigación en varias partes del mundo dirigidas al uso de las microalgas para la producción de biodiésel.

Cuadro 1.1. Comparación de algunas materias primas para la elaboración de biodiésel.

Materia prima	Biodiésel (L/ha/año)	Área requerida como % de la tierra mundial	Área requerida como % de la tierra cultivable mundial
Algodón	325	100.7	756.9
Soya	446	73.4	551.6
Grano de mostaza	572	57.2	430.1
Girasol	952	34.4	258.4
Canola	1,190	27.5	206.7
<i>Jatropha</i> sp.	1,892	17.3	130 (0 ^a)
Cocotero	2,399	11.0	54.0
Palma aceitera	5,950	5.5	41.3
Microalga (10 gm ⁻² día ⁻¹ con 30% TAG)	12,000	2.7	20.5 (0 ^b)
Microalga (50 gm ⁻² día ⁻¹ con 50% TAG)	98,500	0.3	2.5 (0 ^b)
Microalga (50 gm ⁻² día ⁻¹ con 70% TAG)	136,900	0.1	0.83 (0 ^b)

^a*Jatropha* sp. se cultiva principalmente en tierras marginales; ^bAsumiendo que los estanques y biorreactores de microalgas se encuentran en la tierra no cultivable (Schenk, 2008; Chisti, 2007).

El glicerol, comúnmente llamado glicerina, es un polihidroxi alcohol ampliamente utilizado en las industrias química, farmacéutica y cosmética en virtud de sus propiedades humectante, antisépticas, hidrocópicas y espesantes. Es el principal subproducto en la producción de biodiésel, aproximadamente 10% en peso del aceite (Figura 1.5). Tomando

en consideración el aumento del precio de las materias primas utilizadas tradicionalmente para la obtención del glicerol, resulta interesante la búsqueda de nuevas y variadas fuentes (Antonini *et al.*, 2010). En este sentido, el perfil lipídico de las microalgas se caracteriza por la presencia de cantidades apreciables de lípidos neutros, principalmente glicéridos, que representan una fuente potencial de glicerol, además se ha reportado la existencia de glicerol libre en las células de un número considerable de especies (Hernández *et al.*, 2000). La microalga marina *D. salina* contiene cantidades significativas de glicerol, que pueden incrementarse en respuesta a un aumento de la presión osmótica externa (Hernández *et al.*, 2000). Y, en nuestro modelo de estudio, la microalga verde de agua dulce *C. reinhardtii*, se ha observado la síntesis de glicerol en forma continua durante condiciones de estrés osmótico (León y Galván, 1994).

1.2.4 Estrés osmótico y su relación con la síntesis de glicerol y lípidos

En levaduras se ha observado que para responder a ambientes osmóticos extremos las células acumulan glicerol para compensar las diferencias de potencial hídrico extra e intracelular. Sin embargo, no todos los organismos tienen la capacidad natural de sintetizar glicerol. Se conoce que algunas especies de bacterias, levaduras y algas producen glicerol. La bacteria *Bacillus licheniformis* y *Lactobacillus lycopersica* sintetizan glicerol, igualmente varias levaduras osmotolerantes como *S. cerevisiae* y *Debaromyces hansenii* (Albertyn *et al.*, 1994).

Diversos estudios han demostrado que el contenido de glicerol en las microalgas aumenta cuando éstas son sometidas a condiciones de estrés osmótico, ya que el glicerol funciona como un osmorregulador (Cruz *et al.*, 2001; Ahmado y Hellebust, 1986; Husic y Tolbert, 1986). Sustancias como NaCl y KCl en altas concentraciones (50 a 200 mM, dependiendo de la especie de microalga) en el medio de cultivo causan estrés, haciendo que se produzca un efecto inhibitorio en el metabolismo fotosintético, lo cual reduce los niveles de almidón, fosfatos, lactatos y glicolato, pero causan un aumento del glicerol intracelular y en el medio de cultivo. Otros estudios como el realizado por Takagi *et al.* (2006) indican que no sólo el contenido de glicerol aumenta al someter a las microalgas del género *Dunaliella* a estrés osmótico, sino también el contenido de los lípidos, lo cual podría deberse a que el estrés osmótico causa un aumento en la producción de glicerol en las

microalgas para mantener el balance osmótico intra y extra celular. Como el glicerol es el precursor de los triacilglicéridos, probablemente parte de este glicerol producido de más se sintetiza como triacilglicérido causando un aumento en la producción de éstos.

Lo anterior concuerda con el incremento de lípidos observado en la microalga verde *C. reinhardtii* después de la exposición a 100 mM de NaCl por 48 h (Siaut *et al.*, 2011) y el incremento de lípidos observado en la microalga verde *C. saccharophila* después de la exposición a 150 mM de NaCl por 24 h (Herrera-Valencia *et al.*, 2011). Además, se ha reportado que las microalgas *C. reinhardtii* y *Dunaliella* sintetizan glicerol como soluto osmorregulador cuando se encuentran bajo condiciones de estrés salino (León y Galván, 1994; Avron, 1986), por lo que el glicerol podría estar desempeñando un papel clave en el incremento de lípidos en estas microalgas. La acumulación de glicerol como soluto osmorregulador ante concentraciones extremas de salinidad ha sido reportada también en algunas algas verdes halófilas donde se incluyen *Dunaliella*, *Zooxanthellae*, *Asteromonas* y algunas especies halotolerantes de *Chlamydomonas* (Ben-Amotz *et al.*, 1973). La halotolerancia es un concepto que se refiere a la adaptación de organismos a la salinidad. Los microorganismos halófilos se distinguen o clasifican por el requerimiento de condiciones hipersalinas para su crecimiento: los halófilos ligeros muestran crecimiento óptimo dentro de una concentración de NaCl que oscila entre 0.2 y 0.85 M (2-5%); los halófilos moderados, crecen entre 0.85 y 3.4 M (5-20%) de NaCl, y por último, los halófilos extremos, que crecen de 3.4 a 5.1 M (20-30%) de NaCl (González-Hernández y Peña, 2002). En contraste, los organismos no halófilos sólo pueden crecer por debajo de 0.2 M de NaCl. Los organismos halotolerantes son aquellos que pueden crecer en presencia y en ausencia de altas concentraciones de sal. Muchos organismos halófilos y halotolerantes pueden crecer dentro de un amplio margen de concentración de sal, con requerimiento o tolerancia para algunas sales, dependiendo del medio y de los factores nutricionales (González-Hernández y Peña, 2002).

1.2.5 Función de la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa en la síntesis de glicerol y lípidos en microalgas

La enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) dependiente de NAD⁺ es la encargada de catalizar la reducción de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y NADH

(dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma reducida) a glicerol-3-fosfato (G3P) y NAD^+ (dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma oxidada) (Ansell *et al.*, 1997), que puede ser posteriormente defosforilada a glicerol por la acción de la glicerol fosfatasa (GPP) (Hohmann, 2002). Así mismo, la enzima GPDH es también capaz de llevar a cabo la reacción reversible mediante la oxidación del G3P a DHAP utilizando NAD^+ como aceptor de electrones (Figura 1.6) (EC 1.1.1.8).

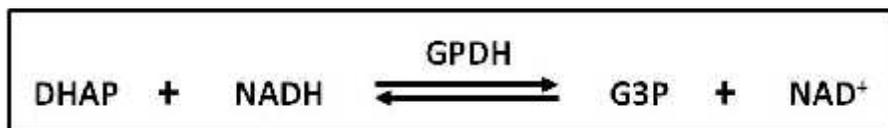


Figura 1.6. Reacción catalizada por la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH).

Se conoce como deshidrogenasas a aquellas enzimas capaces de catalizar tanto la oxidación como la reducción de un sustrato por sustracción o adición de dos átomos de hidrógeno (deshidrogenación), empleando un par de coenzimas que actúan como aceptores o como donadores de electrones y protones (NADH o NAD^+). Sin embargo, la enzima GPDH es también conocida como dihidroxiacetona reductasa en plantas, ya que se ha observado que a un pH fisiológico es esencialmente inactiva como deshidrogenasa, es decir, únicamente es capaz de catalizar la reacción de reducción del DHAP a G3P utilizando a NADH como donador de electrones.

El papel biosintético de la GPDH en las bacterias fue establecido *in vivo* mediante el aislamiento de cepas de *Escherichia coli* auxótrofas mutantes deficientes en la actividad para sintetizar glicerol y G3P (Clark, 1980). Además, el G3P, producto de la reacción catalizada por la GPDH, es precursor de la síntesis de todos los tipos de lípidos compuestos de glicerol, incluyendo los lípidos de membrana y almacenaje.

La enzima GPDH además de ser esencial en la biosíntesis de lípidos, tiene un papel muy importante en el mantenimiento del estado redox en la célula, a través del consumo de NADH y regeneración de NAD^+ . Así mismo, la tasa de NAD^+/NADH juega un papel esencial de reserva y como portador de la reducción de equivalentes en las reacciones

celulares de rédox. Para que se puedan llevar a cabo las reacciones catabólicas, la tasa de NAD^+/NADH debe ser elevada. Bajo condiciones aeróbicas normales, el exceso de NADH es canalizado dentro de la mitocondria y consumido a través de la respiración. Bajo condiciones anaerobias, las reacciones de GPDH sirven como una válvula rédox para disponer de energía adicional. De esta manera, la tasa de NAD^+/NADH puede ser mantenida permitiendo que los procesos metabólicos se lleven a cabo (Nandi *et al.*, 2004).

En las células de plantas vasculares se han observado al menos dos isoformas de la enzima GPDH, una localizada en los plástidos y otra localizada en el citosol (Gee *et al.*, 1988). Uno de los primeros descubrimientos de la actividad de la enzima GPDH en plantas se llevó a cabo en las hojas de espinaca (*Spinacia oleracea L.*), la cual presentó un peso molecular de 63.5 KDa y el pH óptimo entre 6.8 y 9.5 para la reducción de la DHAP (Santora *et al.*, 1979). Adicionalmente se han detectado enzimas GPDH en otras plantas como el chícharo, maíz y soja (Gee *et al.*, 1988). También se detectó la actividad GPDH en las semillas de *B. campestris* (Sharma *et al.*, 2001).

En cuanto a las microalgas, se han aislado y purificado enzimas GPDH en las microalgas *Dunaliella tertiolecta* (Gee *et al.*, 1993) y *D. parva* (Gimmler y Lotter, 1982). En la microalga verde *D. tertiolecta* se encontraron tres isoformas de la enzima GPDH: dos isoformas principales en los cloroplastos y la tercera isoforma en menor proporción en el citosol (Ghoshal *et al.*, 2002). Se ha visto que una de las isoformas del cloroplasto presenta mayor actividad cuando la célula crece bajo concentraciones elevadas de cloruro de sodio (NaCl) y parece estar involucrada en la síntesis de glicerol. La segunda isoforma del cloroplasto incrementa su actividad específicamente cuando incrementa la presencia de fosfato inorgánico y desempeña una función en la estimulación del crecimiento celular y la síntesis de glicéridos. Además, esta isoforma posee propiedades similares a las isoformas del cloroplasto identificadas en las plantas. La isoforma del citosol tiene características similares a la isoforma citosólica localizada en las hojas de la espinaca (Gee *et al.*, 1988). Las isoformas de la GPDH en microalgas son designadas de acuerdo al perfil de elución, localización y características de la siguiente manera:

- La isoforma osmorreguladora presente en el cloroplasto es la que se estimula bajo condiciones de estrés salino y no presenta las mismas propiedades que la GPDH de cloroplasto de las plantas.
- La isoforma glicérido en el cloroplasto es la que se encuentra activa durante el crecimiento de las microalgas, y se inhibe en presencia de detergentes, lípidos y NaCl.
- La isoforma glicérido del citosol no aumenta su actividad en condiciones de estrés salino, y es la que se encuentra en menor proporción tanto en microalgas como en plantas.

En la microalga verde *C. reinhardtii*, Klöck y Kreuzberg (1989) identificaron y purificaron una enzima GPDH del cloroplasto cuya actividad probablemente está regulada *in vivo* por el pH y la tasa de NAD⁺/NADH. Esta GPDH mostró un pH óptimo de reducción de la DHAP de 6.8 y una pérdida de más del 80% en su actividad cuando el pH se incrementaba a 7.0 y 8.0. Además, en oscuridad a un pH de 7.0 y con bajo contenido de ATP y NADH, la actividad de la enzima no fue suficiente para la producción de glicerol-3-fosfato. Esta dependencia de pH también se ha encontrado en las plantas y en la microalga *D. tertiolecta*.

Por otro lado, la enzima GPDH desempeña un papel muy importante en la adaptación al estrés osmótico y la salinidad en la levadura *S. cerevisiae*. Esta respuesta al estrés osmótico y salinidad se da a través de la síntesis de glicerol (Hirayama *et al.*, 1995), el cual es conocido como un soluto osmoprotector y se produce a través de la desfosforilación del G3P, reacción catalizada por una enzima glicerol fosfatasa. Dentro del grupo de las microalgas, *Dunaliella sp.* ha sido una de las microalgas mejor estudiadas en lo que se refiere a mecanismos de tolerancia a salinidad y acumulación de glicerol (Cowan *et al.*, 1992). Esta microalga halotolerante carece de pared celular y tiene gran capacidad para adaptarse a cambios en la salinidad mediante la síntesis o eliminación de glicerol, siendo capaz de tolerar concentraciones salinas de hasta 5 M acumulando glicerol hasta concentraciones intracelulares cercanas a 7 M (Ben-Amotz y Avron, 1981). Su respuesta al aumento en la presión osmótica extracelular se lleva a cabo en dos fases: en una primera fase las células se contraen rápidamente y en la segunda fase, que dura de 2 a 3 h, tiene lugar la síntesis de glicerol y la consecuente recuperación del volumen

original (Bental *et al.*, 1990). Al desaparecer la alta presión osmótica exterior el glicerol acumulado se degrada convirtiéndose en almidón.

En *Dunaliella sp.* se han identificado varias enzimas implicadas en el metabolismo del glicerol y se ha propuesto un “ciclo de glicerol” basado en estas enzimas (Ben-Amozt y Avron, 1990; Liska *et al.*, 2004). En la Figura 1.7 se puede observar que la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) producida por la degradación del almidón o la asimilación fotosintética del CO₂ es transformada en glicerol-3-fosfato en el cloroplasto por la GPDH y después el glicerol-3-fosfato es exportado al citoplasma y transformado en glicerol por medio de la glicerol fosfato fosfatasa (GPP).



Figura 1.7. Representación esquemática del metabolismo del glicerol en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* (León, 1997).

La osmoregulación en las algas halotolerantes ha sido bien estudiada, pero no se puede decir lo mismo sobre la respuesta al estrés salino de algas susceptibles a la salinidad. Este es el caso del alga no halotolerante de agua dulce *C. reinhardtii*. Entre los escasos datos conocidos sobre esta alga se sabe que puede tolerar concentraciones salinas de hasta 200 mM de NaCl usando glicerol como osmolito regulador (Leon y Galván, 1994).

1.2.6 Metabolismo de los lípidos en las microalgas verdes

La ruta de biosíntesis de ácidos grasos y triacilglicéridos (TAGs) ha sido muy poco estudiada en microalgas en comparación con las plantas vasculares. Sin embargo, comparten algunas características bioquímicas, como el número de genes y/o enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos, lo que hace suponer que la ruta básica de los ácidos grasos y de la biosíntesis de TAGs en microalgas es directamente análoga a las rutas seguidas en plantas vasculares (Hu *et al.*, 2008).

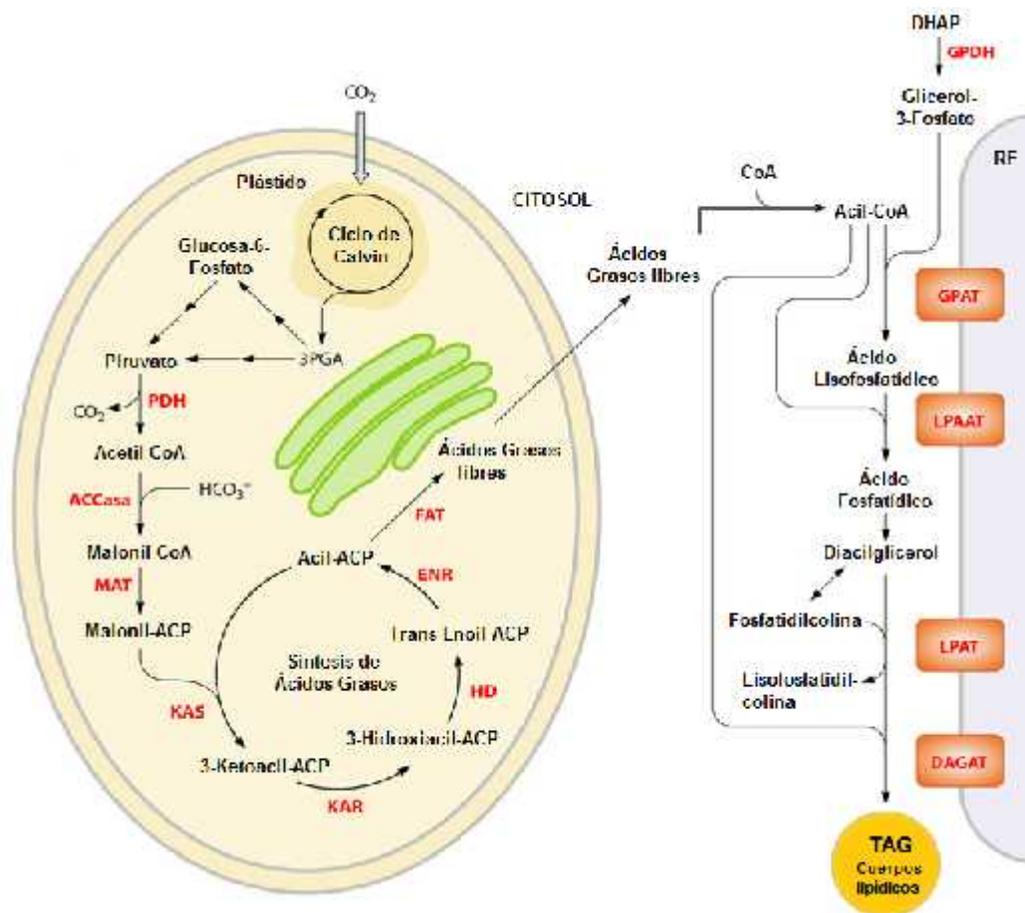


Figura 1.8. Ruta de biosíntesis de los ácidos grasos en el cloroplasto y de la ruta de biosíntesis de triacilglicéridos propuesta para microalgas (Radakovits *et al.*, 2010).

La ruta de biosíntesis de ácidos grasos en microalgas ocurre principalmente en el cloroplasto (Figuras 1.8 y 1.9). Esta ruta produce ácidos grasos de 16 C o 18 C o ambos,

los cuales, son usados como precursores para la síntesis de lípidos neutros, principalmente TAGs, los cuales se acumulan en el cloroplasto y otras membranas celulares bajo condiciones ambientales adversas o condiciones limitantes de cultivo (Hu *et al.*, 2008; Radakovits *et al.*, 2010).

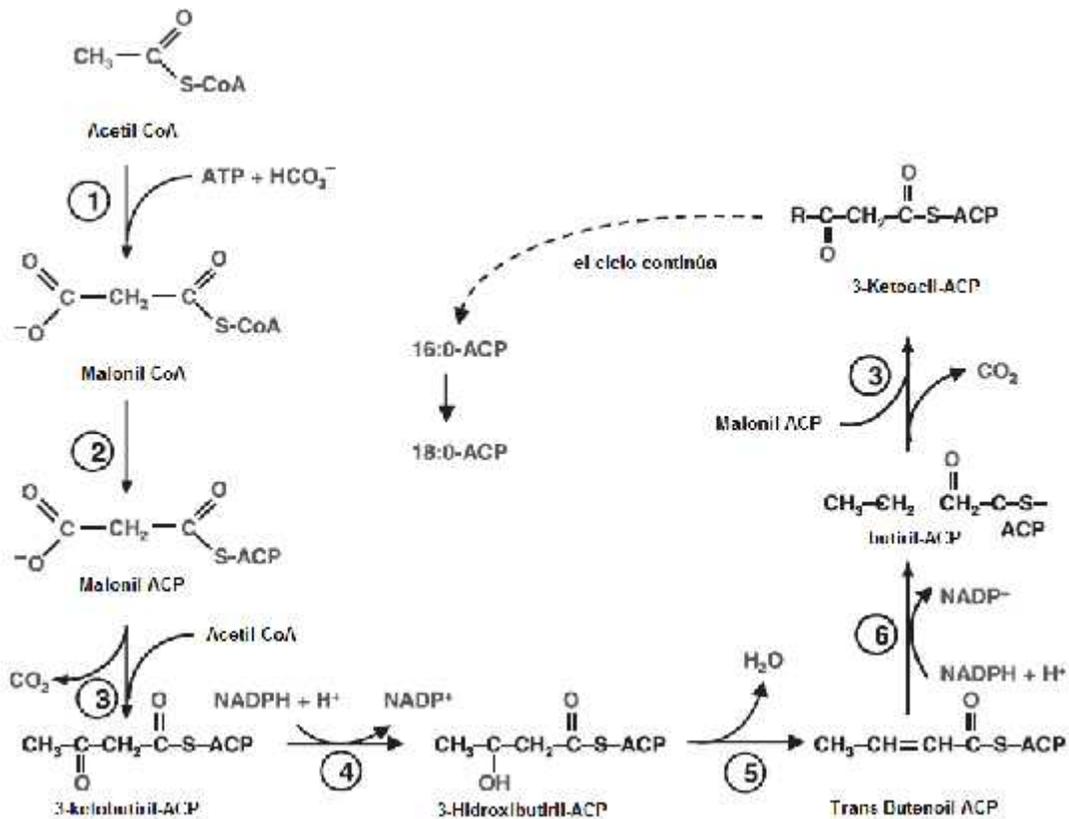


Figura 1.9. Ruta de síntesis de los ácidos grasos en el cloroplasto. Enzimas: (1) Acetil-CoA carboxilasa; (2) Malonil-CoA: ACP transferasa; (3) Ketoacil-ACP reductasa; (4) Ketobutiril-ACP reductasa; (5) 3- Hidroxibutiril-ACP deshidrasa; (6) Enoil-ACP reductasa (Hu *et al.*, 2008).

En cuanto a la ruta de biosíntesis de los TAGs en microalgas, se ha propuesto que ocurre por medio de la vía directa del metabolismo del glicerol (Figuras 1.8 y 1.10) (Radakovits *et al.*, 2011; Ratledge, 1988), en la cual los ácidos grasos producidos en el cloroplasto son activados por la enzima acetil-CoA, exportados del cloroplasto y posteriormente usados en los pasos de acilación al esqueleto del glicerol-3-fosfato para sintetizar TAGs en el retículo endoplásmico (Vigeolas *et al.*, 2007).

En la Figura 1.10 se presenta un esquema simplificado de la ruta de biosíntesis de TAGs, en donde se puede observar que el primer paso es la formación del ácido fosfatídico (PA), para lo cual es necesario que los ácidos grasos producidos en el cloroplasto sean secuencialmente transferidos de CoA (coenzima A) a las posiciones 1 y 2 del glicerol-3-fosfato. La desfosforilación del PA es catalizada por una fosfatasa específica que forma diacilglicerol (DAG) (Ohlrogge y Jaworski, 1997). En la etapa final de la síntesis de TAGs, un tercer ácido graso es transferido a la posición 3 restante del DAG, y esta reacción es catalizada por la diacilglicerol acil transferasa para formar TAGs.

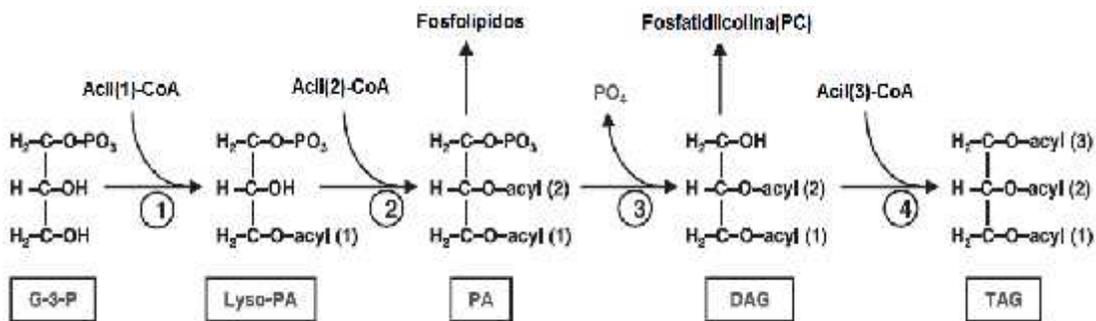


Figura 1. 10. Esquema simplificado de la ruta propuesta de biosíntesis de triacilglicéridos en microalgas. Enzimas: (1) Glicerol-3-fosfato acil transferasa citosólica; (2) Ácido lisofosfatídico acil transferasa; (3) Ácido fosfatídico fosfatasa; (4) Diacilglicerol acil transferasa (Hu *et al.*, 2008).

Aunque en general la ruta de síntesis de ácidos grasos y TAGs es similar entre plantas y microalgas, existe evidencia de diferencias en como ocurre el metabolismo de los lípidos. En las microalgas por ejemplo, la ruta completa desde la fijación del CO₂ hasta la síntesis y acumulación de TAGs se lleva a cabo en una sola célula, mientras que en las plantas la síntesis y la acumulación de TAGs ocurre en tejidos u órganos específicos, por ejemplo: semillas o frutos (Hu *et al.*, 2008). Así mismo, los TAGs después de ser sintetizados son depositados en cuerpos lipídicos densamente empaquetados localizados en el citoplasma de la célula de microalgas, aunque la formación y acumulación de los cuerpos lipídicos también se puede llevar a cabo en el espacio entre los tilacoides del cloroplasto en algunas microalgas verdes, como es el caso de *D. bardawil* (Ben-Amotz *et al.*, 1989). En este último caso los cuerpos lipídicos se conocen como plastoglóbulos.

Por otro lado, el entendimiento del metabolismo lipídico es uno de los principales retos para la producción de biocombustibles. La cantidad y calidad de los precursores de los biocombustibles, en particular del biodiésel, dependen no sólo de la materia prima que se utilice, sino también del control que se tenga sobre el metabolismo lipídico. A diferencia de las plantas vasculares en las microalgas se conoce poco acerca de la biosíntesis y catabolismo de lípidos. Sin embargo, muchos de los genes involucrados en el metabolismo lipídico de plantas vasculares presentan genes homólogos en los genomas de microalgas secuenciados. Tomando ventaja de los genomas secuenciados y las herramientas moleculares disponibles para las microalgas, existe la posibilidad de que a través de la ingeniería genética se puedan realizar modificaciones con el objetivo de incrementar la producción de biocombustibles (Radakovits *et al.*, 2011).

En cuanto a lo anterior, en los últimos años se han diseñado estrategias encaminadas a estudiar a los genes involucrados en la ruta de síntesis de lípidos, con la finalidad de conocer su importancia en la acumulación de lípidos y establecer estrategias para incrementar su contenido en las plantas. En plantas vasculares, como *Arabidopsis thaliana* y *B. napus*, varias estrategias de sobre expresión de genes asociados a la ruta de triacilglicéridos han resultado en un incremento en la producción de TAGs en semillas y otros tejidos (Jako *et al.*, 2001; Vigeolas *et al.*, 2007). Ohlrogge y Jaworski (1997) propusieron que la ruta de los ácidos grasos regula la síntesis de lípidos, por lo cual se han realizado muchos trabajos encaminados a incrementar la expresión de enzimas involucradas en la ruta de síntesis de ácidos grasos. Uno de los primeros pasos en la síntesis de ácidos grasos es la conversión de acetil-CoA (CoA) en malonil-CoA, reacción catalizada por la acetil-CoA carboxilasa (ACCase). Sin embargo, la sobre expresión de la ACCase para incrementar el contenido de lípidos en varios sistemas no ha tenido resultados significativos, ya que al parecer la síntesis de ácidos grasos no es una limitante (Thelen y Ohlrogge, 2002; Roesler *et al.*, 1997; Rosenberg *et al.*, 2008).

A pesar de que el incremento en la expresión de genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos ha sido poco exitoso, se han observado resultados interesantes al sobre expresar algunos de los genes involucrados en el ensamblaje de TAGs. En cuanto a esto, la sobre expresión del ácido fosfatídico (LPAT) y diacilglicerol acil transferasa (DAGAT) (Taylor *et al.*, 2002; Jako *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 1997) mostró que el último paso de la

acilación al esqueleto de glicerol ejercía un control importante sobre el flujo de lípidos. También se ha investigado la importancia del glicerol-3-fosfato, el segundo sustrato requerido para la formación de TAGs. Así, el estudio realizado por Vigeolas *et al.* (2004) presentó evidencia de que la disponibilidad de glicerol-3-fosfato co-limita la tasa de síntesis de TAGs en las semillas de *B. napus*.

Uno de los trabajos más exitosos encaminados al incremento de la cantidad de lípidos fue la sobre expresión del gen *GPD1* que codifica para la enzima GPDH de levadura (*S. cerevisiae*) expresada en una planta de *B. napus L.* bajo el control de un promotor específico de semilla, esto resultó en un incremento del doble en la actividad de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, un aumento de 3 a 4 veces los niveles de glicerol-3-fosfato y, finalmente, un incremento del 40% en el contenido final de lípidos en la semillas. Además, no se presentó ningún cambio sustancial o alteración en el contenido de la proteína, niveles de sacarosa u otros metabolitos de la ruta de formación de TAGs desde los azúcares hasta los ácidos grasos. Este incremento estuvo acompañado de un decremento del precursor directo de la GPDH, la dihidroxiacetona fosfato (DHAP). Estos resultados sugieren que la disponibilidad de glicerol-3-fosfato limita la acumulación de lípidos en las semillas (Vigeolas *et al.*, 2007).

Adicionalmente, se han realizado trabajos encaminados al incremento del contenido lipídico en la microalga *C. reinhardtii* mediante la privación de nitrógeno (Li *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009), en los cuales se observó que después de haber entrado a la fase estacionaria en cultivo líquido, las células produjeron abundantes cuerpos lipídicos citoplasmáticos (LBs) así como abundante almidón. Después de 48 h de privación de nitrógeno en presencia de acetato como fuente de carbono, el contenido de LB en *C. reinhardtii* se incrementó hasta 15 veces más. Además, se observó que al bloquear la biosíntesis de almidón el contenido de LB incrementaba hasta 30 veces, demostrando que el bloqueo de la ruta metabólica del almidón puede mejorar la producción de LBs, lo cual es consistente con los experimentos de inactivación de la ADP-glucopirofosforilasa en una mutante de *C. reinhardtii* en la que se obtuvo un incremento de hasta 10 veces en el contenido de TAGs, sugiriendo que la partición del carbono fotosintético de la síntesis de almidón a TAG puede representar una estrategia para aumentar la producción de TAG. Sin embargo, en el estudio realizado por Siaut *et al.*, (2011), utilizando mutantes

deficientes en la ruta del almidón, se observó que el bloqueo en la síntesis de almidón no presentó un incremento en la acumulación de TAGs, lo que es inconsistente con la hipótesis antes mencionada.

1.2.7 Genes que codifican para la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y su relación con el estrés salino

El papel de las isoenzimas GPDH dependientes de NAD⁺ ha sido ampliamente estudiado en la levadura *S. cerevisiae*, en donde se identificaron dos isogenes (*GPD1* y *GPD2*) que codifican para diferentes enzimas GPDH involucradas en el primer paso de la ruta de producción de glicerol (Ansell *et al.*, 1997; Albertyn *et al.*, 1994). Eriksson *et al.* (1995) observaron que la expresión del gen *GPD1* es inducida por estrés osmótico mientras que el gen *GPD2* se expresa bajo condiciones anaerobias. La expresión de cualquiera de los isogenes resulta de una regulación diferencial. Además, Ansell *et al.* (1997) no produjeron niveles detectables de glicerol al expresar una mutante doble que contenía ambos isogenes (*GPD1 GPD2*), demostrando que la producción de glicerol a través de la enzima GPDH es la única ruta de síntesis de glicerol en *S. cerevisiae*.

Adicionalmente, se ha reportado que la expresión heteróloga de genes tipo *GPDH* en levaduras puede incrementar la producción de glicerol (Watanabe *et al.*, 2004). En el estudio realizado por Watanabe *et al.* (2004) se utilizaron mutantes de *S. cerevisiae* (cepa *GPD1 GPD2*) con los genes glicerol-3-fosfato deshidrogenasa interrumpidos, es decir mutantes susceptibles a la salinidad, a las cuales se le incorporaron los genes *ZrGPD1* y *ZrGCY1* clonados a partir de la levadura *Zigossacharomyces rouxii* que codifican para las enzimas glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y glicerol deshidrogenasa, respectivamente, obteniendo como resultado la producción de glicerol en las células de *S. cerevisiae*, lo cual sugirió que la producción de glicerol depende fuertemente de la actividad de la enzima GPDH (Nevoigt y Stahl, 1996).

Así mismo, se ha demostrado que el flujo de síntesis de glicerol se encuentra regulado principalmente por medio de la actividad del gen *GPD1* (Cronwright *et al.*, 2002; Blomberg y Adler, 1989). El gen *GPD1* codifica para una proteína que contiene dos dominios funcionales; un dominio de unión de co-enzima en el extremo N-terminal y el dominio

catalítico (Otto *et al.*, 1980). El dominio de unión de NAD⁺ se encuentra subdividido en dos regiones, una asociada al anillo de adenina que contiene el motivo conservado GXGXXG (donde la X denota cualquier aminoácido), y otro motivo para el anillo de nicotinamina.

En cuanto a la expresión génica, se observó que altas concentraciones de sal inducen la expresión del gen *GPD1* pero no la expresión del gen *GPD2* (Eriksson *et al.*, 1995; Albertyn *et al.*, 1994). En las investigaciones realizadas por Thomé *et al.* (2004) el nivel de ARNm del gen *GPDH* de *D. hansenii* (*DhGPD*) incrementa durante los primeros 15 min después de la adición de sal. Se sabe que el incremento de osmolaridad al añadir NaCl al medio de cultivo mejora la producción de glicerol en varias especies de levaduras, por lo cual se especula que el estrés salino producido por la adición de NaCl incrementa los niveles del transcrito (Hartlep *et al.*, 2002).

Recientemente se identificaron genes *GPDH* en dos microalgas verdes, *D. salina* y *D. viridis*. En la primera se clonó y caracterizó el gen *DsGPDH2* que codifica para un polipéptido de 701 aminoácidos (He *et al.*, 2007). Basados en los resultados de su expresión, se sugiere que *DsGPDH2* codifica para la isoforma involucrada en la síntesis de glicerol, ya que en condiciones de estrés osmótico se puede inducir la expresión de este gen y la síntesis de glicerol. Además, se sugirió que deben haber al menos dos isoformas (codificadas por diferentes genes) involucradas en la síntesis de glicerol, ya que bajo condiciones de estrés oxidativo la expresión de *DsGPDH2* decreció mientras que la producción de glicerol aumentó (He *et al.*, 2007). *DsGPDH2* mostró una elevada homología con otras *GPDH* dependientes de NAD⁺ publicadas. La proteína para la cual codifica este gen contiene en su extremo N-terminal una secuencia de tránsito al cloroplasto, y mide cerca de 300 aminoácidos más que otras *GPDHs* reportadas previamente en animales, plantas y levaduras (Figura 1.11). Este fragmento de 300 aminoácidos contiene un dominio de fosfoserina fosfatasa, por lo que los autores de este trabajo sugirieron que el dominio de fosfoserina fosfatasa podría funcionar como la glicerol-3-fosfatasa (GPP) y que, consecuentemente, la *GPDH* dependiente de NAD⁺ de *D. salina* catalizaría el paso de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a glicerol directamente. Los autores sugieren esto, ya que tanto la *GPDH* como la GPP son estimuladas con NaCl y tienen un pH óptimo alrededor de 7.0. En otras palabras, el dominio de fosfoserina fosfatasa (SerB) de *DsGPDH2* funcionaría como una glicerol fosfatasa, lo cual nos brinda

una explicación posible para la síntesis rápida de glicerol encontrada en *D. salina* (He *et al.*, 2007). La expresión de *DsGPDH2* se analizó a través de Northern blot, encontrándose que la expresión puede ser significativamente inducida cuando *D. salina* es tratada con concentraciones elevadas de NaCl (3.5 M NaCl).

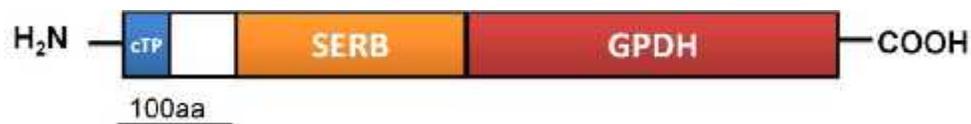


Figura 1.11. Estructura de genes tipo *GPDH* de la microalga *D. salina* (e.g. *DsGPDH2*) (He *et al.* 2007).

En un estudio más reciente se clonaron y caracterizaron dos genes de *D. viridis*, *DvGPDH1* y *DvGPDH2* (He *et al.*, 2009). Estos genes codifican para dos polipéptidos, uno de 695 y otro de 701 aminoácidos, respectivamente, en comparación con las *GPDHs* de plantas vasculares; ambas proteínas contienen un péptido de tránsito al cloroplasto, un dominio extra de fosfoserina fosfatasa (SerB) en su extremo N-terminal además del dominio *GPDH* en su extremo C-terminal (Figura 1.11). Ambas *GPDHs* con presencia de bi-dominios representan nuevos tipos de *GPDHs* y se localizan exclusivamente en el linaje de las clorofitas.

Para investigar la funcionalidad tanto del dominio *GPDH* como del dominio SerB, se realizaron estudios de complementación a los dos genes *DvGPDH1* y *DvGPDH2* con las correspondientes mutantes de *S. cerevisiae* *GPD1* y *SerB* (He *et al.*, 2007). La mutante *GPD1* era incapaz de crecer en un medio con alta salinidad debido a la carencia de actividad de la *GPDH*, y la mutante *SerB* presentaba un fenotipo auxotrófico para serina debido a la carencia de actividad de la SerB. Así mismo, se generaron las líneas *DvGPDH1 N* y *DvGPDH2 N* truncadas en el dominio SerB en el extremo N-terminal y *DvGPDH1 C* y *DvGPDH2 C* truncadas en el dominio *GPDH* en el extremo C-terminal. En el estudio de complementariedad, las mutantes *DvGPDH1 C* y *DvGPDH2 C* pudieron complementar su crecimiento bajo estrés salino, lo que indicaba que los dominios *DvGPDH1* y *DvGPDH2* aislados eran funcionales como *GPDHs*. Por otra parte, las mutantes *DvGPDH1 N* y *DvGPDH2 N* no presentaron un fenotipo

auxotrófico para serina, indicando que los dominios *DvGPDH1* y *DvGPDH2* no presentaban actividad SerB. Por lo tanto, la función de este dominio permanece desconocido.

Con la finalidad de investigar el patrón de expresión de los genes *DvGPDH1* y *DvGPDH2* en respuesta a estrés salino, se realizaron experimentos usando ARN de células de *D. viridis* cultivadas en medio con diferente salinidad (0.5, 1, 2, 3, 4, y 5 M de NaCl) (He *et al.*, 2009), en los cuales se observó un incremento progresivo en los niveles del transcrito de *DvGPDH1* en concentraciones salinas de 0.5 a 2 M de NaCl. Además, el nivel de transcritos de *DvGPDH1* alcanzó su máximo a 2 M de NaCl, que fue dos veces más que el nivel de transcritos presentes en 0.5 M de NaCl. Este incremento fue consistente con lo observado para la expresión de genes *GPDH* de levaduras. Sin embargo, los niveles del transcrito de *DvGPDH1* decrecieron progresivamente a concentraciones de 3 a 5 M de NaCl. Este decremento puede deberse a la inhibición en el crecimiento y metabolismo de las células de *D. viridis* a condiciones elevadas de estrés salino. Por otra parte, la expresión de *DvGPDH2* a diferentes salinidades mostró un patrón similar a *DvGPDH1*. Sin embargo, el nivel de expresión fue más alto y más estable que el observado en *DvGPDH1*. El nivel máximo del transcrito de *DvGPDH2* fue alcanzado a 1 M de NaCl, pero fue sólo ligeramente superior que en 0.5 y 2 M de NaCl.

Así mismo, en el estudio realizado por He *et al.* (2009) se llevó a cabo un análisis de PCR-cuantitativa (Q-PCR) con las células de *D. viridis* tratadas a diferentes tiempos de exposición de NaCl, en el cual se encontró que la respuesta de los transcritos de *DvGPDH1* y *DvGPDH2* era similar. Así mismo, parecían presentar diferentes fases, empezando por una fase de inducción en la primera hora ($P < 0.01$) y a las 1.5 h ($P < 0.05$) después del estrés salino, respectivamente. Subsecuentemente, los niveles del transcrito de *DvGPDH1* decrecieron lentamente a 12.5% después de 1.5 a 6 h del choque salino. El nivel de transcrito de *DvGPDH2* decreció en 40% de 2 a 4 h después del choque salino. La expresión de *DvGPDH1* y *DvGPDH2* se mantuvo a bajos niveles hasta las 48 h y empezaron a recuperarse después de 72 h. En general, el nivel de expresión del gen *DvGPDH2* fue más estable que el gen *DvGPDH1* durante el estrés salino, y la disminución de los niveles del transcrito fue más dramático en *DvGPDH1* que en *DvGPDH2*. El análisis de Q-PCR reveló que ambos genes muestran una inducción

transitoria de la expresión del gen bajo estrés hipersalino, seguida de una reacción negativa de la expresión del gen (He *et al.*, 2009). El tiempo de la inducción fue consistente con una rápida síntesis de glicerol dentro de los 90 min después del estrés salino (Ben-Amontz y Avron, 1973).

1.2.8 Genes que codifican para enzimas tipo glicerol-3-fosfato deshidrogenasa en *Chlamydomonas reinhardtii*

En la microalga verde *C. reinhardtii*, recientemente se identificaron tres genes homólogos a GPDH, denominados *CrGPDH1*, *CrGPDH2* y *CrGPDH3* (Macario-González, 2011) (Figura 1.12).

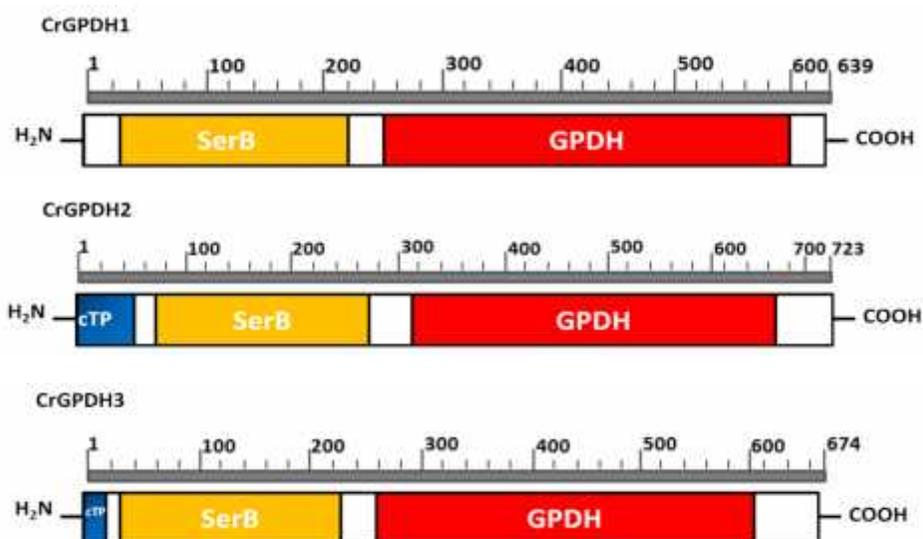


Figura 1. 12. Representación esquemática de la estructura de las proteínas CrGPDH1, CrGPDH2, CrGPDH3 de *C. reinhardtii*. El dominio SerB (fosfoserina fosfatasa) se marca en color anaranjado, el dominio GPDH (glicerol 3-fosfato deshidrogenasa) dependiente de NAD^+ se marca en color rojo y el cTP (péptido de tránsito al cloroplasto) se marca de color azul (Macario-González, 2011).

