



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Obtención del promotor híbrido *RIA3/
HSP70A/RBCS2* en la microalga verde
*Chlamydomonas reinhardtii***

Tesis que presenta

DAYANA AGUILAR STEWART

En opción al título de
MAESTRO EN CIENCIAS
(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2021

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **Dayana Aguilar Stewart**, titulado “**Obtención del promotor híbrido *RIA3/ HSP70A/RBCS2* en la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*”**, fue realizado en los laboratorios de Microalgas y Cultivos Tropicales, dentro de la línea de investigación ‘Biotecnología de microorganismos’ de la **Unidad de Biotecnología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.**. Este trabajo de tesis se realizó dentro del proyecto titulado “Edición de los promotores de *CrGPDH2* y *CrGPDH3* mediante CRISPR/Cpf1, para investigar el mecanismo de respuesta al estrés abiótico en la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*” Convocatoria de CONACYT CB-2017-2018, Proyecto No. A1-S-36206, bajo la dirección de la **Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia** y la **Dra. Ileana de la Caridad Echevarría Machado**, dentro de la opción en Biotecnología, del programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Esta tesis tiene orientación al desarrollo socioeconómico de la región porque está orientada hacia la economía basada en conocimiento.

Atentamente:

Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia
Mérida, Yucatán, México, a 24 de junio de 2021

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.



Dayana Aguilar Stewart

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), y forma parte del proyecto titulado “Edición de los promotores de CrGPDH2 y CrGPDH3 mediante CRISPR/Cpf1, para investigar el mecanismo de respuesta al estrés abiótico en la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*” Convocatoria de CONACYT CB-2017-2018, Proyecto No. A1-S-36206, bajo la dirección de la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia y la Dra. Ileana de la Caridad Echevarría Machado.

AGRADECIMIENTOS

En particular quisiera agradecer a mis asesoras, a la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia por guiarme en el desarrollo del trabajo, su paciencia y consejo en cada etapa de investigación y a la Dra. Ileana de la Caridad Echevarría Machado por sus sugerencias y colaboración en el proyecto.

Igualmente, al Dr. Santy Peraza Echeverría por su participación, apoyo y sugerencias en la realización del proyecto.

A todos los integrantes de mi comité tutorial, el Dr. Santy Peraza Echeverría, el Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís, la Dra. Ileana de la Caridad Echevarría Machado y la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, muchas gracias por su apoyo, dedicación y tiempo.

A la Q.B.A. Ileana Cecilia Borges Argáez por todo su apoyo en cada ensayo, procedimiento, paciencia, dedicación y amistad, muchas gracias.

A la Biol. Verónica Limones Briones por sus aportes a mis conocimientos de biología molecular, contribución al trabajo y amistad, muchas gracias.

A todos mis compañeros de la Unidad de Biotecnología y del laboratorio de Biotecnología de Microalgas y Cultivos Tropicales, por compartir conocimientos y gratos momentos en el laboratorio. A la Dra. Anayeli Guadalupe Beltran Aguilar por su contribución, al M. en C. Jimmy Ricardo Mier Guerra por sus consejos y aportes en cada procedimiento, al M. en C. Sergio García Laynes por su perspicacia en cada técnica, a la M. en C. Dulce Ivonne Guadalupe Álvarez López por sus aportes, al M. en C. Raúl Manzanilla Rivas por sus pláticas, a la Ing. Lilia Guadalupe Tamayo Torres por su constancia y al Biol. Jonathan Galán López por los buenos ratos, muchas gracias. *“El aprendizaje es una expresión natural de la alegría de vivir, más si tengo la dicha de con quien compartirla”*

A todo el personal del Centro de Investigación Científica de Yucatán, la Unidad de Biotecnología y el posgrado de Ciencias Biológicas (opción en biotecnología) por las facilidades otorgadas en la investigación y desarrollo de este trabajo, así como la oportunidad de presentar el cartel: Aguilar Stewart D, Echevarría Machado I, Peraza-Echeverría S, Borges-Argáez IC, Mier-Guerra JR, Herrera-Valencia VA. 'RIA3', the inducible

region of *CrGPDH3* promoter of the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. XVIII National Plant Biochemistry and Molecular Biology Congress, XI Symposium México-USA & 1st ASPB Mexico Section Meeting. Mérida, Yucatán, México, 28 a 31 de octubre de 2019.

Gracias al financiamiento por parte del proyecto titulado “Edición de los promotores de *CrGPDH2* y *CrGPDH3* mediante CRISPR/Cpf1, para investigar el mecanismo de respuesta al estrés abiótico en la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*” Convocatoria de CONACYT CB-2017-2018, Proyecto No. A1-S-36206.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca (No. 749912) otorgada para los estudios en el programa de maestría de Ciencias Biológicas, opción en biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

A todos mis amigos y compañeros de trabajo en Cuba que me apoyaron e incentivaron en la continuación de mis estudios, en especial al M. en C. Rudens Velo Alvarado y la M. en C. Katia Margarita Rodríguez Alameda, muchas gracias por su profesionalismo y amistad.

A mis familiares, en particular mi mamá, mi papá y mi hermano por la inspiración de continuar y cumplir mis sueños. Muchas gracias por ese apoyo incondicional, los amo.

A todas las personas que en algún momento de mi vida me aconsejaron y guiaron:

¡MUCHAS GRACIAS!

DEDICATORIA

A mis padres, mi hermano y Leo,
los amo.



ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS	iii
LISTADO DE TABLAS.....	v
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	4
ANTECEDENTES	4
1.1 GENERALIDADES DE <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	4
1.2 SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	5
1.2.1 <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> COMO ORGANISMO MODELO	7
1.3 MECANISMOS DE REGULACIÓN GÉNICA DE <i>C. REINHARDTII</i> EN RESPUESTA A ESTRÉS OSMÓTICO.....	9
1.4 PROMOTOR: SECUENCIA REGULADORA DE LA TRANSCRIPCIÓN.....	11
1.5 PROMOTORES ESTUDIADOS EN <i>C. REINHARDTII</i>	13
1.5.1 PROMOTORES CONSTITUTIVOS	13
1.5.2 PROMOTORES INDUCIBLES	14
1.5.3 PROMOTORES SINTÉTICOS E HÍBRIDOS.....	15
1.6 IDENTIFICACIÓN DE GENES GPDH EN <i>C. REINHARDTII</i> Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN <i>CRGPDH3</i>	17
1.7 PROMOTOR <i>RIA3/PROMC</i> DE <i>C. REINHARDTII</i>	18
1.8 JUSTIFICACIÓN	20
1.9 HIPÓTESIS.....	20
1.10 OBJETIVOS.....	20
1.10.1 OBJETIVO GENERAL.....	20
1.10.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
1.11 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	22
CAPÍTULO II	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
2.1 OBTENCIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN PRHR: GUSPLUS.....	24
2.1.1 OBTENCIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN PHR:GUSPLUS	24
2.1.2 SUBCLONACIÓN DE LA SECUENCIA RIA3 EN PGEM-T EASY.....	25

2.1.3 CLONACIÓN DE RIA3 MEDIANTE EL PROTOCOLO COMERCIAL IN-FUSION HD CLONING KITS	27
2.1.4 SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR	29
2.1.5 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	29
2.2 CEPAS Y CONDICIONES DE CULTIVO	30
2.3 TRANSFORMACIÓN DE <i>C. REINHARDTII</i> POR EL MÉTODO DE BIOBALÍSTICA	30
CAPÍTULO III	33
RESULTADOS	33
3.1 PREDICCIÓN DE ELEMENTOS REGULATORIOS <i>EN CIS</i> DE LA REGIÓN RIA3 EN RELACIÓN CON LA RESPUESTA A SALES	33
3.2 GENERACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS PHR:GUSPLUS Y PRHR:GUSPLUS	35
3.2.1 GENERACIÓN DEL PHR:GUSPLUS	35
3.2.2 SUBCLONACIÓN DE RIA3 EN PGEM-T EASY	37
3.2.3 OBTENCIÓN DE PRHR: GUSPLUS	40
3.3 OBTENCIÓN DE CLONAS DE <i>C. REINHARDTII</i> BOMBARDEADAS POR BIOBALÍSTICA	42
CAPÍTULO IV	46
DISCUSIÓN GENERAL	46
CAPÍTULO V	51
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	51
5.1 CONCLUSIONES	51
5.2 PERSPECTIVAS	52
BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXOS	63

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1: Estructura celular de la microalga verde <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5
Figura 1.2: Esquema general de la respuesta a estrés osmótico y la cascada de señalización de MAPK cinasas que conduce a la activación de genes. FT: factores de transcripción. PE: proteínas efectoras	10
Figura 1.3: Representación esquemática de las secuencias de un promotor. Las secuencias se señalan en amarillo	11
Figura 1.4: Análisis de delección del fragmento RIA1 del promotor nuclear <i>CrGPDH3</i> de <i>C. reinhardtii</i> . (a)Diagrama esquemático de las delecciones secuenciales del fragmento RIA1 del promotor <i>CrGPDH3</i> . (b)Análisis de transcritos por RT-PCR y visualización en gel de genes expresados en tratamientos con NaCl	19
Figura 2.1: Esquema de obtención de pRHR:GUSPlus	29
Figura 3.1: Localización de los elementos regulatorios en <i>cis</i> identificados en RIA3 en relación con la respuesta a sales. Los motivos CAATBOX1 (CAAT) se muestran en color azul, WRKY71OS (TGAC) en color rojo y DRE2COREZMRAB17 (ACCGAC) en color verde.	34
Figura 3.2: Electroforesis del análisis de restricción de pHR:GPDH3 con las enzimas <i>SwaI</i> , <i>EcoRV</i> , <i>BamHI</i> y <i>NotI</i> . M= marcador de peso molecular 2 Log (New England Biolabs). Los carriles con una enzima de restricción muestran el vector linealizado y los carriles con dos enzimas de restricción muestran los fragmentos liberados de <i>HSP70A/RBCS2</i> y <i>CrGPDH3</i>	35
Figura 3.3: Electroforesis del producto de PCR para la detección del gen reportero GUSPlus (amplicón de 159pb) a partir de pRIA3/PromC con los oligonucleótidos GUSPlusAnyFw y GUSPlusAnyRv. M= marcador de peso molecular 2 Log (New England Biolabs).....	36
Figura 3.4: Electroforesis de los fragmentos purificados, vector linealizado que contiene al promotor <i>HSP70A/RBCS2</i> , y gen reportero GUSPlus. M= marcador de peso molecular 2 Log (New England Biolabs). V= vector linealizado (5.1 Kb). I= inserto gen reportero GUSPlus (2053 pb).	37
Figura 3.5: Electroforesis del análisis de restricción de cinco muestras del pHR:GUSPlus con las enzimas <i>BamHI</i> y <i>NotI</i> . En todas las muestras se puede ver la banda de 5.1 Kb correspondiente al vector que contiene al promotor <i>HSP70A/RBCS2</i> , así como la banda de 2053 pb correspondiente al gen reportero <i>GUSPlus</i> . M= marcador de peso molecular 2 Log (New England Biolabs).	37
Figura 3.6: Electroforesis de la amplificación del fragmento RIA3 del gen nuclear <i>CrGPDH3</i> a partir de pRIA3/PromC y pRIA1. M= marcador de peso molecular 2 Log (New England Biolabs). C+=	

control positivo del gen reportero GUSPlus (amplicón 159pb) en pRIA3/PromC. C-= control negativo con H ₂ O ultrapura.	38
Figura 3.7: Electroforesis del producto de PCR RIA3 purificado. M= marcador de peso molecular 2 Log (New England Biolabs). RIA3= amplicón de 577 pb.	39
Figura 3.8: Electroforesis del análisis de restricción de las muestras de plásmido purificado, pPGEM-T Easy/RIA3 con las enzimas <i>SwaI</i> y <i>EcoRV</i> . M= marcador de peso molecular 2 Log (New England Biolabs). Los carriles marcados con asterisco indica las muestras cuya secuencia fue idéntica a la secuencia reportada por Beltran-Aguilar (2018).	39
Figura 3.9: Electroforesis de los fragmentos purificados del análisis de restricción (vector linealizado pHR:GUSPlus) y del PCR (inserto RIA3). M= marcador de peso molecular 2 Log (New England Biolabs). V= vector linealizado pHR: GUSPlus (7.1Kb). I= inserto RIA3 (577pb).	40
Figura 3.10: Electroforesis del análisis de restricción de la clonas transformadas RHR: GUSPlus con las enzimas <i>SwaI</i> y <i>EcoRV</i> . M= marcador de peso molecular 2 Log (New England Biolabs). De las clonas evaluadas solo las clonas 1, 2 y 3 presentaron la banda de 577pb correspondiente al fragmento RIA3.	41
Figura 3.11: Electroforesis de las distintas partes que conforman al pRHR: GUSPlus (muestra 1) amplificadas por PCR. M= marcador de peso molecular 2 Log (New England Biolabs). HR = promotor constitutivo <i>HSP70A/RBCS2</i> . GUSP = gen reportero GUSPlus. 3'UTR = región no traducible 3' del RBCS. C+ = control positivo del fragmento RIA3 (amplicón 577pb). C- = control negativo con H ₂ O ultrapura.	41
Figura 3.12: Resultados del evento de transformación por biobalística de <i>C. reinhardtii</i> (réplica representativa por plato). WT= Cepa silvestre (<i>en inglés</i> : white type). C+ = control positivo. C- = control negativo.	43

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1: Comparación entre los diferentes sistemas biotecnológicos	7
Tabla 1.2: Transgenes de interés biotecnológico expresados en <i>C. reinhardtii</i>	8
Tabla 1.3: Genes expresados por la actividad del promotor doble constitutivo <i>HSP70A/RBCS2</i> en <i>C. reinhardtii</i>	14
Tabla 3.1 Resultados de la búsqueda de elementos regulatorios en <i>cis</i> predichos por el programa New PLACE en la región de inducibilidad RIA3 en relación con la respuesta a sales.	34
Tabla 3.3: Resultado de cuantificación de midipreps.....	42
Tabla 3.4: Resultados de clonas putativamente transformadas por plato de transformación. ...	4844

ABREVIATURAS

ADNc	ADN complementario
ADNg	ADN genómico
ADNp	ADN plásmídico
ARN	Ácido ribonucleico
FT	Factor de transcripción
GPDH	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
GRAS	(<i>en inglés</i> : generally recognized as safe)
G3P	Glicerol-3-fosfato
HOG	Vía de alta osmolaridad de glicerol (<i>en inglés</i> : High Osmolarity Glicerol)
HSP70A	Región promotora de una proteína protectora a choque térmico (<i>en inglés</i> : heat-shock proteins).
KCl	Cloruro de potasio
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
NaCl	Cloruro de sodio
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PromC	Región de 938 pb del promotor nuclear <i>CrGPDH3</i>
PCT	Proteína celular total
PST	Proteína soluble total
RBCS2	Región promotora de subunidad pequeña de la enzima Rubisco
RIA3	Región de inducibilidad de 577 pb del promotor nuclear <i>CrGPDH3</i>
sap	Promotores de algas sintéticos
TAG	Triacilglicéridos
TFBS	Sitios de unión a factores de transcripción (<i>en inglés</i> : Transcription Factor Binding Sites)

RESUMEN

La microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* es un organismo fotosintético ampliamente estudiado. Presenta requerimientos de crecimiento simple, bien definidos y rentables en la expresión de proteínas recombinantes. Sin embargo, hasta la fecha los rendimientos alcanzados en producción de proteínas recombinantes son muy bajos como para considerar a *C. reinhardtii* una plataforma biotecnológica comercial. Una solución a esto es el uso de secuencias promotoras, como reguladores y potenciadores de la transcripción génica. En *C. reinhardtii*, principalmente se han estudiado genes de tipo constitutivos y en menor grado de tipo inducibles. Recientemente, nuestro grupo de investigación identificó y caracterizó dos genes nucleares, *CrGPDH2* y *CrGPDH3*, que codifican las enzimas glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (GPDH). Estos genes son inducibles por NaCl a bajas concentraciones (5 mM) y en tiempos cortos (5 a 30 minutos). Posteriormente, se obtuvo un promotor quimérico (*RIA3/PromC*) que comprende la región de inducibilidad (*RIA3*) unida al promotor mínimo (*PromC*) de *CrGPDH3*, capaz de conducir la expresión del gen reportero GUSPlus con tratamientos de NaCl y KCl como inductores. Sin embargo, se desconoce la capacidad de respuesta de la región *RIA3* en fusión con otros promotores como el promotor comercial *HSP70A / RBCS2* en presencia de sales. El siguiente trabajo presenta como objetivo general la obtención del promotor híbrido *RIA3/ HSP70A/RBCS2* en la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. Para esto se generaron las construcciones pHR:GUSPlus y pRHR:GUSPlus, tomando como punto de partida los plásmidos pRIA3/PromC y el plásmido pHR:GPDH3. Inicialmente se realizó la digestión enzimática del plásmido pHR:GPDH3 con las enzimas *BamHI* y *NotI*, sustituyendo el gen nuclear *CrGPDH3* por el gen reportero GUSPlus para generar la construcción pHR:GUSPlus. Luego del plásmido pRIA3/Prom se amplificó la región de inducibilidad *RIA3* y por el método comercial de *IN-Fusion HD Cloning* se fusionó corriente arriba del promotor comercial *HSP70A/RBCS2* en pHR:GUSPlus para generar la construcción pRHR:GUSPlus. Las construcciones pSP124S (vector vacío), pHR:GUSPlus y pRHR:GUSPlus previamente comprobadas por secuenciación se emplearon en la transformación por biobalística de *C. reinhardtii* a concentraciones de 1.19, 1.03 y 1.16 µg/µL. Las clonas putativamente transformadas se seleccionaron en medio TAP líquido + Zeocina (5 mg/L) después de 3 resiembras y se resguardaron a 16°C en medio TAP sólido. Los avances en este proyecto sientan las bases para la comprensión de los promotores inducibles y sus inductores en las

microalgas verdes y al desarrollo de nuevas alternativas para la expresión de proteínas recombinantes en *Chlamydomonas reinhardtii*.

ABSTRACT

The green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* is a widely studied photosynthetic organism. It presents simple, well-defined and profitable growth requirements in the expression of recombinant proteins. However, to date the recombinant protein yields achieved are too low to consider *C. reinhardtii* a commercial biotechnological platform. One solution to this is the use of promoter sequences, as gene transcription regulators and enhancers. In *C. reinhardtii*, mainly constitutive-type and in a lesser extent, inducible-type genes have been studied. Recently, our research group identified and characterized two core genes, *CrGPDH2* and *CrGPDH3*, which encode the enzymes glycerol 3-phosphate dehydrogenase (GPDH). These genes are inducible by NaCl at low concentrations (5 mM) and in short times (5 to 30 minutes). Hereinafter, a chimeric promoter (RIA3 / PromC) was obtained that comprises the inducibility region (RIA3) linked to the minimal promoter (PromC) of *CrGPDH3*, capable of driving the expression of the GUSPlus reporter gene in NaCl and KCl treatments as inductors. However, the responsiveness of the RIA3 region in fusion with other promoters such as the commercial HSP70A / RBCS2 promoter in the presence of salts is unknown. The following work presents the general objective of obtaining the RIA3 / HSP70A / RBCS2 hybrid promoter in the green microalgae *C. reinhardtii*. For this, the constructions pHR: GUSPlus and pRHR: GUSPlus were generated, taking as a starting point the plasmids pRIA3 / PromC and the plasmid pHR: GPDH3. Initially, the enzymatic digestion of the plasmid pHR: GPDH3 was carried out with the enzymes *BamHI* and *NotI*, substituting the nuclear gene *CrGPDH3* for the reporter gene GUSPlus to generate the construction pHR: GUSPlus. After from the pRIA3 / Prom plasmid, the RIA3 inducibility region was amplified and by the commercial method of IN-Fusion HD Cloning it was fused upstream of the commercial HSP70A / RBCS2 promoter in pHR: GUSPlus to generate the pRHR: GUSPlus construct. The pSP124S (empty vector), pHR: GUSPlus and pRHR: GUSPlus constructs previously verified by sequencing were used in the biobalistic transformation of *C. reinhardtii* at concentrations of 1.19, 1.03 and 1.16 µg/µL. The putatively transformed clones were selected in liquid TAP medium + Zeocin (5 mg/L) after 3 reseeded and stored at 16 ° C in solid TAP medium. The advances in this project lay the basis for the understanding of inducible promoters and their inducers in green microalgae and the

development of new alternatives for the expression of recombinant proteins in *Chlamydomonas reinhardtii*.