En el estudio realizado por Macario-González (2011) se llevó a cabo un análisis bioinformático de la secuencia de los genes *CrGPDH1*, *CrGPDH2* y *CrGPDH3*, en donde se pudo notar que los genes presentan una estructura lineal similar con regiones conservadas a los genes *GPDH* de otras microalgas verdes. También se observó que la

secuencia de aminoácidos de los genes *CrGPDH1*, *CrGPDH2* y *CrGPDH3* presentan los dominios característicos de las GPDHs de microalgas: el dominio SerB en el extremo N-terminal, el dominio GPDH en el extremo carboxilo, además de un péptido putativo de tránsito al cloroplasto para *CrGPDH2* y *CrGPDH3* (Figura 1.12), lo cual concuerda con lo reportado previamente en la microalga *D. salina* (Figura 1.11) (He *et al.*, 2007). La presencia del dominio extra de aproximadamente 200 a 300 aminoácidos observado únicamente en las microalgas verdes, sugiere la existencia de un nuevo tipo de GPDHs con bi-dominio en el linaje de las clorofitas, quizás como consecuencia evolutiva para mantener un mecanismo de osmorregulación en las algas verdes que requieren sobrevivir en ambientes salinos (He *et al.*, 2007; He *et al.*, 2009).

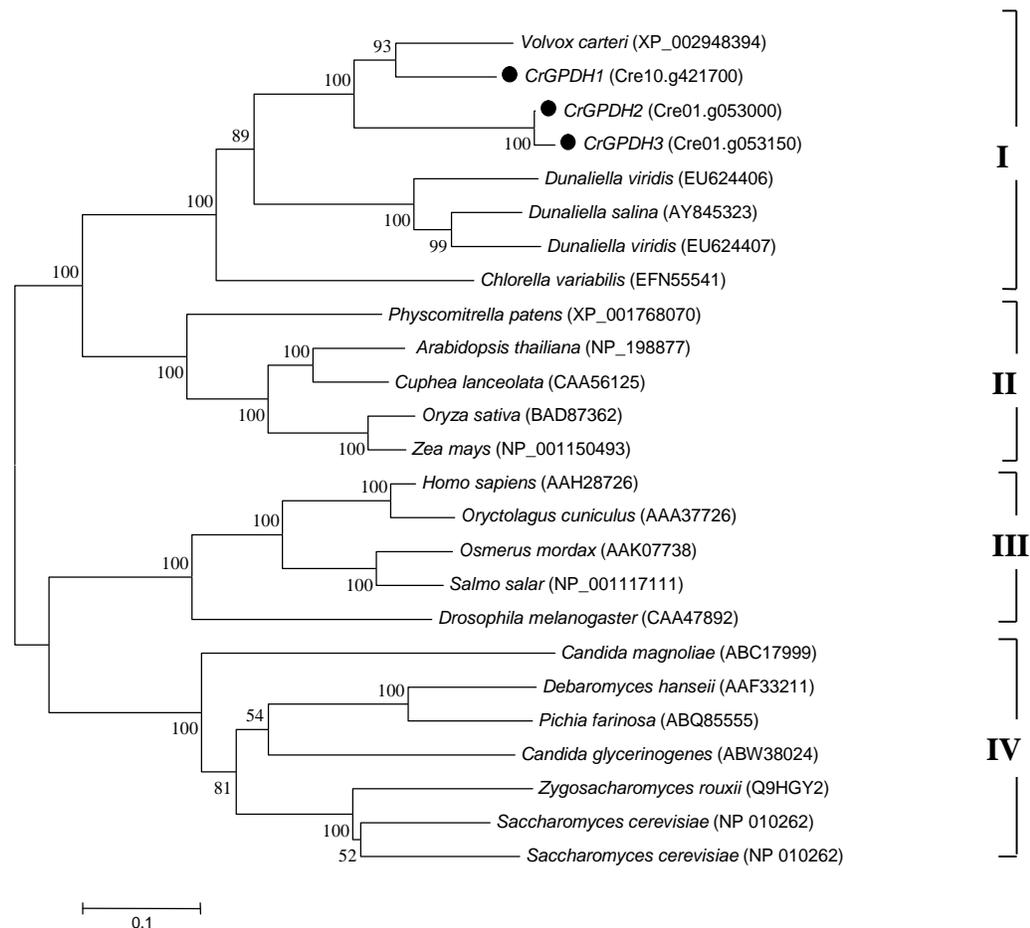


Figura 1.13. Análisis filogenético de la secuencia de genes *GPDH* de *C. reinhardtii* y otros organismos (Macario-González, 2011).

El hecho de que las secuencias de *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de *C. reinhardtii* muestren un parentesco filogenético con las secuencias GPDHs de *D. viridis* (DvGPDH1 y DvGPDH2) que ya han sido caracterizadas funcionalmente (Figura 1.13) y que se sabe están involucradas en el metabolismo del glicerol (He *et al.*, 2009), presenta una evidencia adicional que sugiere que estos genes probablemente codifiquen para una enzima GPDH que desempeña una función similar a la del gen *gpd1* de *S. cerevisiae* en el metabolismo del glicerol, como se observó en las GPDHs de *D. viridis*.

Macario-González (2011) llevó a cabo el mapeo de los extremos 5' y 3' no traducibles del gen *CrGPDH2* de *C. reinhardtii*. Además, presentó por primera vez la expresión inducible de este gen ante condiciones de estrés salino con 200 mM de NaCl durante 2 h, mientras que su expresión basal no fue detectable por RT-PCR en el gel de agarosa (Figura 1.14). Todas las evidencias estructurales de la proteína predicha y el análisis filogenético, aunado a la inducción de la expresión de *CrGPDH2* bajo estrés osmótico, sugieren que *CrGPDH2* probablemente codifique para una isoforma osmorreguladora involucrada en la síntesis de glicerol. Es probable que el gen *CrGPDH3* también codifique para una isoforma osmorreguladora involucrada en la síntesis de glicerol, ya que su secuencia de aminoácidos además de presentar un porcentaje de identidad del 97.9% con respecto a *CrGPDH2* (Macario-González, 2011), posee un péptido de señal putativo de tránsito al cloroplasto como el observado en *CrGPDH2* de esta microalga.

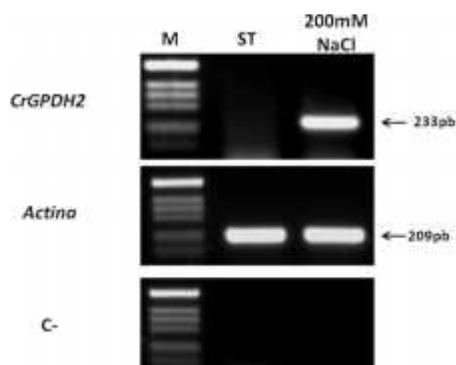


Figura 1.14. Análisis de la expresión del gen *CrGPDH2* mediante RT-PCR en muestras sin tratamiento (ST) y muestras tratadas con 200 mM de NaCl por 2 h (200 mM NaCl). Se utilizó el gen de la actina como control positivo (Actina) en una reacción más reversa transcriptasa (RT), y negativo (C-) sin RT. M = marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen) (Macario-González, 2011).

1.3 HIPÓTESIS

Dado que *C. reinhardtii* posee dos genes homólogos a *GPDH* (*CrGPDH2* y *CrGPDH3*) que comparten una alta identidad y *CrGPDH2* se induce por NaCl, entonces *CrGPDH3* será inducible por NaCl y ambos genes codificarán para proteínas con actividad de GPDH involucradas en la producción de glicerol y tolerancia al estrés osmótico.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar molecular y funcionalmente a los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, para determinar su posible relación con la síntesis de glicerol y tolerancia al estrés osmótico.

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar la expresión de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de *C. reinhardtii* en respuesta a diferentes condiciones de estrés por NaCl.
- Mapear los extremos terminales 5' y 3' de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de *C. reinhardtii* y obtener la región codificante completa de ambos genes.
- Determinar mediante un ensayo de complementación genética si los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de *C. reinhardtii* codifican para una enzima con actividad de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa involucrada en la síntesis de glicerol y tolerancia al estrés por NaCl.

1.5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental general de este trabajo se resume en la Figura 1.15.

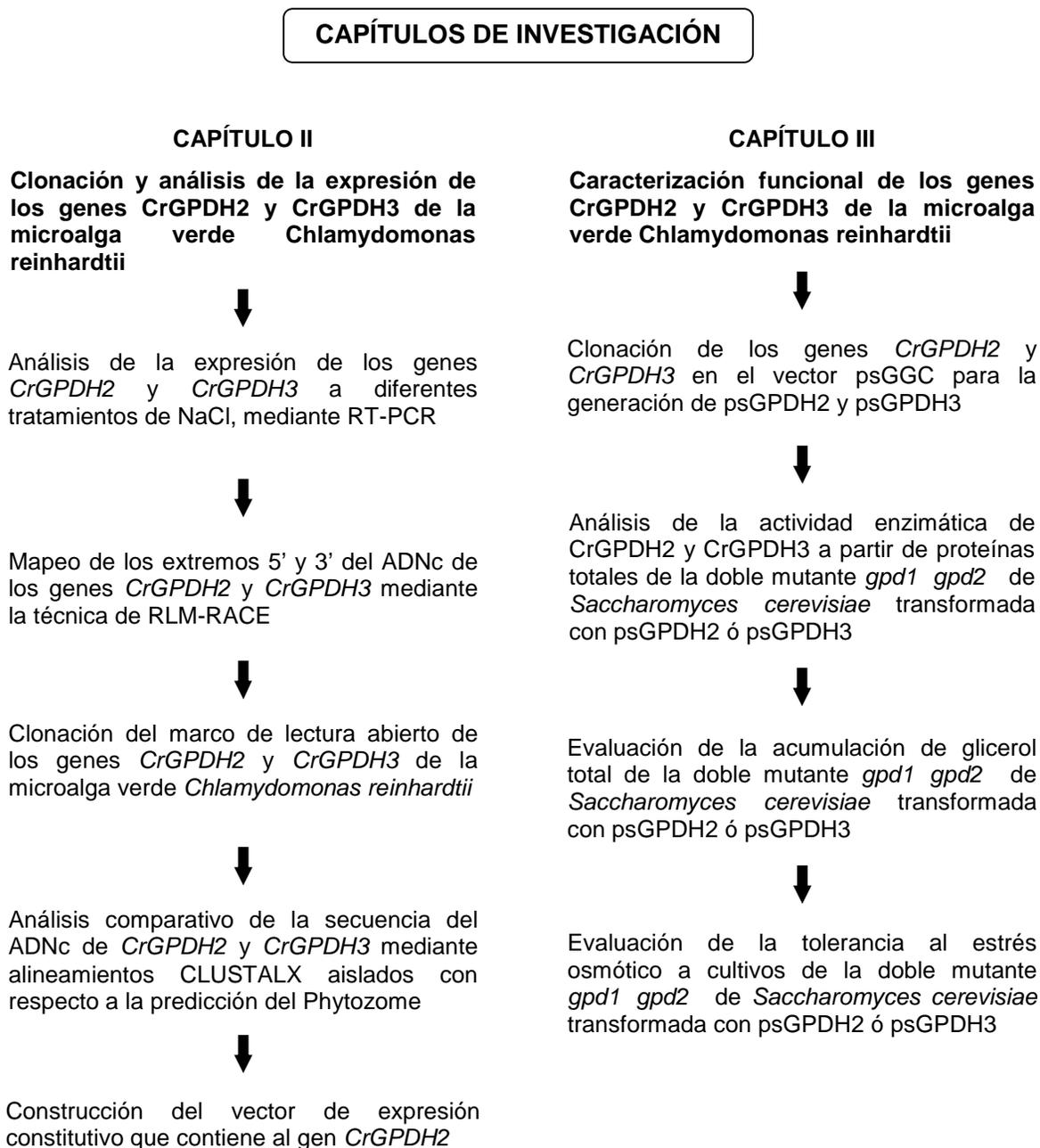


Figura 1.15. Estrategia experimental general para la caracterización molecular y funcional de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*.

1.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmando, I. y J. Hellebust (1986). The role of glicerol and inorganic ions in osmoregulatory responses of the Euryhaline flagellate *Chamydomonas pulsatilla* Wollen Weber. *Plant Physiology*, 82, 406–410.
- Albertyn, J., S. Hohmann, J.M. Thevelein y B.A. Prior (1994). *GPD1*, which encodes Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 14 (6), 4135–4144.
- Ansell, R., K. Granath, S. Hohmann, J.M. Thevelein y L. Adler (1997). The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *The EMBO Journal*, 6 (9), 2179–218.
- Antonini, S.E., E. Menapace, C.E. Cabrera, M. Iriart, C. Gualpa y L.J. Rovetto (2010). Estudio de prefactibilidad de generación de hidrógeno a partir de derivados del biodiésel. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente*, 14, 06.103-06.110. ISSN 0329-5184.
- Avron, M. (1986). The osmotic components of halotolerant algae. *Trends in Biochemical Sciences*, 11, 5–6.
- Ben-Amotz, A. y M. Avron (1973). The role of glycerol in the osmotic regulation of the halophilic alga *D. parva*. *Plant Physiology*, 51, 875–878.
- Ben-Amotz, A. y M. Avron (1983). Accumulation of metabolism by halotolerant algae and its industrial potencial. *Annual Review Microbiology*, 37, 95-119.
- Ben-Amotz, A. y M. Avron (1990). The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. *Trends in Biotechnology*, 8, 121–126.
- Ben-Amotz, A., A. Shaish y M. Avron (1989) Mode of action of the massively accumulated -carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation. *Plant Physiology*. 91, 1040–1043.
- Ben-Amotz, A., M. Avron (1981). Glycerol and -carotene metabolism in the halotolerant alga *Dunaliella*: a model system for biosolar energy conversion. *Trends in Biochemical Sciences*, 6, 297–299.

-
-
- Bental, M., U. Pick, M. Avron y H. Degani (1990). The role of intracellular orthophosphate in triggering osmoregulation in the alga *Dunaliella salina*. *European Journal of Biochemistry*, 188, 117–122.
- Blomberg, A. y L. Adler (1989). Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *S. cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 171, 1087–1092.
- Boynton, J.E., N.W. Gillham, E.H. Harris, J.P. Hosler, A.M. Johnson y A.R. Jones (1988). Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science*, 240, 1534–1538.
- Cai, M., L.H. He y T.Y. Yu (2013). Molecular clone and expression of a NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase isozyme gene from the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *PLoS ONE*, 8, 1–8.
- Chen, H., Y.M. Lao y J.G. Jiang (2011). Effects of salinities on the gene expression of a (NAD⁺)-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Dunaliella salina*. *Science of the Total Environment*, 409, 1291–1297.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25, 294–306.
- Clark, D., V. Lightner, R. Edgar, P. Modrich, J.E. Cronan y R.M. Bell (1980). Regulation of phospholipid Biosynthesis in *Escherichia coli*: Cloning of the Structural Gene for the Biosynthetic *sn*-Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase EC. 1.1.1.8. *Journal of biological Chemistry*, 225 (2), 714–717.
- Contreras-Pool, P.Y. (2010). 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. 127 p.
- Cowan, A.K., P.D. Rosa y L.G. Horne (1992). *Dunaliella salina*: A model system from studying the response of plant cells to stress. *Journal of Experimental Botany*, 43, 1535–1547.
- Cronwright, G.R., J.M. Rohwer y B.A. Prior (2002). Metabolic control analysis of glycerol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 448–4456.
-

-
- Cruz, J., B. Salvilla, A. Kanazawa y D. Kramer (2001). Inhibition of plastocyanin to P700+ Electro transfer in *Chlamydomonas reinhardtii* by hyperosmotic stress. *Plant Physiology*, 127, 1167–1179.
- Durrett, T., C. Benning y J. Ohlrogge (2008). Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. *Plant Journal*, 54, 593–607.
- Eriksson, P., L. Andre, R. Ansell, A. Blomberg y L. Adler (1995). Cloning and characterization of *GPD2*, a second gene encoding sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in *Saccharomyces cerevisiae*, and its comparison with *GPD1*. *Molecular Microbiology*, 17, 95–107.
- 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.
- Fletcher, S., M. Machiko y S. Mayfield (2007). Chapter 8: Optimization of recombinant protein expression in the chloroplast of green algae, *Transgenic microalgae as cell factories*. Landes Bioscience and Springer Science. 90–98 pp.
- Gancedo, C., J.M. Gancedo y A. Sols (1968). Glycerol metabolism in yeasts. *European Journal of Biochemistry*, 5, 165-172.
- Gee, R., A. Coyal, R.U. Byerrum y N.E. Tolbert (1993). Two isoforms of dihydroxyacetone phosphate reductase from the chloroplasts of *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Physiology*, 103, 243–249.
- Gee, R.W., R.U. Byerrum, D.W. Gerber y N.E. Tolbert (1988). Dihydroxyacetone Phosphate Reductase in Plants. *Plant Physiology*, 86, 98–103.
- Ghoshal, D., D. Mach, M. Agarwal y A. Goyal (2002). Osmoregulatory isoform of dihydroxyacetone phosphate reductase from *Dunaliella tertiolecta*: Purification and characterization. *Protein Expression and Purification*, 24, 404–411.
- Gimmler, H. y G. Lotter (1982). The intracellular distribution of enzymes of the glycerol cycle in the unicellular algae *Dunaliella parva*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 37c, 1107–1114.
- Giroud, C., A. Gerber y W. Eichenberger (1988). Lipids of *Chlamydomonas reinhardtii*. Analysis of molecular species and intracellular site(s) of biosynthesis. *Plant and Cell Physiology*, 29, 587–595.
-

-
- González-Hernández, J.C. y A. Peña (2002). Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (levadura halófila). Revista Latinoamericana de Microbiología, 44 (3): 137-156.
- Gouveia, L. y A. Oliveira (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 36, 269–274.
- Gray, M.W. y P.H. Boer (1988). Organization and expression of algal (*Chlamydomonas reinhardtii*) mitochondrial DNA. Philosophical Transactions of the Royal Society. London, B 319, 135–147.
- Greenwell, H.C., L.M. Laurens, R.J. Shields, R.W. Lovitt y K.J. Flynn (2010). Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. Journal of the Royal Society, 7, 703–226.
- Guschina, I.A. y L.J. Harwood (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. Progress in Lipid Research, 45, 160–186.
- Gutman, B.L. y K.K. Niyogi (2004). *Chlamydomonas* and *Arabidopsis*. A dynamic duo. Plant Physiology, 135, 607–610.
- Harris, E.H. (2001). *Chlamydomonas* as a model organism. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 52, 363–406.
- Hartlep, M., W. Hussmann y N. Prayitno (2002). Study of two-stage processes for the microbial production of 1, 3-propanediol from glucose. Applied Microbiology and Biotechnology, 60, 60–66.
- He, Q.H., D.R. Qiao, L.H. Bai, Q.L. Zhang, W.G. Yang, Q. Li y Y. Cao (2007) Cloning and characterization of a plastidic glycerol 3-phosphate dehydrogenase cDNA from *Dunaliella salina*. Journal of Plant Physiology, 164, 214–220.
- He, Y., X. Meng, Q. Fan, X. Sun, Z. Xu y R. Song (2009). Cloning and characterization of two novel chloroplastic glycerol-3-phosphate dehydrogenases from *Dunaliella viridis*. Plant Molecular Biology, 71, 193–205.
- Hernández, L., M. M. Quintana y H.J. Morris (2000). Obtención de glicerol a partir de la Microalga *Dunaliella salina*. Revista Cubana de Farmacia, 34 (2), 134-137.
- Herrera-Valencia, V.A., P.Y. Contreras-Pool, S.J. López-Adrián, S. Peraza-Echeverría, L.F. Barahona-Pérez (2011). The green microalga *Chlorella saccharophila* as a suitable source of oil for biodiesel production. Current Microbiology. DOI 10.1007/s00284-011-9956-7.
-

-
-
- Hirayama, T., T. Maeda, H. Saito y K. Shinozaki (1995). Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity responsive (HOR) genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics*, 249, 127–138.
- Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 300–372.
- Hu, Q.M., E.J. Sommerfeld, M. Ghirardi, M. Posewitz, Seibert y Darzins (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant Journal*, 54, 621–639.
- Husic, D. y N. Tolbert (1986). Effect of osmotic stress on carbon metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 82, 549–596.
- Jako, C., A. Kumar, Y.D. Wei, J.T. Zou, D.L. Barton, E.M. Giblin, P.S. Covello y D.C. Taylor (2001). Seed-specific over-expression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight. *Plant Physiology*, 126, 861–874.
- Khan, S., H.M Rashmi, S. Prasad y U.C. Banerjee (2009). Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. (In Press).
- Klöck, G. y K. Kreuzberg (1989). Kinetic properties of a sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase purified from the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 991, 347–352.
- Kumar, S.V., R.W. Misquitta, V.S. Reddy, B.J. Rao, M.V. Rajam (2004). Genetic transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*, 166, 731–738.
- Lefebvre, P.A. y C.D. Silflow (1999). *Chlamydomonas*: the cell and its genomes. *Genetics*, 151, 9–14.
- León, R. y F. Galván (1994). Halotolerance studies on *Chlamydomonas reinhardtii*: glycerol excretion by free and immobilized cells. *Journal of Applied Phycology*, 6, 13–20.
- León, R.M. (1997). Estudios de halotolerancia en el alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*. Fotoproducción de glicerol por células libres e inmovilizadas. Tesis de doctorado. Universidad de Sevilla. Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular. España. 193 p.
-

-
- Li, Y., H. Danxiang, H. Guongrong, D. Dauvillee, M. Sommerfeld, S. Ball y H. Qiang (2010). *Chlamydomonas* starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyperaccumulates triacylglycerol. *Metabolic Engineering*. In press.
- Lilly, J.W., J.E. Maul y D.B. Stern (2002). The *Chlamydomonas reinhardtii* organellar genomes respond transcriptionally and post-transcriptionally to abiotic stimuli. *Plant Cell*, 14, 2681–2706.
- Liska, A., A. Shevchenko, U. Pick y A. Katz (2004). Enhanced Photosynthesis and Redox Energy Production Contribute to Salinity Tolerance in *Dunaliella* as Revealed by Homology-Based Proteomics. *Plant Physiology*, 136, 2806–2817.
- Macario-González, L. (2011). Caracterización molecular de genes que codifican para proteínas tipo glicerol-3-fosfato deshidrogenasa en la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 125 p.
- Maul, J.E., J.W. Lilly, L. Cui, C.W. Pamphilis, E.H. Harris y D.B. Stern (2002). The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats. *Plant Cell*, 14, 2659–2679.
- Merchant, S., S.E. Prochnik, O. Vallon, E.H. Harris, S. J. Karpowicz, G.B. Witman, A. Terry, A. Salamov, L.K. Fritz-Laylin, L. Maréchal-Drouard, W.F. Marshall, L.H. 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, J. Schmutz, *Chlamydomonas* Annotation Team, JGI annotation Team, I.V. Grigoriev, D.S. Rokhsar y A.R. Grossman (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 318, 245–251.
- Michaelis, G., C. Vahrenholz y E. Pratje (1990). Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: The gene for apocytochrome *b* and the complete functional map of the 15.8 kb DNA. *Molecular Genetics and Genomics*, 223, 211–216.
- Morowat, M., S. Rasoul-Amini y Y. Ghasemi (2009). *Chlamydomonas* as a “new” organism for biodiesel production. *Bioresource Technology*. 101 (6), 2059-2062.
- Nandi, A., R. Welti y J. Shah (2004). The *Arabidopsis thaliana* dihydroxyacetone phosphate reductase gene suppressor of fatty acid desaturase deficiency 1 is required for glycerolipid metabolism and for the activation of systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 16, 465–477.
-

-
- Nevoigt, E. y U. Stahl (1996). Reduced pyruvate decarboxylase and increased glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) levels enhance glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12, 1331–1337.
- Nickelsen, J. y U. Kuck (2000). The unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* as an experimental system to study chloroplast RNA metabolism. *Naturwissenschaften*, 87, 97–107.
- Ohlrogge, J.B. y J.G. Jaworski (1997). Regulation of fatty acid synthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 48, 109–136.
- Otto, J., P. Argos y M.G. Rossmann (1980). Prediction of secondary structural elements in glycerol-3-phosphate dehydrogenase by comparison with other dehydrogenases. *European Journal of Biochemistry*, 109, 325–330.
- Pineau, B., J. Girard-Bascou, S. Eberhard, Y. Choquet, A. Trémolières y C. Gerard-Hirne (2004). A single mutation that causes phosphatidylglycerol deficiency impairs synthesis of photosystem II cores in *Chlamydomonas reinhardtii*. *European Journal of Biochemistry*, 271, 329–338.
- Prieto, R., A. Dubus, A. Galván y E. Fernández (1996). Isolation and characterization of two regulatory mutants for nitrate assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Genetics and Genomics*, 251, 461–471.
- Radakovits, R., E.R. Jinkerson, A. Darzins y M.C. Posewitz (2010). Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryotic Cell*, 9 (4), 486–501.
- Randolph-Anderson, B.L., J.E. Boynton, N.W. Gillham, E.H. Harris, A.M. Johnson, M.P. Dorthu y R.F. Matagne (1993). Further characterization of the respiratory deficient dum-1 mutation of *Chlamydomonas reinhardtii* and its use as a recipient for mitochondrial transformation. *Molecular Genetics and Genomics*, 236, 235–244.
- Ratledge, C. (1988). An overview of microbial lipids. In *Microbial Lipids*, Vol. 1 (Ratledge, C. y S. G. Wilkerson, eds). New York: Academic Press. 3–21 pp.
- Riekhof, W.R., B.B. Sears y C. Benning (2005). Annotation of Genes Involved in Glycerolipid Biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: Discovery of the Betaine Lipid Synthase BTA1. *Eukaryotic Cell*, 4 (2), 242–252.
- Rochaix, J.D. (1995). *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Annual Review of Genetics*, 29, 209–230.
-

-
- Roesler, K., D. Shintani, L. Savage, S. Boddupalli y J. Ohlrogge (1997). Targeting of the *Arabidopsis* homomeric acetyl-coenzyme. A carboxylase to plastids of rapeseeds. *Plant Physiology*, 113, 75–81.
- Rosenberg, J.N., G.O. Oyler, L. Wilkinson y M.J. Betenbaugh (2008). A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 430–436.
- Santora, G.T., R. Gee y N.E. Tolbert (1979). Isolation of a *sn*-glycerol-3-phosphate: NAD oxidoreductase from spinach leaves. *Archives of Biochemistry Biophysics*, 196, 403–411.
- Sato, N., K. Sonoike, A. Kawaguchi y M. Tsuzuki (1996). Contribution of lowered unsaturation levels of chloroplast lipids to high temperature tolerance of photosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 36, 333–337.
- Sato, N., M. Aoki, Y. Maru, K. Sonoike, A. Minoda y M. Tsuzuki (2003). Involvement of sulfoquinovosyl diacylglycerol in the structural integrity and heat-tolerance of photosystem II. *Planta*, 217, 245–251.
- Schenk, P., S. Thomas y E. Stephens (2008). Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research*, 1, 20–43.
- Schroda, M., C.F. Beck y O. Vallon (2002). Sequence elements within an HSP70 promoter counteract transcriptional transgene silencing in *Chlamydomonas*. *Plant Journal*, 31, 445–455.
- Sharma, N., A. Phutela, S.P. Malhotra y R. Singh (2001). Purification and characterization of dihydroxyacetone phosphate reductase from immature sedes of *Brassica campestris* L. *Plant Science*, 160, 603–610.
- Shrager, J., C. Hauser, C.W. Chang, E.H. Harris, J. Davies, J. McDermott, R. Tamse, Z. Zhang y A.R. Grossman (2003). *Chlamydomonas reinhardtii* genome project. A guide to the generation and use of the cDNA information. *Plant Physiology*, 131, 401–408.
- Siaut, M., S. Cuiné, 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, 2–15.
-

-
- Singh, A., D. Singh y J. Murphy (2010). Mechanism and challenges in comercialisation of alga biofuel. *Bioresource Technology*. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.057.
- Siripornadulsil, S., S. Traina, D.P.S. Verma y R.T. Sayre (2002). Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell*, 14, 2837–2847.
- Takagi, M., Karseno y T. Yoshida (2006). Effect of salt concentration on intracelular acumulation of lípidos and triglycerides in marine microalgae *Dunaliella* cell. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, 223–226.
- Tatsuzawa, H., E. Takizawa, M. Wada y Y. Yamamoto (1996). Fatty acid and lipid composition of the acido philic green alga *Chlamydomonas* sp. *Journal of Phycology*, 32, 598–601.
- Taylor, D.C., V. Katavic, J.T. Zou, S.L. MacKenzie, W.A. Keller, J. An, W. Friesen, D.L. Barton, K. K. Pedersen, E.M. Giblin, Y. Ge, M. Dauk, C. Sonntag, T. Luciw, y D. Males (2002). Field testing of transgenic rapeseed cv. Hero transformed with a yeast sn-2 acyltransferase results in increased oil content, erucic acid content and seed yield. *Molecular Breeding*, 8, 317–322.
- Thelen, J.J. y J.B. Ohlrogge (2002) Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in plants. *Metabolic Engineering*, 4, 12–21.
- Thomé, P.E. (2004). Isolation of a GPD gene from *Debaromyces hansenii* encoding a glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺). *Yeast*, 21, 119–126.
- Vigeolas, H., P. Waldeck, T. Zank, P. Geigenberger (2007). Increasing seed oil content in oil-seed rape (*Brassica napus* L.) by over-expression of a yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenase under the control of a seed-specific promoter. *Plant Biotechnology Journal*, 5, 431–441.
- Vigeolas, H., T. Mohlmann, N. Martini, H.E. Neuhaus y P. Geingenberger (2004). Embryo-specific reduction of ADP-glucose pyrophosphorylase leads to an inhibition of starch synthesis and a delay in oil accumulation in developeping seeds of *Brassica napus* L. *Plant Physiology*, 136, 2676–2678.
- Wang, Z., 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 reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 8 (12), 1856–1868.
-

- Watanabe, Y., S. Tsuchimoto y Y. Tamai (2004). Heterologous expression of *Zygosaccharomyces rouxii* glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene (*ZrGPD1*) and glycerol dehydrogenase gene (*ZrGCV1*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 4, 505–510.
- Yao, Y., Y. Lu, K.T. Peng, T. Huang, Y. F. Niu, W.H. Xie, W.D. Yang, J.S. Liu y H.Y. Lie (2014). Glycerol and neutral lipid production in the oleaginous marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* promoted by overexpression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Biotechnology for Biofuels*, 7, 110-118.
- Zou, J.T., V. Katavic, E.M. Giblin, D.L. Barton, S.L. MacKenzie, W.A. Keller, X. Hu y D.C. Taylor (1997). Modification of seed oil content and acyl composition in the *Brassicaceae* by expression of a yeast *sn-2* acyltransferase gene. *Plant Cell*, 9, 909–923.

CAPÍTULO II. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES CrGPDH2 Y CrGPDH3 DE *C. reinhardtii*, MAPEO DE SUS EXTREMOS TERMINALES 5' Y 3' Y CLONACIÓN DE LA REGIÓN CODIFICANTE DE AMBOS GENES^{1,2}

2.1 INTRODUCCIÓN

La enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) es una enzima clave en el metabolismo del glicerol y los triacilglicéridos (TAGs) en plantas, y ha sido ampliamente estudiada en la levadura *S. cerevisiae*. La enzima GPDH cataliza la reducción de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a glicerol-3-fosfato (G3P), usando NADH como donador de electrones, en donde el G3P juega un papel importante en la síntesis de glicerol además en plantas es el precursor de la síntesis de todos los tipos de lípidos compuestos de glicerol, incluyendo los lípidos de membrana y almacenamiento (Renz *et al.*, 2009).

En la levadura *S. cerevisiae*, el gen *gpd1* que codifica para una enzima GPDH es responsable de la síntesis de glicerol bajo condiciones de estrés osmótico (Ansell *et al.*, 1997), y en plantas se observó que la sobre expresión de este gen incrementó la acumulación de lípidos en las semillas de *B. napus L.* hasta en un 40% (Vigeolas *et al.*, 2007). En cuanto a esto, se ha observado que algunas microalgas verdes, como *B. braunii*, *D. tertiolecta* y *C. reinhardtii*, acumulan tanto glicerol como TAGs en condiciones de estrés osmótico por NaCl (Takagi *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2007; Contreras-Pool, 2010; Herrera-Valencia *et al.*, 2011). Además, en las microalgas verdes *D. salina* y *D. viridis* se han identificado genes *GPDH* asociados a la síntesis de glicerol durante la osmoregulación como en las levaduras, y se ha observado que la expresión de estos genes se incrementa cuando se encuentran sujetos a altas concentraciones salinas (He *et al.*, 2007; He *et al.*, 2009). Por su parte, *C. reinhardtii* acumula y secreta glicerol en respuesta al estrés osmótico de hasta 200 mM de NaCl (León y Galván 1994), y recientemente se identificaron tres genes homólogos a *GPDH* (*CrGPDH1*, *CrGPDH2* y

Los resultados de este capítulo fueron publicados como parte de los artículos:

¹Herrera-Valencia, V.A., L.A. Macario-González, M.L. Casais-Molina, A.G. Beltran-Aguilar y S. Peraza-Echeverría (2012). In silico cloning and characterization of the glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) gene family in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current Microbiology*, 64, 477-485. DOI 10.1007/s00284-012-0095-6.

²Casais-Molina, M.L., S. Peraza-Echeverría, I. Echevarría-Machado y V.A. Herrera-Valencia (2015). Expression of *Chlamydomonas reinhardtii* *CrGPDH2* and *CrGPDH3* cDNAs in yeast reveals that they encode functional glycerol-3-phosphate dehydrogenases involved in glycerol production and osmotic stress tolerance. *Journal of Applied Phycology*, DOI 10.1007/s10811-015-0588-3.

CrGPDH3), de los cuales, el gen *CrGPDH2* presentó una inducción en su expresión a 200 mM de NaCl por 2 h (Macario-González, 2011), y se sugirió que el aumento en la expresión de este gen podría estar asociado a la tolerancia al estrés osmótico, síntesis de glicerol, y posiblemente síntesis de TAGs en esta microalga. La microalga verde *C. reinhardtii* presenta grandes ventajas para su uso como un modelo de estudio de la función de los genes *GPDH*, sin embargo hasta ahora sólo se ha reportado la caracterización molecular *in silico* de los genes *CrGPDH* de esta microalga (Macario-González, 2011).

En la presente tesis se realizó el análisis de expresión de los tres genes *GPDH* de *C. reinhardtii* bajo condiciones de estrés osmótico con 200 mM de NaCl por 2 h. Con base en los resultados obtenidos, se continuó el análisis de expresión de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* a diferentes tratamientos de NaCl, y se clonaron sus respectivos ADNc. Adicionalmente, se obtuvo el plásmido denominado pCrGPDH2c, el cual contiene el marco de lectura abierto del gen *CrGPDH2* de *C. reinhardtii* bajo el control del promotor constitutivo binario Hsp70A/RbcS2 unido a la región 5' UTR y al intrón 1 del gen de la Rubisco (*RbcS2*), y unido a la región 3' UTR del gen *RbcS2* de la microalga verde *C. reinhardtii* como terminador. Este plásmido fue generado para su uso en estudios posteriores para la transformación del núcleo de *C. reinhardtii* e investigar la relación de este gen con la síntesis de glicerol y el contenido de lípidos en esta microalga.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Estrategia experimental

La estrategia experimental que se llevó a cabo en este capítulo se resume en la Figura 2.1.

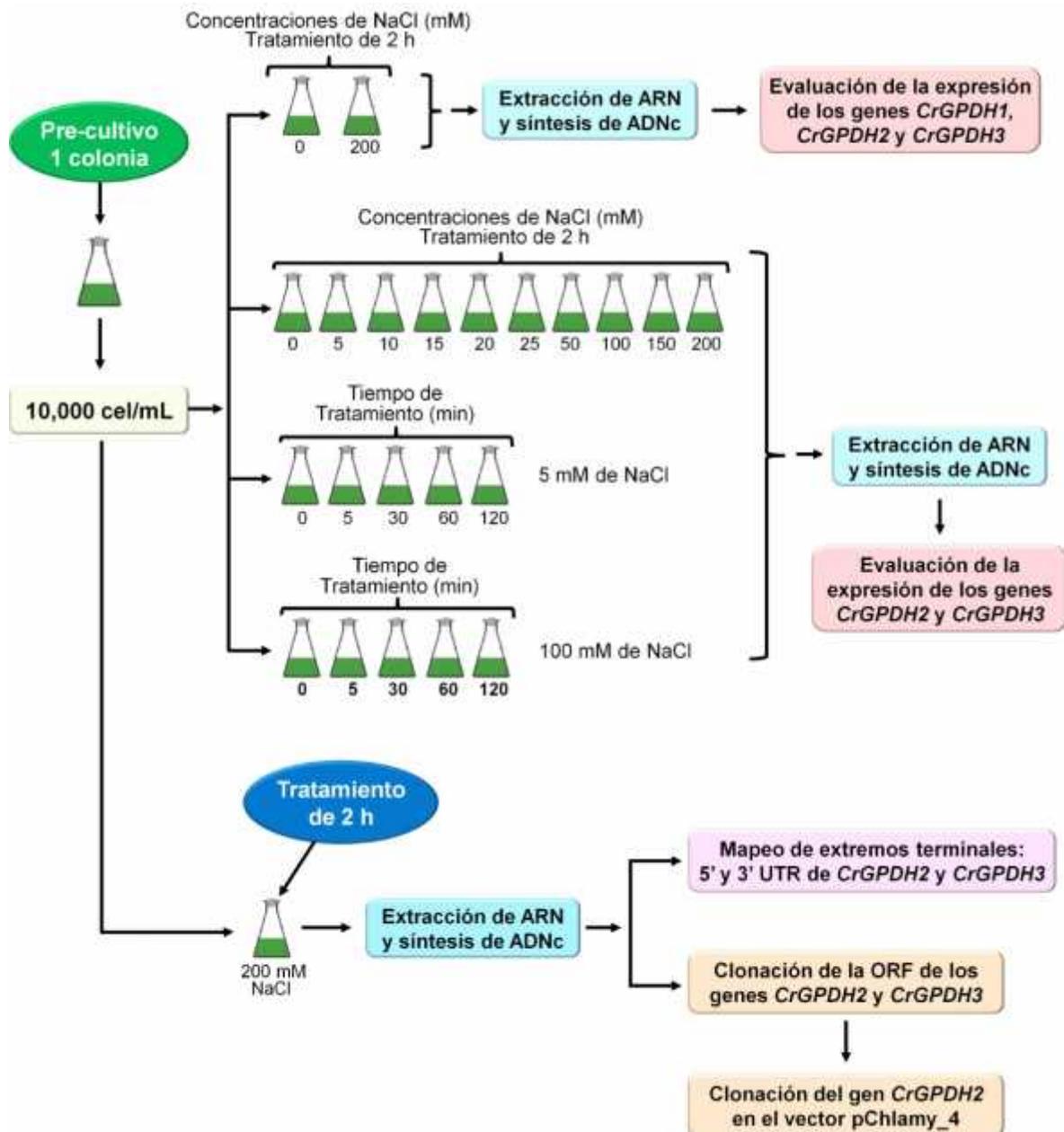


Figura 2.1. Estrategia experimental general para la clonación y el análisis de la expresión de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*.

2.2.2 Cepa y cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii*

La cepa de *C. reinhardtii* que se utilizó para realizar estos experimentos fue la CC-125 (mt+) proporcionada por la Dra. Elizabeth H. Harris del Centro de *Chlamydomonas* (www.chlamy.org). El mantenimiento de los cultivos se realizó de manera axénica en medio Tris-Acetato-Fosfato (TAP) pH 7.00 (Gorman y Levine 1965) a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en un cuarto con fotoperíodo de 16:8 h (luz/oscuridad) con una intensidad lumínica de $90 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ proveniente de lámparas MAGG F54T5/6500 K en un orbitador a 140 rpm (marca Thermo Scientific, modelo MAXQ 4450). Para el cultivo semisólido se adicionó 1.5% de agar bacteriológico al medio líquido TAP.

2.2.3 Experimentos de estrés osmótico con NaCl

Para cada experimento de estrés osmótico por NaCl se realizó un precultivo inoculando una colonia de *C. reinhardtii* en 50 mL de medio TAP y al día siete de cultivo, final de la fase exponencial de crecimiento, se tomó una alícuota para inocular 10,000 células/mL en 50 mL de medio TAP contenido en un matraz de 250 mL de volumen estéril y se cultivó durante siete días. Al séptimo día de cultivo se aplicó el tratamiento de NaCl pertinente. Inicialmente se evaluó la expresión de los genes *CrGPDH1*, *CrGPDH2* y *CrGPDH3* en células de *C. reinhardtii* tratadas a 0 y 200 mM de NaCl por 2 h. A partir de los resultados obtenidos en el primer análisis de expresión génica se procedió a evaluar el efecto del estrés por NaCl en la expresión de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3*, para ello las células de *C. reinhardtii* fueron incubadas en medio TAP con 0, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150 y 200 mM de NaCl por 2 h. Las células de *C. reinhardtii* también fueron incubadas en medio TAP ya sea con 5 o 200 mM de NaCl por diferentes tiempos (5, 30, 60 y 120 min), utilizando como control del experimento una muestra sin tratamiento de NaCl (tiempo 0). Al final de cada experimento se tomaron muestras para el conteo celular, y las células fueron recolectadas por medio de centrifugación y lavadas con H₂O desionizada estéril. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla celular fue resuspendida en el volumen necesario de H₂O desionizada estéril para tener aproximadamente 50×10^6 células mL⁻¹. Cada mL resuspendido fue transferido a un tubo estéril de 1.5 mL tipo Eppendorf y se centrifugó nuevamente a 775 g durante 5 min en una microcentrífuga marca Eppendorf modelo 5424. El sobrenadante se desechó y los tubos con la pastilla celular se congelaron con

nitrógeno líquido para la extracción de ARN inmediata o se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. La estrategia experimental que se siguió se presenta en la Figura 2.1.

2.2.4 Determinación de la concentración celular de cultivos de *C. reinhardtii*

La concentración celular fue determinada por conteo celular en una cámara de Neubauer (hemocitómetro). Se recolectaron $900\text{ }\mu\text{L}$ del cultivo de células de *C. reinhardtii* en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL tipo Eppendorf y se le adicionaron $100\text{ }\mu\text{L}$ de una disolución de yoduro de lugol (Mcmanus y Mowry, 1964) con el fin de fijar la muestra, posteriormente se colocaron por 5 min en el orbitador a 140 rpm . Se tomaron $20\text{ }\mu\text{L}$ de la muestra fijada y se colocaron en la cámara de Neubauer para realizar el conteo. Se contaron todas las células contenidas en los 5 campos visuales situados en la cuadrícula pequeña (Figura 2.2) siguiendo siempre las manecillas del reloj.

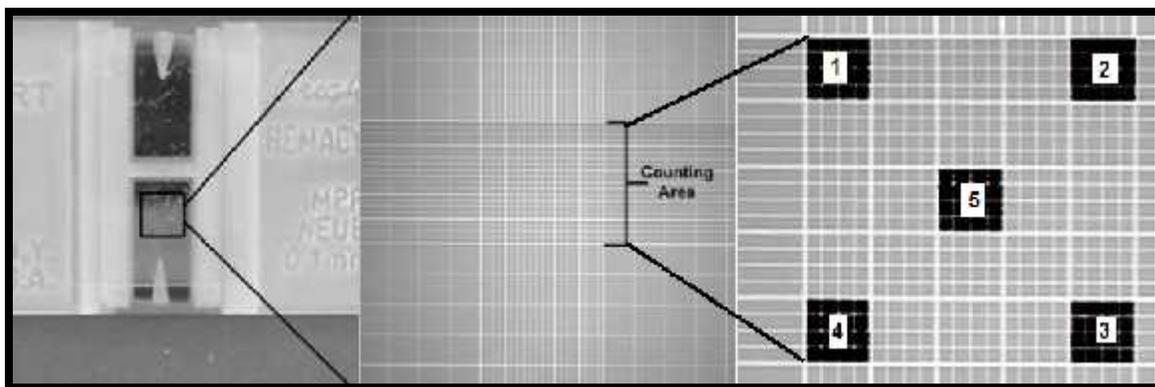


Figura 2.2. Esquema del área de conteo en la cámara de Neubauer para la medición de la densidad celular. Los números indican el orden en el cual se realizó el conteo celular.