INTRODUCCIÓN

Chlamydomonas reinhardtii, es considerada por muchos autores como un organismo modelo, debido a las ventajas que ofrece en cuanto a fácil cultivo, pocos requerimientos nutricionales, bajo costo de escalado, amplio conocimiento de la secuencia genómica, procesos fisiológicos y regulación osmótica, por ello, se ha mostrado gran interés en esta microalga y en su potencial para la obtención de proteínas recombinantes. En biotecnología, el uso de estos microorganismos ha permitido la obtención de biocombustibles, biofertilizantes, cosméticos, suplementos nutritivos, fármacos, biomasa y biorremediación de agua y suelos (Rivera *et al.*, 2011; Franklin & Mayfield 2004). Sin embargo, los niveles de expresión de genes en *C. reinhardtii* son relativamente bajos y los rendimientos de proteína soluble total (PST) generalmente no superan el 1%, valor mínimo requerido para considerar a *C. reinhardtii* como una plataforma biotecnológica de interés comercial (Aguilar *et al.*, 2013).

En los últimos años, los esfuerzos por obtener líneas transgénicas más eficientes en la expresión de genes heterólogos en *C. reinhardtii* se han incrementado. Algunas estrategias que facilitan los mecanismos de regulación y expresión de transgenes en cloroplasto y núcleo de *C. reinhardtii* son: el uso de codón optimizado en secuencias heterólogas para incrementar la compatibilidad con el genoma de *C. reinhardtii*, el uso de interferencia por ARN (miRNA) como método de elección en el silenciamiento genético de genes endógenos que interfieren con la expresión de transgenes y el uso de secuencias no codificantes como intrones y regiones promotoras potenciadoras de la expresión. La importancia de los promotores radica en su fortaleza y capacidad de expresión, ya sea de tipo constitutivo o inducible. Uno de los promotores más estudiado es el promotor doble constitutivo *HSP70A/RBCS2* de la proteína de choque térmico HSP70A y la subunidad 2 de la enzima Ribulosa bifosfato carboxilasa (Rubisco) (Schroda *et al.*, 2000). Sin embargo, los promotores inducibles han cobrado mayor importancia por su respuesta controlada a diferentes estímulos, tales como la respuesta a luz (*PSAD*; Fischer & Rochaix, 2001), cobre (*CYC6*; Quinn & Merchant, 1995), nitrato (*NIT1*; Ohresser *et al.*, 1997), vitamina B12 (*METE*; Helliwell *et al.*, 2014), sulfuro (*LHCBM9*; Sawyer *et al.*, 2015) y recientemente a sales (*CrGPDH3*; Beltran-Aguilar *et al.*, 2019).

Una de las rutas metabólicas más estudiadas en *C. reinhardtii* es la biosíntesis de lípidos, por su aplicación en la producción de biocombustibles como fuente de energía renovable. En la célula la biosíntesis de lípidos se asocia a la producción de componentes de membrana, almacenamiento de energía, moléculas de señalización y protección celular. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se han observado cambios fisiológicos en situaciones de estrés hiperosmótico con la consecuente síntesis y acumulación de glicerol como principal responsable del mecanismo de osmoregulación (Folch-Mallol *et al.*, 2004). Una respuesta similar se ha observado en *C. reinhardtii* con una tolerancia máxima de hasta 200 mM de NaCl (León & Galván, 1994). Aunque el mecanismo de respuesta en *C. reinhardtii* no ha sido completamente elucidado, se han identificado genes de activación inmediata en condiciones de estrés osmótico. En 2012 Herrera-Valencia *et al.*, identificaron y caracterizaron *in silico* tres genes homólogos del núcleo de *C. reinhardtii*, que codifican para la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH). La enzima GPDH participa en la formación de glicerol-3-fosfato (G3P) precursor en el metabolismo de glicerol y triacilglicéridos (TAG). Los genes homólogos GPDH se denominaron *CrGPDH1*, *CrGPDH2* y *CrGPDH3* respectivamente. De estos *CrGPDH1* representó un gen tipo constitutivo que se expresó de manera constante durante el ciclo de vida de la microalga, mientras que *CrGPDH2* y *CrGPDH3* representaron genes tipo inducibles que se expresaron bajo condiciones específicas de salinidad (Casais-Molina *et al.*, 2016; Herrera-Valencia *et al.*, 2012).

Los estudios de las secuencias promotoras de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* constituyen una herramienta potencial para el análisis y comprensión de los mecanismos de expresión de genes en *C. reinhardtii*, tanto de genes endógenos como exógenos en diferentes condiciones de estrés osmótico. Se ha demostrado por estudios anteriores, que el gen nativo *CrGPDH3* tiene respuesta inmediata en presencia de ciertas concentraciones de sales. La alta capacidad de inducibilidad de este promotor ha permitido que cepas de *C. reinhardtii* toleren concentraciones entre 5 y 200 mM de NaCl mediante la síntesis de moléculas osmoreguladoras como el glicerol (Casais-Molina *et al.*, 2016). En 2019, Beltran-Aguilar *et al.* (2019), lograron obtener mediante ingeniería genética el promotor híbrido *RIA3/PromC*. Este promotor contiene una región de inducibilidad río arriba de 577pb (*RIA3*) y una región mínima promotora de 938pb (*PromC*). El promotor híbrido *RIA3/PromC* es un derivado del gen nuclear *CrGPDH3* y

se ha demostrado que es capaz de conducir la expresión de un gen reportero en condiciones de estrés osmótico por sales como NaCl y KCl. Sin embargo, aún quedan interrogantes por responder sobre la región de inducibilidad RIA3 como los elementos responsivos que comprenden la región, la posible interacción con otras secuencias promotoras o su activación frente a otros inductores en la regulación transcripcional. Por tal razón este trabajo propone la obtención del promotor híbrido *RIA3/HSP70A/RBCS2* en la microalga verde *C. reinhardtii*, como punto de partida en la evaluación de la región de inducibilidad. De esta manera se espera contribuir en el conocimiento de genes inducibles como *CrGPDH3* en *C. reinhardtii* y en la ingeniería de promotores como herramienta biotecnológica en la expresión de genes heterólogos en la microalga verde *C. reinhardtii*.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Generalidades de *Chlamydomonas reinhardtii*

Las algas del género *Chlamydomonas* se clasifican taxonómicamente dentro del reino *Plantae*, subreino *Viridiplantae*, en la división *Clorofitas* de algas verdes. En estudios de filogenia se ha clasificado el género *Chlamydomonas* como el ancestro común de plantas superiores y animales. Las *Clorofitas* (algas verdes, incluida *Chlamydomonas*) divergieron de las *Estreptofitas* (plantas terrestres y sus estrechos familiares) hace más de mil millones de años. Muchos de los genes de *Chlamydomonas* se pueden rastrear en las plantas terrestres o en el ancestro común planta-animal en análisis comparativos de genomas. Específicamente, muchos de los genes de *Chlamydomonas* y angiospermas derivan de plantas verdes ancestrales, incluidos los genes asociados a la función de fotosíntesis y plastidios. Los genes compartidos por *Chlamydomonas* y animales son derivado del último ancestro común planta-animal y muchos de ellos se han perdido en las angiospermas, en particular los que codifican proteínas del flagelo eucariota (o cilio) y el asociado al cuerpo basal (o centriolo) (Merchant *et al.*, 2007).

Del género *Chlamydomonas* se han descrito alrededor de 500 especies, en medios de agua salada, dulce y diferentes tipos de suelo. Aunque científicamente solo se emplean unas cuantas especies, entre ellas *Chlamydomonas reinhardtii* como la más estudiada en laboratorio (Llopis y Loreto, 2007). Las principales cepas *C. reinhardtii* en laboratorio derivan de aislamientos hechos por G.M. Smith en 1945 a partir de suelo recolectado cerca de Amherst, Massachusetts. Desde entonces el estudio de diversos linajes de *C. reinhardtii* ha conllevado al entendimiento de los procesos fisiológicos, bioquímicos y moleculares de este organismo (Harris, 2001).

La microalga verde *C. reinhardtii* es un organismo eucariota unicelular de 10 µm de longitud aproximadamente. Presenta una pared celular, un par de flagelos, mitocondrias y un único cloroplasto basal que ocupa casi el 40% del volumen celular y rodea el núcleo. Además, contiene una mancha ocular rica en pigmentos de carotenos que capta la luz solar, como fuente de energía necesaria en los procesos de fotosíntesis (Figura 1.1). *C. reinhardtii* se caracteriza por ser un organismo de rápido crecimiento con un ciclo

biológico haploide-diploide. Las cepas silvestres de *C. reinhardtii* son fácilmente cultivables en medio líquido definido o medio agar a pH neutro, sin requerimiento de suplementos vitamínico u otros cofactores. Otra ventaja es su capacidad de crecer de manera fotoautotrófica, mixotrófica y heterotróficamente en presencia de acetato como fuente de carbono, a diferencia de otras especies del mismo género como *Chlamydomonas moewusii* y *Chlamydomonas eugametos*, lo que ha conllevado a diversos estudios y caracterización de cepas mutantes (Harris, 2001).

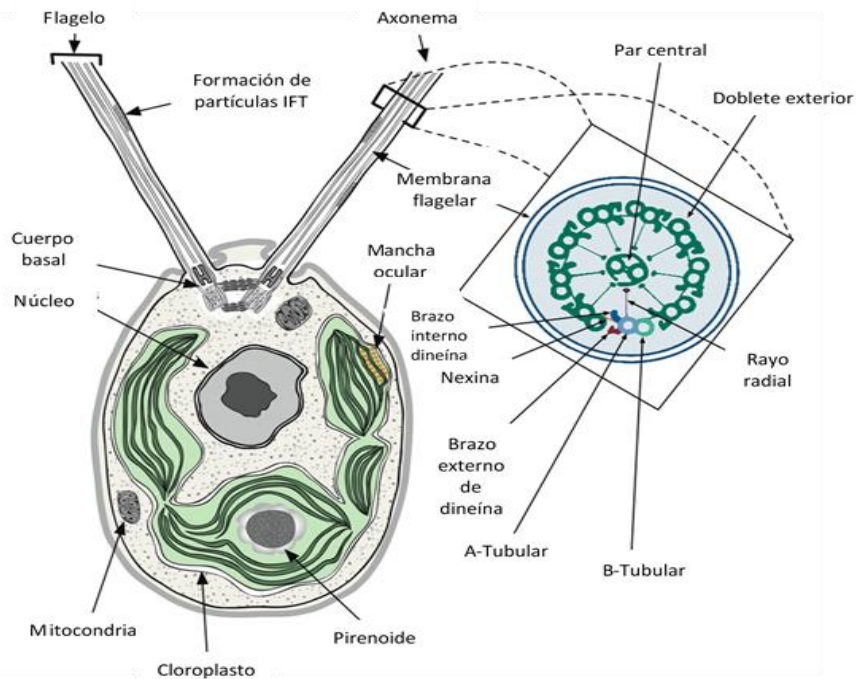


Figura 1.1: Estructura celular de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Merchant *et al.*, 2007).

1.2 Sistemas de producción de proteínas recombinantes

En los últimos años la demanda de proteínas recombinantes con interés biotecnológico ha orientado el estudio hacia sistemas biológicos cada vez más eficientes y económicamente sustentables. Los sistemas biotecnológicos mayormente empleados se conforman por microorganismos procariontes y células superiores de mamífero, sin embargo, ambos presentan deficiencias biotecnológicas y de producción. En el caso de bacterias el ensamblado de proteínas complejas es limitado o está ausente, debido a que carecen de las estructuras celulares encargadas de estos procesos post-

traduccionales. En cambio, las células de mamífero ofrecen la ventaja de producir proteínas recombinantes idénticas a las de origen humano, sin embargo, los procesos de escalado industrial generalmente demandan altos costos (Rosales-Mendoza *et al.*, 2012). Otra gran desventaja para estos sistemas es el posible riesgo para la salud, ya que pueden introducir endotoxinas, patógenos y virus durante la producción de proteínas terapéuticas (Franklin y Mayfield, 2004).

Por otro lado, las plantas transgénicas también han sido consideradas como sistemas productivos de proteínas recombinantes, donde los mecanismos de síntesis y modificaciones post-traduccionales son los propios de las células de mamíferos. Esto ha permitido la producción y ensamblado de proteínas multiméricas como anticuerpos, vacunas, hormonas y enzimas. Las plantas generalmente son reconocidas como sistemas seguros (*en inglés*, GRAS: generally recognized as safe) por presentar bajo riesgo de contaminación viral, priónica o bacteriana por endotoxinas. Sin embargo, algunos de los inconvenientes inherentes al cultivo de plantas transgénicas son los largos periodos de producción, la demanda de extensiones de tierra y la contaminación de cultivos circundantes por el flujo de genes mediante procesos de polinización (Franklin y Mayfield, 2004).

En cambio, las microalgas han emergido con un potencial revolucionario en la biotecnología. Las microalgas al igual que las plantas son considerados sistemas GRAS y presentan una serie de características que la hacen deseable como sistema comercial en la expresión de proteínas recombinantes. Tales son: las altas tasas de crecimiento y facilidad de cultivo, con la capacidad de realizar modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales (Surzycki *et al.*, 2009). Las microalgas también exhiben una eficiencia fotosintética superior, siendo aproximadamente tres veces más eficiente en el uso de la luz que las plantas superiores (Shimizu, 1996). Además, cuentan con un sistema de señalización y secreción que permite la localización y aislamiento de proteínas en los procesos de purificado. Eso sin contar la amplia variedad de elementos promotores de cloroplastos y núcleo bien caracterizados para estos organismos (Rosales-Mendoza *et al.*, 2012; Rochaix *et al.*, 2000).

Entre las principales aplicaciones de microalgas se encuentra la obtención de biocombustible, biofertilizantes, cosméticos, suplementos nutritivos, fármacos, biomasa y biorremediación. Bajo ciertas condiciones, muchas especies de microalgas pueden acumular altas concentraciones compuestos de interés comercial, tales como proteínas, lípidos, almidón, glicerol, pigmentos naturales o biopolímeros (Gómez Luna, 2007). En la tabla 1.1 se muestra una comparación entre los diferentes sistemas biotecnológicos empleados para la producción de proteínas recombinantes entre los que se incluyen las microalgas (Rivera *et al.*, 2011).

Tabla 1.1: Comparación entre los diferentes sistemas biotecnológicos para producción de proteínas recombinantes.

Características	Bacterias	Levaduras	Cultivo de Células Mamífero	Animales transgénicos	Plantas transgénicas	Microalgas
Tiempo de producción	Corto	Mediano	Largo	Largo	Largo	Corto
Costos de producción	Mediano	Mediano	Altos	Alto	Bajo	Muy bajo
Costo de escalamiento	Alto	Alto	Alto	Alto	Bajo	Muy bajo
Costo de almacenamiento	Económico -20°C	Económico -20°C	Costoso NL	Costoso	Económico TA	Económico TA
Propagación	Fácil	Fácil	Difícil	Factible	Fácil	Muy fácil
Tamaño de genes	Desconocido	Desconocido	Limitado	Limitado	No limitado	No limitado
Glucosilación	Ausente	Incorrecto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
Ensamble de proteínas	NO	NO	NO	SI	SI	SI

NL: Nitrógeno líquido; TA: Temperatura ambiente (Aguilar *et al.*, 2013; Rivera *et al.*, 2011).

1.2.1 *Chlamydomonas reinhardtii* como organismo modelo

Chlamydomonas reinhardtii es considerado un organismo modelo para la expresión de proteínas recombinantes. Entre los beneficios que presenta se incluyen el amplio conocimiento de su secuencia genómica y la eficiencia en metodologías de transformación para genomas de cloroplastos y nuclear. La expresión de proteínas con interés biotecnológico en *C. reinhardtii* ha cobrado mayor importancia en los últimos años, especialmente en la obtención de biofármacos, sin embargo, los rendimientos de

transgenes reportados hasta la fecha son relativamente bajos, y se requiere de mayores investigaciones para comprender los mecanismos de regulación y expresión de genes en esta microalga (Rosales-Mendoza *et al.*, 2012; Neupert *et al.*, 2009; Harris, 2001). La regulación osmótica, es uno de los mecanismos mayormente estudiados en *C. reinhardtii*. Como fuente atractiva en el análisis de nuevos genes, la regulación osmótica permite la activación y silenciamiento de secuencias promotoras que responden a condiciones de estrés osmótico, dirigiendo de esta manera la expresión genes adyacentes y consecuentemente la generación de transcritos y proteínas claves en los mecanismos de regulación osmótica (De Guglielmo y Fernandez Da Silva, 2016).

Algunos de los transgenes expresados hasta la fecha provienen generalmente de la transformación de cloroplasto como los ejemplos mencionados la tabla 1.2; sin embargo, para la expresión de proteínas complejas se requiere de transformación nuclear de *C. reinhardtii*. Actualmente la expresión de proteínas recombinantes a nivel nuclear presenta inconvenientes como el silenciamiento genético por problemas de inserción, modificaciones de genotipo y actividad proteolítica de proteasas que generan la baja expresión de transgenes o acumulación de proteínas recoombinales en *C. reinhardtii* (Bilas *et al.*, 2016).

Tabla 1.2: Transgenes de interés biotecnológico expresados en *C. reinhardtii*

Gen expresado	Tipo de proteína	Rendimiento de PST	Referencia
83K7C	Anticuerpo derivado de IgG1	0.1%	Tran <i>et al.</i> , (2009)
M-SAA	Suero bovino amiloide asociado a las glándulas mamarias	5.0%	Manuell <i>et al.</i> , (2007)
hGAD65	Descarboxilasa de ácido glutámico humana 65	0.25%-0.3%	Wang <i>et al.</i> , (2008)
appA	Gen de la fitasa de <i>E.coli</i>	3.7%	Yoon <i>et al.</i> , (2011)
IgG	Anticuerpo IgG de cadena simple fusionado a luciferasa	No reportado	Griesbeck <i>et al.</i> , (2006)

(Modificado de Rivera *et al.*, 2011).

Por ello se requieren nuevas estrategias para orientar la investigación hacia un sistema productivo más eficiente de *C. reinhardtii*, a fin de satisfacer necesidades de la industria biotecnológica (Griesbeck *et al.*, 2006).

1.3 Mecanismos de regulación génica de *C. reinhardtii* en respuesta a estrés osmótico

Una de las ventajas que ofrece *C. reinhardtii* como organismo modelo es su facilidad de adaptación a diferentes entornos. Esta característica es el resultado de diversos procesos evolutivos y fenómenos epigenéticos en respuesta al entorno cambiante. Muchos de los mecanismos involucrados en la adaptación se conservan entre eucariontes, como las respuestas a variaciones térmicas, estrés oxidativo y estrés por alta osmolaridad (Folch-Mallol *et al.*, 2004; Nguyen y Shiozaki, 2002). Entre las especies más estudiadas con relación a estrés osmótico se encuentran la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la microalga *Dunaliella salina*, las cuales han sido tomadas como organismos modelos para comprender los mecanismos de regulación génica que median la respuesta de *C. reinhardtii* en condiciones de estrés osmótico (Casais-Molina *et al.*, 2016; Perrineau *et al.*, 2014).

En estudios previos se ha reportado que *C. reinhardtii* puede tolerar hasta 200 mM de NaCl en su entorno circundante sin llegar a comprometer sus funciones vitales (León y Galván, 1994); concentraciones superiores a ésta, pueden producir reducción del tamaño celular, inhibición de los procesos fotosintéticos, disminución de las tasas de crecimiento y muerte celular (Perrineau *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha observado altas tasas de biosíntesis de glicerol y triacilglicéridos (TAG) en respuesta al estrés osmótico. El glicerol es un metabolito osmoregulador que previene la pérdida de la turgencia celular. En *S. cerevisiae* la biosíntesis de glicerol está regulada a nivel transcripcional principalmente por la vía de HOG (*en inglés*: High Osmolarity Glicerol) la cual involucra una serie de genes corriente abajo, como los genes GPD1 y GPD2 que codifican para la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa de levaduras (Folch-Mallol *et al.*, 2004). En *D. salina*, *D. viridis* y más recientemente en *C. reinhardtii* se han identificado genes GPDH homólogos involucrados en la biosíntesis de glicerol (Herrera-Valencia *et al.*, 2012).

Los mecanismos de percepción del déficit hídrico o estrés osmótico aún no han sido del todo descritos para estos organismos, sin embargo, se ha sugerido que la señal de estrés osmótico se genera a través de cambios físicos en la membrana celular y de la actividad de proteínas transmembranales que funcionan como osmosensores (Suescún-Bolívar y Thomé, 2015). Estas proteínas se caracterizan por producir cambios

conformacionales en su estructura en respuesta a la percepción del desbalance osmótico. Esto conduce a la activación de la cascada de señalización en la que se encuentran involucradas diferentes enzimas MAPK cinasas que fosforilan corriente abajo otras proteínas responsables de la activación de factores de transcripción y subsecuentemente de genes diana que median la respuesta al estrés osmótico. En la figura 1.2 se muestra el esquema general de la respuesta a estrés osmótico y la cascada de señalización de MAPK cinasas que conduce a la activación de genes diana en eucariotas (Karlusich *et al.*, 2014; González Cantó, 2018).