Se realizaron dos conteos por muestra (uno en cada celda de la cámara) y se obtuvo el promedio. Los cálculos para determinar el número de células por mL de cultivo se realizaron con la siguiente fórmula:

$$C = (N) (5000) (F)$$

Donde: $C =$ cantidad de células mL^{-1}
 $N =$ promedio del número de células contadas
 $F =$ factor de dilución

2.2.5 Diseño de oligonucleótidos para el análisis de expresión génica

Para llevar a cabo los análisis de expresión de los genes *CrGPDH1*, *CrGPDH2* y *CrGPDH3* se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada una de las tres secuencias encontradas en el genoma de *C. reinhardtii* y se mandaron a sintetizar a Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com). Los oligonucleótidos de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* fueron diseñados en la región 3' UTR de cada gen; por su parte los correspondientes al gen *CrGPDH1* fueron diseñados dentro del marco de lectura abierto y comprenden un intrón que permite diferenciar la amplificación a partir de ADNg y ADNc. Dichas secuencias se presentan en el Cuadro 2.1

Cuadro 2.1. Oligonucleótidos específicos empleados para el análisis de expresión génica de la microalga verde *C. reinhardtii*.

Gen CrGPDH	Secuencia del oligonucleótido	Nombre del oligonucleótido	Amplicón de ADNc	Amplicón de ADNg
CrGPDH1	5'-AGATGCGGGCGTTCTCCAAGG-3'	CrGPDH1F(b)	210 pb	1361 pb
	5'-AGCAGGTCCGTCTCCAGGTCC-3'	CrGPDH1R(b)		
CrGPDH2	5'-ATGCTATGCGACCTATCTGC-3'	GPDH23UTRF(250)	191 pb	191 pb
	5'-ACTGCTCCTGCTCATTGTG-3'	GPDH23UTRR(250)		
CrGPDH3	5'-ATCGGCTCTGGCGCGAGCAGCAC-3'	GPDH33UTRF(190)	280 pb	280 pb
	5'-ACTGCTCCTGCTCATCGGTGAC-3'	GPDH33UTRR(190)		

Las condiciones para la amplificación de dichos oligonucleótidos se evaluaron primeramente en ADNg extraído de acuerdo con el protocolo de Dellaporta (1983) con algunas modificaciones. La extracción se realizó de la siguiente manera: Se recolectaron 50 mL de un cultivo de *C. reinhardtii* de 7 días, al final de la fase logarítmica. Se centrifugó a 3200 g en una centrífuga marca Eppendorf modelo 5810R durante 5 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se agregó el volumen necesario de medio de cultivo para resuspender la pastilla y tener aproximadamente 40×10^6 células mL⁻¹. Cada mL de cultivo resuspendido fue transferido a un tubo estéril de 1.5 mL tipo Eppendorf y se centrifugó nuevamente a 775 g durante 5 min en una microcentrífuga marca Eppendorf modelo 5424. El sobrenadante se desechó y los tubos con la pastilla celular se

congelaron con nitrógeno líquido ya sea para su almacenamiento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ o para la extracción inmediata. Se preparó la mezcla de extracción: $650\text{ }\mu\text{L}$ de amortiguador TEN + $9.1\text{ }\mu\text{L}$ de β -mercaptoetanol por cada muestra, se homogeneizó con un vórtex a velocidad 6 (Vortex-Genie 2, modelo G560) y se incubó a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. En la campana de extracción, se agregó la mezcla de amortiguador TEN más β -mercaptoetanol a cada muestra y se agitó vigorosamente con ayuda de un vórtex durante 2 min. A cada muestra se le añadieron $43\text{ }\mu\text{L}$ de SDS al 20%, se agitaron en un vórtex a velocidad 9 y se incubaron a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 25 min con agitaciones periódicas cada 3 min durante la incubación. Posteriormente, se adicionaron $700\text{ }\mu\text{L}$ de cloroformo:alcohol isoamílico (CHCl_3 :AIA) en una proporción 24:1 a cada muestra y se agitó en el vórtex. Las muestras fueron centrifugadas a $14,500\text{ g}$ durante 5 min, se recuperó el sobrenadante y fue transferido a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. A cada muestra se le añadió un volumen de CHCl_3 :AIA igual al del sobrenadante y se mezcló por agitación en vórtex. Las muestras fueron centrifugadas a $14,500\text{ g}$ durante cinco min, se recuperó el sobrenadante y fue transferido a un tubo nuevo de microcentrífuga de 1.5 mL. Esta extracción se repitió hasta tres veces, con el fin de conseguir el sobrenadante lo más claro posible. Para precipitar los ácidos nucleicos del sobrenadante, a cada muestra se le adicionó un volumen de isopropanol (100%) igual al del sobrenadante, se mezcló suavemente por inversión del tubo durante 3 min y se centrifugó a $14,500\text{ g}$ durante 5 min. La pastilla obtenida fue lavada dos veces con $800\text{ }\mu\text{L}$ de etanol frío al 70% y se centrifugó a $14,500\text{ g}$ durante 5 min. El sobrenadante fue desechado. La pastilla fue secada a temperatura ambiente durante 10 min y después se resuspendió en $40\text{ }\mu\text{L}$ de amortiguador Tris-HCl (10 mM; pH 7.5). Se incubó a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL nuevo. Para la eliminación del ARN se adicionó $1\text{ }\mu\text{L}$ de ARNasa (1 mg/mL) y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min.

2.2.6 Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó empleando un protocolo modificado del reactivo del TRIZOL (Invitrogen) que incluye el tratamiento con DNAsa (Promega) como se describe a continuación.

A cada muestra con aproximadamente 50×10^6 células de *C. reinhardtii* congeladas en nitrógeno líquido se le adicionaron 1,000 μL del reactivo de TRIZOL y se homogeneizó mediante un gentil pipeteo mientras se mantenía en hielo, con la finalidad de proteger el ARN. Una vez homogeneizadas, las muestras se agitaron vigorosamente mediante vórtex (Vortex-Genie 2, modelo G560) a máxima velocidad durante 2 min. El lisado celular se centrifugó a 9,856 g durante 10 min en una microcentrífuga marca Eppendorf modelo 5424, se recuperó el sobrenadante y fue transferido a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL (evitando tomar el pellet formado en el fondo del tubo). Posteriormente se incubaron a 20 °C durante 5 min y transcurrido ese tiempo a cada muestra se le adicionaron 200 μL de CHCl_3 :AIA en una proporción 24:1 y se agitó en el vórtex durante 15 s. Las muestras se incubaron a 20 °C durante 3 min y después se centrifugaron a 9,856 g durante 15 min, se recuperó el sobrenadante y fue transferido a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Para precipitar el ARN, a cada muestra se le adicionó un volumen de isopropanol (100%) y 0.1 mL de 3 M de AcNa pH 7.0 igual al del sobrenadante recuperado, se mezcló suavemente por inversión del tubo durante 20 s y se incubó a 20 °C durante 10 min con posterior centrifugación a 9,856 g durante 10 min. La pastilla obtenida fue lavada con 1 mL de etanol frío al 70% y se centrifugó a 7,500 g durante 5 min. El sobrenadante fue desechado. La pastilla fue secada a temperatura ambiente durante 10 min y después se resuspendió en 39 μL de agua ultra pura. La digestión del ADN se realizó adicionando 5 U de RQ DNase, 40 U RNase out y 5 μL de amortiguador 10X marca Promega para tener un volumen final de 50 μL . La mezcla fue homogeneizada suavemente con el vórtex a velocidad 6. Tras la homogeneización, las muestras fueron incubadas durante 30 min a 37 °C. Después, se adicionaron 700 μL de SSTE (Hilario y Mackay, 2007) y 700 μL CHCl_3 :AIA en una proporción 24:1 y se agitó en el vórtex durante 15 s. Las muestras se centrifugaron a 9,856 g durante 10 min, se recuperó el sobrenadante y fue transferido a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.

Para precipitar el ARN, a cada muestra se le adicionó un volumen de isopropanol (100%) y 0.1 mL de 3 M de AcNa pH 7.0 igual al del sobrenadante recuperado, se mezcló suavemente por inversión del tubo durante 20 s y se incubó a 20 °C durante 10 min con posterior centrifugación a 9,856 g durante 10 min. La pastilla obtenida fue lavada con 1 mL de etanol frío al 70%, se centrifugó a 7,500 g durante 5 min, y se desechó el

sobrenadante. La pastilla fue secada a temperatura ambiente durante 10 min y después se resuspendió en 40 μL de agua ultrapura. El ARN se colocó en hielo inmediatamente y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su uso inmediato o a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis.

La integridad del ARN fue evaluada mediante una electroforesis en un gel de agarosa-TAE1X al 1.2%. Para determinar la concentración del ARN se tomaron 5 μL de cada muestra y se diluyeron en 95 μL de agua ultrapura (dilución 1:20), y se midió la absorbancia a 260 nm (A_{260}) en un espectrofotómetro (SmartSpec™Plus, BioRad). Para estimar la pureza del ARN se tomaron 5 μL de cada muestra y se diluyeron en 95 μL de 10 mM Tris-HCl, pH de 7.5. En la lectura de la pureza del ARN se utilizó un ratio de absorbancia de A_{260}/A_{280} , en donde el ARN fue considerado puro si A_{260}/A_{280} se encontraba dentro del rango de 1.9 a 2.1 (Qiagen, 2001).

2.2.7 Síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc se realizó con una cantidad inicial de 10 μg de ARN total como molde. El ARN se mezcló con 2.5 μM de oligo dT (Invitrogen) en un volumen final de 20 μL , se incubó a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min e inmediatamente se enfrió en hielo. Una vez realizado lo anterior, se procedió a llevar a cabo la reacción de la transcriptasa reversa, para lo cual se dividió la muestra anterior en dos tubos, el primero como muestra experimental (+RT) y el segundo como control negativo (sin adición de la transcriptasa reversa, -RT). La mezcla de reacción para la RT-PCR quedó compuesta de la siguiente manera: 10 μL de muestra (ARN + oligodT, Invitrogen), amortiguador First Strand (1X), 10 mM de DTT (0.1 M, Invitrogen), 1 mM de dNTP's (10 mM, Roche), 40 U del inhibidor de ARNasa (40 U/ μL , Invitrogen), 200 U de la enzima Superscript III (200 U/ μL , Invitrogen) para +RT o agua ultrapura para -RT, para tener un volumen final de 20 μL por muestra. Se incubó a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 90 min y después se inactivó la reacción a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min. A cada muestra se le adicionaron 4 μL de ARNasa A (100 mg/mL, Sigma) y se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. Finalmente, se realizó una dilución 1:5 con agua ultrapura y los tubos se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Como control para los experimentos de RT-PCR se empleó el gen nuclear de la actina cuyos oligonucleótidos flanquean un intrón de forma que se obtiene un amplicón de 209

pb en ADNc y 429 pb en ADN genómico. La actina al ser un gen constitutivo se utilizó como control positivo para corroborar que la carga en el gel haya sido homogénea y que los componentes de la reacción de RT-PCR funcionaran adecuadamente. Estos oligonucleótidos también se usaron como control negativo en la muestra sin retrotranscriptasa donde no se debe observar amplificación, ya que de observarse un amplicon de 429 pb sería un indicador de contaminación con ADNg.

2.2.8 Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR

El análisis de expresión génica se realizó empleando como template ADNc generado según lo descrito en el apartado anterior. La reacción de PCR general consistió de lo siguiente: 5 µL de template, oligonucleótido forward 10 µM (1 µL), oligonucleótido reverse 10 µM (1 µL), dNTP's 10 mM (1 µL), MgCl₂ 50 mM (1.5 µL), amortiguador de PCR 10X (1X), Taq polimerasa 5 U/µL (1 U) y agua ultrapura en un volumen final de 50 µL.

El programa de la reacción de PCR fue el siguiente: 1) desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, 2) desnaturalización a 95 °C durante 30 s, 3) alineamiento a 55 °C durante 30 s, 4) extensión a 72 °C durante 30 s, del paso 2 al 4 se realizaron 39 repeticiones y una extensión final a 72 °C durante 10 min. Los oligonucleótidos empleados se presentan en el Cuadro 2.1.

2.2.9 Mapeo de los extremos terminales del ADNc de CrGPDH2 y CrGPDH3 mediante la técnica de RLM-RACE

El mapeo de los extremos terminales 5' y 3' de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de *C. reinhardtii* se llevó a cabo mediante la amplificación por PCR de los extremos de ADNc mediado por ARN ligasa (RLM-RACE) utilizando el estuche comercial GeneRacer (Invitrogen). Los oligonucleótidos específicos que se presentan en el Cuadro 2.2 fueron diseñados basados en la secuencia *in silico* de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* reportada en la base de datos del Phytozome del genoma v5.3.1 de *C. reinhardtii* (<http://www.phytozome.net/chlamy.php>).

El extremo 5' de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* fue amplificado mediante PCR utilizando ADNc como template. El ADNc fue sintetizado a partir del ARN de un cultivo de

C. reinhardtii con tratamiento de 200 mM de NaCl por 2 h para la expresión de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* en esta microalga (Herrera-Valencia *et al.*, 2012). Sin embargo, antes de realizar la síntesis de ADNc, el ARN total fue tratado con una fosfatasa intestinal (CIP) [10 U/μL en: 25 mM Tris HCl, pH 7.6, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM ZnCl₂, 50% glicerol (w/v)] para desfosforilar el ARNm (Figura 2.3), seguido de un tratamiento con la enzima ácido pirofosfatasa (TAP) [0.5 U/ μL en: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.01% Tritón X-100, 50% glicerol (w/v)] para remover la estructura CAP (Figura 2.4) y por último una ligación con el oligo ARN (GeneRacer™ RNA Oligo; 44 nucleótidos; 5'-CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA-3') al extremo 5' del ARNm usando la ARN Ligasa T4 [5 U/ μL en: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% Tritón X-100, 50% glicerol (w/v)] (Figura 2.5).

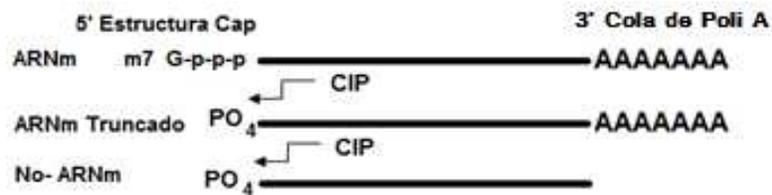


Figura 2.3. Representación esquemática del proceso de desfosforilación con la enzima fosfatasa intestinal de ternera (CIP). Esta enzima sólo actúa sobre los ARN's que no contengan la estructura "CAP".

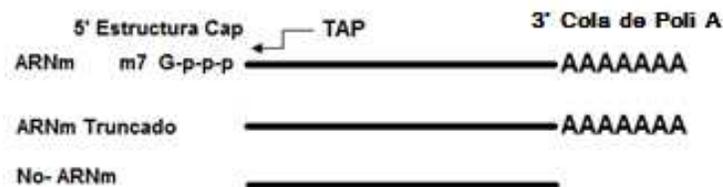


Figura 2.4. Representación esquemática del proceso de decapitación en aquellos ARN mensajeros que contienen la estructura "CAP".

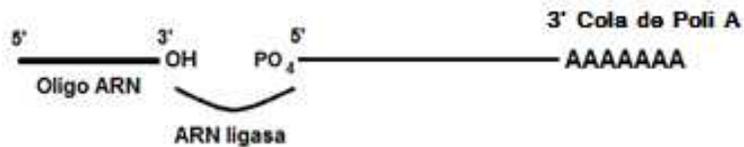


Figura 2.5. Representación gráfica del proceso de ligación del oligonucleótido Gene Racer y el ARN mensajero decapitado.

El 5' RACE de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos reverse que se presentan en el Cuadro 2.2 en combinación con los oligonucleótidos 5' GeneRacer (Invitrogen). El amplicón resultante fue usado como molde para una segunda amplificación (PCR anidada) utilizando los oligonucleótidos reverse nested que se presentan en el Cuadro 2.2 en combinación con los oligonucleótidos nested 5' GeneRacer (Invitrogen).

En la amplificación mediante RT-PCR del extremo 3' RACE de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* el ADNc usado como templete fue sintetizado con ARN proveniente de un cultivo de *C. reinhardtii* tratado a 200 mM de NaCl por 2 h para la expresión de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* en esta microalga (Herrera-Valencia *et al.*, 2012). En la reacción de retrotranscriptasa reversa se utilizó el ARN total, la enzima SuperScript III, para retrotranscribir el ARNm, y el oligo dT [Gene RACER™ Oligo dT Primer; 54 nucleótidos; 50 mM; 5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG(T)₂₄-3' para crear la primera hebra del ADNc con sitios de anclaje para los cebadores de secuencia conocida en el extremo 3' terminal.

Para la amplificación del 3' RACE de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* se utilizaron los oligonucleótidos forward que se presentan en el Cuadro 2.2 en combinación con los oligonucleótidos 3' GeneRacer (Invitrogen). El amplicón resultante fue usado como molde para una segunda amplificación (PCR anidada) utilizando los oligonucleótidos forward nested que se presentan en el Cuadro 2.2 en combinación con los oligonucleótidos nested 3' GeneRacer (Invitrogen).

Cuadro 2.2. Oligonucleótidos específicos utilizados para la amplificación de las secuencias flanqueantes de los extremos terminales 5' y 3' del ADNc de *CrGPDH2* y *CrGPDH3* mediante la técnica de RLM-RACE.

Gen CrGPDH	Orientación del Oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido	Nombre del oligonucleótido
<i>CrGPDH2</i>	Reverse 5' RACE	5'-AGCGCGCGCTCGGACGGGACG-3'	2-Rv-GR5'
	Reverse 5' RACE nested	5'-TGGCAGAGGAAGCGGTCTTTTGTG-3'	2-Rv-GRN5'
	Forward 3' RACE	5'-TGTGGGCATGGTGGACGGCC-3'	CrGPDH7F
	Forward 3' RACE nested	5'-AAGTACCCGCTGTTCACCACCATC-3'	6Fw-GRN3'
<i>CrGPDH3</i>	Reverse 5' RACE	5'-AGCAGGTCCAGGCCGTCGTTGAC-3'	Rv-5'GPDH3
	Reverse 5' RACE nested	5'-ACATTGCCGTTGTTGGAAGTGGTG-3'	Rv-5'NGPDH3
	Forward 3' RACE	5'-AAGTACCCGCTGTTCACCACCATC-3'	Fw-3'GPDH3
	Forward 3' RACE nested	5'-TCGCCGTTGACGTCGAGGAGGAC-3'	Fw-3'NGPDH3

El programa que se utilizó para la amplificación de los extremos 5' y 3' de *CrGPDH2* y *CrGPDH3* fue de 95 °C durante 3 min, 10 ciclos de 95 °C durante 30 s, 65 °C durante 30 s (en cada ciclo se disminuye 0.5 °C hasta llegar a los 60 °C), 68 °C durante 1 min (5' UTR de *CrGPDH2* y *CrGPDH3*) ó 2 min (3' UTR de *CrGPDH2* y *CrGPDH3*), después 30 ciclos de 95 °C durante 30 s, 60 °C durante 30 s, 68 °C durante 1 min (5' UTR de *CrGPDH2* y *CrGPDH3*) ó 2 min (3' UTR de *CrGPDH2* y *CrGPDH3*), y finalmente una extensión final a 68 °C durante 10 min. La enzima que se utilizó para llevar a cabo la reacción fue la Expand Long Template PCR System (Roche) y se adicionó el amortiguador 5X CES (Combinatorial PCR Enhancer Solution) a la reacción de PCR, debido al alto contenido de G y C en la secuencia de ambos genes. El amortiguador 5X CES es una mezcla de 6.7 mM DTT, 6.7 % DMSO, 55 µg/mL BSA y 2.7 M betaína (Ralser *et al.*, 2006).

Los productos de PCR del 5' y 3' RACE de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* fueron visualizados en una electroforesis con un gel de agarosa al 1.2% y las bandas de ~350 y ~942 pb correspondientes al fragmento esperado del 5' y 3' RACE de *CrGPDH2* y, las bandas de ~433 y ~1,212 pb correspondientes al fragmento esperado de 5' y 3' RACE de *CrGPDH3* fueron escindidas del gel con un bisturí y posteriormente cada una fue

purificada con el Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Cada fragmento purificado fue ligado al vector pGEM[®]-T Easy mediante una reacción de ligación cuya composición fue la siguiente: 1 µL del vector pGEM[®]-T Easy (50 ng/µL) (Promega), 7.5 µL del fragmento purificado, amortiguador T4-DNA ligasa 10X (1X) (New England BioLabs, NEB) y T4-DNA ligasa 20 U/µL (20U) (New England BioLabs, NEB) en un volumen final de 10 µL. La ligación se dejó incubando a 16 °C durante toda la noche y posteriormente fue inactivada a 65 °C durante 20 min. Las células competentes de *E. coli* DH10B fueron transformadas con el resultado de la ligación previa mediante el protocolo de pGEM[®]-T Easy (Promega).

Las células transformadas fueron plaqueadas en una caja de medio de selección LB adicionado con ampicilina (10 mg/mL), Xgal (80 µg/mL) e IPTG (0.5 mM) y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Las colonias obtenidas fueron picadas y se propagaron en 4 mL de medio de selección LB líquido adicionado con ampicilina (10 mg/mL). El plásmido fue extraído con el Kit comercial High Pure Plasmid Isolation (Roche) y se verificó su integridad mediante una digestión con la enzima de restricción *EcoRI*, cuyo sitio de corte flanquea al inserto. La reacción de digestión constó de plásmido (0.5-1 µg), amortiguador 4 10X (1X) y *EcoRI* 20 U/µL (20U) en un volumen final de 20 µL. Los plásmidos generados en esta etapa fueron nombrados como 5'CrGPDH2 y 3'CrGPDH2 para el 5' y 3' RACE de *CrGPDH2*, respectivamente, y 5'CrGPDH3 y 3'CrGPDH3 para el 5' y 3' RACE de *CrGPDH3*, respectivamente.

Los plásmidos obtenidos fueron enviados para su secuenciación al Instituto de Genómica de la Universidad de Clemson (GUCI, SC, EEUU). Los cromatogramas resultantes de cada secuencia de estudio fueron ensamblados con el programa bioinformático SeqMan (DNASTAR Lasergene v7.2.1). Las secuencias fueron alineadas con el programa ClustalX v2.0 con los parámetros pre-establecidos (Larkin *et al.*, 2007) para comparar la secuencia ensamblada con la predicción *in silico* obtenida de la base de datos del Phytozome (<http://www.phytozome.net/chlamy.php>). Los nucleótidos idénticos fueron sombreados en el alineamiento con color negro y las sustituciones conservativas con color gris usando el programa en línea BoxShade v3.21 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

2.2.10 Clonación de los genes CrGPDH2 y CrGPDH3 de *C. reinhardtii*

El marco de lectura abierto de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* se amplificó mediante RT-PCR utilizando los oligonucleótidos específicos que se presentan en el Cuadro 2.3. Los oligonucleótidos que se presenta en el Cuadro 2.3 fueron diseñados basados en la secuencia obtenida del mapeo de cada uno de los extremos 5' y 3' de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* del apartado anterior.

Se utilizó la reacción de PCR anidada para amplificar a los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de *C. reinhardtii*. En la primera reacción de PCR se utilizó como templete el ADNc obtenido en el RLM-RACE en combinación con el oligonucleótido forward que se une tanto a la secuencia del gen *CrGPDH2* como a la del gen *CrGPDH3* junto con el oligonucleótido reverse que se une de manera específica al gen *CrGPDH2* o al gen *CrGPDH3* (Cuadro 2.3). En la segunda reacción de PCR, cada uno de los amplicones resultantes de la primera PCR fue utilizado como templete junto con la combinación de oligonucleótidos forward y reverse nested para amplificar tanto a *CrGPDH2* como a *CrGPDH3* (Cuadro 2.3).

Cuadro 2.3. Oligonucleótidos específicos empleados para la amplificación del marco de lectura abierto de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de *C. reinhardtii*.

Gen CrGPDH	Orientación del Oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido	Nombre del oligonucleótido
<i>CrGPDH2</i> <i>CrGPDH3</i>	Forward	5'-GGACACTGACATGGACTGAAGG AGTA-3'	Gene Racer™ 5'Nested primer
<i>CrGPDH2</i>	Reverse	5'-ACTGCTCCTGCTCATTGTG-3'	GPDH23UTRR(250)
<i>CrGPDH3</i>	Reverse	5'-ACTGCTCCTGCTCATCGGTGAC- 3'	GPDH33UTRR(190)
<i>CrGPDH2</i> <i>CrGPDH3</i>	Forward nested	5'-ATCGAATTCGGATCCGCAACAAT GATGCTGTCAGGCCGCACC-3'	*Fa-CrGPDH2
<i>CrGPDH2</i> <i>CrGPDH3</i>	Reverse nested	5'-TATACTAGTGC GGCCGCTTACAC GCTGTTGCTGGCAGC-3'	*Ra-CrGPDH2

* Las secuencias subrayadas indican los sitios de restricción de las enzimas *EcoRI* (GAATTC), *BamHI* (GGATCC), *SpeI* (ACTAGT) y *NotI* (GCGGCCGC).

El programa que se utilizó para la primera amplificación de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* fue de 95 °C durante 3 min, 20 ciclos de 95 °C durante 30 s, 65 °C durante 30 s (en cada ciclo se disminuye 0.5 °C hasta llegar a los 55 °C), 68 °C durante 3 min, después 20 ciclos (*CrGPDH2*) ó 10 ciclos (*CrGPDH3*) de 95 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s, 68 °C durante 3 min seguido de una extensión final a 68 °C durante 10 min. El programa de la segunda amplificación fue de 95 °C durante 3 min, 10 ciclos de 95 °C durante 30 s, 60 °C durante 30 s (en cada ciclo se disminuye 0.5 °C hasta llegar a los 55 °C), 68 °C durante 3 min, después 10 ciclos de 95 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s, 68 °C durante 3 min y finalmente una extensión final a 68 °C durante 10 min. La enzima que se utilizó para llevar a cabo la reacción de PCR fue la Expand Long Template PCR System (Roche) y se adicionó el amortiguador 5X CES (Combinatorial PCR Enhancer Solution) a la reacción de PCR, debido al alto contenido de G y C en la secuencia de ambos genes. El amortiguador 5X CES es una mezcla de 6.7 mM DTT, 6.7 % DMSO, 55 µg/mL BSA y 2.7 M betaína (Ralser *et al.*, 2006).

Los productos de PCR fueron visualizados en una electroforesis con un gel de agarosa al 1.2% y las bandas de ~2,172 y ~2,200 pb correspondientes al fragmento esperado de *CrGPDH2* y *CrGPDH3* fueron escindidas del gel con un bisturí y posteriormente cada una fue purificada con el Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Cada fragmento purificado fue ligado al vector pGEM®-T Easy mediante la reacción de ligación que se presenta en el apartado anterior. La ligación se dejó incubando a 16 °C durante toda la noche y posteriormente fue inactivada a 65 °C durante 20 min. Las células competentes de *E. coli* DH10B fueron transformadas con el resultado de la ligación previa mediante el protocolo de pGEM®-T Easy (Promega). Las células transformadas fueron plaqueadas en una caja de medio de selección LB adicionado con ampicilina (10 mg/mL), Xgal (80 µg/mL) e IPTG (0.5 mM) y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Las colonias obtenidas fueron picadas y se propagaron en 4 mL de medio de selección LB líquido adicionado con ampicilina (10 mg/mL). El plásmido fue extraído con el Kit comercial High Pure Plasmid Isolation (Roche) y se verificó su integridad mediante una digestión con la enzima de restricción *EcoRI*, como se menciona en el apartado anterior. Los plásmidos generados en esta etapa fueron nombrados como ORFCrGPDH2 y ORFCrGPDH3 para el marco de lectura abierto de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3*, respectivamente.

Los plásmidos obtenidos fueron enviados para su secuenciación al Instituto de Genómica de la Universidad de Clemson (GUCI, SC, EEUU). Los cromatogramas resultantes de cada secuencia de estudio fueron ensamblados con el programa bioinformático SeqMan (DNASTAR Lasergene v7.2.1). Las secuencias fueron alineadas con el programa ClustalX v2.0 con los parámetros pre-establecidos (Larkin *et al.*, 2007) para comparar la secuencia ensamblada con la predicción *in silico* obtenida de la base de datos del Phytozome (<http://www.phytozome.net/chlamy.php>). Los nucleótidos y residuos aminoacídicos idénticos fueron sombreados en el alineamiento con color negro y las sustituciones conservativas con color gris usando el programa en línea BoxShade v3.21 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

Como parte de la clonación del marco de lectura abierto (ORF) de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3*, se utilizó el protocolo de mutagénesis sitio-dirigida del estuche comercial QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) para revertir una mutación generada durante el proceso de amplificación de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* mediante PCR. Los oligonucleótidos específicos se diseñaron de tal forma que fueran complementarios al sitio de la mutación de cada uno de los genes de acuerdo con las recomendaciones del proveedor del estuche comercial (Cuadro 2.4).

Cuadro 2.4. Oligonucleótidos específicos utilizados para la corrección de la mutación del marco de lectura abierto de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de *C. reinhardtii*.

Gen CrGPDH	Orientación del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido	Nombre del oligonucleótido
<i>CrGPDH2</i>	Forward	5'-CTCGCCCGACGACATCCGCCGCTTCAT CAAG-3'	*FMutGPDH2
	Reverse	5'-CTTGATGAAGCGGCGGATGTCGTCGGG CGAG-3'	RMutGPDH2
<i>CrGPDH3</i>	Forward	5'-CATGATCGGCGACGGCATCACCGACCT GGAG-3'	FMutGPDH3
	Reverse	5'-CTCCAGGTCGGTGATGCCGTCGCCGAT CATG-3'	RMutGPDH3

*Ambos oligonucleótidos fueron diseñados de tal forma que dentro de su secuencia contengan la reversión de la mutación en el nucleótido deseado.

2.2.11 Obtención del plásmido pCrGPDH2c

El marco de lectura abierto (ORF) del gen *CrGDPH2* fue clonado en el vector p424GPD (Mumberg *et al.*, 1995) entre los sitios de restricción *EcoRI* y *SpeI*. La reacción de digestión para p424GPD y el plásmido donde se encontraba la ORF de *CrGDPH2* constó de: Plásmido 1 µg, Amortiguador 4 10X (1X), *EcoRI* 20 U/µL (10U), *SpeI* 20 U/µL (10 U) en un volumen final de 50 µL. Se incubó a 37 °C durante 2 h y después se inactivo a 80 °C durante 20 min. La digestión del vector p424GPD y el inserto de la ORF de *CrGDPH2* fue separada en una electroforesis con un gel de agarosa al 0.7%. Las bandas de ~6,527 (p424GPD) y ~2,172 pb (ORF de *CrGDPH2*) fueron escindidas del gel con un bisturí y purificadas con el Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). La ligación de los fragmentos purificados se llevó a cabo usando la siguiente reacción: 5 µL de vector, 7 µL de inserto, Amortiguador T4-DNA ligasa 10X (1X) y T4-DNA ligasa 20 U/µL (20U) en un volumen final de 20 µL. La ligación se dejó incubando a 16 °C toda la noche y después se inactivó a 65 °C durante 20 min. Se realizó la transformación de células competentes de *E. coli* DH10B siguiendo el protocolo de pGEM®-T-easy (Promega). Las células transformadas fueron plaqueadas en platos de Petri con medio de selección LB sólido adicionado con ampicilina (10 mg/mL) y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Las colonias blancas se picaron y se propagaron en medio de selección LB líquido adicionado con ampicilina (10 mg/mL). El plásmido fue purificado por medio del Kit comercial High Pure Plasmid Isolation (Roche) y se verificó su integridad mediante una digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *SpeI* de la misma manera descrita anteriormente. El plásmido generado en este paso fue nombrado p424GPDGPD2. A partir de este plásmido se clonó la ORF del gen *CrGDPH2* en el vector pChlamy_4 (Invitrogen) entre los sitios de restricción *BamHI* y *XbaI*. La reacción de digestión para el vector pChlamy_4 y el plásmido p424GPDGPD2 constó de los siguientes componentes: Plásmido 1 µg, Amortiguador 3 10X (1X), BSA 100X (1X), *BamHI* 20 U/µL (10U), *XbaI* 20 U/µL (10 U) en un volumen final de 50 µL. La digestión del vector pChlamy_4 y el inserto de la ORF de *CrGDPH2* fue separada en una electroforesis con un gel de agarosa al 0.7%. Las bandas de ~3,640 (pChlamy_4) y ~2,172 pb (ORF de *CrGDPH2*), fueron escindidas del gel con un bisturí y purificadas con el Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). La ligación de los fragmentos purificados, transformación y purificación del plásmido se llevó a cabo como se mencionó anteriormente. El plásmido generado fue nombrado pCrGPDH2c.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

La calidad del ARN utilizado para la síntesis de ADNc se presenta en las Figuras 2.6, 2.7 y 2.8, y la concentración y pureza del ARN de cada una de las muestras se presenta en los Cuadros 2.5, 2.6 y 2.7. La síntesis de ADNc se realizó tomando 10 µg de ARN total de cada muestra para posteriormente realizar el análisis de expresión de los genes *CrGPDH* a los diferentes tratamientos de NaCl evaluados.

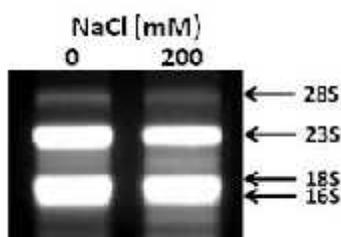


Figura 2.6. Calidad del ARN total extraído a partir de células de *C. reinhardtii* empleando el Protocolo GE Healthcare Illustra RNAspin Mini. 0 mM NaCl: Muestra sin tratamiento, 200 mM NaCl: Muestra tratada a 200 mM de NaCl por 2 h. En cada carril se depositaron 2 µg de ARN de la muestra correspondiente.

Cuadro 2.5. Concentración y pureza del ARN extraído a partir de células de *C. reinhardtii* cultivadas a 0 y 200 mM de NaCl por 2 h.

Tratamiento de NaCl	Concentración (µg/µL)	Pureza (A260/A280)
0 mM	1.08	2.01
200 mM	0.69	1.94

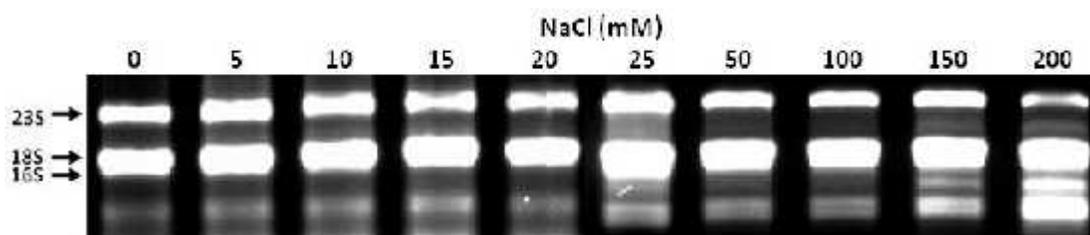


Figura 2.7. Calidad del ARN total extraído a partir de células de *C. reinhardtii* empleando el reactivo de TRIZOL. 0 mM NaCl: Muestra sin tratamiento, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150 y 200 mM de NaCl: Muestra tratada a 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150 y 200 mM de NaCl por 2 h, respectivamente. En cada carril se depositaron 2 µg del ARN de cada muestra.

Cuadro 2.6. Concentración y pureza del ARN extraído a partir de células de *C. reinhardtii* cultivadas a 0, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150 y 200 mM de NaCl por 2 h.

Tratamiento de NaCl	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Pureza (A260/A280)
0 mM	2.45	1.95
5 mM	2.08	1.97
10 mM	2.40	1.93
15 mM	2.49	1.91
20 mM	2.27	1.93
25 mM	1.40	1.92
50 mM	1.52	2.00
100 mM	1.19	1.97
150 mM	1.80	1.98
200 mM	1.87	2.00

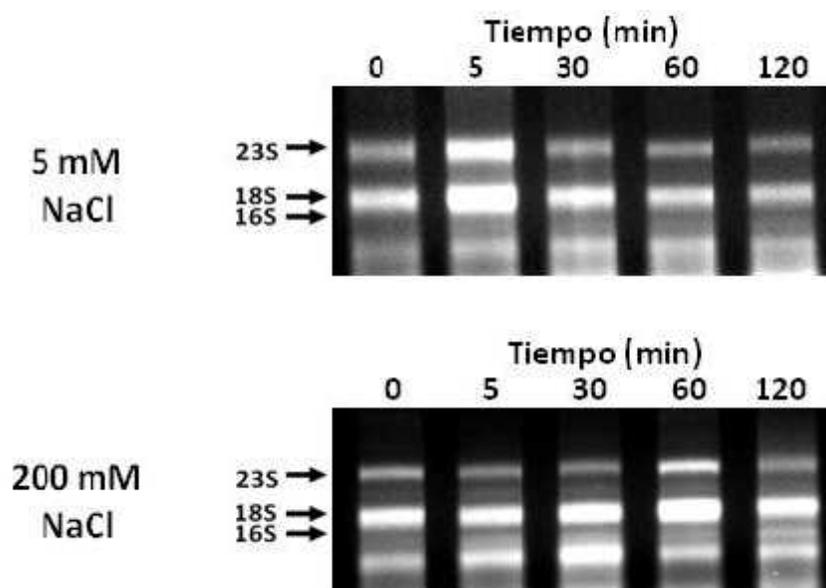


Figura 2.8. Calidad del ARN total extraído a partir de células de *C. reinhardtii* empleando el reactivo de TRIZOL. 5 y 200 mM NaCl: Muestras tratadas a 5 y 200 mM de NaCl, 200 mM de NaCl: Muestra tratada a 200 mM de NaCl por 5, 30, 60 y 120 min, respectivamente. 0 min: Muestra control sin tratamiento de NaCl. En cada carril se depositó 2 μg del ARN de cada muestra.

Cuadro 2.7. Concentración y pureza del ARN extraído a partir de células de *C. reinhardtii* cultivadas a 5 y 200 mM de NaCl por 5, 30, 60 y 120 min.

Tratamiento de NaCl	Tiempo de tratamiento	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Pureza (A260/A280)
5 mM	0 min	1.32	1.97
	5 min	2.07	1.96
	30 min	1.63	1.90
	60 min	1.56	1.98
	120 min	1.11	1.95
200 mM	0 min	1.82	1.99
	5 min	1.96	1.97
	30 min	2.09	2.00
	60 min	2.37	1.98
	120 min	1.88	1.95

2.3.2 Análisis de la expresión de los tres genes CrGPDH en respuesta al tratamiento de 200 mM de NaCl por 2 h

La expresión de los tres genes *CrGPDH* de *C. reinhardtii* fue evaluada por medio de RT-PCR. Se llevó a cabo el análisis de la expresión de los genes *CrGPDH1*, *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de *C. reinhardtii* a los tratamientos de 0 y 200 mM de NaCl por 2 h. El resultado de este análisis se presenta en la Figura 2.9, en donde se detectó la expresión constitutiva de *CrGPDH1* al tratamiento de NaCl evaluado, observándose una banda intensa en el gel de electroforesis que corresponde al amplicón esperado de ~210 pb. A diferencia de este gen, *CrGPDH2* y *CrGPDH3* presentaron muy bajos niveles de expresión en el tratamiento a 0 mM de NaCl, sin embargo, y notablemente, en el tratamiento a 200 mM de NaCl se observó una banda intensa para el amplicón de ~191 y ~280 pb predicho para *CrGPDH2* y *CrGPDH3*, respectivamente, lo que sugiere una expresión elevada en los transcritos de ambos genes bajo condiciones de estrés osmótico con NaCl. Este análisis se corroboró mediante una segunda réplica del experimento y se obtuvo el mismo resultado para los tres genes. El resultado de este análisis formó parte de los resultados publicados en el artículo de Herrera-Valencia *et al.* (2012).

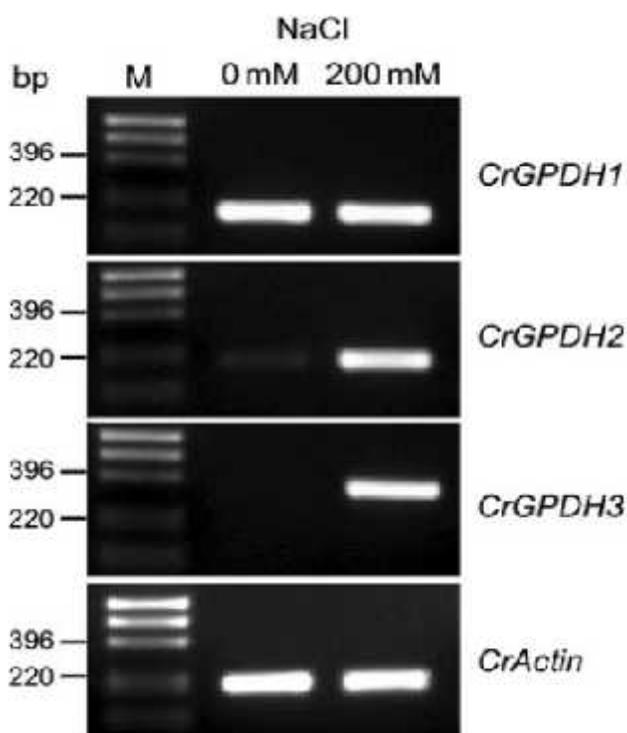


Figura 2.9. Análisis de la expresión de los genes *CrGPDH1*, *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de *C. reinhardtii* mediante RT-PCR en muestras sin tratamiento con NaCl (0 mM de NaCl) y muestras tratadas 2 h a 200 mM de NaCl (200 mM NaCl). *CrActina*: actina de *C. reinhardtii*. M: Marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen).

En la Figura 2.9 se observa que el perfil de expresión del gen de la actina de *C. reinhardtii* (*CrActin*) fue similar en el tratamiento de 0 y 200 mM de NaCl, indicando que la cantidad de ARN utilizado como template para la síntesis de ADNc fue similar en ambos tratamientos y que no se presentó contaminación con ADNg debido a que el amplicón que contiene el intrón de 220 pb no fue detectado.

2.3.3 Análisis de la expresión de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* en respuesta a diferentes tratamientos de NaCl

Para el análisis de expresión a las concentraciones de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150 y 200 mM de NaCl por 2 h se eligieron los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3*, debido a que fueron los únicos que presentaron un aumento en el nivel de transcritos en el experimento previo a 200 mM de NaCl por 2 h (Figura 2.9). Adicionalmente a este experimento, se

analizó la expresión de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* a las concentraciones de 5 y 200 mM de NaCl por diferentes tiempos (5, 30, 60 y 120 min). Los resultados de ambos experimentos se pueden observar en la Figura 2.10.

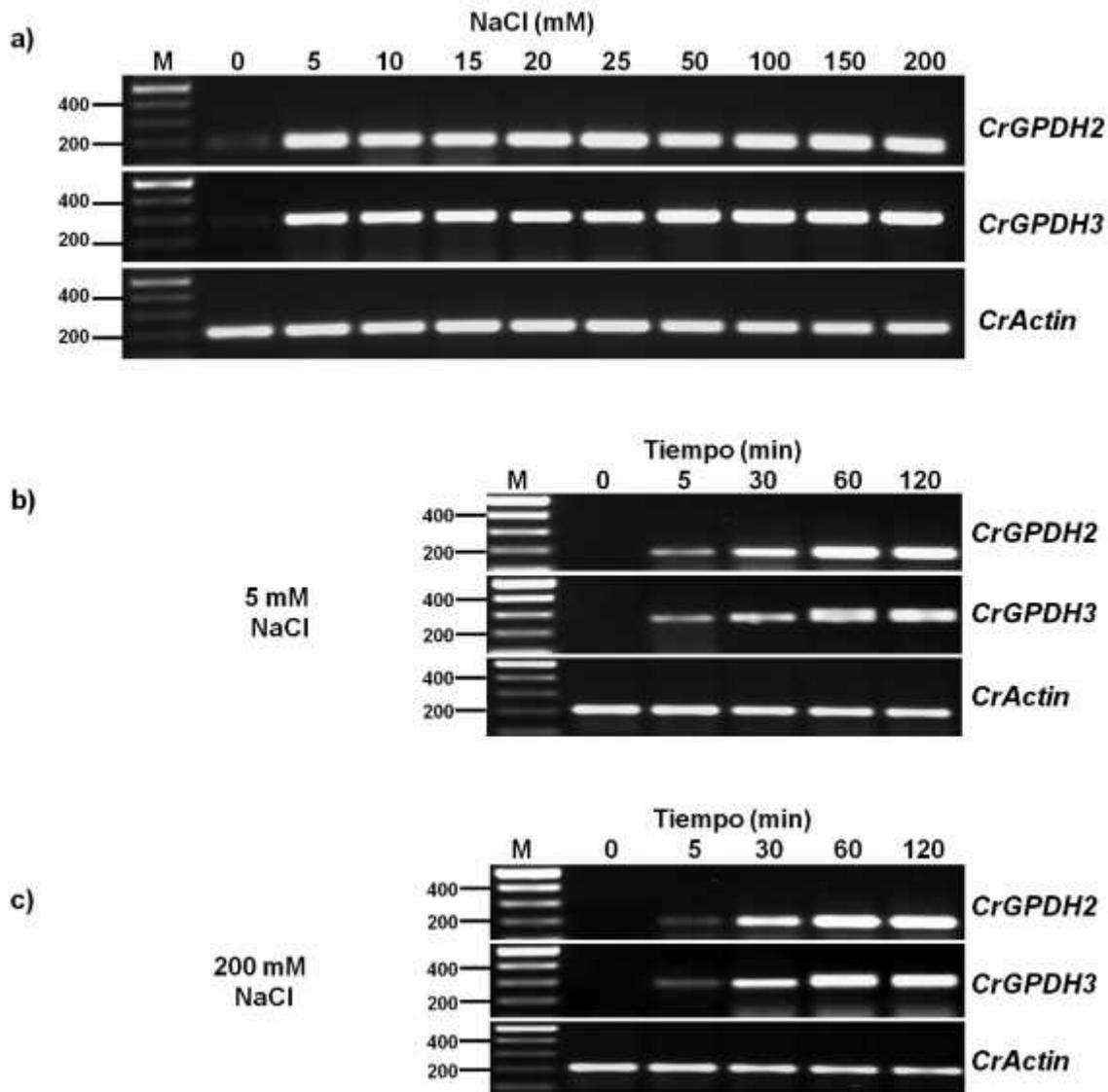


Figura 2.10. Análisis de la expresión de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* mediante RT-PCR a diferentes tratamientos de NaCl. Las células de *C. reinhardtii* fueron colectadas para su análisis después de los siguientes tratamientos: a) 2 h con 0, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 150 y 200 mM de NaCl; b) 5, 30, 60 y 120 min a 5 mM de NaCl, las células sin tratamiento de NaCl fueron usadas como control (tiempo cero); y c) 5, 30, 60 y 120 min a 200 mM de NaCl, las células sin tratamiento de NaCl fueron usadas como control (tiempo cero). *CrActina*: actina de *C. reinhardtii*. M: Marcador de peso molecular 2-log (NEB).

En el análisis de la expresión de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* a diferentes concentraciones de NaCl por 2 h, se observó un perfil de expresión bajo o casi nulo en ausencia de NaCl, similar a lo observado en el experimento de la Figura 2.9. Por su parte, se pudo notar la presencia de una banda intensa que corresponde al amplicón predicho de ~191 y ~280 pb para *CrGPDH2* y *CrGPDH3*, respectivamente, en todos los tratamientos de NaCl evaluados por 2 h, incluso a una concentración de tan sólo 5 mM de NaCl (Figura 2.10a). El perfil de expresión de *CrGPDH2* y *CrGPDH3* a lo largo de los tiempos evaluados demostró que ambos genes presentan una inducción en su expresión a partir de tan sólo 5 min a las concentraciones de 5 y 200 mM de NaCl (Figuras 2.10b y 2.10c), lo cual sugiere que el aumento en la expresión de estos genes está asociada al tratamiento por NaCl.

En la Figura 2.10 se observa que el perfil de expresión del gen de la actina de *C. reinhardtii* (*CrActin*) fue similar en todos los tratamientos evaluados, indicando que la cantidad de ARN utilizado como template para la síntesis de ADNc fue similar en todos los experimentos y que no se presentó contaminación con ADNg debido a que el amplicón que contiene el intrón de 220 pb no fue detectado.

El resultado del análisis de expresión de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de *C. reinhardtii* que se presenta en la Figura 2.10 formó parte de los resultados que se publicaron en el artículo de Casais-Molina *et al.* (2015).

2.3.4 Clonación del ADNc del gen *CrGPDH2* de *C. reinhardtii*

2.3.4.1 Mapeo de los extremos terminales 5' y 3' UTR del ADNc del gen *CrGPDH2*

La amplificación de los extremos terminales 5' y 3' del gen *CrGPDH2* se llevó a cabo mediante RT-PCR utilizando la enzima Expand Long Template (Roche) para eliminar la inespecificidad del pegado de los oligonucleótidos y obtener un fragmento de mejor calidad. Los resultados de la amplificación se presentan en la figura 2.11. Los productos de PCR del 5' y 3' RACE de *CrGPDH2* fueron denominados arbitrariamente 5'CrGPDH2 y 3'CrGPDH2 y corresponden a un amplicón de ~350 y ~942 pb, respectivamente.

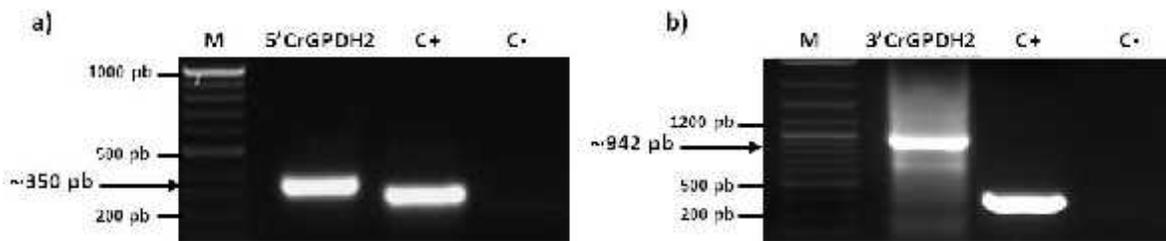


Figura 2.11. Amplificación de los extremos 5' y 3' terminales del gen *CrGPDH2* de *C. reinhardtii* mediante la técnica del RLM-RACE, en donde: a) Extremo 5' terminal de *CrGPDH2* (5'CrGPDH2) y b) Extremo 3' terminal de *CrGPDH2* (3'CrGPDH2). M: Marcador de peso molecular 2-log (NEB); C+: Control positivo de la reacción (*CrActin*); C-: Control negativo de la reacción.

Los productos de la reacción de PCR mostrados anteriormente fueron clonados en el vector pGEM[®]-T Easy y se comprobó su inserción mediante una digestión con la enzima de restricción *EcoRI* (NEB). El resultado de esta digestión fue la visualización de dos bandas, la primera de ~3.0 Kb que corresponde al vector pGEM[®]-T Easy y la segunda de ~350 pb y ~942 pb que corresponde al extremo 5' ó 3' RACE del gen *CrGPDH2*, respectivamente (figura 2.12).

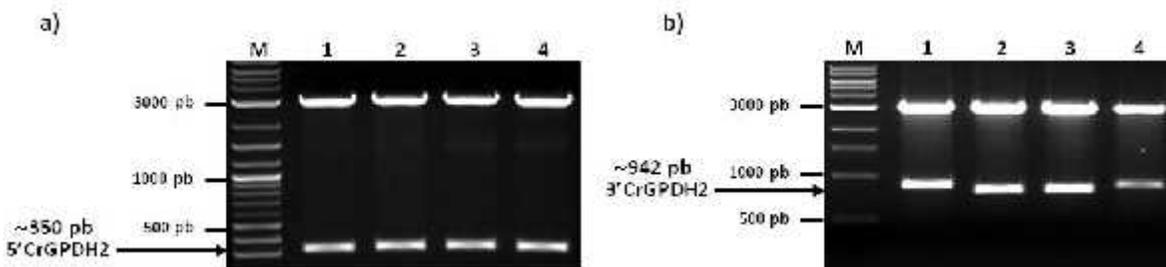


Figura 2.12. Verificación de la clonación de los extremos 5' y 3' RACE de *CrGPDH2* en pGEM[®]-T Easy. Patrón de electroforesis generado por la enzima *EcoRI* para a) pGEM[®]-T Easy (~3.0 Kb) y 5'CrGPDH2 (~350 pb) y b) pGEM[®]-T Easy (~3.0 Kb) y 3'CrGPDH2 (~942 pb). M: Marcador de peso molecular 2-log (NEB); 1 al 4: clonas analizadas.

Tras enviar a secuenciar los plásmidos que contienen al extremo 5' y 3' RACE de *CrGPDH2* al Instituto de Genómica de la Universidad de Clemson (GUCL, SC, EEUU) se llevó a cabo el alineamiento de cada secuencia obtenida con respecto a la predicción *in silico* de la base de datos del Phytozome y se obtuvieron los resultados que se presentan en las Figuras 2.13 y 2.14.

El alineamiento del extremo 5' del ADNc del gen *CrGPDH2* secuenciado con respecto a la predicción *in silico* no presentó variación alguna en la secuencia de nucleótidos, sin embargo el 5' UTR de *CrGPDH2* encontrado con la técnica de RLM-RACE resultó 20 pb más largo (Figura 2.13).

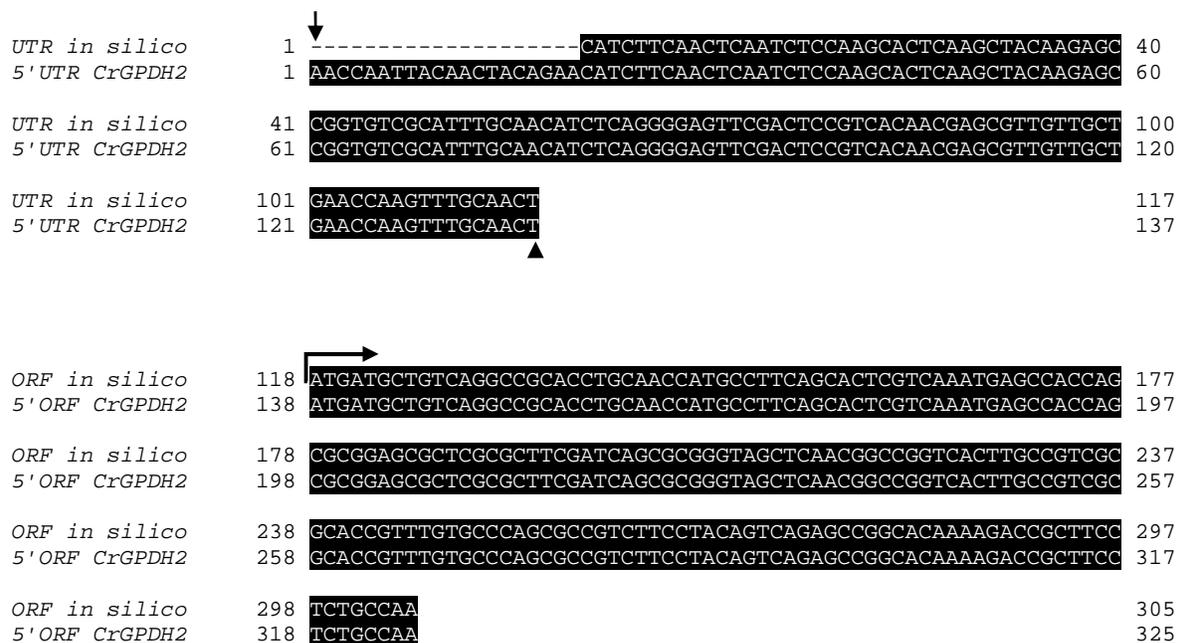


Figura 2.13. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos del extremo 5' del gen *CrGPDH2* de la predicción *in silico* con respecto a la secuencia obtenida del producto secuenciado. La flecha hacia abajo indica el inicio de la región 5' UTR de *CrGPDH2*, el triángulo indica el final de la región 5' UTR de *CrGPDH2* y la flecha que apunta hacia la derecha indica el inicio de la ORF de dicho gen.

El alineamiento del extremo 3' del ADNc del gen *CrGPDH2* secuenciado con respecto a la predicción *in silico* presentó variaciones en cuanto a la longitud de la secuencia de nucleótidos de la región 3' UTR, siendo los 3' UTR de *CrGPDH2* encontrados con la técnica de RACE más cortos que la predicción *in silico*, la cual mide 914 pb (Figura 2.14).

Las longitudes identificadas de la región 3' UTR de *CrGPDH2* fueron de 453, 511, 530 y 564 pb. Las regiones conservadas entre el producto de la secuenciación y la predicción *in silico* se señalan por medio de sombreado.

ORF <i>in silico</i>	1	AAGTACCCGCTGTTTACCACCATCAACCGCATCGTCAACGGCCACCTGCCGCCGCACCTG	60
3'ORF <i>CrGPDH2</i>	1	AAGTACCCGCTGTTTACCACCATCAACCGCATCGTCAACGGCCACCTGCCGCCGCACCTG	60
ORF <i>in silico</i>	61	GTGGTTCGACTACCTGGAGGGCGCCAAGGCCGATATCGCCGTTGACGTTCGAGGAGGATATT	120
3'ORF <i>CrGPDH2</i>	61	GTGGTTCGACTACCTGGAGGGCGCCAAGGCCGATATCGCCGTTGACGTTCGAGGAGGATATT	120
ORF <i>in silico</i>	121	GTGCCCCTGCCGCCAGCCCGCTCCGCCATGGCCCGCCTATTCGGCCAGCTGGTCCGGC	180
3'ORF <i>CrGPDH2</i>	121	GTGCCCCTGCCGCCAGCCCGCTCCGCCATGGCCCGCCTATTCGGCCAGCTGGTCCGGC	180
ORF <i>in silico</i>	181	GGCATCACGCAGCAGGGCGGAGCAGCTGCTGGCGCCGCCAGCGCCGCCAGGCGCC	240
3'ORF <i>CrGPDH2</i>	181	GGCATCACGCAGCAGGGCGGAGCAGCTGCTGGCGCCGCCAGCGCCGCCAGGCGCC	240
		*	
ORF <i>in silico</i>	241	GCCTCCGGCGCTGCCAGCAACAGCGTGTAA	270
3'ORF <i>CrGPDH2</i>	241	GCCTCCGGCGCTGCCAGCAACAGCGTGTAA	270
		↓	
UTR <i>in silico</i>	271	AGGAGGACGTTCCCTTGTGGCAATGGGTGCTGTGATACCGCGCGGAGGGAGGGGCGCGCA	330
3'UTR <i>CrGPDH2</i>	271	AGGAGGACGTTCCCTTGTGGCAATGGGTGCTGTGATACCGCGCGGAGGGAGGGGCGCGCA	330
UTR <i>in silico</i>	331	GCTGCGTACGTGAGCTTCTGTCTCGTAATCTTTGTGCGTGCAGAGCCAAGCGGGATGCT	390
3'UTR <i>CrGPDH2</i>	331	GCTGCGTACGTGAGCTTCTGTCTCGTAATCTTTGTGCGTGCAGAGCCAAGCGGGATGCT	390
UTR <i>in silico</i>	391	GGGACGGAGTTAGCATGGCATGGCGTGGGCTGGTGTACATAACCTTAATTTGTTTTCGTA	450
3'UTR <i>CrGPDH2</i>	391	GGGACGGAGTTAGCATGGCATGGCGTGGGCTGGTGTACATAACCTTAATTTGTTTTCGTA	450
UTR <i>in silico</i>	451	CTTGTGTCAATCGGCTCTGGCGGAGCAGCAATAAGTGAACAGGTGTATTGGCATGCTAT	510
3'UTR <i>CrGPDH2</i>	451	CTTGTGTCAATCGGCTCTGGCGGAGCAGCAATAAGTGAACAGGTGTATTGGCATGCTAT	510
UTR <i>in silico</i>	511	GCGACCTATCTGCCTGTGAGGTAAGGGCCAGCGGGTCTTTGCAAGCGCGTGTTTTGTCT	570
3'UTR <i>CrGPDH2</i>	511	GCGACCTATCTGCCTGTGAGGTAAGGGCCAGCGGGTCTTTGCAAGCGCGTGTTTTGTCT	570
UTR <i>in silico</i>	571	TGGTAGCATAGATCGACACGTGTGTGTGTGTGTATTGGGCGCCGCCGCGCTGTACT	630
3'UTR <i>CrGPDH2</i>	571	TGGTAGCATAGATCGACACGTGTGTGTGTGTGTATTGGGCGCCGCCGCGCTGTACT	630
UTR <i>in silico</i>	631	CGACGTGCAGCCAGCGTTGCCAGGACTGACTTGCAGCGTAGTTCACAAATGAGCAGGAG	690
3'UTR <i>CrGPDH2</i>	631	CGACGTGCAGCCAGCGTTGCCAGGACTGACTTGCAGCGTAGTTCACAAATGAGCAGGAG	690
UTR <i>in silico</i>	691	CAGTGGCAGGCCGTTTGTAAAGGGCCTTGCTGTGGGGATGTCATCTATTCCCTTAGGACAGA	750
3'UTR <i>CrGPDH2</i>	691	CAGTGGCAGGCCGTTTGTAAAGGGCCTTGCTGTGGGGATGTCATCTATTCCCTTAGGACAGA	750
		▲	
UTR <i>in silico</i>	751	AATGATCCCGTGAGTAATCTCGTATGTGGTCTGTATCCACTGCGCCGGCATTCTGCCGCT	810
3'UTR <i>CrGPDH2</i>	751	AATGATCCCGTGAGTAATCTCGTATGTGGTCTGTATCCACTGCGCCGGCATTCTGCCGCT	810
		▲	
UTR <i>in silico</i>	811	GTCGCCCTGTACCTGATGGAGGTG	834
3'UTR <i>CrGPDH2</i>	811	GTCGCCCTGTACCTGATGGAGGTG	834
		▲	

Figura 2.14. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos del extremo 3' del gen *CrGPDH2* de la predicción *in silico* con respecto a la secuencia obtenida del producto secuenciado. El asterisco indica el final de la ORF, la flecha hacia abajo el inicio de la región 3' UTR y el triángulo las diferentes longitudes de la región 3' UTR de dicho gen.

2.3.4.2 Clonación del marco de lectura abierto del gen *CrGPDH2* de *C. reinhardtii*

La amplificación del marco de lectura abierto (ORF) del gen *CrGPDH2* se llevó a cabo mediante RT-PCR utilizando la enzima Expand Long Template (Roche) para eliminar la

inespecificidad del pegado de los oligonucleótidos y obtener un fragmento de mejor calidad. El producto de PCR de la amplificación del marco de lectura abierto del gen *CrGPDH2* fue denominado arbitrariamente ORFCrGPDH2 y corresponde a amplicón de ~2,172 pb (Figura 2.15).

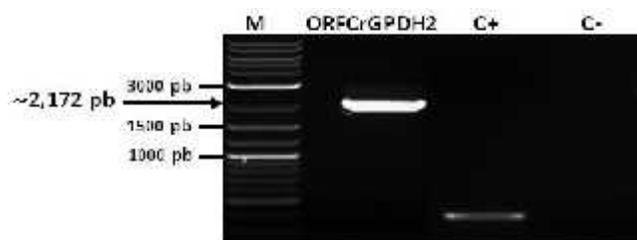


Figura 2.15. Amplificación del marco de lectura abierto del gen *CrGPDH2* de *C. reinhardtii* mediante RT-PCR. M: Marcador de peso molecular 2-log (NEB); C+: Control positivo de la reacción (*CrActin*); C-: Control negativo de la reacción.

El producto de PCR de la amplificación de la ORF del gen *CrGPDH2* denominado ORFCrGPDH2 fue clonado en el vector pGEM[®]-T Easy y se comprobó su inserción mediante una digestión con la enzima de restricción *EcoRI* (NEB). El resultado de esta digestión fue la visualización de dos bandas, la primera de ~3.0 Kb que corresponde al vector pGEM[®]-T Easy y la segunda de ~2,172 pb que corresponde al marco de lectura abierto del gen *CrGPDH2* (figura 2.16).

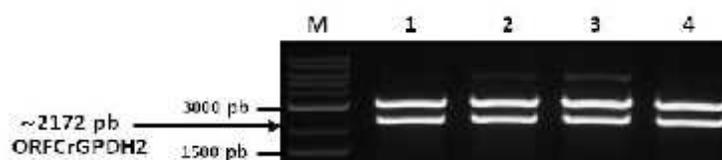


Figura 2.16. Verificación de la clonación del marco de lectura abierto del gen *CrGPDH2* en pGEM[®]-T Easy. Patrón de electroforesis generado por la enzima *EcoRI* para pGEM[®]-T Easy (~3.0 Kb) y ORFCrGPDH2 (~2,172 pb). M: Marcador de peso molecular 2-log (NEB); 1 al 4: clonas analizadas.

Tras enviar a secuenciar los plásmidos que contienen la ORF del gen *CrGPDH2* al GUCI se llevó a cabo el alineamiento de cada secuencia obtenida con respecto a la predicción

in silico de la base de datos del Phytozome y se identificó un plásmido cuya secuencia de nucleótidos contenía sólo dos mutaciones, el cual fue denominado arbitrariamente pCrGPDH2 (figura 2.17). En el análisis de la secuencia de aminoácidos de pCrGPDH2 se pudo notar que una de las mutaciones era silenciosa, ya que codifica para el mismo aminoácido, y la otra mutación no lo era, ya que codifica para el aminoácido valina (V) en lugar del aminoácido isoleucina (I) (Figura 2.18).

En cuanto a la ORF de *CrGPDH2* se observó que la secuencia de nucleótidos obtenida experimentalmente corresponde con la predicción *in silico* reportada para este gen.

ORF <i>in silico</i>	1	ATGATGCTGT CAGGCCGCACCTGCAACCATGCCTTCAGCACTCGTCAAATGAGCCACCAG	60
ORF pCrGPDH2	1	ATGATGCTGT CAGGCCGCACCTGCAACCATGCCTTCAGCACTCGTCAAATGAGCCACCAG	60
ORF <i>in silico</i>	61	CGCGGAGCGCTCGCGCTTCGATCAGCGCGGGTAGCTCAACGGCCGGTCACTTGCCGTCGC	120
ORF pCrGPDH2	61	CGCGGAGCGCTCGCGCTTCGATCAGCGCGGGTAGCTCAACGGCCGGTCACTTGCCGTCGC	120
ORF <i>in silico</i>	121	GCACCGTTTGTGCCAGCGCCGTCTTCTACAGTCAGAGCCGGCACAAAAGACCGCTTCC	180
ORF pCrGPDH2	121	GCACCGTTTGTGCCAGCGCCGTCTTCTACAGTCAGAGCCGGCACAAAAGACCGCTTCC	180
ORF <i>in silico</i>	181	TCTGCCAACAAACGGCGATGCCGCGCCCTCGGAGGCTCGCACCGTCCCCTCGAGCGCGCG	240
ORF pCrGPDH2	181	TCTGCCAACAAACGGCGATGCCGCGCCCTCGGAGGCTCGCACCGTCCCCTCGAGCGCGCG	240
ORF <i>in silico</i>	241	CTGGCCATCTGGCGCTCCGCCGACGCCGTCTGCTTCGACGTAGACTGCACCATCACCATC	300
ORF pCrGPDH2	241	CTGGCCATCTGGCGCTCCGCCGACGCCGTCTGCTTCGACGTAGACTGCACCATCACCATC	300
ORF <i>in silico</i>	301	AATGACGGCCTGGACCTGCTGGCCGAGTTTCATGGGCGTCAAGGAGGAGGTTGAGGAGCTC	360
ORF pCrGPDH2	301	AATGACGGCCTGGACCTGCTGGCCGAGTTTCATGGGCGTCAAGGAGGAGGTTGAGGAGCTC	360
ORF <i>in silico</i>	361	ACCAACAAGGCCATGGACGGCACCATGTCTCTGACGCGCTCTCTGGAGGAGCGCCTCAAC	420
ORF pCrGPDH2	361	ACCAACAAGGCCATGGACGGCACCATGTCTCTGACGCGCTCTCTGGAGGAGCGCCTCAAC	420
ORF <i>in silico</i>	421	CTGATCAACTGCTCGCCCGACGACATCCGCCGCTTCATCAAGGCTACCCGCCCCAGTCC	480
ORF pCrGPDH2	421	CTGATCAACTGCTCGCCCGACGACATCCGCCGCTTCATCAAGGCTACCCGCCCCAGTCC	480
ORF <i>in silico</i>	481	CGCCTGGCGCCCGGCATCAAGGAGCTGATCAAGGCGCTCCAGAAGCGCGGTGTGGCGGTG	540
ORF pCrGPDH2	481	CGCCTGGCGCCCGGCATCAAGGAGCTGATCAAGGCGCTCCAGAAGCGCGGTGTGGCGGTG	540
ORF <i>in silico</i>	541	TACCTCATCAGCGGCGGCTTCCGCGAGCTGTGCTGCCATCGCGGCGCACCTGGGCATC	600
ORF pCrGPDH2	541	TACCTCATCAGCGGCGGCTTCCGCGAGCTGTGCTGCCATCGCGGCGCACCTGGGCATC	600
ORF <i>in silico</i>	601	CCGAAGGACCGCTCTTCGCCAACCGCATGCACTGGCAGTGGGACGACGAGACCGGCATG	660
ORF pCrGPDH2	601	CCGAAGGACCGCTCTTCGCCAACCGCATGCACTGGCAGTGGGACGACGAGACCGGCATG	660
ORF <i>in silico</i>	661	CCCACCAAGCTGGTTCGGCTTTGACACGTCCGAGCCCACGGCCCGCAACCAGGGCAAGCCC	720
ORF pCrGPDH2	661	CCCACCAAGCTGGTTCGGCTTTGACACGTCCGAGCCCACGGCCCGCAACCAGGGCAAGCCC	720
ORF <i>in silico</i>	721	GAGGCCATCGCGCGCATCCGCGAGAACAACCCTACAACACCGTGGTTCATGATCGGCGAC	780
ORF pCrGPDH2	721	GAGGCCATCGCGCGCATCCGCGAGAACAACCCTACAACACCGTGGTTCATGATCGGCGAC	780
ORF <i>in silico</i>	781	GGCATCACCGACCTGGAGGCGGTGCAGACCAGCGGCGGCGCCGACTTGTTTCATCGGCAGC	840
ORF pCrGPDH2	781	GGCATCACCGACCTGGAGGCGGTGCAGACCAGCGGCGGCGCCGACTTGTTTCATCGGCAGC	840

ORF <i>in silico</i>	841	GGCGTGGTGGTGGAGCGCGAGGCCGTGGTGGCGGAGGCCGAGTGGTATGTGTACGACTAC	900
ORF pCrGPDH2	841	GGCGTGGTGGTGGAGCGCGAGGCCGTGGTGGCGGAGGCCGAGTGGTATGTGTACGACTAC	900
ORF <i>in silico</i>	901	AAGGCACTTGTGTGGCCCTGTCCCGTTACAAGGTGGCCATGGTGGGCAGCGGCCCTGG	960
ORF pCrGPDH2	901	AAGGCACTTGTGTGGCCCTGTCCCGTTACAAGGTGGCCATGGTGGGCAGCGGCCCTGG	960
ORF <i>in silico</i>	961	GCGTGTGCGGCGGTGCGCATGATCGCGCAGAACACCAGCCAGGACGACCCCGAGGACGAG	1020
ORF pCrGPDH2	961	GCGTGTGCGGCGGTGCGCATGATCGCGCAGAACACCAGCCAGGACGACCCCGAGGACGAG	1020
ORF <i>in silico</i>	1021	TTTGACGACGACGTCCGCATGTGGGTGCACCAGGGCGCGAGCTGGTTCGACACGATCAAC	1080
ORF pCrGPDH2	1021	TTTGACGACGACGTCCGCATGTGGGTGCACCAGGGCGCGAGCTGGTTCGACACGATCAAC	1080
ORF <i>in silico</i>	1081	AGCACCACGAGAACC CGCCTACTTCCCGGCATCCCCCTGGGCCCAACGTCATCGCC	1140
ORF pCrGPDH2	1081	AGCACCACGAGAACC CGCCTACTTCCCGGCATCCCCCTGGGCCCAACGTCATCGCC	1140
ORF <i>in silico</i>	1141	ACCGCAACCTGGCGGAGGCGAGTGGCGGACGCCGACCTGCTGGTGTCTCGCGCCGCAC	1200
ORF pCrGPDH2	1141	ACCGCAACCTGGCGGAGGCGAGTGGCGGACGCCGACCTGCTGGTGTCTCGCGCCGCAC	1200
ORF <i>in silico</i>	1201	CAGTACATCCGCGGCATTTGCAAGCAGCTCATGGGCAAGGTCAAGCCGGGCGCCGCCGC	1260
ORF pCrGPDH2	1201	CAGTACATCCGCGGCATTTGCAAGCAGCTCATGGGCAAGGTCAAGCCGGGCGCCGCCGC	1260
ORF <i>in silico</i>	1261	ATCAGCCTGACCAAGGGCATGCGCGTACGCCCCGAGGGCCCCGAGCTCATCAGCCAGATC	1320
ORF pCrGPDH2	1261	ATCAGCCTGACCAAGGGCATGCGCGTACGCCCCGAGGGCCCCGAGCTCATCAGCCAGATC	1320
ORF <i>in silico</i>	1321	GTGCGCCGCACCCTGGGCGTGGACTGCTCCGTGCTCATGGGCGGTAACATCGCCGAGGAC	1380
ORF pCrGPDH2	1321	GTGCGCCGCACCCTGGGCGTGGACTGCTCCGTGCTCATGGGCGGTAACATCGCCGAGGAC	1380
ORF <i>in silico</i>	1381	GTGGGCCGCGAGCAGCTGTCCGAGGCCGTGATCGGCTACTACAACCTGGAGCAGCCAG	1440
ORF pCrGPDH2	1381	GTGGGCCGCGAGCAGCTGTCCGAGGCCGTGATCGGCTACTACAACCTGGAGCAGCCAG	1440
ORF <i>in silico</i>	1441	CGCTTCAAGAAGCTCTTCCAGCGCCCTACTTCCGCGTGACGCTGCTGCCGGACCCGGTG	1500
ORF pCrGPDH2	1441	CGCTTCAAGAAGCTCTTCCAGCGCCCTACTTCCGCGTGACGCTGCTGCCGGACCCGGTG	1500
ORF <i>in silico</i>	1501	GGTGTGAGCTGTGCGGTACGCTCAAGAATATCGTGGCCCTGGGTGTGGGCATGGTGGAC	1560
ORF pCrGPDH2	1501	GGTGTGAGCTGTGCGGTACGCTCAAGAATATCGTGGCCCTGGGTGTGGGCATGGTGGAC	1560
ORF <i>in silico</i>	1561	GGCCTGGGCATGGGACCCAACCTCAAGGCCGCTATCATCCGCCAGGGCCTGCTTGAGATG	1620
ORF pCrGPDH2	1561	GGCCTGGGCATGGGACCCAACCTCAAGGCCGCTATCATCCGCCAGGGCCTGCTTGAGATG	1620
ORF <i>in silico</i>	1621	CGTGACTTCTGCCAGGCCCTCTACCCCTCCGTCCGCGACGACACCTTCTCGAGTGTGTC	1680
ORF pCrGPDH2	1621	CGTGACTTCTGCCAGGCCCTCTACCCCTCCGTCCGCGACGACACCTTCTCGAGTGTGTC	1680
ORF <i>in silico</i>	1681	GGCGTGGGCGACCTGGTCCGACCTGCATCGGCGGCCGCAACCGCCGCTGGCCGAGGCC	1740
ORF pCrGPDH2	1681	GGCGTGGGCGACCTGGTCCGACCTGCATCGGCGGCCGCAACCGCCGCTGGCCGAGGCC	1740
ORF <i>in silico</i>	1741	TGGACCGCTCCGCAGTTGAGGGCGCCGAGGCTGGCGAGGGCAACGGTGGCCGCGCAGC	1800
ORF pCrGPDH2	1741	TGGACCGCTCCGCAGTTGAGGGCGCCGAGGCTGGCGAGGGCAACGGTGGCCGCGCAGC	1800
ORF <i>in silico</i>	1801	TGGGCTGAGCTGGAGAAGGAGCTGCTCCAGGGCCAGAAGCTGCAGGGCGTGTGACCAGC	1860
ORF pCrGPDH2	1801	TGGGCTGAGCTGGAGAAGGAGCTGCTCCAGGGCCAGAAGCTGCAGGGCGTGTGACCAGC	1860
ORF <i>in silico</i>	1861	AACGAGGTGCAGCAGATCCTGAGGACCCGCGCTGGGAGAGCAAGTACCCGCTGTTCACC	1920
ORF pCrGPDH2	1861	AACGAGGTGCAGCAGATCCTGAGGACCCGCGCTGGGAGAGCAAGTACCCGCTGTTCACC	1920
ORF <i>in silico</i>	1921	ACCATCAACCGCATCGTCAACGGCCACCTGCCGCCGACCTGGTGGTTCGACTACCTGGAG	1980
ORF pCrGPDH2	1921	ACCATCAACCGCATCGTCAACGGCCACCTGCCGCCGACCTGGTGGTTCGACTACCTGGAG	1980
ORF <i>in silico</i>	1981	GGCGCAAGGCCGATATCGCCGTTGACGTCGAGGAGGATATTGTGCCCTGCCGCGCCAG	2040
ORF pCrGPDH2	1981	GGCGCAAGGCCGATATCGCCGTTGACGTCGAGGAGGATATTGTGCCCTGCCGCGCCAG	2040
ORF <i>in silico</i>	2041	CCCGCCTCCGCCATGGCCCGCCTATTTCGGCCAGCTGGTCCGCGGCATCACGCAGCAGGGC	2100
ORF pCrGPDH2	2041	CCCGCCTCCGCCATGGCCCGCCTATTTCGGCCAGCTGGTCCGCGGCATCACGCAGCAGGGC	2100

ORF <i>in silico</i>	2101	GGAGCAGCTGCTGGCGCCGCCGCCAGCGCCGCCGAGGCGCCGCTCCGGCGCTGCCAGC	2160
ORF pCrGPDH2	2101	GGAGCAGCTGCTGGCGCCGCCGCCAGCGCCGCCGAGGCGCCGCTCCGGCGCTGCCAGC	2160
ORF <i>in silico</i>	2161	AACAGCGTGTA	2172
ORF pCrGPDH2	2161	AACAGCGTGTA	2172

Figura 2.17. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos del gen *CrGPDH2* obtenida de la predicción *in silico* del Phytozome con respecto a la secuencia obtenida del producto secuenciado. La posición de las mutaciones en la secuencia de nucleótidos de la ORF gen *CrGPDH2* se indica con triángulos.

ORF <i>in silico</i>	1	MMLSGRTC�HAFSTRQMSHQGALALRSARVAQRPVTCRRAPFVPSAVFLQSEPAQKTAS	60
ORF pCrGPDH2	1	MMLSGRTC�HAFSTRQMSHQGALALRSARVAQRPVTCRRAPFVPSAVFLQSEPAQKTAS	60
ORF <i>in silico</i>	61	SANNGDAAPSEARTVPSERALAIWRSADAVCFDVDCTITINDGLDLLAEFMGVKEEVEEL	120
ORF pCrGPDH2	61	SANNGDAAPSEARTVPSERALAIWRSADAVCFDVDCTITINDGLDLLAEFMGVKEEVEEL	120
ORF <i>in silico</i>	121	TNKAMDGTMSLTRSLEERLNLINCSRDDIRRFIKAYPPQSRLAPGIKELIKALQKRGVAV	180
ORF pCrGPDH2	121	TNKAMDGTMSLTRSLEERLNLINCSRDDIRRFIKAYPPQSRLAPGIKELIKALQKRGVAV	180
ORF <i>in silico</i>	181	YLISGGFRELLELPIAAHLGIPKDRVFANRMHWQWDEETGMPTKLVGFDTSEPTARNQGKP	240
ORF pCrGPDH2	181	YLISGGFRELLELPIAAHLGIPKDRVFANRMHWQWDEETGMPTKLVGFDTSEPTARNQGKP	240
ORF <i>in silico</i>	241	EAIARIRENNPYNTVVMIGDGITDLEAVQTSGGADLFIGSGVVVEREAVVAEAEWYVYDY	300
ORF pCrGPDH2	241	EAIARIRENNPYNTVVMIGDGITDLEAVQTSGGADLFIGSGVVVEREAVVAEAEWYVYDY	300
ORF <i>in silico</i>	301	KALVSALSRYKVMVGSAGAWACA AVRMIQNTSQDDPEDEFDDV RMVWHQGGELVDTIN	360
ORF pCrGPDH2	301	KALVSALSRYKVMVGSAGAWACA AVRMIQNTSQDDPEDEFDDV RMVWHQGGELVDTIN	360
ORF <i>in silico</i>	361	STHENPAYFPGIPLGPNVIATGNLAEAVADADLLVFCAPHQYIRGICKQLMGKVKPGAAA	420
ORF pCrGPDH2	361	STHENPAYFPGIPLGPNVIATGNLAEAVADADLLVFCAPHQYIRGICKQLMGKVKPGAAA	420
ORF <i>in silico</i>	421	ISLTKGMRVTPGPELISQIVRRITLGVDCSVLMGGNIAEDVGREQLSEAVIGYYNLEHAQ	480
ORF pCrGPDH2	421	ISLTKGMRVTPGPELISQIVRRITLGVDCSVLMGGNIAEDVGREQLSEAVIGYYNLEHAQ	480
ORF <i>in silico</i>	481	RFKKLFQRPYFRVTLTLLPDPVGAELCGTLKNI VALGVGMVDGLGMGPNSKAAI IROGLLEM	540
ORF pCrGPDH2	481	RFKKLFQRPYFRVTLTLLPDPVGAELCGTLKNI VALGVGMVDGLGMGPNSKAAI IROGLLEM	540
ORF <i>in silico</i>	541	RDFCQALYPSVRDDTFLECCGVGDLVATCIGGRNRRVAEAWTRSAVEGAEAGEGNGAGRS	600
ORF pCrGPDH2	541	RDFCQALYPSVRDDTFLECCGVGDLVATCIGGRNRRVAEAWTRSAVEGAEAGEGNGAGRS	600
ORF <i>in silico</i>	601	WAELEKELLQKQKLGVLTSNEVQQILRTRGWESKYPLFTTINRIVNGHLPPHLVVDYLE	660
ORF pCrGPDH2	601	WAELEKELLQKQKLGVLTSNEVQQILRTRGWESKYPLFTTINRIVNGHLPPHLVVDYLE	660
ORF <i>in silico</i>	661	GAKADIAVDVEEDIVPLRPQPASAMARLFGQLVGGITQQGGAAAGAAASAAAGAASGAAS	720
ORF pCrGPDH2	661	GAKADIAVDVEEDIVPLRPQPASAMARLFGQLVGGITQQGGAAAGAAASAAAGAASGAAS	720
ORF <i>in silico</i>	721	NSV	723
ORF pCrGPDH2	721	NSV	723

Figura 2.18. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del gen *CrGPDH2* obtenida de la predicción *in silico* del Phytozome con respecto a la secuencia obtenida del producto secuenciado. La posición de la mutación en la secuencia de aminoácidos de la ORF del gen *CrGPDH2* se indica con un triángulo.

Para revertir la mutación del nucleótido G (guanina) por A (adenina) en la posición 445 de la secuencia de nucleótidos de la ORF del gen *CrGPDH2* en el plásmido pCrGPDH2, se llevó a cabo la amplificación mediante PCR del plásmido pCrGPDH2 con oligonucleótidos específicos diseñados con la mutación deseada, siguiendo las indicaciones del protocolo de mutagénesis sitio-dirigida del estuche comercial QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). El producto de esta PCR fue denominado arbitrariamente ORFCrGPDH2Mut y corresponde a un amplicón de ~2,172 pb. Este fragmento fue clonado en el vector pGEM®-T Easy para dar lugar al plásmido pCrGPDH2Mut que contiene la ORF del gen *CrGPDH2* con la mutación deseada. En la Figura 2.19 se muestra el resultado de la digestión con la enzima de restricción *EcoRI* (NEB), en donde la banda de ~3.0 Kb corresponde al vector pGEM®-T Easy y la banda de ~2,172 pb corresponde al marco de lectura abierto del gen *CrGPDH2* con la mutación deseada.

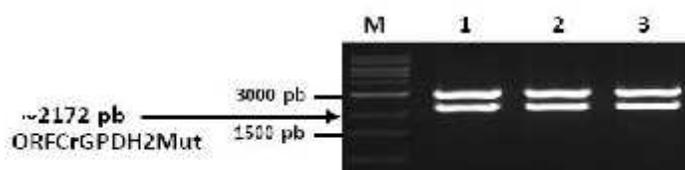


Figura 2.19. Verificación de la clonación del marco de lectura abierto con la reversión de la mutación del gen *CrGPDH2* en pGEM®-T Easy. Patrón de electroforesis generado por la enzima *EcoRI* para pGEM®-T Easy (~3.0 Kb) y ORFCrGPDH2Mut (~2,172 pb). M: Marcador de peso molecular 2-log (NEB); 1 al 3: clonas analizadas.

Tras enviar a secuenciar los plásmidos que contienen la reversión de la mutación de la ORF del gen *CrGPDH2* al GUCI se realizó el alineamiento de cada secuencia obtenida con respecto a la predicción *in silico* de la base de datos del Phytozome y los tres plásmidos analizados contenían la mutación deseada en la posición 445 de la secuencia de la ORF de *CrGPDH2* y no presentaban ninguna otra variación con respecto a la del plásmido pCrGPDH2. En la Figura 2.20 se presenta el resultado del alineamiento de la secuencia de nucleótidos de *CrGPDH2* con la mutación deseada con respecto a la predicción *in silico*, y se puede notar que la secuencia de aminoácidos del producto secuenciado es idéntica a la predicción *in silico* del gen *CrGPDH2*.

ORF <i>in silico</i>	1	MMLSGRTCNHAFSTRQMSHQGALALRSARVAQRPVTCRRAPFVPSAVFLQSEPAQKTAS	60
ORF pCrGPDH2Mut	1	MMLSGRTCNHAFSTRQMSHQGALALRSARVAQRPVTCRRAPFVPSAVFLQSEPAQKTAS	60
ORF <i>in silico</i>	61	SANNGDAAPSEARTVPSERALAIWRSADAVCFDVDCTITINDGLDLLAEFMGVKEEVEEL	120
ORF pCrGPDH2Mut	61	SANNGDAAPSEARTVPSERALAIWRSADAVCFDVDCTITINDGLDLLAEFMGVKEEVEEL	120
ORF <i>in silico</i>	121	TNKAMDGTMSLTRSLEERLNLINCSPPDIRRFIKAYPPQSRLAPGIKELIKALQKRGVAV	180
ORF pCrGPDH2Mut	121	TNKAMDGTMSLTRSLEERLNLINCSPPDIRRFIKAYPPQSRLAPGIKELIKALQKRGVAV	180
ORF <i>in silico</i>	181	YLISGGFRELLLPAAHLGIPKDRVFANRMHWQWDEDTGMPTKLVGFDTSEPTARNQGKP	240
ORF pCrGPDH2Mut	181	YLISGGFRELLLPAAHLGIPKDRVFANRMHWQWDEDTGMPTKLVGFDTSEPTARNQGKP	240
ORF <i>in silico</i>	241	EAIARIRENNPYNTVVMIGDGITDLEAVQTSGGADLFIGSGVVVEREAVVAEAEWVYDY	300
ORF pCrGPDH2Mut	241	EAIARIRENNPYNTVVMIGDGITDLEAVQTSGGADLFIGSGVVVEREAVVAEAEWVYDY	300
ORF <i>in silico</i>	301	KALVSALSRYKVMVSGAWACAARVMIQNTSQDDPEDEFDDVDMWVHQGGELVDTIN	360
ORF pCrGPDH2Mut	301	KALVSALSRYKVMVSGAWACAARVMIQNTSQDDPEDEFDDVDMWVHQGGELVDTIN	360
ORF <i>in silico</i>	361	STHENPAYFPGIPLGNVIATGNLAEAVADADLLVFCAPHQYIRGICKQLMGKVKPGAAA	420
ORF pCrGPDH2Mut	361	STHENPAYFPGIPLGNVIATGNLAEAVADADLLVFCAPHQYIRGICKQLMGKVKPGAAA	420
ORF <i>in silico</i>	421	ISLTKGMRVTEGPELISQIVRRTLGVDCSVLMGGNIAEDVGREQLSEAVIGYYNLEHAQ	480
ORF pCrGPDH2Mut	421	ISLTKGMRVTEGPELISQIVRRTLGVDCSVLMGGNIAEDVGREQLSEAVIGYYNLEHAQ	480
ORF <i>in silico</i>	481	RFKKLFQRPYFRVTLLEPDPVGAELCGTLKNI VALGVGMVDGLGMGPNSKAAIIRQGLLEM	540
ORF pCrGPDH2Mut	481	RFKKLFQRPYFRVTLLEPDPVGAELCGTLKNI VALGVGMVDGLGMGPNSKAAIIRQGLLEM	540
ORF <i>in silico</i>	541	RDFCQALYPSVRDDTFLECCGVGDLVATCIGGRNRRVAEAWTRSAVEGAEAGEGNGAGRS	600
ORF pCrGPDH2Mut	541	RDFCQALYPSVRDDTFLECCGVGDLVATCIGGRNRRVAEAWTRSAVEGAEAGEGNGAGRS	600
ORF <i>in silico</i>	601	WAELEKELLQGQKLQGVLTSTNEVQQILRTRGWESKYPLFTTINRIVNGHLPPHLVVDYLE	660
ORF pCrGPDH2Mut	601	WAELEKELLQGQKLQGVLTSTNEVQQILRTRGWESKYPLFTTINRIVNGHLPPHLVVDYLE	660
ORF <i>in silico</i>	661	GAKADIAVDVEEDIVPLPRQPASAMARLFGQLVGGITQQGGAAAGAAA SAAAGAASGAAS	720
ORF pCrGPDH2Mut	661	GAKADIAVDVEEDIVPLPRQPASAMARLFGQLVGGITQQGGAAAGAAA SAAAGAASGAAS	720
ORF <i>in silico</i>	721	NSV	723
ORF pCrGPDH2Mut	721	NSV	723

Figura 2.20. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del gen *CrGPDH2* obtenida de la predicción *in silico* con respecto a la secuencia obtenida del producto secuenciado de la reversión de la mutación del plásmido pCrGPDH2Mut. La posición de la mutación revertida en la secuencia de aminoácidos de *CrGPDH2* se indica con una flecha.