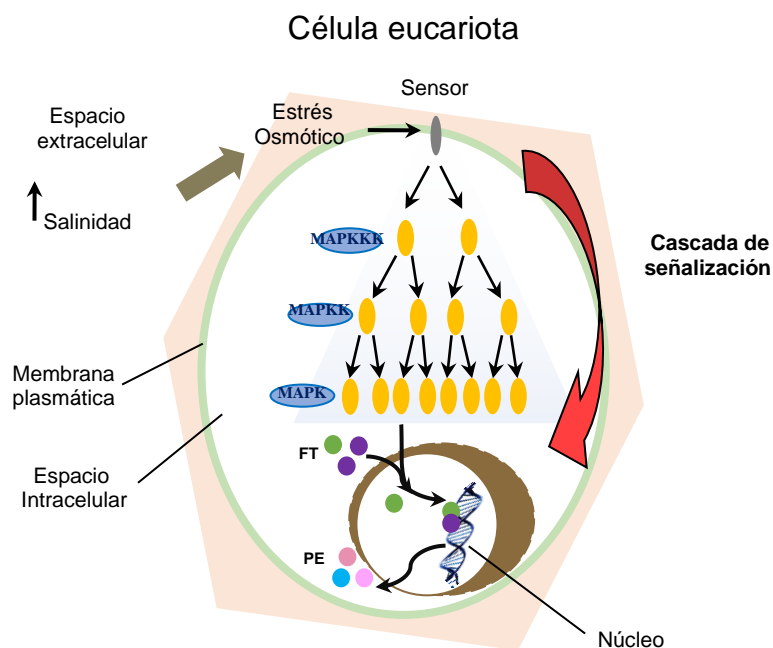


Figura 1.2: Esquema general de la respuesta a estrés osmótico y la cascada de señalización de MAPK cinasas que conduce a la activación de genes. FT: factores de transcripción. PE: proteínas efectoras (modificado de Karlusich *et al.*, 2014).

Se ha informado que la cascada de proteína-cinasa activada por mitógeno (MAPK), también conocida como la vía de señalización de glicerol de alta osmolaridad (HOG) en levaduras, se activa para regular la síntesis de glicerol durante la adaptación al estrés osmótico. Las funciones de MAPK están altamente conservadas en todas las células eucariotas y son reconocidas por su papel en la transducción de señales en respuesta al estrés. Las proteínas y genes MAPK se han estudiado fundamentalmente en plantas superiores como *Arabidopsis*, arroz, maíz, tabaco y más reciente en algas verdes como el gen *DsMPK* involucrado en la respuesta a shock hiperosmótico en *D. salina* (Lei *et*

al., 2008); la participación de una proteína tipo MAPK en *D. viridis* en respuesta al shock hipertónico (Jiménez *et al.*, 2004) y el gen *DtMAPK* involucrado en la regulación y expresión de *DtGPDH* en la síntesis de glicerol en *D. tertiolecta* (Zhao *et al.*, 2016). Así también en *C. reinhardtii* se han identificado genes homólogos MAPK como el gen *CrMAPK3* que regula la expresión de genes sensibles a la deficiencia de hierro (Fei *et al.*, 2017); y en presencia de diversas concentraciones de NaCl se ha observado niveles elevados de actividad cinasa regulada por la señal extracelular (ERK) y la cinasa N-terminal c-Jun (JNK) después de sufrir estrés osmótico, así como un aumento en el contenido de lípidos celulares (Yang *et al.*, 2018).

1.4 Promotor: secuencia reguladora de la transcripción

Entre los elementos regulatorios de la maquinaria de transcripción se encuentran los promotores. Un promotor es una región de ADN no codificante, que se localiza corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. El núcleo del promotor está constituido por regiones proximales TFBS (caja CAAT y GC) que posibilitan la unión de factores de transcripción y el anclaje de la enzima ARN polimerasa II para el ensamblado del complejo de iniciación de la transcripción. Este complejo es activado por regiones distales TFBS que regulan la actividad del núcleo del promotor mediante interacciones funcionales complejas, ya sea por activación o inhibición de la transcripción de un gen (Bilas *et al.*, 2016; De Guglielmo y Fernandez Da Silva, 2016). En la figura 1.3 se representan las secuencias de un promotor.



Figura 1.3: Representación esquemática de las secuencias de un promotor. Las secuencias se señalan en amarillo (De Guglielmo y Fernandez Da Silva, 2016).

La importancia de los promotores radica en el potencial de regulación sobre la expresión de genes de interés en organismo silvestres y en aquellos genéticamente modificados. Actualmente constituyen una herramienta biotecnológica, ya que pueden incrementar la actividad transcripcional o comportarse como controles de expresión en diferentes

estadios del organismo. Los promotores con base en su funcionamiento, tipo y nivel de expresión observados se clasifican en constitutivos (estado basal), estadio-específicos, inducibles (estímulos externos), sintéticos y/o híbridos, resultando de mayor interés aquellos que proporcionen mayores niveles de expresión (De Guglielmo y Fernandez Da Silva, 2016; Blazeck y Alper, 2013).

Entre las primeras secuencias de promotores que se estudiaron destacan los promotores de tipo constitutivos aislados de patógenos vegetales, como los promotores de Opinas de *Agrobacterium tumefaciens*, el *CaMV35S* aislado del virus de coliflor, el *CsVMV* del virus de mosaico de la yuca, el *BSV* del virus rayado de banano y el *FMV-35S* de un virus de coliflor relacionado con *CaMV35S*, entre otros ampliamente usados. Sin embargo, a pesar de ser promotores constitutivos de fuerte expresión, el uso de estas secuencias ha presentado algunos inconvenientes, como el efecto de silenciamiento genético en líneas transformadas, su procedencia de origen viral y la percepción negativa en cuanto a la transformación vegetal para la salud humana (Hull *et al.*, 2000). Por tal razón, una de las alternativas ha sido el estudio de promotores de origen vegetal, tanto en monocotiledóneas como dicotiledóneas. Entre estos destacan el promotor constitutivo de ubiquitina, proteína involucrada en la reparación de ADN y estructura de la cromatina (Plesse *et al.*, 2001; Christensen *et al.*, 1992) y el promotor constitutivo de actina, fundamental en el citoesqueleto vegetal (De Guglielmo y Fernandez Da Silva, 2016; McElroy *et al.*, 1990). Por otro lado, se encuentra los promotores inducibles como los promotores activados por estrés biótico: *NOS* del gen napolina sintetasa en *Agrobacterium* (An *et al.*, 1990), peroxidasa de arroz y el inhibidor de la peroxidasa II en arroz (Sasaki *et al.*, 2007), el promotor de la enzima RuBISCO, inducible por luz y de alcohol deshidrogenasa I, inducible por anaerobiosis (Saidi *et al.*, 2005); los promotores fruto-específico del gen ACC oxidasa y ACO sintasa involucrados en la biosíntesis y los promotores de respuesta a etileno E4 y E8 empleados en la identificación de elementos activadores y supresores en la expresión génica de plantas (De Guglielmo y Fernandez Da Silva, 2016; Hiwasa-Tanase *et al.*, 2012). La identificación y anotación *in silico* de algunas de estas secuencias han asentado las bases para la búsqueda de nuevas secuencias regulatorias en otros organismos eucariotas como *C. reinhardtii* (Romero-Campero *et al.*, 2016).

1.5 Promotores estudiados en *C. reinhardtii*

La importancia del estudio de promotores en microalgas se debe al alto potencial de este organismo como plataforma biotecnológica, pues además de las ventajas fisiológicas que ofrece, es de fácil transformación y puede desarrollar modificaciones postraduccionales de proteínas recombinantes complejas (Eichler-Stahlberg *et al.*, 2009). Sin embargo, *C. reinhardtii* presenta bajas tasas de expresión de transgenes (< 1% de proteína soluble total), limitante que ha impedido el uso de esta microalga como plataforma alternativa y comercial de la industria biotecnológica. Por tal razón uno de los principales objetivos en muchas investigaciones es la caracterización de nuevas secuencias promotoras, a fin de comprender los mecanismos de la regulación génica y de obtener mayor rendimiento en la expresión de transgenes (Aguilar *et al.*, 2013; Eichler-Stahlberg *et al.*, 2009).

1.5.1 Promotores constitutivos

Los promotores constitutivos son secuencias que regulan la expresión de un gen de manera basal y constante. La regulación de genes involucrados en procesos fisiológicos tal como la fotosíntesis, se produce de manera constitutiva. En el genoma de cloroplasto se han estudiado algunas secuencias de carácter constitutivo como el gen *rbcL* que codifica para la subunidad grande de la enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa (enzima clave en la fotosíntesis), el gen *atpA* que codifica la subunidad alfa ATPasa y el gen *psbA* que codifica para la proteína D1 del fotosistema II. Gran parte del estudio de estas secuencias y de sus regiones promotoras ha conducido eficazmente la expresión transgénica de proteínas en cloroplastos (Michelet *et al.*, 2011; Surzycki *et al.*, 2009; Griesbeck *et al.*, 2006). Por otro lado, una de las secuencias más estudiadas del genoma nuclear de *C. reinhardtii* es el gen *RBCS2* que codifica para la subunidad pequeña de la enzima ribulosa-1,5-bifostafa carboxilasa. El promotor del gen *RBCS2* se ha empleado en la expresión de un gran número de genes heterólogos como el gen reportero *ble* que aporta resistencia a la fleomicina y derivados (Stevens *et al.*, 1996), gen *aadA* resistente a espectinomina (Cerutti *et al.*, 1997) y el gen *arg7* que participa en la biosíntesis de arginina en cotransformación de cepas mutantes de *C. reinhardtii* (Auchincloss *et al.*, 1999). Así también el promotor β_2 TUB (Davies *et al.*, 1992) se ha empleado en la

expresión de genes foráneos como el gen *aph7'* que media la resistencia a higromicina B (Berthold *et al.*, 2002). Sin embargo, la poca eficiencia en la obtención de mutantes, fenotipos inestables y bajas respuestas de expresión en la mayoría de estos reportes, han conducido a otras investigaciones en busca de un sistema de promotores de mayor respuesta en la expresión de genes. Una alternativa ha sido el empleo de activadores transcripcionales como el promotor del gen *HSP70A* codificante de una enzima protectora a estrés térmico (*en inglés*: heat-shock proteins). La fusión del promotor *HSP70A* corriente arriba de otras secuencias promotoras como β_2 TUB, *HSP70B* y *RBCS2*, produce un incremento en la expresión de transgenes, fundamentalmente la fusión entre *HSP70A* y *RBCS2* (Schroda *et al.*, 2000; Schroda *et al.*, 2002). El promotor híbrido *HSP70A/RBCS2* ha sido ampliamente estudiado y utilizado en la expresión de proteínas recombinantes en *C. reinhardtii*, incluso se han generado vectores comerciales como pChlamy4 (Thermo Fisher Scientific) y pHsp70A/RbcSChlamy (Heitzer & Zschoernig, 2007). En la tabla 1.3 se nombran algunos ejemplos de genes expresados por la actividad del promotor doble constitutivo *HSP70A/RBCS2*.