El resultado de la clonación del ADNc del gen *CrGPDH2* de *C. reinhardtii* se encuentra disponible en la base de datos del GenBank con el número de acceso KM923898. En la Figura 2.21 se presenta el resultado del mapeo de todo el ADNc de *CrGPDH2*. Se puede notar la ubicación de una secuencia putativa TGTAAG de la señal de poliadenilación en la región 3' UTR de dicho gen, la cual ha sido previamente identificada *in silico* en genes codificados en el núcleo de la microalga *C. reinhardtii* en los trabajos realizados por Silflow *et al.* (1985) y Shen *et al.* (2008).

1	AACCAATTCACAACCTACAGAATCTTCAACTCAATCTCCAAGCACTCAAGCTACAAGAGCCGGTGTCCGCAITTTGCAACATCTCAGGGGAGTTCCGA	95
96	CTCCGCTCACAAACGAGCGCTTGTCTGAACCAAGTTTGCACACT	137
138	<u>ATG</u> ATG CTG TCA GGC CGC ACC TGC AAC CAT GCC TTC AGC ACT CGT CAA ATG AGC CAC CAG CGC GGA GCG CTC	209
1	M M L S G R T C N H A F S T R Q M S H Q R G A L	24
210	GCG CTT CGA TCA GCG CGG GTA GCT CAA CGG CCG GTC ACT TGC CGT CGC GCA CCG TTT GTG CCC AGC GCC GTC	281
25	A L H S A R V A Q R F V T C R R A F F V F S A V	48
282	TTC CTA CAG TCA GAG CCG GCA CAA AAG ACC GCT TCC TCT GCC AAC AAC GGC GAT GCC CGC CCC TCG GAG GCT	353
49	F L Q S E P A Q K T A S S A N N G D A A F S E A	72
354	GCG ACC GTC CCG TCC GAG GGC GCG CTG GCC ATC TGG CGC TCC GCC GAC GCC GTC TGC TTC GAC GTA GAC TGC	425
73	R T V P S E R A L A I W R S A D A V C F D V D C	96
426	ACC ATC ACC ATC AAT GAC GGC CTG GAC CTG CTG GCC GAG TTC ATG GGC GTC AAG GAG GAG GTT GAG GAG CTC	497
97	T I T I N D G L D L L A E F M G V K E E V E E L	120
498	ACC AAC AAG GCC ATG GAC GGC ACC ATG TCT CTG ACG CGC TCT CTG GAG GAG CGC CTC AAC CTG ATC AAC TGC	569
121	T N K A M D G T M S L T R S L E E R L N L I N C	144
570	TGG CCC GAC GAC ATC CGC CGC TTC ATC AAG GCC TAC CCG CCC CAG TCC CGC CTG GCG CCC GGC ATC AAG GAG	641
145	S P D D I R R F I K A Y P Q S R L A P G I K R E	168
642	CTG ATC AAG GCG CTC CAG AAG CGC GGT GTG GCG GTG TAC CTC ATC AGC GGC GGC TTC CGC GAG CTG CTG CTG	713
169	L I K A L Q K R G V A V Y L I S G G F R E L L L	192
714	CCC ATC GCG GCG CAC CTG GGC ATC CCG AAG GAC CGC GTC TTC GCC AAC CGC ATG CAC TGG CAG TGG GAC GAC	785
193	P I A A H L G I P K D R V F A N R M H W Q W D D	216
786	GAG ACC GGC ATG CCC ACC AAG CTG GTC GGC TTT GAC ACG TCC GAG CCC ACG GCC CGC AAC CAG GGC AAG CCC	857
217	E T G M P T K L V G D T T S E P T A R N Q G K F	240
858	GAG GCC ATC GCG CGC ATC CGC GAG AAC AAC CCC TAC AAC ACC GTG GTC ATG ATC GGC GAC GGC ATC ACC GAC	929
241	E A I A R I R E N N F Y N T V V M I G D G I T D	264
930	CTG GAG GCG GTG CAG ACC AGC GGC GGC GCC GAC TTT TTC ATC GGC AGC GGC GTG GTG GTG GAG CGC GAG GCC	1001
265	L E A V Q T S G G A D L F I G S G V V V E R E A	288
1002	GTG GTG GCG GAG GCG GAG TGG TAT GTG TAC GAG TAC AAG GCA CTT GTG TCG GCC CTG TCC CGT TAC AAG GTG	1073
289	V V A E A E W Y V Y D Y K A L V S A L S H Y K V	312
1074	GCC ATG GTG GCG AGC GGC GCC TGG GCG TGT GCG GCG GTG CCG ATC GCG CAG AAC ACC AGC CAG GAC GAC	1145
313	A M V G S G A W A C A A V R M I A Q N T S Q D D	336
1146	CCC GAG GAC GAG TTT GAC GAC GAC GTC CGC ATG TGG GTG CAC CAG GGC GCC GAG CTG GTC ACC ATC AAC	1217
337	P E D E F D D V R M W V H Q G D E L V D T I N	360
1218	AGC ACC CAC GAG AAC CCG GCC TAC TTC CCC GGC ATC CCC CTG GGC CCC AAC GTC ATC GCC ACC GGC AAC CTG	1289
361	S T H E N F A Y F P G I F L G P N V I A T G C N L	384
1290	GCG GAG GCA GTG GCG GAC GCC GAC CTG CTG GTG TTC TGC GCG CCG CAC CAG TAC ATC CGC GGC ATT TGC AAG	1361
385	A E A V A D A D L L V F C A P H Q Y I R G I C K	408
1362	CAG CTC ATG GGC AAG GTC AAG CCG GGC GCC GGC ATC AGC CTG ACC AAG GGC ATG CGC GTC ACG CCC GAG	1433
409	Q L M G K V K F G A A A I S L T K G M R V T P E	432
1434	GCG CCC GAG CTC ATC AGC CAG ATC GTG CGC CGC ACC CTG GGC GAC TGC TCC GTG CTC ATG GGC GGT AAC	1505
433	G F E L I S Q I V R R T L G V D C S V L M G G N	456
1506	ATC GCC GAG GAC GTG GGC CGC GAG CAG CTG TCC GAG GCC GTG ATC GGC TAC TAC AAC CTG GAG CAC GCC CAG	1577
457	I A E A W T R S A V E G A E A G A G R S	480
1578	CGC TTC AAG AAG CTC TTC CAG CCG CCC TAC TTC CCG GTG ACG CTG CTG CCG GAC CCG GTG GGT GCT GAG CTG	1649
481	R F K E L F Q R P Y F L L P D P V G A E L	504
1650	TGC GGT ACG CTC AAG AAT ATC GTG GCC CTG GGT GTG GGC ATG GTG GAC GGC CTG GGC ATG GGA CCC AAC TCC	1721
501	C G T L K N I V A L G V G M V D G L G M G P N S	528
1722	AAG GCC GCT ATC ATC CGC CAG GGC CTG CTT GAG ATG CBT GAC TTC TGC CAG GCC CTC TAC CCC TCC GTC CGC	1793
529	K A A I I R Q G L L E M R D P C Q A L Y F S V R	552
1794	GAC GAC ACC TTC CTC GAG TGC TGC GGC GTG GGC GAC CTG GTC GCC ACC TGC ATC GGC CGC CGC AAC CGC CGC	1865
553	D D T F L E C C G V G D L V A T C I G G R N R R	576
1866	GTG GCC GAG GCG TGG ACG CGC TCC GCA GTT GAG GGC GCC GAG GGT GGC GAG GGC AAC GGT GCC GGC CGC AGC	1937
577	V A E A W T R S A V E G A E A G A G R S	600
1938	TGG GCT GAG CTG SAG AAG GAG CTG CTC CAG GCG CAG AAG CTG CAG GGC GTG CTG ACC AGC AAC GAG GTG CAG	2009
601	W A E L E K E L L Q G Q K L Q G V L T S N E V Q	624
2010	CAG ATC CTG AGG ACC CGC GGC TGG GAG AGC AAG TAC CCG CTG TTC ACC ACC ATC AAC CGC ATC GTC AAC GGC	2081
625	Q I L R T R G W E S K Y P L F T T I H R I V N G	648
2082	CAC CTG CCG CCG CAC CTG STG GTC GAC TAC CTG GAG GGC GCC AAG GCC GAT ATC GCC GTT GAC GTC GAG GAG	2153
649	H L P P H L V V D Y L E G A K A D I A V D V E E	672
2154	GAC ATT GTG CCC CTG CCG CGC CAG CCC GCC TCC GCC ATG GCC CGC CTA TTC GGC CAG CTG GTC GGC GGC ATC	2225
673	D I V P L P R Q P A S A M A R L F G Q L V G G I	696
2226	ACG CAG CAG GGC GGA GCA GCT GCT GGC GCC GCC GCC AGC GCC GCC GCA GGC GCC GCC TCC GGC GCT GCC AGC	2297
697	T Q G G A A A G A A S A A A G A A S G A A S G A A S	720
2298	AAC AGC GTG <u>TAA</u>	2309
721	H S V *	724
2310	AGGAGGACGTTCCCTTGTGGCAATGGGTGCTGTGATACCCCGCGCGAGGGAGGGGGCGCGAGCTCCGCTACGCTGAGCTTCTGTGCTGTAATCTTTG	2404
2405	TCCGTGCAGAGCCCAAGCGGATGCTGGGACGGAGTTAGCATGGCATGGCGTGGGCTGGTGTACATAACCTTAATTTGTTTTCGTACTTGTGTCAA	2499
2500	TCGGCTCTGGCCGAGCAGCAATAAGTGAACAGGTGTAATTGGCATGCTATGCGACCTATCTGCCCTGTGAGGTAAGGCCAGCGGGTCTTGCAA	2594
2595	GCGGTGTGTTTGTCTTGGTAGCATAGATCGACACGTGTGTGTGTGTATTGGCGCCGCCCGCCGCTGTACTCGACGTGCAGCCAGCGTTGC	2689
2690	CCAGGACTGACTTTCAGCGGTAGTTCACAAATGAGCAGGAGCAGTGGCAGGCGCTTGTAAAGGSCCTTGGCTGTGGGATGTCTATCTATTCCTTAGG	2784
2785	ACAGAAATGATCCCGTGAGTAATCTCGTATGTGGTGTGTATCCACTGCGCCGGCACTCTGCGCGTGTCCGCCCTGTACTCTGATGGAGGTG	2873

Figura 2.21. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen *CrGPDH2* de *C. reinhardtii*. La secuencia de nucleótidos de 2873 pb del ADNc de *CrGPDH2* incluye las regiones 5' y 3' UTR. El codón de inicio (ATG) y codón de paro (TAA) del marco de lectura de abierto de *CrGPDH2* se encuentran subrayados. La secuencia putativa de la señal de poliadenilación TGTA en la región 3' UTR se señala con un recuadro y los triángulos en esta misma región indican los diferentes sitios de inicio de poliadenilación identificados.

2.3.5 Clonación del ADNc del gen *CrGPDH3* de *C. reinhardtii*

2.3.5.1 Mapeo de los extremos terminales 5' y 3' UTR del ADNc del gen *CrGPDH3*

La amplificación de los extremos terminales 5' y 3' del gen *CrGPDH3* se llevó a cabo mediante RT-PCR utilizando la enzima Expand Long Template (Roche). Los resultados de la amplificación se presentan en la Figura 2.22, en donde los productos de PCR del 5' y 3' RACE de *CrGPDH3* fueron denominados arbitrariamente 5'CrGPDH3 y 3'CrGPDH3 y corresponden a un amplicón de ~433 y ~1,212 pb, respectivamente.

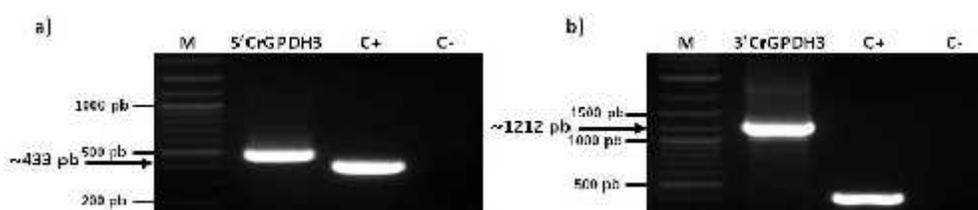


Figura 2.22. Amplificación de los extremos 5' y 3' terminales del gen *CrGPDH3* de *C. reinhardtii* mediante la técnica de RLM-RACE, en donde: a) Extremo 5' terminal de *CrGPDH3* (5'CrGPDH3) y b) Extremo 3' terminal de *CrGPDH3* (3'CrGPDH3). M: Marcador de peso molecular 2-log (NEB); C+: Control positivo de la reacción (*CrActin*); C-: Control negativo de la reacción.

Los productos de PCR 5' y 3'CrGPDH3 fueron clonados en el vector pGEM[®]-T Easy y su inserción fue comprobada mediante una digestión con la enzima de restricción *EcoRI* (NEB). Como resultado de esta digestión se obtuvieron dos bandas, la primera de ~3.0 Kb que corresponde al vector pGEM[®]-T Easy y la segunda de ~433 ó ~1,212 pb que corresponde al extremo 5' ó 3' RACE del gen *CrGPDH3*, respectivamente (Figura 2.23).

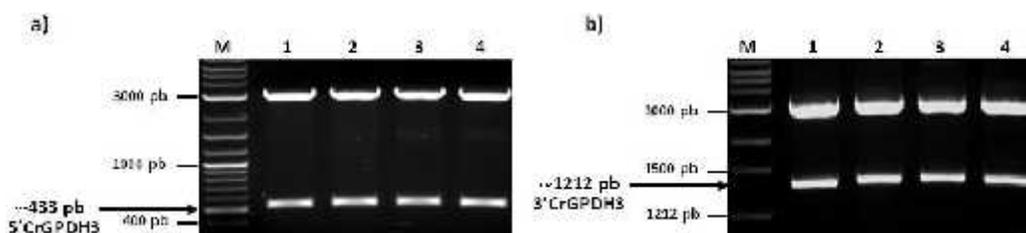


Figura 2.23. Verificación de la clonación de los extremos 5' y 3' RACE de *CrGPDH3* en pGEM[®]-T Easy. Patrón de electroforesis generado por la enzima *EcoRI* para a) pGEM[®]-T Easy (~3.0 Kb) y 5'CrGPDH3 (~433 pb) y b) pGEM[®]-T Easy (~3.0 Kb) y 3'CrGPDH3 (~1,212 pb). M: Marcador de peso molecular 2-log (NEB); 1 al 4: clonas analizadas.

Tras enviar a secuenciar los plásmidos que contienen al extremo 5' y 3' RACE de *CrGPDH3* al Instituto de Genómica de la Universidad de Clemson (GUCL, SC, EEUU) se llevó a cabo el alineamiento de cada secuencia obtenida con respecto a la predicción *in silico* de la base de datos del Phytozome y se obtuvieron los resultados que se presentan en las Figuras 2.24 y 2.25. El alineamiento del extremo 5' del ADNc del gen *CrGPDH3* secuenciado con respecto a la predicción *in silico* no presentó variación alguna en la secuencia de nucleótidos, sin embargo el 5' UTR de *CrGPDH3* encontrado con la técnica de RLM-RACE resultó 25 pb más largo (Figura 2.24). Además, se identificó un posible codón de inicio de la traducción en la región 5' UTR el cual se encuentra 153 pb río arriba con respecto a la predicción *in silico* de la ORF de *CrGPDH3*. Notablemente, la secuencia de nucleótidos identificada alrededor del codón de inicio (ACCATGA) es casi idéntica a la secuencia consenso de Kozak (ACCATGG) (ver figura 2.32), la cual es necesaria para un óptimo inicio de la traducción en células eucariotas (Kozak, 1986).

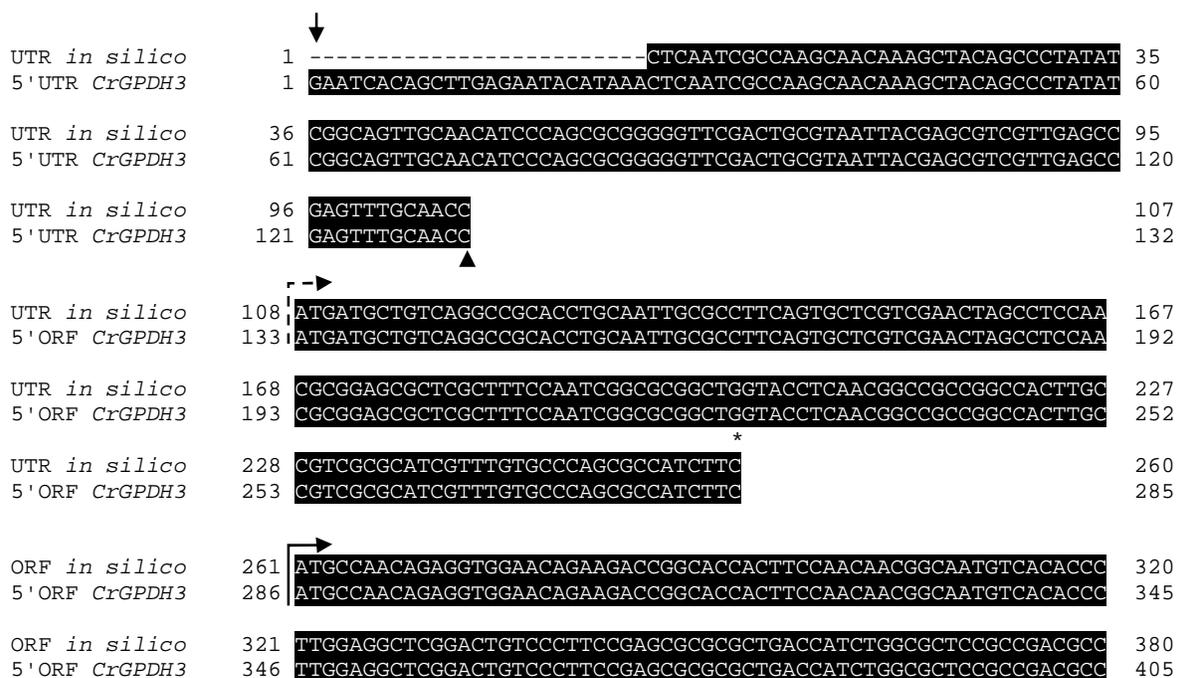


Figura 2.24. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos del extremo 5' del gen *CrGPDH3* de la predicción *in silico* con respecto a la secuencia obtenida del producto secuenciado. La flecha hacia abajo indica el inicio de la región 5' UTR de *CrGPDH2*, el asterisco el final de la región 5' UTR obtenida de forma *in silico*, el triángulo el final de la región 5' UTR obtenida de forma experimental y la flecha que apunta hacia la derecha el inicio de la ORF de dicho gen, en donde, la flecha con línea punteada representa el sitio probable de inicio de la ORF y la flecha con línea continua el sitio de inicio de la ORF obtenida de forma *in silico*.

El alineamiento del extremo 3' del ADNc del gen *CrGPDH3* secuenciado con respecto a la predicción *in silico* no presentó variación alguna en la secuencia de nucleótidos (Figura 2.25). Las regiones conservadas entre la predicción *in silico* y el producto de la secuenciación se señalan por medio de sombreado.

ORF <i>in silico</i>	1	ATGGCCCGCCTATTTCGGCCAGCTGGTCGGCGGAATCATGCAGCAGGGAGGAGCAGCCGCC	60
3'ORF <i>CrGPDH3</i>	1	ATGGCCCGCCTATTTCGGCCAGCTGGTCGGCGGAATCATGCAGCAGGGAGGAGCAGCCGCC	60
		*	
ORF <i>in silico</i>	61	GGCGCCGCCGCCAGCGCCGCCGAGGCGCCGCCGGCGCTGCCAGCAACAGCGTGTAA	120
3'ORF <i>CrGPDH3</i>	61	GGCGCCGCCGCCAGCGCCGCCGAGGCGCCGCCGGCGCTGCCAGCAACAGCGTGTAA	120
		↓	
UTR <i>in silico</i>	121	AGACGTTCCCTTGTGGTAATGGGTGCTGTGATATCGCGCGCAGGGAGGGGCGCCGAGCTG	180
3'UTR <i>CrGPDH3</i>	121	AGACGTTCCCTTGTGGTAATGGGTGCTGTGATATCGCGCGCAGGGAGGGGCGCCGAGCTG	180
UTR <i>in silico</i>	181	CGTACGTAAGCGTCTGTCTTCGCAATGTTTGTACGTGCAGAGCTGGGCGGGGTGCTTGGAA	240
3'UTR <i>CrGPDH3</i>	181	CGTACGTAAGCGTCTGTCTTCGCAATGTTTGTACGTGCAGAGCTGGGCGGGGTGCTTGGAA	240
UTR <i>in silico</i>	241	CGGAGTTGGCATGGCATGECGTGGGCCGGTGTACACAACCGTTATTTGTTTTGTATTTG	300
3'UTR <i>CrGPDH3</i>	241	CGGAGTTGGCATGGCATGECGTGGGCCGGTGTACACAACCGTTATTTGTTTTGTATTTG	300
UTR <i>in silico</i>	301	TGGTCAATCGGCTCTGGCGGAGCAGCACTAAGTGAACAGATGTATTGGCATGCTGTGCC	360
3'UTR <i>CrGPDH3</i>	301	TGGTCAATCGGCTCTGGCGGAGCAGCACTAAGTGAACAGATGTATTGGCATGCTGTGCC	360
UTR <i>in silico</i>	361	ACCTATCTATCTGTGAGCTAAGGGCCCGGGTGTCTTTGCAACCGCGTGTTTTTCCCTG	420
3'UTR <i>CrGPDH3</i>	361	ACCTATCTATCTGTGAGCTAAGGGCCCGGGTGTCTTTGCAACCGCGTGTTTTTCCCTG	420
UTR <i>in silico</i>	421	GTAGCATAGATCGACATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT	480
3'UTR <i>CrGPDH3</i>	421	GTAGCATAGATCGACATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT	480
UTR <i>in silico</i>	481	TTTATCGGGCGCCGTGCGCCGTGACTCGACTGTGCAGCCAGCGTTGCCAGGATTGAC	540
3'UTR <i>CrGPDH3</i>	481	TTTATCGGGCGCCGTGCGCCGTGACTCGACTGTGCAGCCAGCGTTGCCAGGATTGAC	540
UTR <i>in silico</i>	541	TTGCTTAGGTGTGCGCAGCGTAGTGTACCCGATGAGCAGGAGCAGTGGCAGGCCGTTTGA	600
3'UTR <i>CrGPDH3</i>	541	TTGCTTAGGTGTGCGCAGCGTAGTGTACCCGATGAGCAGGAGCAGTGGCAGGCCGTTTGA	600
UTR <i>in silico</i>	601	AAGTGCCCTGCTTTGGGGATGTCATCTATCCCTTAGGATAGAAACGATCCCGTGAGGAAT	660
3'UTR <i>CrGPDH3</i>	601	AAGTGCCCTGCTTTGGGGATGTCATCTATCCCTTAGGATAGAAACGATCCCGTGAGGAAT	660
UTR <i>in silico</i>	661	CTCGTATGTGGTCTATATCCACTGCGCGGGCATTCTGCGCGTGTGCGCCCTGTACCTGATA	720
3'UTR <i>CrGPDH3</i>	661	CTCGTATGTGGTCTATATCCACTGCGCGGGCATTCTGCGCGTGTGCGCCCTGTACCTGATA	720
UTR <i>in silico</i>	721	ATGGAAGTGTGGAGGTGTGTCTATGGGTGCAAGAGAAGACCCAGACCCATAAACACACAAT	780
3'UTR <i>CrGPDH3</i>	721	ATGGAAGTGTGGAGGTGTGTCTATGGGTGCAAGAGAAGACCCAGACCCATAAACACACAAT	780
UTR <i>in silico</i>	781	TGTGCTGAACTGTTTGTGTCGGCGAACTGTAGCTGTACTATAAGTAGGCGAGTGTGTTGC	840
3'UTR <i>CrGPDH3</i>	781	TGTGCTGAACTGTTTGTGTCGGCGAACTGTAGCTGTACTATAAGTAGGCGAGTGTGTTGC	840
UTR <i>in silico</i>	841	GGCAAAGTCCAGATGCAACTGAGAAACAGTGATAGCTGCATGCGCCGCTTTGTGGTGGCA	900
3'UTR <i>CrGPDH3</i>	841	GGCAAAGTCCAGATGCAACTGAGAAACAGTGATAGCTGCATGCGCCGCTTTGTGGTGGCA	900
UTR <i>in silico</i>	901	TGGCGTGGCCATTGAACAAGGGAGCGTTGGGAAAGGGACAGCGCACAGCCTGGAGATGTT	960
3'UTR <i>CrGPDH3</i>	901	TGGCGTGGCCATTGAACAAGGGAGCGTTGGGAAAGGGACAGCGCACAGCCTGGAGATGTT	960
UTR <i>in silico</i>	961	GCGTCCATAATCGACCAGTGCGCCTTGTGGCTGGATGGCATGAGCATGAAAGATGGAGC	1020
3'UTR <i>CrGPDH3</i>	961	GCGTCCATAATCGACCAGTGCGCCTTGTGGCTGGATGGCATGAGCATGAAAGATGGAGC	1020

UTR <i>in silico</i>	1021	GGCACACTGCCACAACAGGTGCCAATGTAATAATACACCTGA	1062
3'UTR <i>CrGPDH3</i>	1021	GGCACACTGCCACAACAGGTGCCAATGTAATAATACACCTGA	1062

Figura 2.25. Alineamiento de nucleótidos del extremo 3' del gen *CrGPDH3* de la predicción *in silico* con respecto a la secuencia obtenida del producto secuenciado. El asterisco indica el final de la ORF y la flecha hacia abajo el inicio de la región 3' UTR de dicho gen.

2.3.5.2 Clonación del marco de lectura abierto del gen *CrGPDH3* de *C. reinhardtii*

La amplificación del marco de lectura abierto (ORF) del gen *CrGPDH3* se llevó a cabo mediante RT-PCR utilizando la enzima Expand Long Template (Roche) para eliminar la inespecificidad del pegado de los oligonucleótidos y obtener un fragmento de mejor calidad. El producto de PCR de la amplificación del marco de lectura abierto del gen *CrGPDH3* fue denominado arbitrariamente ORFCrGPDH3 y corresponde a amplicón de ~2,200 pb (Figura 2.26).

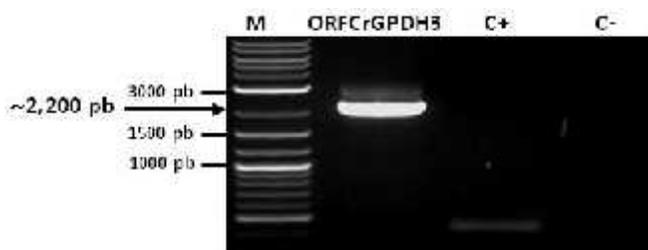


Figura 2.26. Amplificación del marco de lectura abierto del gen *CrGPDH3* de *C. reinhardtii* mediante RT-PCR. M: Marcador de peso molecular 2-log (NEB); C+: Control positivo de la reacción (*CrActin*); C-: Control negativo de la reacción.

El producto de PCR de la amplificación de la ORF del gen *CrGPDH3* denominado ORFCrGPDH3 fue clonado en el vector pGEM[®]-T Easy y se comprobó su inserción mediante una digestión con la enzima de restricción *EcoRI* (NEB). El resultado de esta digestión fue la visualización de dos bandas, la primera de ~3.0 Kb que corresponde al vector pGEM[®]-T Easy y la segunda de ~2, 200 pb que corresponde al marco de lectura abierto del gen *CrGPDH3* (figura 2.27).

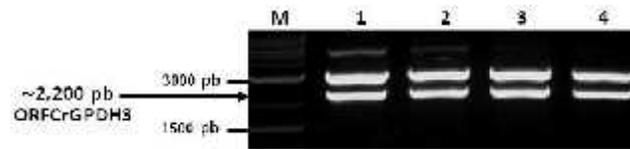


Figura 2.27. Verificación de la clonación del marco de lectura abierto del gen *CrGPDH3* en pGEM®-T Easy. Patrón de electroforesis generado por la enzima *EcoRI* para pGEM®-T Easy (~3.0 Kb) y ORFCrGPDH3 (~2,200 pb). M: Marcador de peso molecular 2-log (NEB); 1 al 4: clonas analizadas.

Tras enviar a secuenciar los plásmidos que contienen la ORF del gen *CrGPDH3* al GUCI se llevó a cabo el alineamiento de cada secuencia obtenida con respecto a la predicción *in silico* de la base de datos del Phytozome y se identificó un plásmido cuya secuencia de nucleótidos contenía sólo tres mutaciones, el cual fue denominado arbitrariamente pCrGPDH3 (Figura 2.28). En el análisis de la secuencia de aminoácidos de pCrGPDH3 se pudo notar que dos de las mutaciones eran silenciosas por tanto codifican para el mismo aminoácido, y la otra mutación no lo era, ya que codifica para el aminoácido valina (V) en lugar del aminoácido isoleucina (I) (Figura 2.29). Además, se identificó en la secuencia de la ORF del *CrGPDH3* un intrón ubicado en la posición del nucleótido 811, que en la predicción *in silico* está incorrectamente predicho como un exón de 24 pb (Figura 2.32).

ORF <i>in silico</i>	1	ATGATGCTGTCAGGCCGCACCTGCAATTGCGCCTTCAGTGCTCGTTCGAACTAGCCTCCAA	60
ORF pCrGPDH3	1	ATGATGCTGTCAGGCCGCACCTGCAATTGCGCCTTCAGTGCTCGTTCGAACTAGCCTCCAA	60
ORF <i>in silico</i>	61	CGCGGAGCGCTCGCTTTCCAATCGGCGCGGCTGGTACCTCAACGGCCGCGGCCACTTGC	120
ORF pCrGPDH3	61	CGCGGAGCGCTCGCTTTCCAATCGGCGCGGCTGGTACCTCAACGGCCGCGGCCACTTGC	120
ORF <i>in silico</i>	121	CGTCGCGCATCGTTTTGTGCCAGCGCCATCTTCATGCCAACAGAGGTGGAACAGAAGACC	180
ORF pCrGPDH3	121	CGTCGCGCATCGTTTTGTGCCAGCGCCATCTTCATGCCAACAGAGGTGGAACAGAAGACC	180
ORF <i>in silico</i>	181	GGCACCCTTCCAACAACGGCAATGTCACACCCTTGGAGGCTCGGACTGTCCCTTCCGAG	240
ORF pCrGPDH3	181	GGCACCCTTCCAACAACGGCAATGTCACACCCTTGGAGGCTCGGACTGTCCCTTCCGAG	240
ORF <i>in silico</i>	241	CGCGCGCTGACCATCTGGCGCTCCGCCAGCCGCTGCTTCGACGTAGACTGCACCATC	300
ORF pCrGPDH3	241	CGCGCGCTGACCATCTGGCGCTCCGCCAGCCGCTGCTTCGACGTAGACTGCACCATC	300
ORF <i>in silico</i>	301	ACCGTCAACGACGGCCTGGACCTGCTGGCCGAGTTTCATGGGCGTCAAGGAGGAGGTGGAG	360
ORF pCrGPDH3	301	ACCGTCAACGACGGCCTGGACCTGCTGGCCGAGTTTCATGGGCGTCAAGGAGGAGGTGGAG	360
ORF <i>in silico</i>	361	GCGCTACCAACAAGGCTATGGACGGCACCATGTCTCTGACGCGCTCTCTGGAGGAGCGC	420
ORF pCrGPDH3	361	GCGCTACCAACAAGGCTATGGACGGCACCATGTCTCTGACGCGCTCTCTGGAGGAGCGC	420
ORF <i>in silico</i>	421	CTCAACCTGATCAACTGCTCGCCAGACGACATCCGCCGCTTCATCAAGGCTACCCGCC	480
ORF pCrGPDH3	421	CTCAACCTGATCAACTGCTCGCCAGACGACATCCGCCGCTTCATCAAGGCTACCCGCC	480
ORF <i>in silico</i>	481	CAGTCCCGCTGGCGCCCGGCATCAAGGAGCTGATCAACGCGCTCCAGAAGCGCGGCTG	540
ORF pCrGPDH3	481	CAGTCCCGCTGGCGCCCGGCATCAAGGAGCTGATCAACGCGCTCCAGAAGCGCGGCTG	540

ORF <i>in silico</i>	541	GCGGTGTACCTCATCAGCGGCGGCTTCCGCGAGCTGCTGCTGCCATCGCGGCGCACCTG	600
ORF pCrGPDH3	541	GCGGTGTACCTCATCAGCGGCGGCTTCCGCGAGCTGCTGCTGCCATCGCGGCGCACCTG	600
ORF <i>in silico</i>	601	GGCATCCCCAAGGACCGCGTCTTCGCCAACCGCATGCACTGGCAGTGGGACGATGAGACC	660
ORF pCrGPDH3	601	GGCATCCCCAAGGACCGCGTCTTCGCCAACCGCATGCACTGGCAGTGGGACGATGAGACC	660
ORF <i>in silico</i>	661	GGCATGCCACCAAGCTGGTTCGGCTTTGACACGTCCGAGCCCACGGCCCCGAACCAGGGC	720
ORF pCrGPDH3	661	GGCATGCCACCAAGCTGGTTCGGCTTTGACACGTCCGAGCCCACGGCCCCGAACCAGGGC	720
ORF <i>in silico</i>	721	AAGCCCAGGCCATCGCGCGCATCCGCGAGAACAACCCCTACAACACCGTGGTCATGATC	780
ORF pCrGPDH3	721	AAGCCCAGGCCATCGCGCGCATCCGCGAGAACAACCCCTACAACACCGTGGTCATGATC	780
ORF <i>in silico</i>	781	GGCGACGGCATCACCGACCTGGAGGCGGTGCAGACCAGCGGCGGCGCCGACTTGTTTCATC	840
ORF pCrGPDH3	781	GGCGACGGCATCACCGACCTGGAGGCGGTGCAGACCAGCGGCGGCGCCGACTTGTTTCATC	840
ORF <i>in silico</i>	841	GGCAGCGGCGTGGTGGTGGAGCGCGAGGCCGTGGTGGCGGAAGCCGAGTGGTATGTGTAC	900
ORF pCrGPDH3	841	GGCAGCGGCGTGGTGGTGGAGCGCGAGGCCGTGGTGGCGGAAGCCGAGTGGTATGTGTAC	900
ORF <i>in silico</i>	901	GACTACAAGGCACTTGTGTTCGGCCCTGTCCCGTTACAAGGTGGCCGTGCTGGGCAGCGGC	960
ORF pCrGPDH3	901	GACTACAAGGCACTTGTGTTCGGCCCTGTCCCGTTACAAGGTGGCCGTGCTGGGCAGCGGC	960
ORF <i>in silico</i>	961	GCCTGGGCGTGTGCGGCGGTGCGCATGATCGCGCAGAACACCAGCCAGGACGACCCCGAG	1020
ORF pCrGPDH3	961	GCCTGGGCGTGTGCGGCGGTGCGCATGATCGCGCAGAACACCAGCCAGGACGACCCCGAG	1020
ORF <i>in silico</i>	1021	GACGAGTTTGACGACGACGTCCGCATGTGGGTGCACCAGGGCGGCGAGTGGTTCGACACG	1080
ORF pCrGPDH3	1021	GACGAGTTTGACGACGACGTCCGCATGTGGGTGCACCAGGGCGGCGAGTGGTTCGACACG	1080
ORF <i>in silico</i>	1081	ATCAACAGCAGCAGCAGAGAACC CGGCTACTTCCCGGCATCCCCCTGGGCCCAACGTC	1140
ORF pCrGPDH3	1081	ATCAACAGCAGCAGCAGAGAACC CGGCTACTTCCCGGCATCCCCCTGGGCCCAACGTC	1140
ORF <i>in silico</i>	1141	ATCGCCACCGGCAACCTGGCGGAGGCGAGTGGCGGACGCCGACTGCTGGTGTCTCTGCGCG	1200
ORF pCrGPDH3	1141	ATCGCCACCGGCAACCTGGCGGAGGCGAGTGGCGGACGCCGACTGCTGGTGTCTCTGCGCG	1200
ORF <i>in silico</i>	1201	CCGCACCAGTACATCCGCGGCATTTGCAAGCAGCTCATGGGCAAGGTCAAGCCGGGCGCC	1260
ORF pCrGPDH3	1201	CCGCACCAGTACATCCGCGGCATTTGCAAGCAGCTCATGGGCAAGGTCAAGCCGGGCGCC	1260
ORF <i>in silico</i>	1261	GCCGCCATCAGCCTGACCAAGGGCATGCGCGTACGCCCGAGGGCCCCGAGCTCATCAGC	1320
ORF pCrGPDH3	1261	GCCGCCATCAGCCTGACCAAGGGCATGCGCGTACGCCCGAGGGCCCCGAGCTCATCAGC	1320
ORF <i>in silico</i>	1321	CAGATCGTGCGCCGACCCCTGGGCGTGGACTGCTCCGTGCTCATGGGCGGTAACATCGCC	1380
ORF pCrGPDH3	1321	CAGATCGTGCGCCGACCCCTGGGCGTGGACTGCTCCGTGCTCATGGGCGGTAACATCGCC	1380
ORF <i>in silico</i>	1381	GAGGACGTGGGTGCGGAGCAGCTGTCTGAGGCCGTGATCGGCTACTACAACCTGGAGCAC	1440
ORF pCrGPDH3	1381	GAGGACGTGGGTGCGGAGCAGCTGTCTGAGGCCGTGATCGGCTACTACAACCTGGAGCAC	1440
ORF <i>in silico</i>	1441	GCCAGCGCTTCAAGAAGCTCTTCCGGCGCCCTACTTCCGCGTACGCTGCTGCCCGAC	1500
ORF pCrGPDH3	1441	GCCAGCGCTTCAAGAAGCTCTTCCGGCGCCCTACTTCCGCGTACGCTGCTGCCCGAC	1500
ORF <i>in silico</i>	1501	CCGGTGGGTGCTGAGCTGTGCGGTACGCTCAAGAACATCGTGGCCCTGGGTGTGGGCATG	1560
ORF pCrGPDH3	1501	CCGGTGGGTGCTGAGCTGTGCGGTACGCTCAAGAACATCGTGGCCCTGGGTGTGGGCATG	1560
ORF <i>in silico</i>	1561	GTGGACGGCATGGGGATGGGACCCAACCTCAAGGCCGAGTTATCCGCCAGGGCCTGCTT	1620
ORF pCrGPDH3	1561	GTGGACGGCATGGGGATGGGACCCAACCTCAAGGCCGAGTTATCCGCCAGGGCCTGCTT	1620
ORF <i>in silico</i>	1621	GAGATGCGTGACTTCTGCCAGGCCCTGTACCCCTCCGTCCGCGACGACACCTTCTCTCGAG	1680
ORF pCrGPDH3	1621	GAGATGCGTGACTTCTGCCAGGCCCTGTACCCCTCCGTCCGCGACGACACCTTCTCTCGAG	1680
ORF <i>in silico</i>	1681	TGCTGCGGCGTGGGCGACCTGGTCGCCACCTGCATCGGCGGCCGTACCCGCCGCTGGCC	1740
ORF pCrGPDH3	1681	TGCTGCGGCGTGGGCGACCTGGTCGCCACCTGCATCGGCGGCCGTACCCGCCGCTGGCC	1740
ORF <i>in silico</i>	1741	GAGGCCTGGACGCGCTCCGCAATTGAGAGCGCCGTGGCCGGCGAGGGCAACGGTGC CGGC	1800
ORF pCrGPDH3	1741	GAGGCCTGGACGCGCTCCGCAATTGAGAGCGCCGTGGCCGGCGAGGGCAACGGTGC CGGC	1800

ORF <i>in silico</i>	1801	CGCAGCTGGGCTGAGCTGGAGAAGGAGCTGCTGCAGGGCCAGAAGCTGCAGGGCGTGCTG	1860
ORF pCrGPDH3	1801	CGCAGCTGGGCTGAGCTGGAGAAGGAGCTGCTGCAGGGCCAGAAGCTGCAGGGCGTGCTG	1860
ORF <i>in silico</i>	1861	ACCAGCAACGAGGTGCAGCAGATCCTGAGGACCCGCGGCTGGGAGAGCAAGTACCCGCTG	1920
ORF pCrGPDH3	1861	ACCAGCAACGAGGTGCAGCAGATCCTGAGGACCCGCGGCTGGGAGAGCAAGTACCCGCTG	1920
ORF <i>in silico</i>	1921	TTCACCACCATCAACCGCATCGTCAACGGCCACCTGCCGCCACCTGGTGGTTCGACTAC	1980
ORF pCrGPDH3	1921	TTCACCACCATCAACCGCATCGTCAACGGCCACCTGCCGCCACCTGGTGGTTCGACTAC	1980
ORF <i>in silico</i>	1981	CTGGAGGGCGCCAAGGCCGATATCGCCGTTGACGTCGAGGAGACATTGTGCCCTGCCG	2040
ORF pCrGPDH3	1981	CTGGAGGGCGCCAAGGCCGATATCGCCGTTGACGTCGAGGAGACATTGTGCCCTGCCG	2040
ORF <i>in silico</i>	2041	CGCCAGCCCGCCTCCGCCATGGCCCGCCTATTCGGCCAGCTGGTCGGCGGAATCATGCAG	2100
ORF pCrGPDH3	2041	CGCCAGCCCGCCTCCGCCATGGCCCGCCTATTCGGCCAGCTGGTCGGCGGAATCATGCAG	2100
ORF <i>in silico</i>	2101	CAGGGAGGAGCAGCCCGCGCCGCCAGCGCCCGCCGAGCGCCCGCAGCGCCCGCGGGCGCT	2160
ORF pCrGPDH3	2101	CAGGGAGGAGCAGCCCGCGCCGCCAGCGCCCGCCGAGCGCCCGCAGCGCCCGCGGGCGCT	2160
ORF <i>in silico</i>	2161	GCCAGCAACAGCGTGTA	2178
ORF pCrGPDH3	2161	GCCAGCAACAGCGTGTA	2178

Figura 2.28. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos del gen *CrGPDH3* obtenida de la predicción *in silico* del Phytosome con respecto a la secuencia obtenida del producto secuenciado. La posición de las mutaciones en la secuencia de nucleótidos de la ORF gen *CrGPDH3* se indica con triángulos.