Tabla 1.3: Genes expresados por la actividad del promotor doble constitutivo *HSP70A/RBCS2* en *C. reinhardtii*.

Gen	Rendimiento (%)	Referencia
<i>GFP</i>	No reportado	Wu <i>et al.</i> , (2008)
<i>crEPO</i>	100 μ g/L (0.03% peso seco)	Eichler-Stahlberg <i>et al.</i> , (2009)
<i>Xyn1</i>	0.25% PST	Rasala <i>et al.</i> , (2012)
<i>crOR</i>	1.4% PCT	Morikawa <i>et al.</i> , (2018)

PST: Proteína soluble total. PCT: Proteína celular total

1.5.2 Promotores inducibles

A diferencia de los promotores constitutivos que presentan una expresión constante y basal en la expresión de proteínas heterólogas, los promotores tipo inducibles pueden ser activados por diferentes estímulos, tanto endógenos (hormonas) como exógenos de tipo físico-mecánico, químico o biológico. Estos promotores posibilitan un control

espacial y temporal más preciso de la expresión de genes, sin llegar afectar todo el ciclo de desarrollo de un organismo (Bilás *et al.*, 2016).

Algunos ejemplos de promotores inducibles identificados en *C. reinhardtii* son: el promotor del gen nitrato reductasa (*nit1*) que codifica para una enzima involucrada en la asimilación de nitrato y el promotor *cyc6* (citocromo c6) inducible por anaerobiosis, ambos facilitan la expresión controlada y reversible de genes cambiando la composición química de los medios de la cultivo (Griesbeck *et al.*, 2006). También destaca el promotor LHCBM9 inducible en presencia de sulfuro (Sawyer *et al.*, 2015) y el promotor sulfoquinovosildiacilglicerol 2 (SQD2) inducible por deficiencia de fósforo (Iwai *et al.*, 2014). A bajas concentraciones de CO₂ se ha observado la actividad inducible del gen de la anhidrasa carbónica (*cah1*) (Kucho *et al.*, 1999) y en condiciones de deficiencia de hierro la actividad del gen *fea1* (Coutinho, 2017). La mayoría de estas secuencias se han podido evaluar gracias al uso de marcadores de selección y proteínas reporteras como arilsulfatasas, luciferasas, proteínas de fluorescencia como GFP (*en inglés*: Green fluorescent protein), genes de resistencia y genes de restauración en mutantes (Mussnug, 2015). Por otro lado, cabe destacar que la importancia de estudiar los promotores inducibles radica en la identificación de elementos regulatorios en *cis* que son los responsables de la especificidad de respuesta a estímulos. Al aislar estos elementos y unirlos en promotores sintéticos, se puede obtener una expresión transgénica controlada eficiente (Venter, 2007; Rushton *et al.*, 2002).

1.5.3 Promotores sintéticos e híbridos

Algunos estudios interesantes han descrito cómo los cambios en la arquitectura del promotor y el diseño específico de motivos conservados en *cis* pueden mejorar el control de la actividad génica espacio-temporal, regular transgenes y superar inconvenientes como el silenciamiento génico. En este sentido, los promotores sintéticos han sido una herramienta valiosa de la ingeniería genética en organismos modificados. Un promotor sintético contiene una región núcleo-promotora (región mínima) con sitios claves de reconocimiento para la ARN polimerasa II y factores de transcripción (FTs) que forman el complejo de inicio de la transcripción, además presenta múltiples repeticiones o combinaciones de elementos reguladores heterólogos río arriba (motivos *cis* o sitios

TFBS) que pueden actuar como potenciadores, activadores o represores de la transcripción. El diseño de estas estructuras sintéticas ha sido posible con el uso de herramientas bioinformáticas que incorporan bases de datos de secuencias regulatorias combinados con la función de modelos precisos *in silico* (Venter, 2007).

En un análisis de genes altamente expresados en *C. reinhardtii* se identificaron motivos *cis* en la región promotora. Estos motivos se usaron para generar un nuevo conjunto de promotores de algas completamente sintéticos (saps) que permitieron una alta expresión génica constitutiva dentro del núcleo de *C. reinhardtii*. Las regiones promotoras (-1000 a +50 nt desde el sitio de inicio de la transcripción) de estos genes se analizaron utilizando el software POWRS que identifica motivos basados no solo en secuencias enriquecidas sino también en la posición de estos elementos dentro de la región promotora. Las secuencias se diseñaron con un perfil GC similar a los promotores nativos y se evaluaron en cassettes de expresión junto al gen indicador de la proteína fluorescente mCherry. De los 25 saps generados en el estudio, 7 presentaron niveles de fluorescencia superiores al control (promotor constitutivo *HSP70A/RBCS2*), entre ellos el promotor sap11 con una mayor producción de proteína mCherry. En adición, un análisis más detallado del promotor sap11 reveló la presencia de un motivo esencial, el motivo CCCAT, el cual se encuentra altamente enriquecido a -65 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de 1,564 genes según análisis bioinformáticos. La eliminación de este motivo condujo a una reducción severa de la función sap11, lo que podría indicar que el motivo CCCAT participa en la metilación del ADN en su papel de regulación transcripcional. Los saps se basan en una columna vertebral promotora completamente sintética con una estructura de motivos reguladores *cis* formada a partir de información genómica basada en anotaciones y ensayos experimentales (Scranton *et al.*, 2016). Por otro lado, los promotores híbridos comprenden regiones promotoras endógenas. A la fecha el mejor promotor híbrido de *C. reinhardtii* es el promotor *HSP70A/RBCS2*. Se ha visto que la región *HSP70A* actúa como un potenciador del estado transcripcional, lo que aumenta la probabilidad de transcripción del promotor vecino (Lodha *et al.*, 2008). Esto se ha comprobado con la fusión a otras regiones promotoras como β 2TUB y *HSP70B* conduciendo la expresión de genes reporteros como *aadA* y *HSP70B* (Schroda *et al.*, 2002). Sería interesante ver si la fusión del

promotor híbrido HSP70A/RBCS2 a otras secuencias endógenas con motivos regulatorios *cis* potencia la expresión de genes heterólogos como alternativamente se ha visto en los promotores sintéticos (Scranton *et al.*, 2016).

1.6 Identificación de genes GPDH en *C. reinhardtii* y caracterización del gen *CrGPDH3*

La biosíntesis y metabolismo del glicerol-3-fosfato (G3P) es un proceso importante en las respuestas de microalgas y hongos al estrés ambiental. La acumulación de glicerol intracelular proporciona un ajuste osmótico al estrés salino, como en las microalgas marinas *Dunaliella spp.* y en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Driver *et al.*, 2017). Se ha comprobado que algunos genes de la ruta de biosíntesis de lípidos responden a cambios en el entorno extracelular, produciendo acumulación de metabolitos osmoreguladores como el glicerol (Goodenough *et al.*, 2014; Husic y Tolbert, 1986). Como en *C. reinhardtii* que puede alcanzar una tolerancia de hasta 200 mM de NaCl y producir altas concentraciones de glicerol (León y Galván, 1994). Algunos genes del metabolismo de lípidos involucrados en la respuesta sales en *C. reinhardtii* son los genes glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) y glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) (Duarte-Coello *et al.*, 2019; Casais-Molina *et al.*, 2016). De estos, los genes GPDH se han identificado en diversos organismos como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* y microalgas marinas *Dunaliella spp.* La enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa que codifican estos genes participa en la reducción de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a G3P, que finalmente se convierte en glicerol por la acción de una G3P fosfatasa (Driver *et al.*, 2017). En 2012 Herrera-Valencia y colaboradores identificaron y caracterizaron *in silico* tres genes homólogos GPDH de la microalga verde *C. reinhardtii*. Una isoforma de GPDH de *Dunaliella salina* *DsGPDH2* y dos de *Dunaliella viridis* *DvGPDH1* y *DvGPDH2* (previamente clonadas y caracterizadas) fueron empleadas como referencia en la identificación *in silico* de los genes *CrGPDH1*, *CrGPDH2* y *CrGPDH3* de *C. reinhardtii*. En este estudio, los genes de mayor relevancia fueron *CrGPDH2* y *CrGPDH3* por su carácter inducible a 200 mM de NaCl y mayor porcentaje de identidad (97.9%) entre sí con respecto a su homólogo *CrGPDH1* de carácter constitutivo (Herrera-Valencia *et al.*, 2012). Además, se logró identificar las secuencias promotoras de los genes inducibles *CrGPDH2* y *CrGPDH3*

mediante el mapeo experimental. Las secuencias se obtuvieron por el método RLM-RACE a partir ADNc amplificado por RT-PCR, donde la región promotora de *CrGPDH2* presentó un total de 2,873 pb y la región promotora de *CrGPDH3* presentó 3,252 pb, lo cual confirmó la participación de ambas regiones en la expresión de la enzima funcional GPDH involucrada en la producción de glicerol en respuesta al estrés osmótico (Casais-Molina *et al.*, 2016).

1.7 Promotor *RIA3/PromC* de *C. reinhardtii*

Como resultado del estudio de la región promotora del gen *CrGPDH3* se identificó al promotor mínimo, denominado PromC, así como una región de inducibilidad denominada RIA3. PromC fue capaz de conducir la expresión del gen reportero GUSPlus en tratamientos de 100 mM NaCl, sin embargo, el patrón de expresión fue diferente al del gen nativo *CrGPDH3* (Fig. 1.4). Posteriormente, se analizó la región río arriba RIA1 (-2,727 a -1,672) del promotor nativo *CrGPDH3* y se obtuvieron tres fragmentos de 500 pares de bases aproximadamente. La región completa RIA1 más los fragmentos RIA2 (-2,172 a -1,672), RIA3 (-2,727 a -2,150) y RIA4 (-2,400 a -1,900) se fusionaron a la región mínima inducible PromC y se evaluaron en cepas transformadas de *C. reinhardtii* a 100 mM de NaCl. En la figura 1.4 se muestran los resultados (Beltran-Aguilar *et al.*, 2019).