ORF <i>in silico</i>	1	MMLSGRTCNCASFARRTSLQRGALAFQSARLVPQRPPATCRRASFVPSAIFMPTEVEQKT	60
ORF pCrGPDH3	1	MMLSGRTCNCASFARRTSLQRGALAFQSARLVPQRPPATCRRASFVPSAIFMPTEVEQKT	60
ORF <i>in silico</i>	61	GTTSNNGNVTPLAERTVPSERALT IWR SADAVCFD VDC TITVNDGLDLLAEFMGVKEEVE	120
ORF pCrGPDH3	61	GTTSNNGNVTPLAERTVPSERALT IWR SADAVCFD VDC TITVNDGLDLLAEFMGVKEEVE	120
ORF <i>in silico</i>	121	ALTNKAMDGTMSLTRSLEERLN LINCSPDDIRRF I KAYPPQSRLAPGIKELINALQKRGV	180
ORF pCrGPDH3	121	ALTNKAMDGTMSLTRSLEERLN LINCSPDDIRRF I KAYPPQSRLAPGIKELINALQKRGV	180
ORF <i>in silico</i>	181	AVYLISGGFRELLLP IAAHLGIPKDRVF ANRMHWQWDETGMP TKLVGFDTSEPTARNQG	240
ORF pCrGPDH3	181	AVYLISGGFRELLLP IAAHLGIPKDRVF ANRMHWQWDETGMP TKLVGFDTSEPTARNQG	240
ORF <i>in silico</i>	241	KPEAIARIENNPYNTVVMIGDGI TDLEAVQTSGGADLFIGSGVVVEREAVVAEAEWYVY	300
ORF pCrGPDH3	241	KPEAIARIENNPYNTVVMIGDGI TDLEAVQTSGGADLFIGSGVVVEREAVVAEAEWYVY	300
ORF <i>in silico</i>	301	DYKALVSALSRYKVAVLGSGAWACA AAVRMIAQNTSQDDPEDEFDDV RMVWHQGGELVDT	360
ORF pCrGPDH3	301	DYKALVSALSRYKVAVLGSGAWACA AAVRMIAQNTSQDDPEDEFDDV RMVWHQGGELVDT	360
ORF <i>in silico</i>	361	INSTHENPAYFPGIPLGPNVIATGNLAEAVADADLLVFCAPHQYIRGICKQLMGKVKPGA	420
ORF pCrGPDH3	361	INSTHENPAYFPGIPLGPNVIATGNLAEAVADADLLVFCAPHQYIRGICKQLMGKVKPGA	420
ORF <i>in silico</i>	421	AAISLTKGMRVTPEGPELISQIVRRTLGVDCSVLMGGNIAEDVGREQLSEAVIGYYNLEH	480
ORF pCrGPDH3	421	AAISLTKGMRVTPEGPELISQIVRRTLGVDCSVLMGGNIAEDVGREQLSEAVIGYYNLEH	480
ORF <i>in silico</i>	481	AQRFKKLFRFPYFRVTL LPPVGAELCGTLKNIVALGVGMVDGMGMGPNskaAVIRQGLL	540
ORF pCrGPDH3	481	AQRFKKLFRFPYFRVTL LPPVGAELCGTLKNIVALGVGMVDGMGMGPNskaAVIRQGLL	540
ORF <i>in silico</i>	541	EMRDFCQALYPSVRDDTFLECCGVGDLVATCIGGRHRRVAEAWTRSAIESAVAGEGNGAG	600
ORF pCrGPDH3	541	EMRDFCQALYPSVRDDTFLECCGVGDLVATCIGGRHRRVAEAWTRSAIESAVAGEGNGAG	600
ORF <i>in silico</i>	601	RSWAELEKELLQGQKLQGVLT SNEVQQILRTRGWESKYPLFTTINRIVNGHLPPHLVVDY	660
ORF pCrGPDH3	601	RSWAELEKELLQGQKLQGVLT SNEVQQILRTRGWESKYPLFTTINRIVNGHLPPHLVVDY	660
ORF <i>in silico</i>	661	LEGAKADI AVDVEEDIVPLRPQASAMARLFGQLVGGIMQQGAAAGAAASAAAGAAAGA	720
ORF pCrGPDH3	661	LEGAKADI AVDVEEDIVPLRPQASAMARLFGQLVGGIMQQGAAAGAAASAAAGAAAGA	720

ORF <i>in silico</i>	721	ASNSV	725
ORF pCrGPDH3	721	ASNSV	725

Figura 2.29. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del gen *CrGPDH3* obtenida de la predicción *in silico* del Phytozome con respecto a la secuencia obtenida del producto secuenciado. La posición de la mutación en la secuencia de aminoácidos de la ORF del gen *CrGPDH3* se indica con un triángulo.

Para revertir la mutación de la guanina (G) por adenina (A) en la posición 790 de la secuencia de nucleótidos de la ORF del gen *CrGPDH3*, se amplificó mediante PCR al plásmido pCrGPDH3 junto con los oligonucleótidos diseñados con la mutación deseada, de acuerdo con el protocolo de mutagénesis sitio-dirigida del estuche comercial QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). El producto de esta PCR fue denominado arbitrariamente ORFCrGPDH3Mut y corresponde a un amplicón de ~2,200 pb. Este fragmento se clonó en el vector pGEM®-T Easy para dar lugar al plásmido pCrGPDH3Mut que contiene al gen *CrGPDH3* con la mutación deseada. En la Figura 2.30 se muestra el resultado de la digestión con la enzima de restricción *EcoRI* (NEB), en donde la banda de ~3.0 Kb corresponde al vector pGEM®-T Easy y la banda de ~2, 200 pb corresponde al marco de lectura abierto del gen *CrGPDH2* con la mutación deseada.

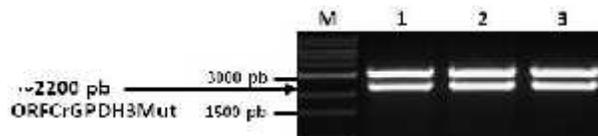


Figura 2.30. Verificación de la clonación del marco de lectura abierto con la reversión de la mutación del gen *CrGPDH3* en pGEM®-T Easy. Patrón de electroforesis generado por la enzima *EcoRI* para pGEM®-T Easy (~3.0 Kb) y ORFCrGPDH3Mut (~2,200 pb). M: Marcador de peso molecular 2-log (NEB); 1 al 3: clonas analizadas.

Tras enviar a secuenciar los plásmidos pCrGPDH3Mut (Figura 2.30) al GUCI se realizó el alineamiento de cada secuencia con respecto a la predicción *in silico* y los tres plásmidos contenían la mutación deseada sin ninguna otra variación con respecto a la del plásmido pCrGPDH3. En la Figura 2.31 se presenta el resultado del alineamiento de la secuencia de nucleótidos de *CrGPDH3* con la mutación deseada con respecto a la predicción *in silico*, y se puede notar que la secuencia de aminoácidos de ambos es idéntica.

ORF <i>in silico</i>	1	MMLSGRTCNCASFARSRTSLQRGALAFQ SARLVLPQRPPATCRRASFVPSAIFMPTEVEQKT	60
ORF pCrGPDH3Mut	1	MMLSGRTCNCASFARSRTSLQRGALAFQ SARLVLPQRPPATCRRASFVPSAIFMPTEVEQKT	60
ORF <i>in silico</i>	61	GTTSNNGNVTPL EARTVPSERALT IWR SDAVCFD VDC TITVNDGLDLLAEFMGVKEEVE	120
ORF pCrGPDH3Mut	61	GTTSNNGNVTPL EARTVPSERALT IWR SDAVCFD VDC TITVNDGLDLLAEFMGVKEEVE	120
ORF <i>in silico</i>	121	ALTNKAMDGTMSL TRSLEERLNLINCSPDDIRRF IKAYPPQSRLAPGIKELINALQKRGV	180
ORF pCrGPDH3Mut	121	ALTNKAMDGTMSL TRSLEERLNLINCSPDDIRRF IKAYPPQSRLAPGIKELINALQKRGV	180
ORF <i>in silico</i>	181	AVYLISGGFREL LLLPIAAHLGIPKDRVFANRMHWQWDETGMP TKLVGFDTSEPTARNQG	240
ORF pCrGPDH3Mut	181	AVYLISGGFREL LLLPIAAHLGIPKDRVFANRMHWQWDETGMP TKLVGFDTSEPTARNQG	240
ORF <i>in silico</i>	241	KPEAIARIRENNPYNTVVMIGDGI TDLEAVQ TSSGADLFIGSGVVVEREAVVAEAEWYVY	300
ORF pCrGPDH3Mut	241	KPEAIARIRENNPYNTVVMIGDGI TDLEAVQ TSSGADLFIGSGVVVEREAVVAEAEWYVY	300
ORF <i>in silico</i>	301	DYKALVSALSRYKVAVLGSGAWACA AAVRMIAQNTS QDDPEDEFDD DVRMVWHQGGELVDT	360
ORF pCrGPDH3Mut	301	DYKALVSALSRYKVAVLGSGAWACA AAVRMIAQNTS QDDPEDEFDD DVRMVWHQGGELVDT	360
ORF <i>in silico</i>	361	INSTHENPAYFPGIPLGPNVIATGNLAEAVADADLLVFCAPHQYIRGICKQLMGKVKPGA	420
ORF pCrGPDH3Mut	361	INSTHENPAYFPGIPLGPNVIATGNLAEAVADADLLVFCAPHQYIRGICKQLMGKVKPGA	420
ORF <i>in silico</i>	421	AAISLTKGMRVTPEGPELISQIVRRTLGVDCSVLMGGNIAEDVGREQLSEAVIGYNYLEH	480
ORF pCrGPDH3Mut	421	AAISLTKGMRVTPEGPELISQIVRRTLGVDCSVLMGGNIAEDVGREQLSEAVIGYNYLEH	480
ORF <i>in silico</i>	481	AQRFKKLFRRPYFRVTL LDPVGAELCGTLKNI VALGVMVDGMGMGPNSKAAVIRQGLL	540
ORF pCrGPDH3Mut	481	AQRFKKLFRRPYFRVTL LDPVGAELCGTLKNI VALGVMVDGMGMGPNSKAAVIRQGLL	540
ORF <i>in silico</i>	541	EMRDFCQALYPSVRDDTFLECCGVGDLVATCIGGRHRRVAEAWTRSAIESAVAGEGNGAG	600
ORF pCrGPDH3Mut	541	EMRDFCQALYPSVRDDTFLECCGVGDLVATCIGGRHRRVAEAWTRSAIESAVAGEGNGAG	600
ORF <i>in silico</i>	601	RSWAELEKELLQGGKLGQVLT SNEVQQILRTRGWESKYPLFTTINRIVNGHLP PHLVVDY	660
ORF pCrGPDH3Mut	601	RSWAELEKELLQGGKLGQVLT SNEVQQILRTRGWESKYPLFTTINRIVNGHLP PHLVVDY	660
ORF <i>in silico</i>	661	LEGA KADI AVDVEEDIVPLRQPASAMARLFGQLVGGIMQQGGAAAGAAASAAAGAAAGA	720
ORF pCrGPDH3Mut	661	LEGA KADI AVDVEEDIVPLRQPASAMARLFGQLVGGIMQQGGAAAGAAASAAAGAAAGA	720
ORF <i>in silico</i>	721	ASNSV	725
ORF pCrGPDH3Mut	721	ASNSV	725

Figura 2.31. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del gen *CrGPDH3* obtenida de la predicción *in silico* con respecto a la secuencia obtenida del producto secuenciado de la reversión de la mutación del plásmido pCrGPDH3Mut. La posición de la mutación revertida en la secuencia de aminoácidos de *CrGPDH3* se indica con una flecha.

El resultado de la clonación del ADNc del gen *CrGPDH3* de *C. reinhardtii* se encuentra disponible en la base de datos del GenBank con el número de acceso KM923899. En la Figura 2.32 se presenta el resultado del mapeo de todo el ADNc de *CrGPDH3*. Se puede notar la ubicación de dos secuencias putativas de la señal de poliadenilación (TGTA y TGTA G) en la región 3' UTR de dicho gen, las cuales fueron previamente identificadas *in silico* en genes codificados en el núcleo de *C. reinhardtii* (Silflow *et al.*, 1985; Shen *et al.*, 2008). Además, se presenta la ubicación de un intrón de 24 pb incorrectamente predicho como un exón en la predicción *in silico* de la ORF de *CrGPDH3* (figura 2.32).

2.3.6 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del dominio GPDH de los genes CrGPDH2 y CrGPDH3 de *C. reinhardtii*

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos del dominio GPDH de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de *C. reinhardtii* reveló que entre ellos varían en nueve aminoácidos, cinco de los cuales son cambios que corresponden a aminoácidos que pertenecen a la misma clasificación de acuerdo a su grupo R (aminoácidos similares) y cuatro de ellos pertenecen a una clasificación diferente (Figura 2.33).

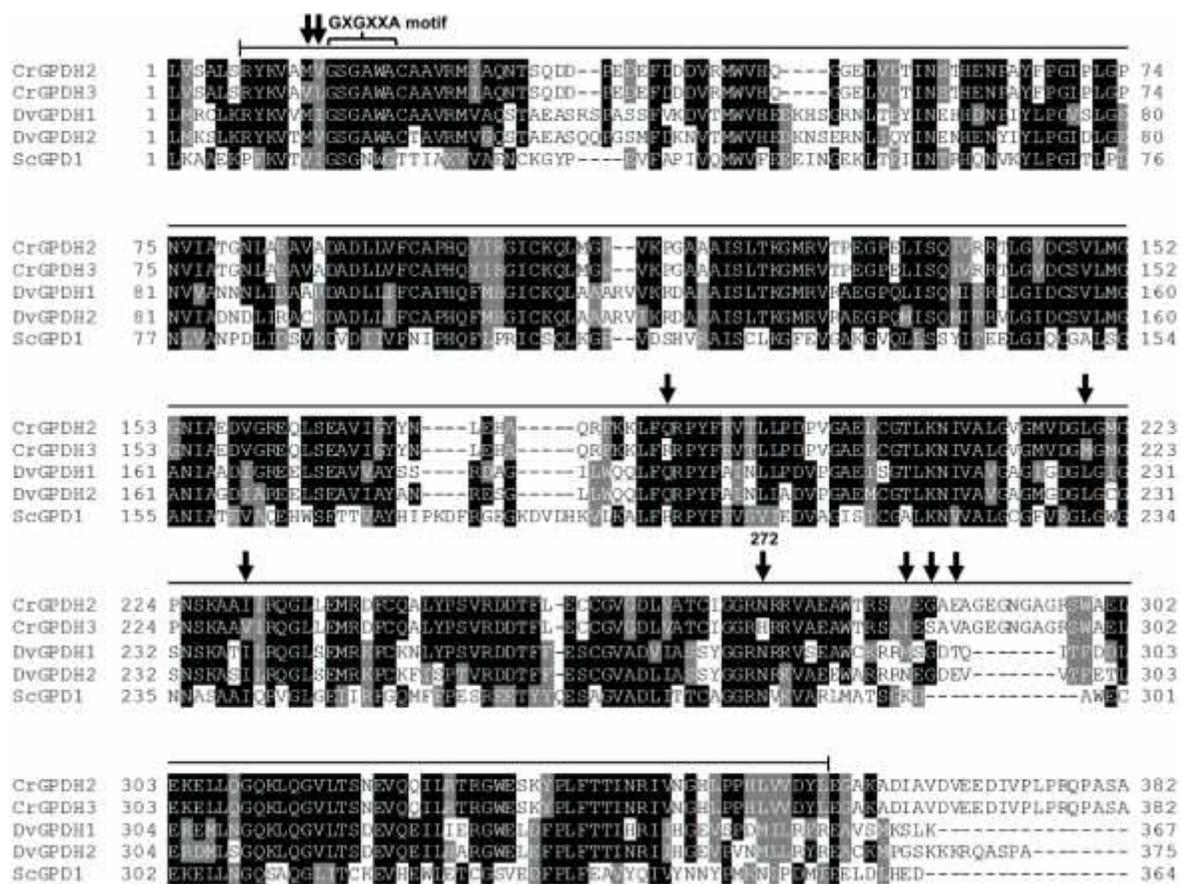


Figura 2.33. Comparación de la secuencia de aminoácidos del dominio GPDH de CrGPDH2 (KM923898), CrGPDH3 (KM923899), DvGPDH1 (EU624406) y DvGPDH2 (EU624407) de *Dunaliella viridis* y GPD1 de *Saccharomyces cerevisiae* (ScGPD1: X76859.1). Las líneas sobre la secuencia de aminoácidos indican el dominio GPDH. El sitio putativo de unión de la NADH está señalado en la secuencia con un paréntesis (GXGXXA). Los aminoácidos similares están sombreados de gris y los aminoácidos idénticos de negro. Las flechas indican los aminoácidos que varían entre la secuencia de CrGPDH2 y CrGPDH3 y el número la posición del aminoácido que es idéntico en CrGPDH2 y ScGPD1 pero diferente en CrGPDH3.

En el alineamiento previo se incluyen las secuencias de la microalga *D. viridis* y la levadura *S. cerevisiae*. Notablemente, la asparagina (Asn) de la posición 272 en la secuencia del gen *CrGPDH2* se encuentra conservada en las secuencias de los genes *DvGPDH1* y *DvGPDH2* de *D. viridis* y el gen *ScGPD1* de *S. cerevisiae*, pero no en la secuencia del gen *CrGPDH3* (Figura 2.33). Adicionalmente, se realizó el alineamiento de la secuencia de aminoácidos del dominio GPDH de *CrGPDH2* y *CrGPDH3* en donde se obtuvo un porcentaje de identidad del 95.8% entre ambas secuencias.

2.3.7 Obtención del plásmido de transformación pCrGPDH2c

La clonación del marco de lectura abierto del gen *CrGDPH2* (ORFCrGPDH2Mut) se realizó entre los sitios de restricción *EcoRI* y *SpeI* del vector p424GPD. Para ello se linearizaron el vector y el inserto y se verificó su integridad mediante una electroforesis. La relación vector:inserto de los fragmentos linearizados y purificados del vector p424GPD (~6,527 pb) y el inserto ORFCrGPDH2Mut (~2,172 pb) se presenta en la Figura 2.34a. La ligación de los fragmentos purificados y posterior clonación del inserto ORFCrGPDH2Mut en el vector p424GPD dio lugar al plásmido p424GPDH2. El resultado de esta clonación fue verificado mediante una digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *SpeI*. Todas las clonas analizadas fueron positivas a la presencia del inserto ORFCrGPDH2Mut como se puede verificar en la Figura 2.34b.

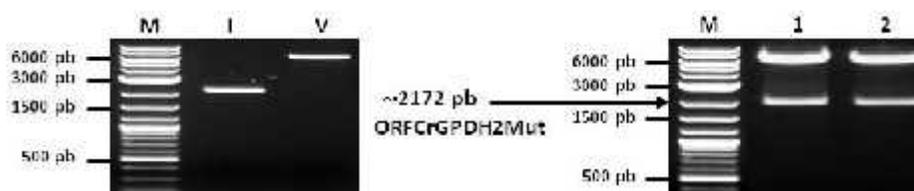


Figura 2.34. Clonación del fragmento ORFCrGPDH2Mut en el vector p424GPD: a) Relación vector:inserto (p424GPD:ORFCrGPDH2Mut) y b) Verificación de la integridad del vector p424GPDH2. Patrón de electroforesis generado por *EcoRI* y *SpeI* (NEB) V: Vector p424GPD (~6,527 pb); I: Inserto ORFCrGPDH2Mut (~2,172 pb); M: Marcador 2-Log (NEB); 1 y 2: clonas analizadas.

A partir del plásmido p424GPDH2 se llevó a cabo la sub-clonación del marco de lectura abierto del gen *CrGDPH2* (ORFCrGPDH2Mut) entre los sitios de restricción *BamHI* y *XbaI*

del vector pChlamy_4, y posteriormente los fragmentos se purificaron como se describió previamente. En la Figura 2.35a se presenta la relación vector:inserto con la cual se llevó a cabo la ligación de ambos fragmentos. Tras la transformación de las células competentes de *E. coli* con la ligación anterior, se picaron 2 colonias para su análisis mediante la digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I. En la Figura 2.35b se observa que las clonas analizadas presentaron los fragmentos esperados de ~3,640 y ~2,172 pb correspondientes al vector pChlamy_4 y al inserto ORFCrGPDH2Mut, respectivamente.

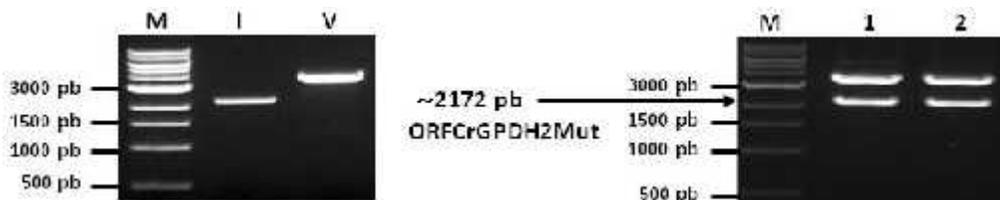


Figura 2.35. Clonación del fragmento ORFCrGPDH2Mut en el vector pChlamy_4: a) Relación vector:inserto (pChlamy_4:ORFCrGPDH2Mut) y b) Verificación de la integridad del vector pCrGPDH2c. Patrón de electroforesis generado por *Bam*HI y *Xba*I. V: Vector pChlamy_4 (~3,640 pb); I: Inserto ORFCrGPDH2Mut (~2,172 pb); M: Marcador 1 Kb (NEB); 1 y 2: clonas analizadas.

Al plásmido generado en este apartado se le nombró como pCrGPDH2c (Figura 2.38).

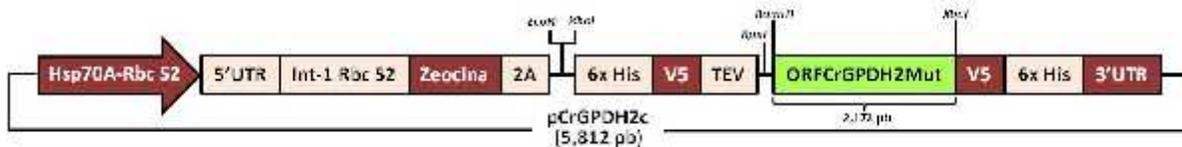


Figura 2.36. Diagrama del vector pCrGPDH2c:ORFCrGPDH2Mut: ADNc del gen *CrGPDH2*.

2.4 DISCUSIÓN

La microalga verde de agua dulce *C. reinhardtii* es capaz de tolerar condiciones de estrés salino de hasta 200 mM de NaCl mediante la síntesis de glicerol y su posterior excreción al medio de cultivo (León y Galván, 1994), además de acumular triacilglicéridos (TAGs) en respuesta a concentraciones que van de 20 a 100 mM de NaCl (Siaut *et al.*, 2011). Dado

que se han identificado genes *GPDH* osmorreguladores involucrados en la síntesis de glicerol en diferentes organismos, entre los que se encuentran los genes *gpd1* y *gpd2* de la levadura *S. cerevisiae* (Ansell *et al.*, 1997), el gen *DsGPDH2* de la microalga verde *D. salina* (He *et al.* 2007) y los genes *DvGPDH1* y *DvGPDH2* de la microalga verde *D. viridis* (He *et al.* 2009), es de esperarse que alguno de los genes *GPDH* identificados en *C. reinhardtii* incremente su expresión en condiciones de estrés osmótico con NaCl. En cuanto a esto, el estudio realizado por Macario-González (2011) demostró que el gen *CrGPDH2* presenta la inducción en su expresión a condiciones de estrés con 200 mM de NaCl por 2 h. En este capítulo de estudio, se presentan evidencias de que, efectivamente, la condición de estrés osmótico a 200 mM de NaCl por 2 h induce la expresión no sólo del gen *CrGPDH2* sino también del gen *CrGPDH3* de *C. reinhardtii*, la cual sin la condición de estrés salino fue casi indetectable mediante RT-PCR en un gel de agarosa. Es probable que la similitud en el patrón de expresión observado en los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* a condiciones de estrés osmótico se relacione con el porcentaje de identidad entre ambas secuencias de aminoácidos (97.9%), así como a la presencia de un péptido putativo de tránsito al cloroplasto identificado en ambas secuencias (Macario-González, 2011), el cual también ha sido reportado en las microalgas verdes *D. salina* y *D. viridis* (He *et al.*, 2007; He *et al.*, 2009).

Gee *et al.* (1993) y Ghoshal *et al.* (2002) reportaron la existencia de al menos tres isoformas de la enzima GPDH basados en el perfil de elución, localización y características de las diferentes isoformas en microalgas del género *Dunaliella*. Estos autores concluyeron que la forma osmorreguladora del cloroplasto es la isoforma que se estimula con NaCl; la forma glicérido del cloroplasto es la isoforma que se presenta a lo largo del crecimiento y se inhibe con NaCl y la forma glicérido del citosol es la que desempeña un papel en la síntesis de glicéridos. Probablemente, *CrGPDH2* y *CrGPDH3* codifiquen para isoformas del cloroplasto involucradas en la síntesis de glicerol y tolerancia a estrés osmótico por NaCl, ya que ambas secuencias poseen un péptido putativo de tránsito hacia este organelo y, dado que *C. reinhardtii* acumula y excreta glicerol, como soluto osmorregulador, en condiciones de estrés osmótico (León y Galván, 1994), es probable que la inducción en la expresión de estos genes *GPDH* esté asociada a la síntesis de glicerol en condiciones de estrés osmótico por NaCl, como se ha observado en las microalgas verdes *D. salina* y *D. viridis* (He *et al.*, 2007; He *et al.*, 2009).

Por su parte, el gen *CrGPDH1* de *C. reinhardtii* presentó una expresión constitutiva tanto en el control como en la condición de estrés osmótico por NaCl, lo cual indica que su expresión no está asociada al tratamiento de estrés salino. Esta es la primera vez que se analiza la expresión del gen *CrGPDH1* de *C. reinhardtii*, sin embargo, este gen también fue caracterizado *in silico* por Macario-González (2011), y se observó que su secuencia de aminoácidos no posee algún péptido putativo de tránsito al cloroplasto contrario a lo observado en la secuencia de aminoácidos de *CrGPDH2* y *CrGPDH3*, por tanto es probable que *CrGPDH1* codifique para una proteína involucrada en la síntesis de glicéridos similar a la función de la GPDH citoplasmática identificada en la microalga *D. tertiolecta* (Gee *et al.*, 1993), debido a que este gen no presenta un péptido señal de tránsito al cloroplasto y no se observó la inhibición en su expresión por la presencia de NaCl.

Con base en los resultados del análisis de expresión de los tres genes *CrGPDH* a 200 mM de NaCl por 2 h y en las evidencias de la caracterización *in silico* realizada por Macario-González (2011), se decidió continuar con la evaluación de la expresión de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* a diferentes concentraciones de NaCl y con variaciones en el tiempo del tratamiento. En este análisis se observó que ambos genes presentaron la inducción en su expresión en todos los tratamientos de NaCl evaluados, incluso a una concentración de tan sólo 5 mM de NaCl por 5 min. El hecho de que ambos genes presenten la inducción en su expresión a una concentración tan baja como 5 mM de NaCl podría tener implicaciones para la adaptación de la microalga de agua dulce *C. reinhardtii* en respuesta a los cambios de su entorno, debido a que *C. reinhardtii* es una microalga de agua dulce, no halófila, cuyo crecimiento óptimo se da a una concentración inferior al 1% p/v de NaCl (Kushner y Kamekura, 1988), por tanto, es probable que al percibir diferencias en la salinidad de su medio se inicie la activación de la ruta de síntesis de glicerol, ya que la excreción y síntesis de glicerol en esta microalga es directamente proporcional a la concentración salina del medio (León, 1997). Además, debido a que *C. reinhardtii* es un microorganismo con poca tolerancia a salinidad es fundamental que sea capaz de responder incluso a bajas concentraciones salinas para garantizar el balance hídrico dentro y fuera de la célula para su supervivencia.

Actualmente la identificación y caracterización de genes *GPDH* se ha llevado a cabo principalmente en levaduras, así como en las microalgas verdes halotolerantes del género *Dunaliella* y la información que se posee de microalgas susceptibles a la salinidad, como *C. reinhardtii*, es muy escasa. Si se compara la información actualmente disponible con los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, se puede observar que el incremento en el nivel de transcritos de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de *C. reinhardtii* en respuesta a los diferentes tratamientos con NaCl es muy drástico, de apenas detectable a una alta expresión, en comparación a la expresión de los genes *GDPH* que se han estudiado hasta el momento en otros organismos, en los cuales se puede detectar fácilmente la expresión, pero se nota un aumento en ésta ante condiciones de estrés osmótico. En la levadura *S. cerevisiae*, por ejemplo, se observó la presencia del ARNm de los genes *gpd1* y *gpd2* sin la condición de estrés osmótico con NaCl, siendo el gen *gpd1* el único que presentó un incremento en la acumulación del ARNm ante estrés osmótico (Eriksson *et al.*, 1995). En la levadura *D. hansenii* se observó el incremento en la acumulación del ARNm del gen *DhGPD* 15 min después de la adición de NaCl, similar a lo observado para el gen *gpd1* de *S. cerevisiae* (Adler *et al.*, 1995; Thomé y Trench, 1999). En la microalga verde *D. salina*, el gen *DsGPDH2* presenta una expresión basal alta la cual incrementa después de 4 h ante condiciones de estrés por NaCl (He *et al.*, 2007), similar a lo reportado en las levaduras *S. cerevisiae* y *D. hansenii*. Por otro lado, en la microalga *D. viridis* la expresión basal de los genes *DvGPDH1* y *DvGPDH2* aumenta significativamente bajo condiciones de estrés hiperosmótico, sin embargo, ambos genes están sujetos a una regulación negativa, es decir, que la acumulación de sus transcritos decrece en condiciones de estrés salino elevados (3 M a 5 M) (He *et al.*, 2009). En estas microalgas también se observó que el aumento en la expresión de sus genes *GPDH* estaba asociado a la síntesis de glicerol bajo condiciones de estrés por NaCl. Este comportamiento, es similar al que presentan algunas especies de algas verdes, las cuales acumulan metabolitos intracelularmente para obtener un balance osmótico y sobrevivir a las condiciones de estrés en ambientes salinos (Husic y Tolbert, 1986; Ben-Amotz y Avron, 1983).

Por otro lado, se ha observado que algunas microalgas en condiciones de estrés osmótico por NaCl no sólo aumentan la síntesis de glicerol sino que también incrementan su acumulación de lípidos. Ejemplo de esto es la microalga *D. tertiolecta* (Takagi *et al.*,

2006), *B. braunii* (Rao *et al.*, 2007) y *C. saccharophila* (Herrera-Valencia *et al.*, 2011). La microalga verde *C. reinhardtii* también es capaz de acumular TAGs bajo condiciones de estrés osmótico por NaCl (Siaut *et al.*, 2011), por lo tanto, es probable que el aumento en la expresión de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* así como la síntesis de glicerol bajo condiciones de estrés osmótico estén asociados a la acumulación de TAGs. De ser así, es posible en estudios futuros manipular molecularmente la acumulación de glicerol y TAGs en *C. reinhardtii* u otras microalgas, sin embargo, para ello es necesario identificar y caracterizar molecularmente genes con función de GPDH, de forma experimental, para poder usarlos con este propósito.

En este capítulo de investigación se clonó el ADNc de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de *C. reinhardtii*. A partir del mapeo de los extremos terminales 5' y 3' de cada gen se identificó el sitio de inicio y de término de la transcripción de cada gen. El mapeo del extremo 5' no traducible de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* no presentó mayor variación con respecto a la predicción *in silico* a excepción de 20 y 25 pb marcadas como parte de la región intergénica en la predicción *in silico* que en realidad forman parte del extremo 5' no traducible del gen *CrGPDH2* y *CrGPDH3*, respectivamente. Además, el resultado del mapeo del extremo 5' del gen *CrGPDH2* corresponde con el resultado del mapeo realizado por Macario-González (2011), en donde la única variación fue también 20 pb marcadas como parte de la región intergénica en la predicción *in silico* que en realidad eran parte de la región 5' no traducible del gen *CrGPDH2*.

Se sabe que la región 3' no traducible juega un papel importante en la regulación post-transcripcional de los ARNm, para la estabilidad y eficiencia de la traducción (Pesole *et al.*, 2001). En cuanto a la región 3' no traducible del gen *CrGPDH3* no existieron variaciones detectadas por medio de la técnica de RACE. Sin embargo, en el gen *CrGPDH2* se identificaron regiones 3' no traducibles de diferentes longitudes (453, 511, 530 y 564 pb) las cuales resultaron ser más cortas que la predicción *in silico* (914 pb). En el reporte de Macario-González (2011), se identificó únicamente una región 3' no traducible (564 pb), la cual resultó ser idéntica a la región más larga obtenida en este trabajo. En general, se observó que la región 5' no traducible presentó una longitud mucho menor a la región 3' no traducible en los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3*, lo cual concuerda con lo reportado por Pesole *et al.* (2001). Además, las longitudes obtenidas en

las regiones 5' y 3' no traducibles de ambos genes son muy similares a las longitudes reportadas para otros genes *GPDH* de microalgas (He *et al.*, 2007; He *et al.*, 2009). Es probable que aun cuando se identificaron dos secuencias putativas de la señal de poliadenilación (TGTA y TGTA) en la región 3' no traducible de *CrGPDH3*, sea la secuencia TGTA la que funcione como señal para la poliadenilación de este gen, debido a que fue la única secuencia identificada tanto en *CrGPDH2* como en *CrGPDH3* y la secuencia de aminoácidos de ambos genes presenta un porcentaje de identidad del 94.2%, tomando en consideración para el análisis el marco de lectura abierto caracterizado para ambos genes en este capítulo de estudio. Sin embargo, hasta ahora no se ha verificado de forma experimental que alguna de estas secuencias funcione como señal de poliadenilación en alguno de los genes de *C. reinhardtii* en donde se han identificado (Sugase *et al.*, 1996; Silflow *et al.*, 1985).

La clonación del marco de lectura abierto (ORF) de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* demostró que la secuencia de ambos genes corresponde con la secuencia de la predicción *in silico* de la ORF para cada gen. Un resultado interesante se observó durante el análisis del marco de lectura abierto del gen *CrGPDH2*, debido a que en este estudio la secuencia analizada sí corresponde con la predicción *in silico* para este gen, contrario a lo reportado por Macario-González (2011), en donde se observó una región no codificante (intrón) de 99 pb ubicada 20 pb río arriba con respecto al codón de término. Notablemente, tanto en este estudio como en el realizado por Macario-González (2011), se observó la presencia de una citocina en lugar de una timina en el nucleótido 2,019 de la secuencia obtenida experimentalmente en comparación con la predicción *in silico*. En cuanto al marco de lectura abierto del gen *CrGPDH3*, es probable que éste se encuentre 153 pb río arriba con respecto a la predicción *in silico*, debido a que la secuencia de nucleótidos (ACCATGA) identificada alrededor de ese codón de inicio es casi idéntica a la secuencia consenso de Kozak (ACCATGG), la cual es necesaria para el óptimo inicio de la traducción en las células eucariotas (Kozak, 1986). Debido a lo anterior, la longitud del marco de lectura abierto que se clonó en este estudio para el gen *CrGPDH3* fue de 2,200 pb en lugar de 2,049 pb como se reporta en la predicción *in silico*, además, la clonación de esta secuencia no genera un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína de *CrGPDH3*. Por el contrario, si no se tomara en cuenta esta observación existe la posibilidad de ocasionar algún cambio en la funcionalidad de la proteína. Adicionalmente,

en el alineamiento de la secuencia de aminoácidos del dominio GPDH de CrGPDH2 y CrGPDH3 se obtuvo un porcentaje de identidad del 95.8% entre ambas secuencias, y es probable que de los cuatro aminoácidos que no son similares, el aminoácido asparagina (Asn) en la posición 272 esté asociado a alguna diferencia en cuanto a la regulación de la proteína de CrGPDH2 y CrGPDH3, debido a que este aminoácido es idéntico entre CrGPDH2 y ScGPD1, pero se sustituye por un residuo de histidina (His) en CrGPDH3. Además, la Asn identificada en este estudio de CrGPDH2 corresponde con la Asn previamente identificada de HwGpd1B en el estudio de Lenassi *et al.* (2011), en donde se sugiere que este aminoácido podría ser responsable de la diferencia observada entre la actividad enzimática de las proteínas HwGpd1B y HwGpd1A de la levadura *H. werneckii*.

Por otro lado, la sobre expresión de genes *GPDH* en plantas y levaduras ha sido ampliamente estudiada en comparación con las microalgas, aun cuando estas últimas presentan un gran potencial para la acumulación de glicerol y TAGs. Recientemente, se observó que la sobre expresión del gen *GPDH* de la diatomea marina *P. tricornutum* incrementó 6.8 veces la concentración del glicerol y hasta en un 60% el contenido de lípidos en este microorganismo (Yao *et al.*, 2014). Debido a lo anterior, y con base en los resultados encontrados en el capítulo III, en el presente capítulo de investigación se obtuvo un plásmido para la transformación del núcleo de *C. reinhardtii* que contiene la secuencia del ADNc del gen *CrGPDH2*. Este plásmido fue denominado como pCrGPDH2c y cuenta con el promotor binario Hsp70A/RbcS2 el cual permite altos niveles de expresión así como una secuencia intrónica y el extremo 3' no traducible del gen de la Rubisco (*RbcS2*) permitiendo ambos el correcto procesamiento del transcrito. Este plásmido permitirá evaluar en futuras investigaciones el potencial de este gen en la síntesis de glicerol y TAGs en esta u otra microalga, similar al estudio realizado por Yao *et al.* (2014), lo cual permitiría su uso biotecnológico para la generación de materia prima para numerosos procesos industriales y la producción de biocombustibles.

2.5 CONCLUSIONES

1. El gen *CrGPDH1* de la microalga verde *C. reinhardtii* se comporta como un gen de tipo constitutivo, cuya expresión no está relacionada con la presencia de NaCl en el medio de cultivo.
2. Los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de la microalga verde *C. reinhardtii* se comportan como genes inducibles ante la presencia de NaCl en el medio de cultivo, incluso a una concentración tan baja como 5 mM y a una exposición tan corta como 5 min.
3. Se obtuvo el mapeo y la clonación del ADNc de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de *C. reinhardtii*, lo que reveló que la secuencia obtenida para cada uno de los genes presenta algunas variaciones con respecto a la predicción *in silico* reportada en la base de datos del Phytozome, principalmente en la predicción de las longitudes de los extremos 5' y 3' de ambos genes, y probablemente del inicio del marco de lectura abierto del gen *CrGPDH3*.
4. Se logró obtener, de manera experimental, la secuencia completa del ADNc de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de la microalga verde *C. reinhardtii*, y a partir de la secuencia del ADNc de *CrGPDH2* se obtuvo el vector de expresión constitutiva pCrGPDH2c diseñado para la transformación del núcleo de la microalga verde *C. reinhardtii*.

2.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler, L., A. Blomberg y A. Nilsson (1985). Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Bacteriology*, 162, 300-306.
- Albertyn, J., S. Hohmann, J.M. Thevelein y B.A. Prior (1994). *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 14 (6), 4135-4144.
- Ansell, R., K. Granath, S. Hohmann, J.M. Thevelein y L. Adler (1997). The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *The EMBO Journal*, 6 (9), 2179-218.
- Ben-Amotz A. y M. Avron (1983). Accumulation of metabolism by halotolerant algae and its industrial potencial. *Annual Review Microbiology*, 37, 95-119.
- Casais-Molina, M.L., S. Peraza-Echeverria, I. Echevarría-Machado y V.A. Herrera-Valencia (2015). Expression of *Chlamydomonas reinhardtii* *CrGPDH2* and *CrGPDH3* cDNAs in yeast reveals that they encode functional glycerol-3-phosphate dehydrogenases involved in glycerol production and osmotic stress tolerance. *Journal of Applied Phycology*, DOI 10.1007/s10811-015-0588-3.
- Contreras-Pool, P.Y. (2010). 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. 127 p.
- Dellaporta, S., J. Wood y J. Hicks (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1 (4), 19-21.
- Eriksson, P., L. Andre, R. Ansell, A. Blomberg y L. Adler (1995). Cloning and characterization of *GPD2*, a second gene encoding sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in *Saccharomyces cerevisiae*, and its comparison with *GPD1*. *Molecular Microbiology*, 17, 95–107.
- Gee, R., A. Coyal, R.U. Byerrum y N.E. Tolbert (1993). Two isoforms of dihydroxyacetone phosphate reductase from the chloroplasts of *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Physiology*, 103, 243–249.

-
- Ghoshal, D., D. Mach, M. Agarwal y A. Goyal (2002). Osmoregulatory isoform of dihydroxyacetone phosphate reductase from *Dunaliella tertiolecta*: Purification and characterization. *Protein Expression and Purification*, 24, 404–411.
- Gorman, D. S. y R.P. Levine (1965). Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 54, 1665-1669.
- He, Y., X. Meng, Q. Fan, X. Sun, Z. Xu y R. Song (2009). Cloning and characterization of two novel chloroplastic glycerol-3-phosphate dehydrogenases from *Dunaliella viridis*. *Plant Molecular Biology*, 71,193-205.
- He, Q.H., D.R. Qiao, L.H. Bai, Q.L. Zhang, W.G. Yang, Q. Li y Y. Cao (2007). Cloning and characterization of a plastidic glycerol 3-phosphate dehydrogenase cDNA from *Dunaliella salina*. *Journal of Plant Physiology*, 164, 214-220.
- Herrera-Valencia, V.A., P.Y. Contreras-Pool, S.J. López-Adrián, S. Peraza-Echeverría y L.F. Barahona-Pérez (2011). The green microalga *Chlorella saccharophila* as a suitable source of oil for biodiesel production. *Current Microbiology*, 63 (2), 151-157. DOI 10.1007/s00284-011-9956-7.
- Herrera-Valencia, V.A., L.A. Macario-González, M.L. Casais-Molina, A.G. Beltran-Aguilar y S. Peraza-Echeverría (2012). In silico cloning and characterization of the glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) gene family in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current Microbiology*, 64, 477-485. DOI 10.1007/s00284-012-0095-6.
- Hilario, E. y J. Mackay (2007). Protocols for nucleic acid analysis by nonradioactive probes, in: *Extraction of Plant RNA*, 2nd edición, *Methods in Molecular Biology*TM (ed.), Humana Press Inc. New Jersey. pp. 15-24.
- Husic, D. y N. Tolbert (1986). Effect of osmotic stress on carbon metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 82, 549-596.
- Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 44, 283–292.
- Kushner, D.J. y M. Kamekura (1988). Physiology of halophilic eubacteria, in *Halophilic Bacteria* (Vol. I), Rodriguez-Valera F. (ed.). Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 109–138.
-

- Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, y D.G. Higgins (2007). Clustal W and Clustal X Version 2.0. *Bioinformatics* 23, 21, 2947-2948.
- Lenassi, M., J. Zajc, C. Gostincar, A. Gorjan, N. Gunde-Cimerman y A. Plemenitas (2011). Adaptation of the glycerol-3-phosphate dehydrogenase Gpd1 to high salinities in the extremely halotolerant *Hortaea werneckii* and halophilic *Wallemia ichthyophaga*. *Fungal Biology*, 115, 959-970.
- León, R. y F. Galván (1994). Halotolerance studies on *Chlamydomonas reinhardtii*: glycerol excretion by free and immobilized cells. *Journal of Applied Phycology*, 6, 13-20.
- León, R.M. (1997). Estudios de halotolerancia en el alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*. Fotoproducción de glicerol por células libres e inmovilizadas. Tesis de doctorado. Universidad de Sevilla. Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular. España. 193 p.
- Macario-González, L. (2011). Caracterización molecular de genes que codifican para proteínas tipo glicerol-3-fosfato deshidrogenasa en la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 125 p.
- Mcmanus, J.F.A. y R. Mowry (1964). Special Methods for the constituents of cell and tissues en: *Staining Methods, Histologic and Histochemical*, Harper y Row, Nueva York, Evanston y Londres. John Weatherhill, Inc., Tokyo. pp 186.
- Mumberg, D., R. Müller y M. Funk (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene*, 156, 119-122.
- Pesole, G., F. Mignonea, C. Gissia, G. Grillob, F. Licciulib y S. Liuni (2001). Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. *Gene*, 276, 73-81.
- Qiagen (2001). The Bench Guide. Protocols, hints and tips for molecular biology labs. Disponible en <http://www.qiagen.com/literature/benchguide/default.aspx>. [Acceso 12 de diciembre 2011].
- Ralser, M., R. Querfurth, H.J. Warnatz, H. Lehrach, M.L. Yaspo y S. Krobitsch (2006). An efficient and economic enhancer mix for PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 347 (3), 747-751.

-
-
- Rao, R., C. Dayananda, R. Sarada, T.R. Shamala y G.A. Ravishankar (2007). Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource Technology*, 98, 560–564.
- Renz, A., J. Bauer, A.S. Nigel, R.M. Zrenner, P. Geingenberger y H. Vigeolas (2009). Methods for increasing oil content in plants, US 7, 579, 517 B2.
- Shen, Y., Y. Liu, L. Liu, C. Liang y Q.Q. Li (2008). Unique features of nuclear mRNA Poly(A) signals and alternative polyadenylation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, 179, 167–176.
- Siaut, M., S. Cuiné, 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, 2–15.
- Silflow, C.D., R.L. Chisholm, T.W. Conner y L.P. Ranum (1985). The two alpha-tubulin genes of *Chlamydomonas reinhardtii* code for slightly different proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 5 (9), 2389-2398.
- Sugase, Y., M. Hirono, K.L. Kindle y R. Kamiya (1996). Cloning and characterization of the actin-encoding gene of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene*, 168, 117-121.
- Takagi, M., Karseno y T. Yoshida (2006). Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *Journal of Bioscience Bioengineering*, 101, 223-226.
- Thomé, P.E. y R.K. Trench (1999). Osmoregulation and the Genetic Induction of Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase by NaCl in the Euryhaline Yeast *Debaryomyces hansenii*. *Marine Biotechnology*, 1, 230–238.
- Vigeolas, H., P. Waldeck, T. Zank y P. Geigenberger (2007). Increasing seed oil content in oil-seed rape (*Brassica napus L.*) by over-expression of a yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenase under the control of a seed-specific promoter. *Plant Biotechnology Journal*, 5, 431-441.
- Yao, Y., Y. Lu, K.T. Peng, T. Huang, Y. F. Niu, W.H. Xie, W.D. Yang, J.S. Liu y H.Y. Lie (2014). Glycerol and neutral lipid production in the oleaginous marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* promoted by overexpression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Biotechnology for Biofuels*, 7, 110-118.
-

CAPÍTULO III. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS GENES CrGPDH2 Y CrGPDH3 DE LA MICROALGA VERDE *C. reinhardtii*¹

3.1 INTRODUCCIÓN

En lo que respecta al estrés osmótico, *S. cerevisiae* ha sido por mucho tiempo el modelo de levadura más estudiado, a pesar de su baja tolerancia a la salinidad (Hohmann, 2002). La enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) desempeña un papel muy importante en la adaptación al estrés osmótico en la levadura *S. cerevisiae*, y se ha observado que su respuesta al estrés osmótico se da a través de la síntesis de glicerol (Hirayama *et al.*, 1995). En *S. cerevisiae* los genes *gpd1* y *gpd2*, que se inducen bajo condiciones de estrés osmótico y por anaerobiosis, respectivamente, codifican para enzimas GPDH involucradas en el primer paso de la ruta de producción del glicerol (Ansell *et al.*, 1997; Albertyn *et al.*, 1994; Eriksson *et al.*, 1995). El glicerol se forma a partir de la reducción de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a glicerol-3-fosfato (G3P) por la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH), usando NADH como donador de electrones, seguida de la desfosforilación por la enzima glicerol-3-fosfato fosfatasa (GPP). Cabe señalar que el G3P es el componente limitante para la formación tanto de glicerol como de triacilglicéridos (TAGs) en plantas (Renz *et al.*, 2009). El ciclo del glicerol finaliza con la degradación o asimilación del mismo, en donde, el glicerol es oxidado a dihidroxiacetona (DHA) por la enzima glicerol deshidrogenasa (GDH) usando NADP⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada) como aceptor de electrones, seguido de la fosforilación por la dihidroxiacetona cinasa (DHAK) para formar DHAP (León, 1997).

A través de los años, los estudios realizados en levaduras han demostrado que la información obtenida de sus genes puede ser transferida y aplicada a otros microorganismos, plantas y eucariotas superiores (Oren, 2003). Uno de los métodos más utilizados para caracterizar la función de un gen es el empleo de una mutante en donde el gen de interés ha sido interrumpido con una secuencia foránea. La interrupción completa de uno o más genes permite determinar la función del mismo mediante un estudio de

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

¹Casais-Molina, M.L., S. Peraza-Echeverría, I. Echevarría-Machado y V.A. Herrera-Valencia (2015). Expression of *Chlamydomonas reinhardtii* CrGPDH2 and CrGPDH3 cDNAs in yeast reveals that they encode functional glycerol-3-phosphate dehydrogenases involved in glycerol production and osmotic stress tolerance. Journal of Applied Phycology, DOI 10.1007/s10811-015-0588-3.

complementación genética, como por ejemplo el estudio realizado por Lee *et al.* (2008) en donde la expresión heteróloga de un gen *GPDH* de *C. magnolia* (*CmGPD1*) en la doble mutante *gpd1 gpd2* de *S. cerevisiae*, deficiente en la síntesis de glicerol y susceptible a la salinidad, demostró que el gen *CmGPD1* codifica para una enzima con función de *GPDH*. Por su parte, en algunas microalgas, como *D. salina* y *D. viridis*, se han identificado genes *GPDH* asociados a la síntesis de glicerol en condiciones de estrés osmótico (He *et al.*, 2007; 2009). Además, se ha visto que en condiciones de estrés salino algunas microalgas como *B. braunii*, *D. tertiolecta*, *C. saccharophila* y *C. reinhardtii*, aumentan la acumulación de lípidos (Takagi *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2007; Contreras-Pool, 2010; Herrera-Valencia *et al.*, 2011). Por su parte, la microalga *C. reinhardtii* ha demostrado su capacidad de acumular y secretar glicerol, así como de acumular TAGs en respuesta a estrés osmótico (León y Galván, 1994; Siaut *et al.*, 2011).

Hasta donde se sabe, no se ha caracterizado la función de algún gen que codifique para una enzima *GPDH* en *C. reinhardtii*, aunque se ha purificado una enzima *GPDH* (Klöck y Kreuzberg, 1989). Recientemente se reportó la existencia de tres genes homólogos a *GPDH*: *CrGPDH1*, *CrGPDH2* y *CrGPDH3* (Macario-González, 2011; Herrera-Valencia *et al.*, 2012), y se reportó que la expresión de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* fue inducida en respuesta a condiciones de estrés osmótico con 200 mM de NaCl por 2 h (Macario-González, 2011). Debido a lo anterior se sugirió que ambos genes podrían codificar para enzimas con actividad de *GPDH* involucradas en la síntesis de glicerol y posiblemente de TAGs en esta microalga. Para corroborarlo es necesario determinar si las proteínas para las cuales codifican los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* presentan actividad de *GPDH*, es decir, que las proteínas de ambos genes sean capaces de catalizar la conversión de DHAP a G3P, en presencia de NADH. De igual forma, es necesario demostrar que la expresión de estos genes está asociada a la síntesis de glicerol y tolerancia al estrés osmótico.

Con base en lo anterior, el objetivo de este capítulo de investigación fue analizar la función de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de la microalga verde *C. reinhardtii* mediante un ensayo enzimático y el estudio de complementación genética utilizando a la doble mutante *gpd1 gpd2* de la cepa de *S. cerevisiae*, deficiente en la síntesis de glicerol y susceptible al estrés osmótico. Los resultados de este estudio están encaminados a contribuir al conocimiento de la relación de estos genes *CrGPDH* con la síntesis de glicerol y lípidos.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Estrategia experimental

La estrategia experimental que se llevó a cabo en este capítulo se resume en la Figura 3.1.

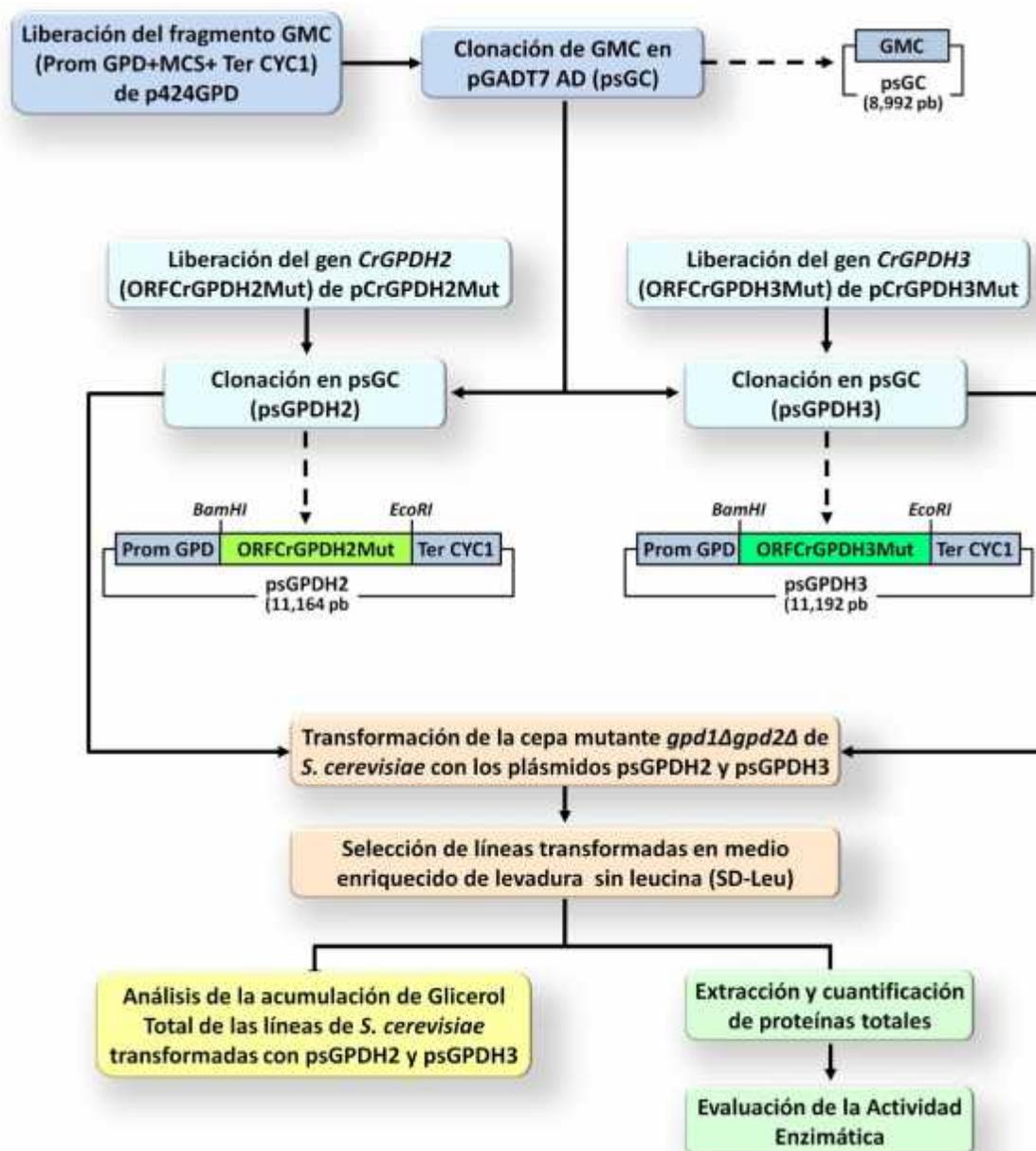


Figura 3.1. Esquema experimental general para la caracterización funcional de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de la microalga verde *C. reinhardtii*. GMC = Región que incluye desde el promotor del gen *GPD* hasta la región 3' UTR del gen *CYC1* contenida en el vector p424GPD; Prom GPD = Promotor del gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; Ter CYC1: 3' UTR del gen *CYC1* (citocromo C-1); MCS = sitio de clonación múltiple.

3.2.2 Cepa y cultivo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

La cepa *W303-1A* y la mutante *gpd1 gpd2* de *S. cerevisiae* (MAT GPD1::TRP1 GPD2 ::URA3, derivada de la cepa *W303-1A*) fueron donadas amablemente por el Dr. Peter Dahl de la Universidad de Gothenburg (Gothenburg University, Germany) (Ansell *et al.*, 1997). La cepa *gpd1 gpd2* es mutante para los genes *GPD1* y *GPD2* de *S. cerevisiae*, asociados a la síntesis de glicerol; debido a lo anterior, esta cepa es deficiente en la síntesis de glicerol y susceptible al estrés osmótico (Ansell *et al.*, 1997; Albertyn *et al.*, 1994). Por tanto, se utilizó a la cepa mutante *gpd1 gpd2* para el estudio de complementación con los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de *C. reinhardtii* como se describe posteriormente.

Las cepas de *S. cerevisiae* fueron cultivadas en 5 mL de medio líquido YPD (extracto de levadura de peptona y dextrosa, por sus siglas en inglés yeast peptone dextrose), marca Sigma, en un tubo con extremo cónico de 50 mL (marca Falcon), y se incubaron durante 24 h a una temperatura de 30 ± 2 °C con agitación constante a 225 rpm. Para el cultivo semisólido se utilizó medio YPD sólido (Sigma).

3.2.3 Obtención de los plásmidos de transformación psGPDH2 y psGPDH3

3.2.3.1 Clonación del fragmento GMC en el vector pGADT7 AD

La región que comprende del promotor del gen GPD (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) a la región 3' no traducible del gen *CYC1* (citocromo C-1) contenida en el vector p424GPD (Mumberg *et al.*, 1995) fue denominada arbitrariamente GMC. El fragmento GMC fue clonado en el vector pGADT7 AD (Clontech) entre los sitios de restricción *SacI* y *KpnI*. La reacción de digestión para el vector pGADT7 AD y el plásmido p424GPD que contiene al fragmento GMC constó de: plásmido 1 µg, amortiguador 1 10X (1X), BSA 100X (1X), *SacI* 10 U/µL (10U), *KpnI* 20 U/µL (10 U) en un volumen final de 50 µL. Se incubó a 37 °C durante 2 h y después se inactivo a 65 °C durante 20 min. El vector pGADT7 AD y el inserto GMC fueron digeridos y posteriormente separados por electroforesis con un gel de agarosa al 1.2%. Las bandas de ~7,987 (pGADT7 AD) y ~1,005 pb (GMC) fueron escindidas del gel con un bisturí y purificadas con el Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). La ligación de los fragmentos purificados se llevó a cabo usando la siguiente reacción: 7 µL de vector, 10 µL de inserto, Amortiguador T4-DNA ligasa 10X (1X) y T4-DNA ligasa 20 U/µL (20U) en

un volumen final de 20 μL . La ligación se dejó incubando a 16 $^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche y después se inactivó a 65 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 min. Se realizó la transformación de células competentes de *E. coli* DH10B siguiendo el protocolo de pGEM®-T-easy (Promega). Las células transformadas fueron plaqueadas en platos de Petri con medio de selección LB sólido adicionado con ampicilina (10 mg/mL) y se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche. Las colonias blancas se picaron y se propagaron en medio de selección LB líquido adicionado con ampicilina (10 mg/mL). El plásmido fue purificado por medio del Kit comercial High Pure Plasmid Isolation (Roche) y se verificó su integridad mediante una digestión con las enzimas de restricción *SacI* y *KpnI* de la misma manera descrita anteriormente. El plásmido generado en este paso fue nombrado psGC.

3.2.3.2 Clonación del ADNc de los genes CrGPDH2 y CrGPDH3 en el vector psGC

Los fragmentos correspondientes al marco de lectura abierto de los genes *CrGPDH2* (ORFCrGPDH2) y *CrGPDH3* (ORFCrGPDH3), obtenidos en el capítulo II y contenidos en los plásmidos pCrGPDH2Mut y pCrGPDH3Mut, respectivamente, fueron subclonados en el vector psGC entre los sitios de restricción *EcoRI* y *BamHI*. La reacción de digestión para el vector psGC y los plásmidos pCrGPDH2Mut y pCrGPDH3Mut constó de lo siguiente: plásmido 1 μg , amortiguador 3 10X (1X), BSA 100X (1X), *EcoRI* 20 U/ μL (10U) y *BamHI* 20 U/ μL (10 U) en un volumen final de 50 μL . Se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 h y posteriormente se inactivó a 65 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 min. El vector psGC y los insertos ORFCrGPDH2 y ORFCrGPDH3 fueron digeridos y posteriormente separados por electroforesis con un gel de agarosa al 0.7%. Las bandas de ~8,992 (psGC), ~2,172 (ORFCrGPDH2) y ~2,200 pb (ORFCrGPDH3) fueron escindidas del gel con un bisturí y purificadas con el Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). La ligación de los fragmentos purificados se llevó a cabo usando la siguiente reacción: 7 μL de vector, 10 μL de inserto, amortiguador T4-DNA ligasa 10X (1X) y T4-DNA ligasa 20 U/ μL (20U) en un volumen final de 20 μL . La ligación se dejó incubando a 16 $^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche y después se inactivó a 65 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 min. Se realizó la transformación de células competentes de *E. coli* DH10B siguiendo el protocolo de pGEM®-T-easy (Promega). Las células transformadas fueron plaqueadas en platos de Petri con medio de selección LB sólido adicionado con ampicilina (10 mg/mL) y se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche. Las colonias blancas se picaron y se propagaron en medio de selección LB líquido adicionado con ampicilina (10 mg/mL). El plásmido fue purificado por

medio del kit comercial High Pure Plasmid Isolation (Roche) y se verificó su integridad mediante una digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* de la misma manera descrita anteriormente. Los plásmidos generados en esta etapa se nombraron psGPDH2 y psGPDH3, los cuales corresponden a los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3*, respectivamente.

3.2.4 Transformación de la cepa mutante *gpd1 gpd2* de *S. cerevisiae* con los plásmidos psGPDH2 y psGPDH3

Las células de la cepa mutante *gpd1 gpd2* de *S. cerevisiae* fueron transformadas mediante polietilglicol (PEG) con el vector psGPDH2, psGPDH3 ó con ambos vectores (psGPDH2-3) siguiendo las indicaciones del protocolo de Yeastmaker™ Yeast Transformation (Clontech). Las líneas transformadas fueron cultivadas en medio SD-Leu (medio mínimo sin leucina) (Clontech) para su selección a 30 °C.

3.2.5 Extracción de proteínas totales

Para llevar a cabo la extracción de proteínas totales, se recolectaron 30 mL del cultivo de levadura contenido en un matraz de 250 mL de volumen estéril con una $DO_{610} = 1-1.5$ (Ansell *et al.*, 1997). Las células de la cepa parental *W303-1A* fueron cultivadas hasta alcanzar una DO_{610} de 0.6 y después fueron tratadas a 200 mM de NaCl durante 4 h para inducir la expresión del gen *gpd1*. Una vez alcanzada la DO_{610} deseada, las células fueron recolectadas en un tubo de centrifuga tipo Eppendorf a 3,300 *g* por 3 min a 4 °C, y lavadas dos veces con 1 mL del amortiguador de trietanolamina frío (Sigma) para después congelarlas en nitrógeno líquido. Cada muestra fue homogeneizada durante 1 min en 1.5 mL del amortiguador de extracción [amortiguador de trietanolamina frío (20 mM, Sigma) y ditioneitol ó DTT (1 mM, pH 7.5)] suplementado con β -mercaptoetanol (2 mM), y 0.5 μ L de una mezcla de inhibidores de proteasa (Sigma) por cada mL de amortiguador de extracción, usando el Ultra Turrax T25 Polytron (Janke & Kunkel). Después, las células fueron lisadas a 4 °C cada 30 s durante 5 s un tiempo total de 25 s usando el XL-2000 Sonicator 3000 (Misonix, USA). Transcurrido ese tiempo, se procedió a centrifugar durante 30 min a 12,000 rpm a 4 °C. El sobrenadante se recuperó y se almacenó en hielo para trabajar con él de forma inmediata, o a -80 °C si las muestras serían utilizadas posteriormente.

3.2.6 Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo de acuerdo al método de Bradford (1976), utilizando el protein assay dye reagent concentrate (Bio-Rad, cat. 500-0006). Se tomaron 5 μL de cada extracto y se llevarán a un volumen de 800 μL con H_2O destilada desionizada, posteriormente se le adicionaron 200 μL del reactivo de Bradford y se dejará 10 min en reposo para permitir el desarrollo de la coloración. Una vez que el colorante entre en contacto con la muestra, sólo se tiene una hora para realizar la lectura. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro de luz visible de la marca BioRad. La curva de calibración que se utilizó fue de un rango de 0 a 10 mg mL^{-1} de albumina sérica bovina (BSA).

3.2.7 SDS-PAGE

Las proteínas fueron visualizadas por medio de la técnica conocida como “sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis” (SDS-PAGE) en un gel de poliacrilamida al 10%, y la electroforesis se realizó a 100 V. Se cargaron aproximadamente 10, 20 o 30 μg de proteína de cada muestra. El gel fue teñido utilizando el protocolo de tinción con plata del estuche Silver Stain Kit (BioRad).

3.2.8 Evaluación de la actividad enzimática

La evaluación de la actividad de GPDH se llevó a cabo siguiendo el protocolo basado en la metodología descrita por Vigeolas *et al.*, (2007) con algunas modificaciones. La mezcla de reacción estuvo constituida por amortiguador HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico) (50 mM), DHAP (1 mM), NADH (0.2 mM) y diferentes cantidades del extracto proteico (20, 40, 60 y 80 μg) en un volumen final de 2 mL. La reacción enzimática se realizó a 30 °C y se inició añadiendo el extracto proteico. La disminución de NADH se monitoreó midiendo el cambio en la absorbancia a 340 nm durante 20 min utilizando un espectrofotómetro (modelo DU 650, Beckman Coulter, Inc., USA). Una unidad (U) de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que reduce 1 μmol de NADH por min, calculada utilizando un coeficiente de extinción para NADH de 6.22 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Galafassi *et al.*, 2013). La actividad específica fue calculada como unidades por miligramo

de proteína ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína). La actividad fue calculada a partir de la velocidad inicial durante el periodo inicial de la reacción.

3.2.9 Determinación de glicerol total

La doble mutante *gpd1 gpd2* de *S. cerevisiae* es una cepa deficiente en la síntesis de glicerol y susceptible al estrés osmótico. Por lo tanto, fue usada para el estudio de complementación genética como se describió previamente por Lee *et al.* (2008) y Lenassi *et al.* (2011). Para la medición del contenido de glicerol total, las células de levadura fueron cultivadas en medio YPD ($\text{DO}_{610} = 0.6$), colectadas por centrifugación a 1000 g durante 5 min y resuspendidas en medio YPD suplementado con 200 mM de NaCl. Las células fueron colectadas después de 4 o 12 h de incubación a 30 °C y con agitación a 250 rpm. El contenido de glicerol total fue determinado siguiendo la metodología descrita por Watanabe *et al.* (2004) (anexo H) utilizando el reactivo libre de glicerol (Sigma-Aldrich) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La reproducibilidad fue confirmada por medio de tres experimentos independientes. Para los ensayos de tolerancia a NaCl, las células de levadura fueron cultivadas en medio YPD (Lee *et al.*, 2008) hasta alcanzar una DO_{610} de 0.6, y después se adicionaron 20 μL de cada dilución serial (1:10) del cultivo de levadura sobre medio sólido YPD suplementado con la concentración indicada de NaCl. Las cajas fueron incubadas durante 4 días a 30 °C. La reproducibilidad fue confirmada por medio de dos experimentos independientes.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Obtención de los plásmidos de transformación psGPDH2 y psGPDH3

3.3.1.1 Clonación del fragmento GMC en el vector pGADT7 AD

La clonación de la región que comprende del promotor del gen GPD (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) a la región 3' no traducible del gen CYC1 (citocromo C-1) contenida en el vector p424GPD y denominada arbitrariamente GMC, se realizó entre los sitios de restricción *SacI* y *KpnI* del vector pGADT7 AD. Para ello, se linearizaron el vector y el inserto y se verificó su integridad mediante una electroforesis.

La relación vector:inserto de los fragmentos linearizados y purificados del vector pGADT7 AD (~7,987 pb) y el inserto GMC (~1,005 pb) se presenta en la Figura 3.2a. La ligación de los fragmentos purificados y posterior clonación del inserto GMC en el vector pGADT7 AD dio lugar al plásmido psGC. El resultado de esta clonación fue verificado mediante una digestión con las enzimas de restricción *SacI* y *KpnI*. Todas las clonas analizadas fueron positivas a la presencia del inserto GMC como se puede verificar en la Figura 3.2b.

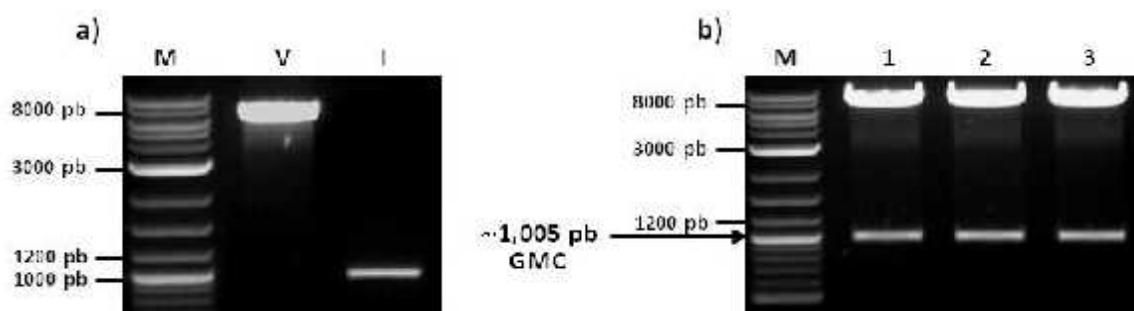


Figura 3.2. Clonación del fragmento GMC en el plásmido pGADT7: a) Relación vector:inserto (pGADT7 AD:GMC) y b) Verificación de la integridad del vector psGC. Digestión del plásmido psGC con las enzimas *SacI* y *KpnI* (NEB). V: vector pGADT7 AD (~7,987 pb); I: inserto GMC (~1,005 pb); M: Marcador de peso molecular 2-log (NEB); 1-3: clonas analizadas.

Al plásmido generado se le nombró como psGC (Figura 3.3).

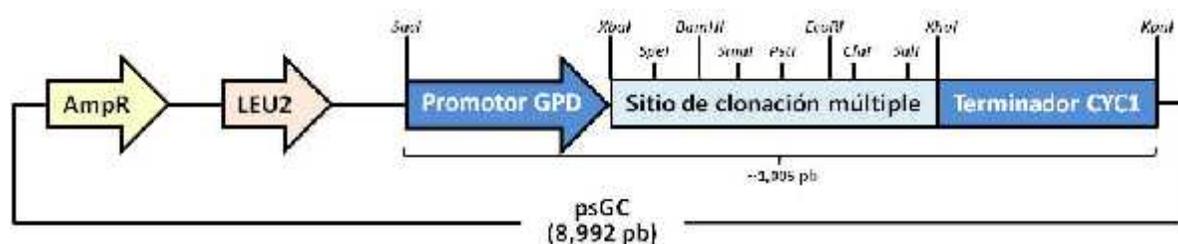


Figura 3.3. Diagrama del vector psGC para la transformación de la cepa mutante *gpd1 gpd2* de la levadura *S. cerevisiae*.

3.3.1.2 Clonación del ADNc de CrGPDH2 y CrGPDH3 en el vector psGC

La clonación del marco de lectura abierto de los genes *CrGDPH2* (ORFCrGPDH2Mut) y *CrGDPH3* (ORFCrGPDH3Mut) se realizó entre los sitios de restricción *BamHI* y *EcoRI* del

vector psGC. Para ello se linearizaron el vector y el inserto y se verificó su integridad mediante una electroforesis. La relación vector:inserto de los fragmentos linearizados y purificados del vector psGC (~8,992 pb) y del inserto ORFCrGPDH2Mut (~2,172 pb) o ORFCrGPDH3Mut (~2,200 pb) se presenta en las Figuras 3.4a y 3.5a. La ligación de los fragmentos purificados y posterior clonación del inserto ORFCrGPDH2Mut o ORFCrGPDH3Mut en el vector psGC dió lugar a los plásmidos psGPDH2 y psGPDH3, respectivamente. El resultado de esta clonación fue verificado mediante una digestión con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI. Todas las clonas analizadas fueron positivas a la presencia del inserto como se puede verificar en las Figuras 3.4b y 3.5b. A los plásmidos generados se le nombró como psGPDH2 y psGPDH3 (Figuras 3.6a y 3.6b).

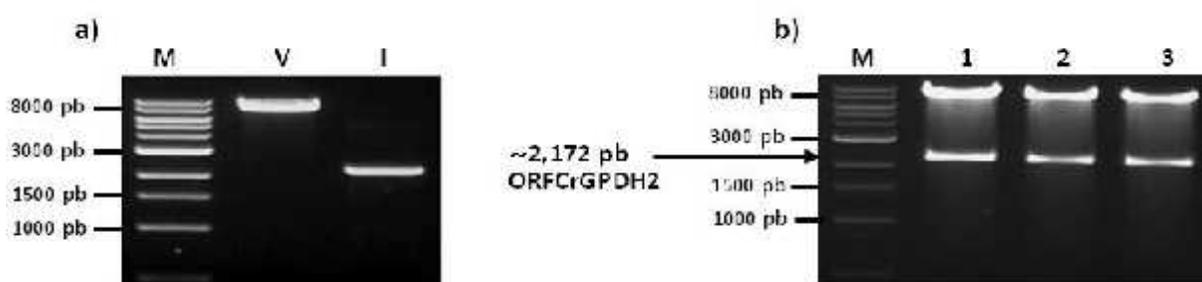


Figura 3.4. Clonación del ADNC del gen *CrGPDH2* en el plásmido psGC: a) Relación vector:inserto (psGC:ORFCrGPDH2Mut) y b) Verificación de la integridad del vector psGPDH2. Digestión del plásmido psGPDH2 con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI (NEB). V: vector psGC (~8,992 pb); I: inserto ORFCrGPDH2Mut (~2,172 pb); M: Marcador de peso molecular 1 Kb (NEB); 1-3: clonas analizadas.

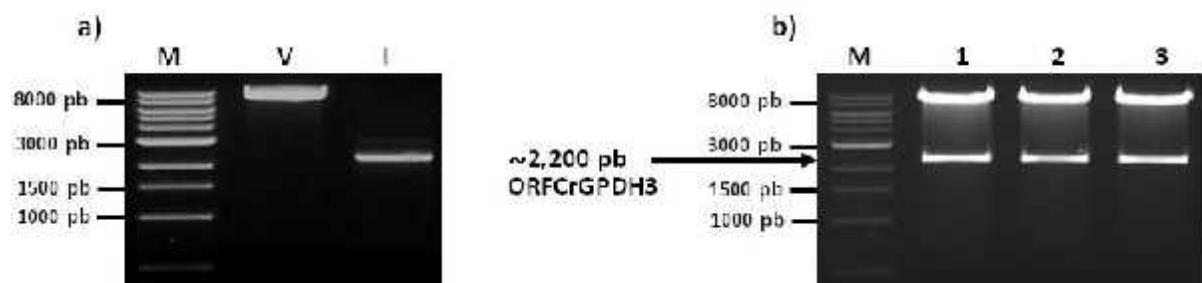


Figura 3.5. Clonación del ADNC del gen *CrGPDH3* en el plásmido psGC: a) Relación vector:inserto (psGC:ORFCrGPDH3Mut) y b) Verificación de la integridad del vector psGPDH3. Digestión del plásmido psGPDH3 con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI (NEB). V: vector psGC (~8,992 pb); I: inserto ORFCrGPDH3Mut (~2,200 pb); M: Marcador de peso molecular 1 Kb (NEB); 1-3: clonas analizadas.

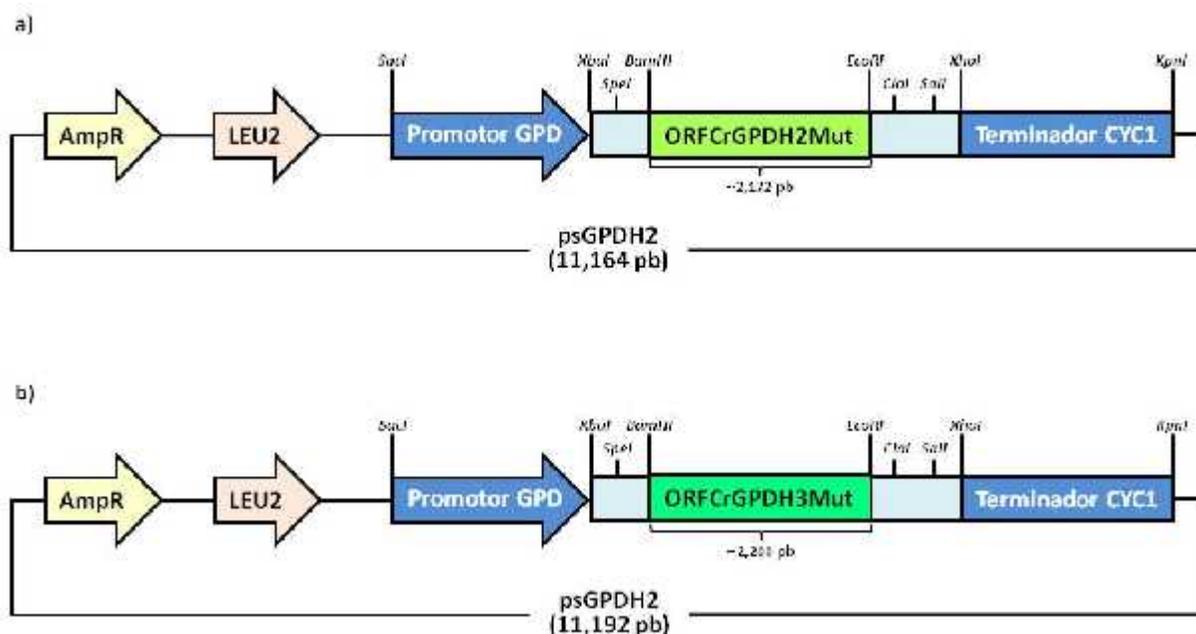


Figura 3.6. Diagrama de los vectores para la transformación de la cepa mutante *gpd1 gpd2* de la levadura *S. cerevisiae*: a) psGPDH2 y b) psGPDH3.

3.3.2 Transformación de la cepa mutante *gpd1 gpd2* de *S. cerevisiae* con los plásmidos psGPDH2 y psGPDH3

Las células de la mutante *gpd1 gpd2* de *S. cerevisiae* fueron transformadas con el plásmido vacío psGC o con el plásmido que contiene el ADNc de *CrGPDH2* (psGPDH2), *CrGPDH3* (psGPDH3) o ambos (psGPDH2-3). Todos los plásmidos contienen al gen LEU2 (leucina) para la selección de las células de las líneas transformadas de *S. cerevisiae* a partir de medio sólido SD-Leu (medio mínimo sin leucina).

El resultado de la transformación se presenta en la Figura 3.7. La presencia de colonias blancas en las cajas indica que se obtuvieron líneas transformadas con los plásmidos de interés. Así mismo, se puede observar que los controles de la transformación funcionaron adecuadamente, observándose únicamente crecimiento en las células sin transformar de la mutante *gpd1 gpd2* de *S. cerevisiae* cultivada en medio sólido YPD. Las colonias blancas obtenidas de la transformación fueron lavadas y recuperadas en 50 mL de medio líquido YPD y se dejaron incubando a 30 °C con agitación a 200 rpm hasta alcanzar un DO₆₁₀ entre 1-1.2. Estos cultivos fueron conservados en glicerol al 50% y cultivados nuevamente en

medio sólido SD-Leu. Las colonias transformadas obtenidas en este apartado fueron utilizadas para el análisis de la actividad enzimática y la determinación del glicerol total que se mencionan posteriormente.

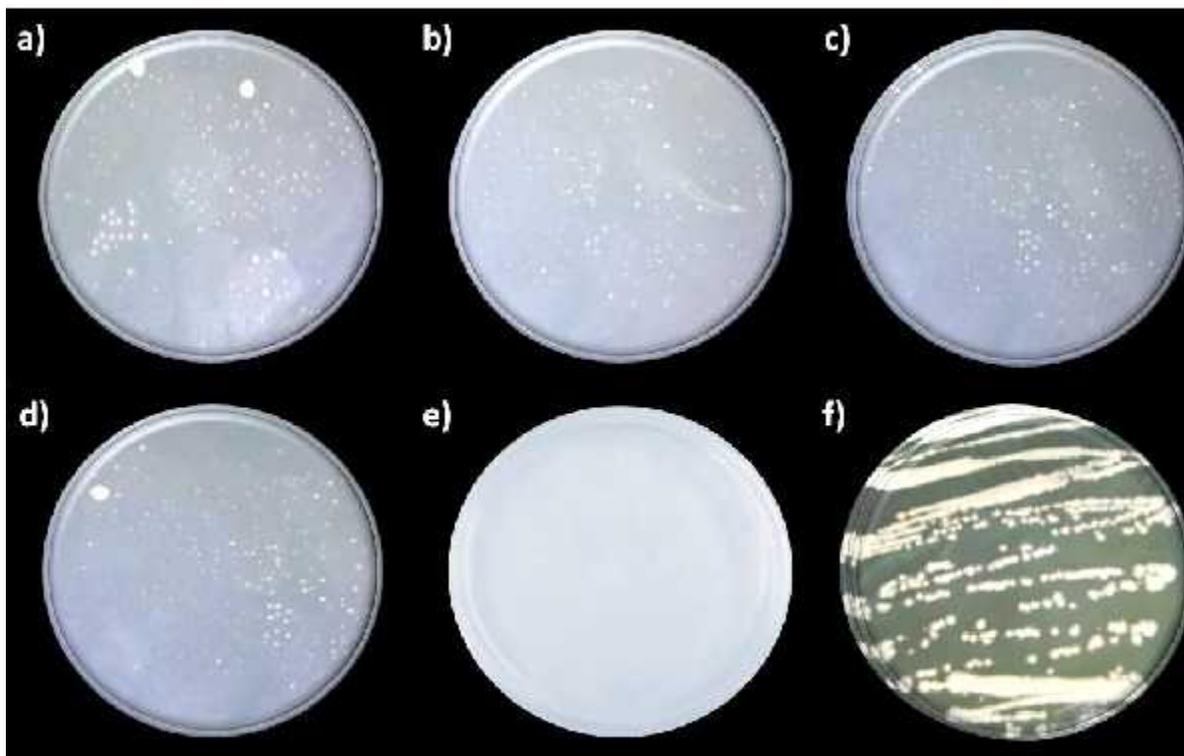


Figura 3.7. Resultado de la transformación mediante PEG de la mutante *gpd1 gpd2* de *S. cerevisiae* con los plásmidos correspondientes: a) psGPDH2, b) psGPDH3, c) psGPDH2-3 y d) psGC, e) control negativo (células de *gpd1 gpd2* cultivadas en medio SD-Leu) y f) control positivo (células de *gpd1 gpd2* cultivadas en medio YPD).

3.3.3 Perfil electroforético de las proteínas obtenidas de las células de la mutante *gpd1 gpd2* de *S. cerevisiae* transformada con psGPDH2, psGPDH3 ó psGPDH2-3

Con respecto al perfil de proteínas, no se encontraron diferencias entre los diferentes extractos proteicos obtenidos de los cultivos de las líneas de *S. cerevisiae* transformadas con psGPDH2, psGPDH3 y psGPDH2-3 (Figura 3.8). En cuanto a la cuantificación de proteínas totales se utilizó una curva de regresión lineal con una R^2 de 0.99.

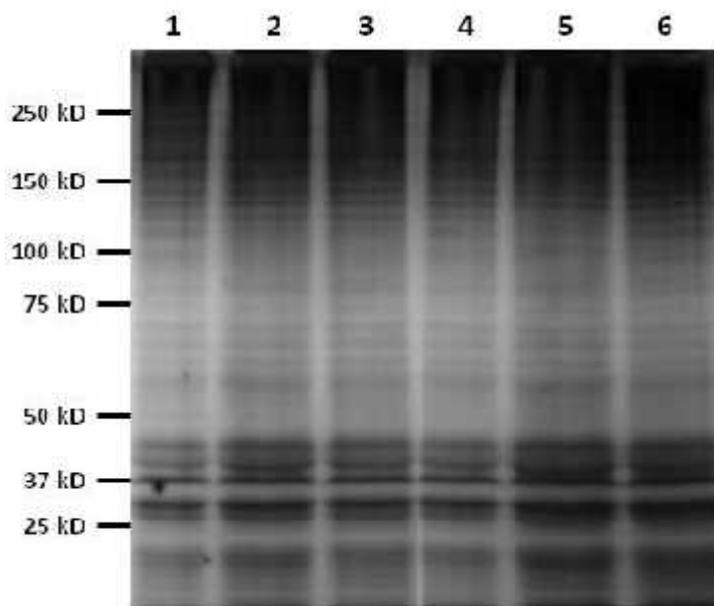


Figura 3.8. Perfil electroforético de proteínas de cultivos de la levadura *S. cerevisiae* cultivados en medio YPD de la cepa: 1) *W303-1A*, 2) Mutante *gpd1 gpd2*, 3) Mutante transformada con psGC, 4) Mutante transformada con psGPDH2, 5) Mutante transformada con psGPDH3 y 6) Mutante transformada con psGPDH2-3. En cada carril se depositaron ~20 μg de extracto proteico.

3.3.4 Evaluación de la actividad de GPDH de las enzimas CrGPDH2 y CrGPDH3 de *C. reinhardtii* mediante cultivos de levadura

Los extractos proteicos utilizados para los ensayos de la actividad enzimática fueron obtenidos a partir de cultivos de la doble mutante de levadura *gpd1 gpd2* transformados con el plásmido vacío (psGC) o con los plásmidos que contienen el ADNc de *CrGPDH2* (psGPDH2), *CrGPDH3* (psGPDH3) o ambos (psGPDH2-3). En la Figura 3.9 se puede observar que tanto CrGPDH2 como CrGPDH3 tienen actividad de GPDH. La actividad específica de GPDH más alta, como era de esperarse para el control positivo, fue la de la cepa parental *W303-1A* (aproximadamente $48 \text{ mU}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína), mientras que como también era de esperarse, la más baja fue la de la cepa *gpd1 gpd2* transformada con el plásmido vacío psGC ($8 \text{ mU}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína). La actividad específica de GPDH en la doble mutante *gpd1 gpd2* transformada ya sea con psGPDH2, psGPDH3 o psGPDH2-3 fue de aproximadamente 26, 15 y 31 $\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína, respectivamente. Estas actividades fueron significativamente más altas que en la cepa de la doble mutante transformada sólo con el plásmido vacío psGC, lo cual indica que las actividades específicas de GPDH obtenidas son

el resultado de la expresión heteróloga del ADNc de los genes *CrGPDH2* y/o *CrGPDH3* de *C. reinhardtii* en la mutante *gpd1 gpd2* y se confirma que el ADNc tanto de *CrGPDH2* como de *CrGPDH3* codifica para enzimas con actividad de GPDH.

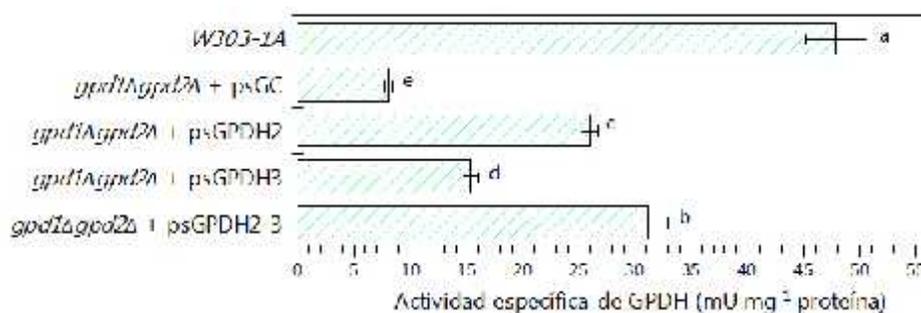


Figura 3.9. Incremento en la actividad de GPDH en la doble mutante *gpd1 gpd2* de la levadura *S. cerevisiae* transformada con el ADNc de *CrGPDH2* y *CrGPDH3*. La actividad de GPDH fue determinada en la doble mutante de levadura *gpd1 gpd2* transformada con el plásmido que contiene a *CrGPDH2* (psGPDH2), *CrGPDH3* (psGPDH3) o con ambos plásmidos (psGPDH2-3). La cepa parental W303-1A y la doble mutante transformada con el plásmido vacío (psGC) fueron incluidos como controles. Los datos son las medias (\pm SD) de tres experimentos independientes, cada uno llevado a cabo por duplicado. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza).