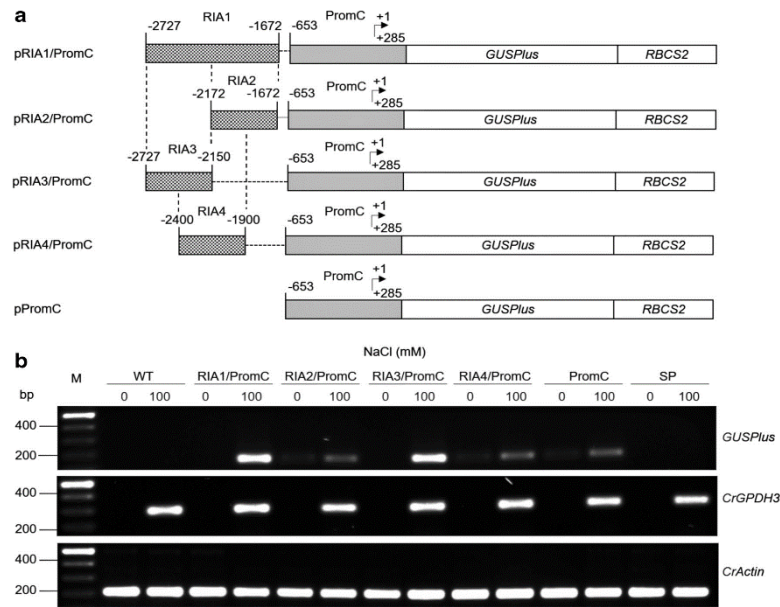


Figura 1.4: Análisis de delección del fragmento RIA1 del promotor nuclear *CrGPDH3* de *C. reinhardtii*. (a) Diagrama esquemático de las delecciones secuenciales del fragmento RIA1 del promotor *CrGPDH3*. (b) Análisis de transcritos por RT-PCR y visualización en gel de genes expresados en tratamientos con NaCl 100 mM. M= marcador de peso molecular 2 Log (New England Biolabs). WT=Cepa silvestre. SP= Vector vacío pSP124S (Beltran-Aguilar *et al.*, 2019).

Según los resultados obtenidos, la expresión del *GUSPlus* cuando fue conducida por *RIA2/PromC* y *RIA4/PromC* fue levemente inducible al tratamiento de 100 mM de NaCl y presentó una expresión menor que el gen nativo *CrGPDH3*, evaluada de manera cualitativa. Sin embargo, la expresión del *GUSPlus* cuando fue conducida por *RIA1/PromC* o *RIA3/PromC*, presentó una respuesta inducible similar al resultado de expresión del gen nativo *CrGPDH3*, evaluada de forma cualitativa. Lo anterior, puede estar asociado a la presencia de elementos regulatorios *en cis* de la transcripción de genes en la región RIA3, los cuales podrían ser responsivos a sales como NaCl y KCl, como indicó Beltran-Aguilar *et al.* (2019) al comparar dos tratamientos de 5 mM de NaCl y 100 mM de KCl en cepas transformadas con el promotor *RIA3/PromC*, conduciendo en ambos casos la expresión del gen reportero *GUSPlus* de manera inducible. Sin embargo, pese a los avances en el conocimiento del promotor híbrido *RIA3/PromC* y su respuesta a tratamientos de sales y estrés osmótico, poco se conoce sobre la región de inducibilidad RIA3 en cuanto a los mecanismos de activación, los elementos reguladores *en cis*, genes involucrados o la respuesta que pueda desempeñar si se

fusiona con otros promotores, como por ejemplo el promotor constitutivo comercial *HSP70A/RBCS2* (Schroda *et al.*, 2000).

1.8 Justificación

A pesar de las ventajas que ofrecen los promotores inducibles previamente estudiados en *C. reinhardtii*, aún no se cuenta con un promotor nuclear inducible fuerte que pueda ser utilizado en investigación y/o de forma comercial para la producción de proteínas recombinantes. En este sentido, el promotor híbrido *RIA3/PromC* del gen nuclear *CrGPDH3* ha demostrado un gran potencial para la expresión de proteínas recombinantes ya que es capaz de conducir la expresión génica de manera inducible con NaCl y KCl como inductores. Además, la región *RIA3* que le confiere inducibilidad al promotor puede ser empleada en la caracterización de otros promotores, mediante su fusión a promotores como por ejemplo el promotor comercial *HSP70A/RBCS2*. El contar con un promotor híbrido que incluya *RIA3/HSP70A/RBCS2* permitirá realizar investigación dirigida a responder la pregunta de si la región *RIA3* del promotor *CrGPDH3* es capaz de conferir inducibilidad a otros promotores.

1.9 Hipótesis

Es posible obtener un promotor híbrido *RIA3/HSP70A/RBCS2* para la transformación génica de *Chlamydomonas reinhardtii*.

1.10 Objetivos

1.10.1 Objetivo general

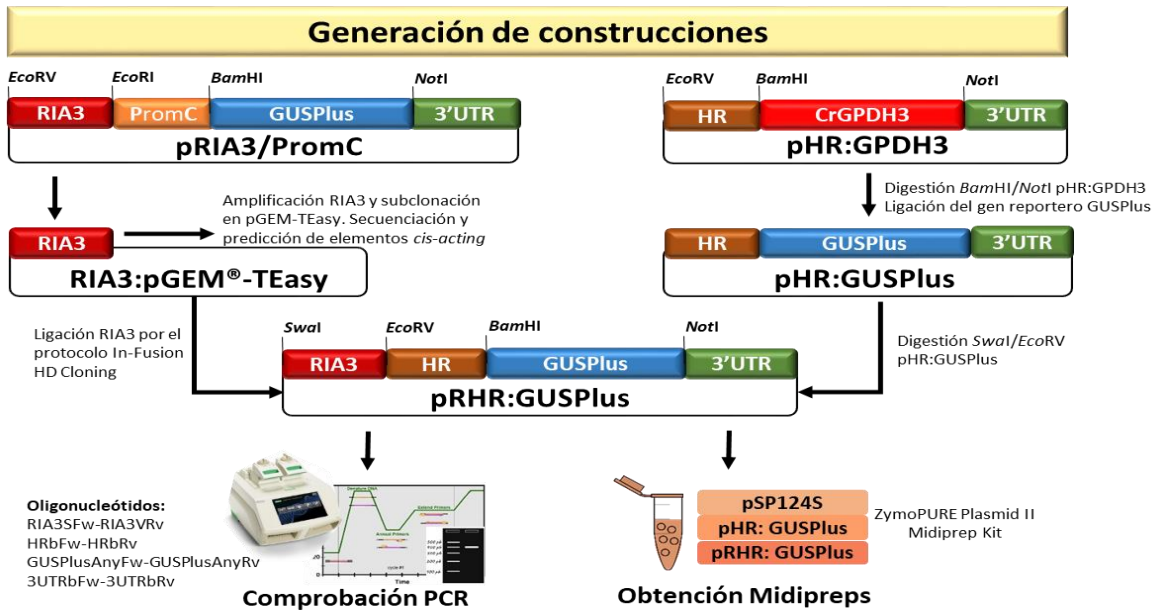
Obtener un promotor híbrido *RIA3/HSP70A/RBCS2* de la fusión entre *RIA3* del promotor *CrGPDH3* y el promotor constitutivo híbrido *HSP70A/RBCS2* para la transformación de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*.

1.10.2 Objetivos específicos

Generar un promotor híbrido que conste de la región *RIA3* del promotor *CrGPDH3* fusionado al promotor constitutivo *HSP70A/RBCS2*.

Generar clonas bombardeadas de *C. reinhardtii* con una construcción de expresión que contenga al promotor híbrido *RIA3/HSP70A/RBCS2*.

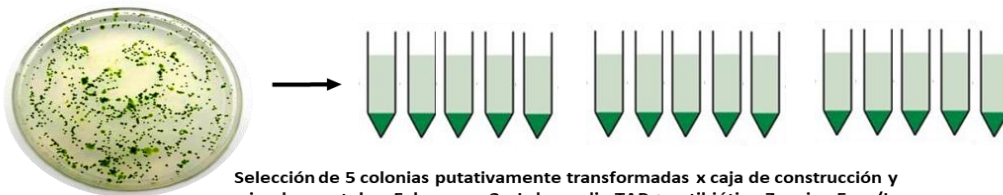
1.11 Estrategia experimental



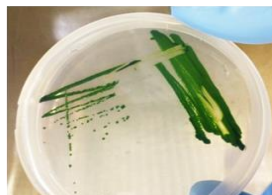
Transformación de *C. reinhardtii* por Biobalística



Selección de cepas putativamente transformadas



A los 7 días de cultivo se toman 50 µL de cada cultivo y se plaquea en cajas de TAP sólido + zeocina 5mg/L como resguardo para posterior análisis



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Obtención de la construcción pRHR: GUSPlus

2.1.1 Obtención de la construcción pHR:GUSPlus

De una alícuota original de Casais-Molina y colaboradores (2016), (plásmido pHR: GPDH3) se tomaron muestras para la cuantificación, digestión y detección de las secuencias *HSP70A/RBCS2* (promotor constitutivo) y el 3'UTR de *RBCS2* (terminador). De acuerdo con esto se diseñaron nuevos oligonucleótidos para la detección por PCR y secuenciación de las muestras. Los oligonucleótidos diseñados se denominaron HRbFw 5'-ACGGTGACCTCCACTTTTCAG-3' (sentido, 20 pb, Tm=64.2°C) y HRbRv 5'-CGGATAAGGGTTGCAAGTGCTC-3' (antisentido, 22 pb, Tm=68.6°C) para un amplicón esperado de 183 pb del promotor constitutivo y los oligonucleótidos 3UTRbFw 5'-CGGTGGATGGAAGATACTGC-3' (sentido, 20 pb, Tm=64.4°C) y 3UTRbRv 5'-ATGGAGAAAGAGGCCAAAATC-3' (antisentido, 21 pb, Tm=63.1°C) para un amplicón esperado de 153 pb del terminador. Adicionalmente se evaluó otra alícuota de Beltran-Aguilar y colaboradores (2019) que contenía el plásmido pRIA3/PromC. Las muestras procedentes de esta alícuota se emplearon para la detección del gen reportero GUSPlus con los oligonucleótidos GUSPlusAnyFw y GUSPlusAnyRv que generan un amplicón de 159 pb. Todos los oligonucleótidos empleados para la obtención de las construcciones se muestran en el **Anexo 1**.

Una vez identificadas las secuencias se procedió en la construcción del plásmido pHR:GUSPlus. Primero, se realizó la digestión enzimática de los plásmidos pHR: GPDH3 y pRIA3/PromC con 600 ng de cada muestra, 1 µL (20 000 U/mL) de la enzima *BamHI* (NEB), 1 µL (20 000 U/mL) de la enzima *NotI* (NEB), 2 µL de buffer NEB 3.1 y H₂O ultrapura a completar 20 µL de reacción en tubo Eppendorf de 1.5 mL. La reacción se colocó en el Eppendorf™ Thermoblock a temperatura óptima de 37 °C durante 2 horas (una hora por cada enzima). Al finalizar las muestras se evaluaron en gel de agarosa al 1.2 %. Las bandas obtenidas se cortaron con ayuda de un escalpelo, se aislaron y purificaron por el protocolo comercial QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (QIAGEN). Los fragmentos purificados se cuantificaron para posterior ligación.