3.3.5 Función de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* en la producción de glicerol y la tolerancia al estrés osmótico

Para el análisis de la función de *CrGPDH2* y *CrGPDH3* en la producción de glicerol y tolerancia al estrés osmótico se introdujo el ADNc de *CrGPDH2*, *CrGPDH3* ó ambos ADNcs en la doble mutante *gpd1 gpd2* de la levadura *S. cerevisiae*. Como se observa en la Figura 3.10, la producción de glicerol se restauró en la cepa mutante transformada que contenía a *CrGPDH2*, la cual fue muy similar a la cepa parental W303-1A después de 12 h bajo tratamiento con NaCl (Figura 3.10b). La acumulación de glicerol en la cepa mutante transformada con ambas secuencias, *CrGPDH2* y *CrGPDH3*, fue similar a aquella que contenía sólo a *CrGPDH2* (Figura 3.10b). La cepa mutante transformada con *CrGPDH3* mostró un aumento significativo en su producción de glicerol con respecto a aquellas transformadas con el plásmido vacío psGC, que como era de esperarse produjeron muy poco glicerol; sin embargo, la cantidad de glicerol fue significativamente menor que la producida por las células transformadas con psGPDH2 ó psGPDH2-3 (Figura 3.10b).

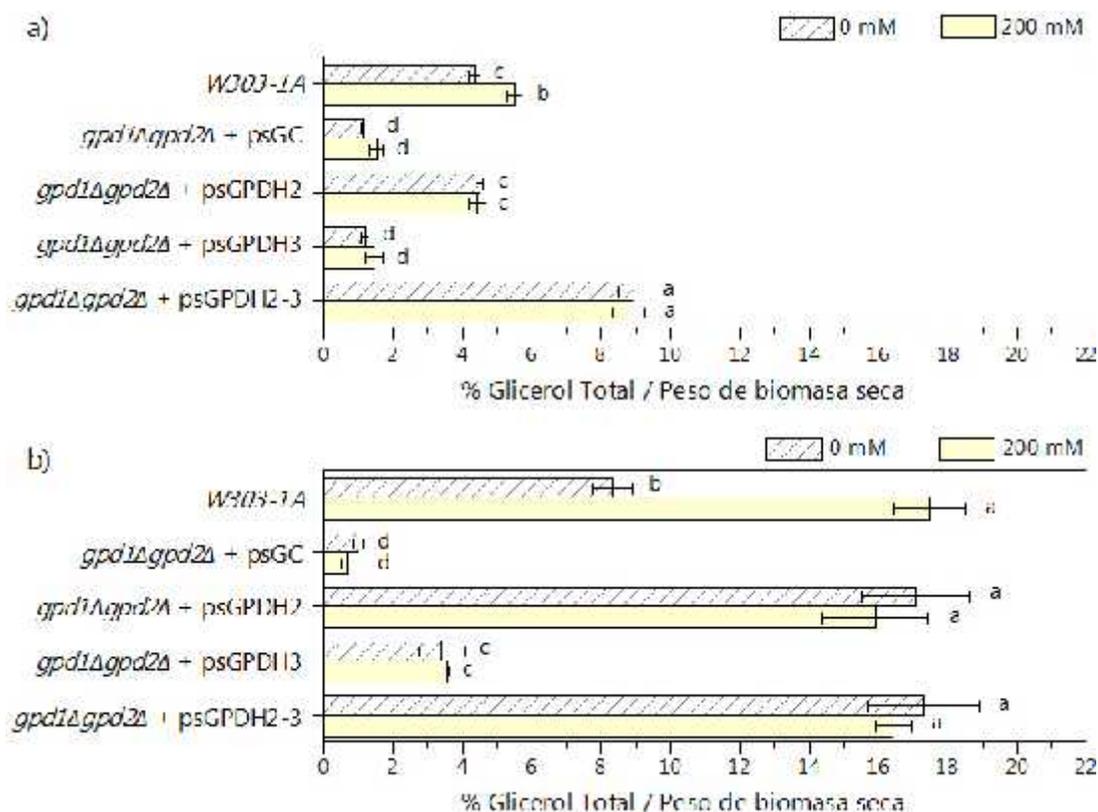


Figura 3.10. Complementación funcional de la doble mutante *gpd1 gpd2* de *S. cerevisiae* con el ADNc de *CrGPDH2* y *CrGPDH3*. El contenido de glicerol fue determinado en la doble mutante de levadura *gpd1 gpd2* transformada con el plásmido que contiene a *CrGPDH2* (psGPDH2), *CrGPDH3* (psGPDH3) o con ambos plásmidos (psGPDH2-3). La cepa parental W303-1A y la doble mutante transformada con el plásmido vacío (psGC) fueron incluidos como controles. El glicerol total fue cuantificado en cultivos incubados en medio YPD sin NaCl o después del tratamiento a 200 mM de NaCl por a) 4 h y b) 12 h. Los datos son las medias (\pm SD) de tres experimentos independientes. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las medias (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza).

Tanto *CrGPDH2* como *CrGPDH3* fueron capaces de restaurar la tolerancia a NaCl en la cepa mutante *gpd1 gpd2* de *S. cerevisiae* susceptible a estrés salino, aunque *CrGPDH2* confirió mayor tolerancia que *CrGPDH3* (Figura 3.11). Las cepas transformadas que contenían a *CrGPDH2* fueron capaces de crecer en cajas en medio con una concentración de 500 mM de NaCl y se observó algo de crecimiento celular a 800 mM de NaCl cuando el cultivo no se encontraba diluído. Por su parte, las cepas transformadas que contenían sólo a *CrGPDH3* presentaron un menor crecimiento celular a la concentración de 500 mM de NaCl, y fueron incapaces de crecer en el medio a la concentración de 800 mM de NaCl. Las cepas transformadas que contenían tanto a *CrGPDH2* como a *CrGPDH3* mostraron un crecimiento

celular similar a las transformadas que sólo contenían a *CrGPDH2*. Estos resultados demuestran que *CrGPDH2* y *CrGPDH3* están involucrados en la síntesis de glicerol y tolerancia al estrés osmótico.



Figura 3.11. Incremento en la tolerancia al estrés osmótico de la doble mutante *gpd1 gpd2* de *S. cerevisiae* transformada con el ADNc de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3*. La doble mutante de levadura *gpd1gpd2* fue transformada con el plásmido que contiene a *CrGPDH2* (psGPDH2), *CrGPDH3* (psGPDH3) o con ambos plásmidos (psGPDH2-3). La cepa parental *W303-1A* y la doble mutante transformada con el plásmido vacío (psGC) fueron incluidos como controles. Las células de los cultivos experimentales y controles fueron diluidos serialmente 1:10 y después adicionados sobre platos con medio YPD sólido sin tratamiento de NaCl o suplementado con las concentraciones indicadas de NaCl y se incubaron a 30 °C por 4 días.

3.4 DISCUSIÓN

Macario-González (2011) presentó por primera vez evidencias de que el gen *CrGPDH2* podría codificar para una enzima GPDH involucrada en la síntesis de glicerol y tolerancia al estrés osmótico en la microalga verde de agua dulce *C. reinhardtii*. En este trabajo de tesis, se realizó el análisis de la expresión de los tres genes *CrGPDH1*, *CrGPDH2* y *CrGPDH3* ante condiciones de estrés osmótico con 200 mM de NaCl por 2 h, lo cual aportó una evidencia que sugirió que *CrGPDH3* también podría tener una función en la síntesis de glicerol y tolerancia al estrés osmótico. En este capítulo se demostró que el producto de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* tiene actividad de GPDH, de donde el extracto proteico que contiene al gen *CrGPDH2* presentó un incremento significativo en la actividad enzimática con respecto al extracto que tiene al gen *CrGPDH3*. Además, se observó que el extracto proteico que contiene tanto a *CrGPDH2* como a *CrGPDH3* presenta mayor actividad de GPDH que cuando sólo tiene a uno de estos genes. En la microalga verde halófila *Dunaliella viridis* también se identificaron y caracterizaron dos enzimas GPDH asociadas a la síntesis

de glicerol por estrés osmótico con NaCl, de las cuales DvGPDH1 presentó una actividad enzimática superior a DvGPDH2 (He *et al.*, 2009). Sin embargo, He *et al.* (2009) no evaluaron en conjunto la actividad de ambas enzimas, de ser así es posible que hubieran observado un aumento en la actividad enzimática como el que se obtuvo en este estudio.

Adicionalmente al estudio de la actividad enzimática, en el estudio de complementación genética se observó que los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de *C. reinhardtii* fueron capaces de restaurar la producción de glicerol en la cepa mutante *gpd1 gpd2* de la levadura *S. cerevisiae*, deficiente en la síntesis de glicerol y susceptible a la salinidad. Así mismo, se pudo notar que después de 12 h de tratamiento a 200 mM de NaCl no existe una diferencia significativa entre la cantidad de glicerol producida por las células transformadas que contienen sólo al gen *CrGPDH2* con respecto a las que tienen tanto a *CrGPDH2* como a *CrGPDH3*. La acumulación de glicerol en respuesta a estrés salino concuerda con los resultados visuales obtenidos en el experimento de tolerancia a estrés salino, en donde se observó que todas las células transformadas con los genes *CrGPDH2*, *CrGPDH3* o ambos toleran una concentración salina de 500 mM de NaCl y únicamente las que contienen al gen *CrGPDH2* o ambos genes fueron capaces de tolerar hasta 800 mM de NaCl. Todos los resultados obtenidos en este estudio presentan evidencias de que los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de la microalga verde *C. reinhardtii* son homólogos funcionales del gen *gpd1* de la levadura *S. cerevisiae*.

Se han publicado reportes similares al que se presenta en este estudio, en donde, mediante un estudio de complementación genética se han logrado caracterizar genes homólogos al gen *gpd1* de la levadura *S. cerevisiae*; estos estudios se han llevado a cabo principalmente en otras especies de levaduras y en algunas microalgas. Entre los genes homólogos que han sido caracterizados se encuentra por ejemplo el gen *ZrGPD1* de la levadura tolerante a la salinidad *Zygosaccharomyces rouxii* (Watanabe *et al.*, 2004), en las levaduras osmotolerantes *Candida magnoliae* y *Candida glycerinogenes*, los genes *CmGPD1* y *CgGPD*, respectivamente (Lee *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2008) y el gen *PfGPD* en la levadura halotolerante *Pichia farinosa* (Peng *et al.*, 2010). En microalgas se han caracterizado genes que codifican para la enzima GPDH, particularmente en las microalgas verdes halófitas *D. salina* (*DsGPDH2*) (He *et al.*, 2007) y *D. viridis* (*DvGPDH1* y *DvGPDH2*) (He *et al.*, 2009). Hasta donde se sabe, *C. reinhardtii* es la primera microalga de agua dulce en donde se han

caracterizado dos enzimas funcionales GPDH asociadas a la síntesis de glicerol y la tolerancia al estrés osmótico por NaCl (Casais-Molina *et al.*, 2015). Sería interesante evaluar el potencial de los genes de *C. reinhardtii* en la síntesis de glicerol y tolerancia a estrés osmótico, incluso en la acumulación de TAGs en esta u otra microalga.

En los estudios bioquímicos, que se llevaron a cabo previamente en las microalgas *D. parva* y *D. tertiolecta*, se observó la presencia de al menos tres isoformas de la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH), dos de estas isoformas se encuentran localizadas en el cloroplasto y una de ellas en el citosol (Gimmler y Lotter, 1982; Gee *et al.*, 1988; Gee *et al.*, 1993). En cuanto a esto, la presencia de dos isoformas en el cloroplasto sugiere una localización enzimática subcelular para la síntesis de glicerol-3-fosfato (G3P), una para la síntesis de lípidos de membrana (glicerolípidos, sulfolípidos, galactolípidos, etcétera) denominada forma glicérido y otra para la síntesis de glicerol (Gee *et al.*, 1993) denominada isoforma osmorreguladora involucrada en la adaptación a ambientes extremos. El estrés salino estimula la isoforma osmorreguladora, mientras que inhibe a la isoforma glicérido (Ghoshal *et al.*, 2002). Probablemente, las enzimas CrGPDH2 y CrGPDH3 correspondan a las isoformas osmorreguladoras del cloroplasto, ya que ambas contienen un péptido señal putativo de tránsito hacia este organelo, además en este estudio se demostró que los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* codifican para enzimas funcionales GPDH involucradas en la síntesis de glicerol y tolerancia al estrés osmótico en esta microalga. En cuanto a esto, sería deseable realizar un estudio de expresión transitoria en las células de la hoja de la planta *Nicotiana benthamiana*, similar al realizado por He *et al.* (2009), para verificar si, en efecto, ambas enzimas tiene su localización en el cloroplasto.

Hasta el momento, casi todos los genes identificados en las microalgas codifican para isoformas del cloroplasto y sólo en algunos casos se han identificado genes que codifican para isoformas del citosol. En la microalga verde *D. salina*, por ejemplo, se sugiere que el gen *DsGPDH2* codifica para la isoforma del cloroplasto osmorreguladora involucrada en el estrés salino (He *et al.*, 2007; Cai *et al.*, 2013). En el caso de la microalga *D. viridis* se identificaron dos genes, *DvGPDH1* y *DvGPDH2* que codifican para dos proteínas cloroplásticas con actividad de GPDH asociadas al estrés salino, de las cuales el gen *DvGPDH2* mostró un incremento y una expresión más estable durante el estrés salino de 2 a 4 h con 1.5 M de NaCl, por lo que es probable que codifique para una isoforma

osmorreguladora (He *et al.*, 2009). En la microalga verde *C. reinhardtii* se ha sugerido que las enzimas CrGPDH2 y CrGPDH3 podrían codificar para isoformas del cloroplasto (Herrera-Valencia *et al.* 2012), y en este trabajo de tesis se corroboró que estas enzimas están de hecho involucradas en la síntesis de glicerol y tolerancia a estrés osmótico.

Los resultados obtenidos en el presente estudio convierten al gen *CrGPDH2* y, tal vez, al gen *CrGPDH3* en genes de gran interés para estudios futuros de sobre expresión con el fin de aumentar el contenido de glicerol y lípidos, en particular TAGs en microalgas.

3.5 CONCLUSIONES

1. Los resultados del ensayo enzimático demostraron que los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de la microalga verde *C. reinhardtii* codifican para enzimas con actividad de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH).
2. El estudio de complementación indicó que los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de la microalga verde *C. reinhardtii* están involucrados en la síntesis de glicerol y la tolerancia al estrés osmótico, ya que ambos genes fueron capaces de restaurar la producción de glicerol y la tolerancia a NaCl en la doble mutante *gpd1 gpd2* de la levadura *S. cerevisiae*, deficiente en la síntesis de glicerol y susceptible a la salinidad.
3. *Chlamydomonas reinhardtii* es la primera microalga de agua dulce en donde se han caracterizado dos enzimas funcionales glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) asociadas a la síntesis de glicerol y la tolerancia al estrés osmótico por NaCl.

3.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albertyn, J., S. Hohmann, J.M. Thevelein y B.A. Prior (1994). *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Molecular and cellular Biology*, 14 (6), 4135-4144.
- Ansell, R., K. Granath, S. Hohmann, J.M. Thevelein y L. Adler (1997). The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *The EMBO Journal*, 6 (9), 2179-218.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Cai, M., L.H. He y T.Y. Yu (2013). Molecular clone and expression of a NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase isozyme gene from the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *PLoS ONE*, 8, 1–8.
- Casais-Molina, M.L., S. Peraza-Echeverría, I. Echevarría-Machado y V.A. Herrera-Valencia (2015). Expression of *Chlamydomonas reinhardtii* *CrGPDH2* and *CrGPDH3* cDNAs in yeast reveals that they encode functional glycerol-3-phosphate dehydrogenases involved in glycerol production and osmotic stress tolerance. *Journal of Applied Phycology*, DOI 10.1007/s10811-015-0588-3.
- Chen, X., H. Fang, Z. Rao, W. Shen, B. Zhuge, Z. Wang y J. Zhuge (2008). Cloning and characterization of a NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene from *Candida glycerinogenes*, an industrial glycerol producer. *FEMS Yeast Research*, 8, 725-734.
- Contreras-Pool, P.Y. (2010). 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. 127 p.
- Eriksson, P., L. Andre, R. Ansell, A. Blomberg y L. Adler (1995). Cloning and characterization of *GPD2*, a second gene encoding sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in *Saccharomyces cerevisiae*, and its comparison with *GPD1*. *Molecular Microbiology*, 17, 95–107.

- Galafassi, S., M. Toscano, I. Vigentini, J. Piškur y C. Compagno (2013). Osmotic stress response in the wine yeast *Dekkera bruxellensis*. *Food Microbiology*, 36, 316–319.
- Gee, R., A. Coyal, R.U. Byerrum y N.E. Tolbert (1993). Two isoforms of dihydroxyacetone phosphate reductase from the chloroplasts of *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Physiology*, 103, 243–249.
- Gee, R.W., R.U. Byerrum, D.W. Gerber y N.E. Tolbert (1988). Dihydroxyacetone Phosphate Reductase in Plants. *Plant Physiology*, 86, 98–103.
- Ghoshal, D., D. Mach, M. Agarwal y A. Goyal (2002). Osmoregulatory isoform of dihydroxyacetone phosphate reductase from *Dunaliella tertiolecta*: Purification and characterization. *Protein Expression and Purification*, 24, 404–411.
- Gimmler, H. y G. Lotter (1982). The intracellular distribution of enzymes of the glycerol cycle in the unicellular algae *Dunaliella parva*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 37c, 1107–1114.
- He, Q.H., D.R. Qiao, L.H. Bai, Q.L. Zhang, W.G. Yang, Q. Li y Y. Cao (2007). Cloning and characterization of a plastidic glycerol 3-phosphate dehydrogenase cDNA from *Dunaliella salina*. *Journal of Plant Physiology*, 164, 214-220.
- He, Y., X. Meng, Q. Fan, X. Sun, Z. Xu y R. Song (2009). Cloning and characterization of two novel chloroplastic glycerol-3-phosphate dehydrogenases from *Dunaliella viridis*. *Plant Molecular Biology*, 71, 193-205.
- Herrera-Valencia, V.A., L.A. Macario-González, M.L. Casais-Molina, A.G. Beltran-Aguilar y S. Peraza-Echeverría (2012). In Silico Cloning and Characterization of the Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase (GPDH) Gene Family in the Green Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current Microbiology*, 64, 477-485. DOI 10.1007/s00284-012-0095-6.
- Herrera-Valencia, V.A., P.Y. Contreras-Pool, S.J. López-Adrián, S. Peraza-Echeverría y L.F. Barahona-Pérez (2011). The green microalga *Chlorella saccharophila* as a suitable source of oil for biodiesel production. *Current Microbiology*, 63 (2), 151-157. DOI 10.1007/s00284-011-9956-7.
- Hirayama, T., T. Maeda, H. Saito y K. Shinozaki (1995). Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity responsive (HOR) genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics*, 249, 127–138.
- Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 300–372.

-
- Klöck, G. y K. Kreuzberg (1989). Kinetic properties of a sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase purified from the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 991, 347–352.
- Lee, D.H., K. Myoung-Dong, R. Yeon-Woo y S. Jin-Ho (2008). Cloning and characterization of *CmGPD1*, the *Candida magnolia* homologue of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *FEMS Yeast Research.*, 8, 1324-1333.
- Lenassi, M., J. Zajc, C. Gostincar, A. Gorjan, N. Gunde-Cimerman y A. Plemenitas (2011). Adaptation of the glycerol-3-phosphate dehydrogenase Gpd1 to high salinities in the extremely halotolerant *Hortaea werneckii* and halophilic *Wallemia ichthyophaga*. *Fungal Biology*, 115, 959-970.
- León, R. y F. Galván (1994). Halotolerance studies on *Chlamydomonas reinhardtii*: glycerol excretion by free and immobilized cells. *Journal of Applied Phycology*, 6, 13-20.
- León, R.M. (1997). Estudios de halotolerancia en el alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*. Fotoproducción de glicerol por células libres e inmovilizadas. Tesis de doctorado. Universidad de Sevilla. Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular. España. 193 p.
- Macario-González, L. (2011). Caracterización molecular de genes que codifican para proteínas tipo glicerol-3-fosfato deshidrogenasa en la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 125 p.
- Mumberg, D., R. Müller y M. Funk (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene*, 156, 119-122.
- Oren, A. (2003). *Halophilic Microorganisms and their Environments*. Kluwer, Kluwer Academic Publishers. New York. pp. 1-20.
- Peng, F., G. Li, X. Wang, Y. Jiang y L. Yang (2010). Cloning and characterization of a glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) gene from the halotolerant yeast *Pichia farinosa*. *Yeast*, 27, 115–121.
- Rao, R., C. Dayananda, R. Sarada, T.R. Shamala y G.A. Ravishankar (2007). Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource Technology*, 98, 560–564.
- Siaut, M., S. Cuiné, 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, 2–15.
- Takagi, M., Karseno y T. Yoshida (2006). Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *Journal of Bioscience Bioengineering*, 101, 223-226.
- Watanabe, Y., S. Tsuchimoto y Y. Tamai (2004). Heterologous expression of *Zygosaccharomyces rouxii* glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene (*ZrGPD1*) and glycerol dehydrogenase gene (*ZrGCY1*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 4, 505–510.
- Yang, W., Y. Cao, X. Sun, F. Huang, Q. He, D. Qiao y L. Bai (2007). Isolation of a FAD-GPDH gene encoding a mitochondrial FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Dunaliella salina*. *Journal of Basic Microbiology*, 47, 266– 274.

CAPÍTULO IV.

4.1 DISCUSIÓN GENERAL

Las microalgas verdes son organismos que viven en ambientes muy diversos que van desde el agua salada o dulce, el suelo e incluso en la nieve. Entre las microalgas verdes, se ha observado que las del género *Dunaliella* son capaces de tolerar concentraciones de NaCl que varían entre 0.2 y 35% (50 mM hasta 5.5 M de NaCl) (Farahat *et al.*, 2011), además son los organismos eucariontes más tolerantes a salinidad. Así mismo, se ha observado que las microalgas verdes *D. salina* y *D. viridis* se adaptan a estas condiciones de alta salinidad a través de la acumulación de glicerol como osmolito compatible, y se ha sugerido que en este proceso están involucrados los genes *GPDH* (glicerol-3-fosfato deshidrogenasa) de estas microalgas (He *et al.* 2007; He *et al.* 2009), los cuales codifican para una enzima GPDH que utiliza NADH, como donador de electrones, para reducir la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a glicerol-3-fosfato (G3P) que es desfosforilado a glicerol por la enzima glicerol fosfatasa (GPP) (Gancedo *et al.*, 1968; Ghoshal *et al.*, 2002).

Notablemente, en la microalga verde de agua dulce *C. reinhardtii* se ha observado la síntesis de glicerol como osmolito en respuesta al estrés osmótico (Husic y Tolbert, 1986; Avron, 1986) y cuando su cultivo se incubaba a 200 mM de NaCl por más de 24 h esta microalga produce una cantidad significativa de glicerol, en donde tanto la cantidad de glicerol excretado como la de glicerol acumulado intracelularmente son proporcionales a la concentración salina del medio y sólo el 15% del glicerol total producido durante las primeras 24 h se acumula intracelularmente, mientras que la mayoría es excretado al medio de cultivo (León, 1997). En el estudio realizado por León y Galván (1994) se demuestra que *C. reinhardtii* no tolera una concentración superior a 200 mM de NaCl y que a bajas condiciones de estrés salino (e.g. 50 mM de NaCl) no se produce glicerol. En el presente trabajo de tesis se demostró que el tratamiento de estrés salino a 200 mM de NaCl indujo la expresión de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de la microalga *C. reinhardtii*, y que en ausencia de este tratamiento la expresión de ambos genes es apenas detectable por RT-PCR en un gel de agarosa. Lo anterior sugiere que el aumento en la expresión los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de *C. reinhardtii* podría estar asociado a la tolerancia al estrés osmótico y la síntesis de glicerol en esta microalga. Por su parte, en el

gen *CrGPDH1* de *C. reinhardtii* se observó una expresión constitutiva que no se vió inhibida ante condiciones de estrés osmótico por NaCl, además su secuencia de aminoácidos no posee algún péptido señal de tránsito al cloroplasto (Macario-González, 2011), lo que sugiere que este gen podría codificar para una proteína GPDH del citosol involucrada en la síntesis de glicéridos, similar a la función de la GPDH citoplasmática identificada en la microalga *D. tertiolecta* (Gee *et al.*, 1993). Estos resultados se incluyeron en la publicación de Herrera-Valencia *et al.* (2012). Posteriormente, se continuó con un análisis más extenso de la expresión de *CrGPDH2* y *CrGPDH3*, y se encontró que ambos genes presentaron la inducción de su expresión a todas las condiciones de NaCl que se evaluaron, desde 5 hasta 200 mM de NaCl. Notablemente, una concentración de NaCl tan baja como 5 mM fue suficiente para conducir la expresión de ambos genes en tan sólo 5 min de tratamiento, lo cual podría tener implicaciones para la adaptación de la microalga de agua dulce *C. reinhardtii* a los cambios en la salinidad de su medio, ya que al ser un microorganismo con poca tolerancia a la salinidad (< 200 mM de NaCl) (León y Galván, 1994) debe ser capaz de responder incluso a bajas concentraciones salinas, por lo que es probable que al percibir el aumento en la salinidad de su medio active la transcripción de genes osmorreguladores que codifican para enzimas GPDH asociadas a la ruta de síntesis de glicerol, con la finalidad de garantizar su supervivencia en caso de que la concentración salina aumente y represente un estrés osmótico.

Basándonos en los resultados del análisis de la expresión de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de *C. reinhardtii* obtenidos en este estudio, así como en los resultados obtenidos por Macario-González (2011) del análisis de la expresión del gen *CrGPDH2* y el análisis filogenético y la caracterización *in silico* de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3*, se sugirió que ambos genes posiblemente codifican para una enzima con función de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) involucrada en la síntesis de glicerol en respuesta al estrés por NaCl. Por tal razón, en este estudio se llevó a cabo el mapeo y clonación de los extremos 5' y 3' no traducibles de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de *C. reinhardtii*, y a partir de esos resultados se obtuvo la región codificante completa de ambos genes. Estas secuencias se utilizaron para obtener vectores de expresión constitutiva que nos permitieron realizar el ensayo de complementación con ambos genes. Como resultado, se demostró por primera vez que los productos de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de la microalga verde *C. reinhardtii* tienen actividad de GPDH. Además, se presentó evidencia

de que efectivamente, ambos genes son capaces de restaurar la producción de glicerol y la tolerancia a la salinidad en la doble mutante *gpd1 gpd2* de la levadura *S. cerevisiae*, indicando que tanto *CrGPDH2* como *CrGPDH3* son homólogos funcionales del gen *gpd1* de *S. cerevisiae*.

Se han caracterizado otros homólogos del gen *gpd1* mediante la complementación genética en la levadura *S. cerevisiae*, principalmente en otras especies de levaduras, por ejemplo en la levadura tolerante a la salinidad *Zygosaccharomyces rouxii* (Watanabe *et al.* 2004), en las levaduras osmotolerantes *Candida magnoliae* y *Candida glycerinogenes* (Lee *et al.* 2008; Chen *et al.* 2008) y en la levadura halotolerante *Pichia farinosa* (Peng *et al.* 2010). Así mismo, se han clonado y caracterizado genes que codifican para enzimas GPDH en la microalga verde halotolerante *D. salina* (He *et al.* 2007; Cai *et al.* 2013). Los genes *DvGPDH1* y *DvGPDH2* de la microalga *D. viridis* fueron caracterizados mediante complementación genética y por ensayos enzimáticos (He *et al.* 2009). En el estudio realizado por He *et al.* (2009) se demostró que *DvGPDH1* y *DvGPDH2* son capaces de funcionar como enzimas GPDH, sin embargo, los autores no ofrecieron alguna explicación del porque la actividad enzimática de la enzima *DvGPDH2* fue marcadamente inferior a la de *DvGPDH1*.

En este estudio se encontró que la actividad de GPDH en la doble mutante de *gpd1 gpd2* transformada con el gen *CrGPDH2* fue significativamente superior con respecto a la transformada que contiene al gen *CrGPDH3*, aun cuando el patrón de expresión de los genes nativos es muy similar, así como el porcentaje de identidad en la secuencia de sus productos proteicos (94.2%). Por tanto, es interesante que la actividad enzimática entre ellas sea tan diferente, así como la diferencia observada en cuanto a la restauración de la producción de glicerol y la tolerancia a NaCl en la doble mutante cuando contiene a un gen u otro; siendo las transformadas que contienen al gen *CrGPDH2* las que mostraron una producción de glicerol y tolerancia a NaCl significativamente mayor. Un caso similar a este fue reportado en el estudio realizado por Lenassi *et al.* (2011) para la levadura negra, extremadamente halotolerante, *Hortaea werneckii*. En este caso, el gen *HwGPD1B*, pero no el gen *HwGPD1A*, fue capaz de complementar la función de GPDH en la mutante *gpd1* de *S. cerevisiae* mediante la mejora en la producción de glicerol y la tolerancia a NaCl. Esto se observó a pesar de que

HwGPD1B y *HwGPD1A* presentaban patrones similares de expresión génica y un 98% de identidad entre sus secuencias de aminoácidos. Además, el análisis de la secuencia de aminoácidos demostró que existe una diferencia de nueve aminoácidos entre *HwGPD1B* y *HwGPD1A*. Dos de estos aminoácidos, asparagina (Asn) y ácido aspártico (Asp), fueron idénticos entre GPD1 de *S. cerevisiae* (*ScGPD1*) y *HwGpd1B* pero diferente en *HwGpd1A*, sugiriendo que estos aminoácidos podrían ser críticos para la función de estas proteínas. En nuestro estudio, se encontró que el dominio GPDH de *CrGPDH2* y *CrGPDH3* varía entre ellos en sólo nueve aminoácidos, y, uno de estos cambios, la Asn en la posición 272, podría ser responsable de la diferencia que se observa entre la actividad enzimática de *CrGPDH2* y *CrGPDH3*, debido a que este aminoácido es idéntico entre *CrGPDH2* y *ScGPD1*, pero se sustituye por un residuo de histidina (His) en *CrGPDH3*. Además, la Asn identificada en este estudio para *CrGPDH2* corresponde a la Asn que fue previamente identificada en *HwGpd1B* en el estudio de Lenassi *et al.* (2011). En cuanto a la secuencia de aminoácidos del dominio GPDH de *DvGPDH1* y *DvGPDH2* es probable que otro cambio de aminoácido sea el responsable que ocasiona la diferencia entre la actividad enzimática de *DvGPDH1* y *DvGPDH2*, ya que ambas enzimas tienen el aminoácido Asn conservado en su dominio GPDH (He *et al.* 2009). Con base en estos resultados, sería interesante investigar el papel del aminoácido Asn conservado en la posición 272 del dominio GPDH de *CrGPDH2* mediante un estudio de mutagénesis dirigida, y de esta forma dilucidar el papel de otros aminoácidos en las GPDHs que han sido caracterizadas en otras microalgas y levaduras.

En estudios previos se ha observado que algunas microalgas en condiciones de estrés osmótico por NaCl aumentan la síntesis de glicerol y acumulación de TAGs, por ejemplo *B. braunii* (Takagi *et al.* 2006), *D. tertiolecta* (Rao *et al.* 2007) y *C. saccharophila* (Contreras-Pool, 2010; Herrera-Valencia *et al.* 2011), incluyendo a la microalga de agua dulce *C. reinhardtii* (Albertyn *et al.* 1994; Contreras-Pool, 2010; Siaut *et al.* 2011). Además, se ha reportado que la expresión heteróloga de genes tipo *GPDH* puede incrementar la producción de glicerol en la levadura *S. cerevisiae* (Watanabe *et al.* 2004), y, se observó que la sobre expresión del gen *gpd1* de *S. cerevisiae* incrementó hasta en un 40% el contenido de lípidos en las semillas maduras de un cultivo comercial de la planta oleaginosa *B. napus L.* (Vigeolas *et al.* 2007). En un estudio más reciente, se reportó que la sobre expresión del gen *GPDH* de la diatomea marina *P. tricornutum*

incrementó 6.8 veces la concentración del glicerol y hasta en un 60% el contenido de lípidos en esta diatomea (Yao *et al.*, 2014), siendo esta la estrategia que ha demostrado el mayor incremento en la acumulación de lípidos hasta la fecha. Tomando en consideración que la enzima GPDH es responsable de la síntesis del G3P, el cual a su vez es el substrato limitante para la síntesis de glicerol y TAGs (Renz *et al.* 2009), y que en este estudio se encontró que la actividad enzimática de CrGPDH2 fue mucho mayor que la actividad observada en CrGPDH3, sería interesante determinar si la sobre expresión del gen *CrGPDH2* en *C. reinhardtii* podría aumentar la síntesis de glicerol y TAGs en esta microalga. Debido a lo anterior, en este trabajo de tesis se obtuvo un plásmido para la transformación del núcleo de *C. reinhardtii* que contiene la secuencia del ADNc de la región codificante del gen *CrGPDH2*. Este plásmido podrá ser utilizado en futuras investigaciones para la generación de nuevas cepas de *C. reinhardtii* u otras microalgas y evaluar su relación con la acumulación de glicerol y TAGs, y que podrían ser usadas como una materia prima renovable en numerosos procesos industriales y biocombustibles.

4.2 CONCLUSIONES GENERALES

1. En la microalga verde *C. reinhardtii*, la transcripción de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* se induce en presencia de NaCl, incluso a una concentración de tan sólo 5 mM por 5 min, por lo que se consideran genes de tipo inducible. Por su parte, el gen *CrGPDH1* resultó de expresión constitutiva, tanto en presencia como en ausencia del tratamiento de NaCl.
2. El mapeo y clonación de los extremos terminales 5' y 3' del ADN complementario de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de *C. reinhardtii* permitió el aislamiento del marco de lectura abierto de cada uno de estos genes. A partir de esto, se obtuvo de manera experimental la secuencia completa del ADN complementario de ambos genes.
3. Los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de la microalga verde *C. reinhardtii* codifican para enzimas con actividad de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa involucradas en la síntesis y acumulación de glicerol, así como en la tolerancia al estrés osmótico.
4. Los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de la microalga *C. reinhardtii* son homólogos funcionales del gen *gpd1* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ya que la expresión de ambos genes está involucrada en la síntesis de glicerol y la tolerancia al estrés osmótico, y sus productos tienen actividad de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa.
5. Este es el primer estudio en donde se reporta la caracterización de dos enzimas con función de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa involucradas en la producción de glicerol y la tolerancia al estrés osmótico por NaCl en una microalga verde de agua dulce.

4.3 PERSPECTIVAS

En este trabajo se demostró por primera vez que la microalga verde de agua dulce *C. reinhardtii* posee dos enzimas con actividad de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) involucradas en la síntesis de glicerol y la tolerancia al estrés osmótico. Por tanto, sería interesante realizar un estudio de localización celular y determinar de forma *in vitro* si las enzimas CrGPDH2 y CrGPDH3 de *C. reinhardtii* tiene su localización en el cloroplasto, debido a que en la caracterización *in silico* realizada por Macario-González (2011) se observó que la secuencia de aminoácidos de ambas enzimas contiene un péptido putativo de tránsito hacia este organelo. Adicionalmente, un estudio de mutagénesis dirigida permitirá dilucidar el papel del aminoácido Asn conservado en la posición 272 del dominio GPDH de CrGPDH2, el cual probablemente sea el responsable de la diferencia observada entre la actividad de GPDH de las enzimas CrGPDH2 y CrGPDH3 de *C. reinhardtii*.

Por otro lado, siendo la enzima CrGPDH2 la que presenta mayor potencial para estudios posteriores de acuerdo con lo que se observó en este estudio, y dado que la enzima GPDH es clave en el metabolismo del glicerol y TAGs, sería interesante que se pudiera incrementar la producción de ambos productos mediante la sobre expresión de genes *GPDH* involucrados en su biosíntesis. Debido a lo anterior, en este estudio se obtuvo el plásmido pCrGPDH2c, que contiene al promotor binario Hsp70A/RbcS2 para la expresión constitutiva del gen *CrGPDH2*. Este plásmido permitirá la transformación del núcleo de *C. reinhardtii* y de otras especies de microalgas con la finalidad de evaluar su capacidad para producir glicerol y TAGs, y si se obtiene un buen porcentaje de alguno de estos productos se podrían utilizar estas especies de microalgas como materia prima renovable en numerosos procesos industriales y biocombustibles. Así mismo, sería deseable sobre expresar al gen *CrGPDH2* utilizando otro promotor inducible con la finalidad de hacer más eficiente el cultivo y más rentable la producción de glicerol y biocombustibles a partir de microalgas. Es posible que con la manipulación de este gen y el consecuente incremento del glicerol y TAGs en microalgas se reduzcan los costos en su producción y con ello hacer más rentable su elaboración.

Finalmente, y de manera importante, los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* resultaron ser inducibles con una molécula tan sencilla como cloruro de sodio, lo cual representa un gran

potencial dentro de los desarrollos biotecnológicos del área de expresión de proteínas recombinantes, por lo que es necesario llevar a cabo un análisis detallado de la región promotora de ambos genes y evaluar su potencial como promotor inducible en *C. reinhardtii*. En cuanto a esto, sería interesante caracterizar la región promotora de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3*, ya que a la fecha sólo se conocen tres promotores inducibles en el genoma nuclear de *C. reinhardtii*: CYC6, NIT1 y CA1, (Ferrante *et al.* 2008; Koblenz y Lechtreck, 2005; Villand *et al.*, 1997). Para ello, se podría partir del mapeo y clonación del ADNc obtenido en este estudio para ambos genes y utilizar un programa bioinformático, como el BPROM, para predecir la longitud de dichos promotores. Posteriormente, mediante ensayos de delección se podría obtener la longitud mínima del promotor de cada gen. Cabe señalar que esta investigación se encuentra actualmente en progreso en nuestro grupo de investigación como parte de una tesis de doctorado.

4.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albertyn, J., S. Hohmann, J.M. Thevelein y B.A. Prior (1994). *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 14 (6), 4135-4144.
- Avron, M. (1986). The osmotic components of halotolerant algae. *Trends in Biochemical Science*. 11, 5–6.
- Cai, M., L.H. He y T.Y. Yu (2013). Molecular clone and expression of a NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase isozyme gene from the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *PLoS ONE*, 8, 1–8.
- Chen, X., H. Fang, Z. Rao, W. Shen, B. Zhuge, Z. Wang y J. Zhuge (2008). Cloning and characterization of a NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene from *Candida glycerinogenes*, an industrial glycerol producer. *FEMS Yeast Research*, 8, 725-734.
- Farahat, N., M. Rabhi, H. Falleh, J. Jouini, C. Abdelly y A. Smaoui (2011). Optimization of salt concentrations for a higher carotenoid production in *Dunaliella salina* (Chlorophyceae). *Phycological Society of America*. DOI: 10.1111/j.15298817.2011.01036.x
- Ferrante, P., C. Catalanotti, G. Bonente y G. Giuliano (2008). An optimized, chemically regulated gene expression system for *Chlamydomonas*. *PLoS ONE*. 3 (9), e3200.
- He, Q.H., D.R. Qiao, L.H. Bai, Q.L. Zhang, W.G. Yang, Q. Li y Y. Cao (2007). Cloning and characterization of a plastidic glycerol 3-phosphate dehydrogenase cDNA from *Dunaliella salina*. *Journal of Plant Physiology*, 164, 214-220.
- He, Y., X. Meng, Q. Fan, X. Sun, Z. Xu y R. Song (2009). Cloning and characterization of two novel chloroplastic glycerol-3-phosphate dehydrogenases from *Dunaliella viridis*. *Plant Molecular Biology*, 71, 193-205.
- Herrera-Valencia, V.A., L.A. Macario-González, M.L. Casais-Molina, A.G. Beltran-Aguilar y S. Peraza-Echeverría (2012). In silico cloning and characterization of the glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) gene family in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current Microbiology*, 64, 477-485. DOI: 10.1007/s00284012-0095-6.

-
- Herrera-Valencia, V.A., P.Y. Contreras-Pool, S.J. López-Adrián, S. Peraza-Echeverría y L.F. Barahona-Pérez (2011). The green microalga *Chlorella saccharophila* as a suitable source of oil for biodiesel production. *Current Microbiology*, 63 (2), 151-157. DOI 10.1007/s00284-011-9956-7.
- Husic, D. y N. Tolbert (1986). Effect of osmotic stress on carbon metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 82, 549-596.
- Koblenz, B. y K.F. Lechtreck (2005). The *NIT1* promoter allows inducible and reversible silencing of centrin in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 4 (11), 1959-1962.
- Lee, D.H., K. Myoung-Dong, R. Yeon-Woo y S. Jin-Ho (2008). Cloning and characterization of *CmGPD1*, the *Candida magnolia* homologue of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *FEMS Yeast Research*, 8, 1324-1333.
- Lenassi, M., J. Zajc, C. Gostincar, A. Gorjan, N. Gunde-Cimerman y A. Plemenitas (2011). Adaptation of the glycerol-3-phosphate dehydrogenase Gpd1 to high salinities in the extremely halotolerant *Hortaea werneckii* and halophilic *Wallemia ichthyophaga*. *Fungal Biology*, 115, 959-970.
- León, R. y F. Galván (1994). Halotolerance studies on *Chlamydomonas reinhardtii*: glycerol excretion by free and immobilized cells. *Journal of Applied Phycology*, 6, 13-20.
- Macario-González, L. (2011). Caracterización molecular de genes que codifican para proteínas tipo glicerol-3-fosfato deshidrogenasa en la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 125 p.
- Osami, M., Y. Yamato, N. Keiji, F. Takayuki, S. Takayuki, H. Syunsuke, N. Yoshiki y K. Tsuneyoshi (2008). Genome analysis and its significance in four unicellular algae, *Cyanidioshizon merolae*, *Ostreococcus tauri*, *Chlamydomonas reinhardtii*, and *Thalassiosira pseudonana*. *Journal of Plant Research*, 121, 3–17.
- Peng, F., G. Li, X. Wang, Y. Jiang y L. Yang (2010). Cloning and characterization of a glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) gene from the halotolerant yeast *Pichia farinosa*. *Yeast*, 27, 115–121.
- Rao, R., C. Dayananda, R. Sarada, T.R. Shamala y G.A. Ravishankar (2007). Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource Technology*, 98, 560–564.
-

-
-
- Siaut, M., S. Cuiné, 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, 2–15.
- Takagi, M., Karseno y T. Yoshida (2006). Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *Journal of Bioscience Bioengineering*, 101, 223-226.
- Vigeolas, H., P. Waldeck, T. Zank y P. Geigenberger (2007). Increasing seed oil content in oil-seed rape (*Brassica napus* L.) by over-expression of a yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenase under the control of a seed-specific promoter. *Plant Biotechnology Journal*, 5, 431-441.
- Villand, P., M. Eriksson y G. Samuelsson (1997). Carbon dioxide and light regulation of promoters controlling the expression of mitochondrial carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemical Journal*, 327, 51-57.
- Watanabe, Y., S. Tsuchimoto y Y. Tamai (2004). Heterologous expression of *Zygosaccharomyces rouxii* glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene (*ZrGPD1*) and glycerol dehydrogenase gene (*ZrGCY1*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 4, 505–510.
- Yao, Y., Y. Lu, K.T. Peng, T. Huang, Y. F. Niu, W.H. Xie, W.D. Yang, J.S. Liu y H.Y. Lie (2014). Glycerol and neutral lipid production in the oleaginous marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* promoted by overexpression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Biotechnology for Biofuels*, 7, 110-118.