La ligación del gen reportero GUSPlus de pRIA3/PromC y el vector linealizado procedente de pHR: GPDH3 se realizó en la relación 1:3 vector-inserto, con 9.52 μL de vector linealizado (77.4 ng), 7.81 μL de inserto (75.8 ng), 0.67 μL (3 U/ μL) de la enzima T4 DNA Ligasa (PROMEGA) y 2 μL de buffer 10X (PROMEGA) a volumen final de 20 μL . El tiempo de incubación fue de 16 horas a temperatura de 4 °C. Al día siguiente de la reacción de ligación se tomó 50 ng de ADN para la transformación de células competentes *E. coli* DH10B. Luego del proceso de transformación las células se estriaron con asa codada en platos de Petri que contenían medio LB sólido con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los platos se dejaron en incubación durante toda la noche a temperatura de 37 °C (**Anexo 2**). Y al día siguiente de las colonias posiblemente transformadas se seleccionaron 5 clonas y se cultivaron en 4 mL de medio líquido LB con ampicilina (100 mg/L). El cultivo se dejó en incubación durante toda la noche a temperatura de 37 °C para posterior extracción de ADN plasmídico (ADNp). El procedimiento de extracción de ADNp se realizó por el protocolo comercial High Pure Plasmid Purification Kit (ROCHE). Al finalizar se cuantificaron las muestras y evaluaron por digestión enzimática. Estas se visualizaron en gel de agarosa al 1.2 % y las clonas positivas se mandaron a secuenciar.

2.1.2 Subclonación de la secuencia RIA3 en pGEM-T Easy

De los oligonucleótidos previamente diseñados por Beltran-Aguilar y colaboradores (2019), RIA3Fw 5'-TAAGATATCTGTCGCAATTCACACATCCAC-3' (sentido, 30 pb, $T_m=68^\circ\text{C}$) y RIA3Rv 5'-CTAGAATTCTATGCCTAACGCCCATGCTCGG-3' (antisentido, 31 pb, $T_m=76^\circ\text{C}$) que amplifican la secuencia conocida RIA3 (577 pb) del gen nuclear *CrGPDH3* se modificaron los sitios de restricción, dando lugar a los oligonucleótidos RIA3SFw 5'-TAAATTTAAATTGTCGCAATTCACACATCCAC-3' (sentido, 32 pb, $T_m=71.0^\circ\text{C}$) y RIA3VRv 5'-CTAGATATCTATGCCTAACGCCCATGCTCGG-3' (antisentido, 31 pb, $T_m=74.7^\circ\text{C}$), los cuales presentan sitios de restricción para las enzimas *SwaI* y *EcoRV* (**Anexo 1**). Los oligonucleótidos modificados RIA3SFw y RIA3VRv se evaluaron con las herramientas bioinformáticas Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), OligoAnalyzer Tool (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) y el programa SerialCloner (versión 2.6.1). Para la amplificación del fragmento RIA3 se utilizó como plantilla el plásmido

pRIA3/PromC. Inicialmente se realizó una PCR de identificación con un programa de un ciclo de 95 °C por 3 min, 34 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 1 min y un ciclo final de 72 °C por 10 min. La reacción se llevó a cabo en el Thermociclador (BIO-RAD, USA) y la enzima empleada fue Taq DNA polimerasa de Thermo Scientific.

Una vez confirmada la presencia de RIA3 (amplicón de 577 pb) en la plantilla pRIA3/PromC, se procedió con la amplificación de RIA3 por PCR usando la enzima Expand Long Template PCR (ROCHE). El programa de PCR consistió en un ciclo de 95 °C por 3 min, 20 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 68 °C por 1 min y un ciclo de 68 °C por 10 min. El amplicón esperado de 577 pb se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1.2 % y con ayuda de un escalpelo se procedió a aislar la banda para purificar por el protocolo comercial QIAquick Gel Extraction Kit Protocol (QIAGEN) http://www.indiana.edu/~lchenlab/protocol_files/agarose_gel_extraction.pdf. Luego el fragmento purificado fue ligado al vector comercial pGEM-T Easy (PROMEGA) en la relación 1:5 vector-inserto con 1 µL de vector linealizado (50 ng), 16 µL de inserto (33.6 ng), 1 µL (20 000 U/mL) de enzima T4 DNA ligasa y 2 µL buffer 10X de New England Biolabs (NEB). La reacción transcurrió durante toda la noche a incubación de 16 °C. Al día siguiente se realizó la transformación de células competentes *E. coli* DH10B con 1 µL de la reacción de ligación. El procedimiento se realizó como describe el **Anexo 2** empleando medio de selección con antibiótico. De las colonias transformadas se seleccionaron 5 clonas y se colocaron en medio líquido LB con ampicilina (100 mg/L). El cultivo se dejó en incubación a 37 °C toda la noche para posterior extracción de ADN plasmídico (ADNp) por el protocolo comercial High Pure Plasmid Purification Kit (ROCHE). Al finalizar se cuantificaron las muestras y evaluaron en gel de agarosa al 1.2 %.

La comprobación de las muestras con el plásmido purificado pPGEM-TEasy/RIA3 se realizó por digestión enzimática. La reacción se llevó a cabo a partir de 200 ng de muestra, 0.5 µL (20 000 U/mL) de la enzima *SwaI* (NEB), 0.5 µL (20 000 U/mL) de la enzima *EcoRV* (NEB), 1 µL de buffer NEB 3.1 y H₂O ultrapura a completar 10 µL de reacción en el tubo eppendorf de 1.5 mL. La reacción se colocó en el EppendorfTM Thermoblock primero a temperatura óptima de la enzima *SwaI* (25 °C durante 1 hora) y luego a temperatura óptima de la enzima *EcoRV* (37 °C durante 1 hora). Al finalizar las

muestras se evaluaron en gel de agarosa al 1.2 % y las clonas positivas se mandaron a secuenciar.

2.1.3 Clonación de RIA3 mediante el protocolo comercial In-Fusion HD Cloning Kits

Con el objetivo de insertar la secuencia RIA3 corriente arriba del promotor constitutivo de pHR: GUSPlus se empleó el protocolo comercial de In-Fusion HD Cloning Kits (Takara Bio USA, Inc.). El kit de clonación In-Fusion HD está diseñado para la clonación rápida y direccional de uno o más fragmentos de ADN en cualquier vector. El método se basa en el uso de una enzima recombinasa que fusiona fragmentos de ADN (como insertos generados por PCR y vectores linealizados) de manera eficiente y precisa al reconocer solapamientos de 15 pb en sus extremos. Las superposiciones de 15 pb se pueden obtener diseñando cebadores para la amplificación de las secuencias deseadas. El protocolo de In-Fusion HD Cloning Kits se puede encontrar en el siguiente link: https://www.takarabio.com/assets/documents/User%20Manual/In-Fusion%20HD%20Cloning%20Kit%20User%20Manual_121416.pdf.

A partir de los oligonucleótidos RIA3SFw y RIA3VRv previamente modificados para amplificar RIA3 se adicionaron 15 pb sentido y antisentido que se corresponden con los extremos de la secuencia del vector linealizado. Los nuevos oligonucleótidos RIA3SFwPlus 5'-CTCCTTCTGGCATTAAATTGTCGCAATTCACACATCCAC-3' (sentido, 40pb, Tm=80.7 °C) y RIA3ERevPlus 5'-CAGCGAGGTACCGATATCTATG CCTAACGCCCATGCTCGG-3' (antisentido, 40pb, Tm=84.7 °C) se emplearon para obtener el amplicón de RIA3 (577pb) con los correspondiente 15 pb sentido y antisentido adicionales. La reacción de PCR se realizó con un programa de 95 °C por 3 min, 25 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 68 °C por 1 min y un ciclo de 68 °C por 10 min. La reacción se realizó con 0.33 µL (50 ng) de la plantilla RIA3: pGEM-T clona #1 (conc.: 152.6 ng/µL y A_{260/280} 1.94), 1 µL de cada oligonucleótido, 1 µL de dNTPs, 5 µL de buffer PCR 10X, 0.3 µL de la enzima Expand Long Template y H₂O ultrapura (Invitrogen) a completar 50 µL de reacción. Al finalizar, el producto de PCR se purificó por el protocolo comercial de High Pure PCR Product Purification Kit (ROCHE), se cuantificó y visualizó en gel de agarosa 1.2 %.

La digestión de pHR: GUSPlus se realizó a partir de 500 ng de muestra, 1 μ L (20 000 U/mL) de la enzima *SwaI* (NEB), 1 μ L (20 000 U/mL) de la enzima *EcoRV* (NEB), 2 μ L de buffer NEB 3.1 y H₂O ultrapura a completar 20 μ L de reacción en el tubo eppendorf de 1.5 mL. La reacción se colocó en el Eppendorf™ Thermoblock primero a temperatura óptima de la enzima *SwaI* (25 °C durante 1 hora) y luego a temperatura óptima de la enzima *EcoRV* (37 °C durante 1 hora). Al finalizar, el producto de la digestión enzimática se purificó por el protocolo comercial de High Pure PCR Product Purification Kit (ROCHE), se cuantificó y visualizó en gel de agarosa 1.2 %.

La enzima In Fusion recombinasa 5X Premix se reconstituyó con 10 μ L de reacción que contenían la relación vector-inserto 1:2 con, 7 μ L (70 ng) de vector linealizado, 1 μ L (15 ng) del inserto (dil 1:10) y 2 μ L de H₂O de ultrapura (Invitrogen). El control positivo de la reacción se preparó de acuerdo al protocolo comercial y el tiempo de incubación fue 15 minutos a 37 °C y luego 15 minutos a 50 °C. Transcurrido el periodo de incubación se procedió a la transformación de células competentes *E.coli* DH10B con 2.5 μ L de muestra control y muestra de análisis (**Anexo 2**). Luego de las colonias transformadas se seleccionaron 5 clonas y se colocaron en 4 mL de medio líquido LB con ampicilina (100 mg/L). El cultivo se dejó en incubación de 37 °C toda la noche para posterior extracción de ADN plasmídico (ADNp) por el protocolo comercial High Pure Plasmid Purification Kit (ROCHE). Al finalizar se cuantificaron las muestras, evaluaron en gel de agarosa al 1.2 % y las clonas positivas se mandaron a secuenciar.

La verificación de las muestras con la construcción pRHR: GUSPlus se realizó por digestión enzimática, PCR y secuenciación de los fragmentos correspondientes. En la figura 2.1 se muestra el esquema de obtención de pRHR: GUSplus.

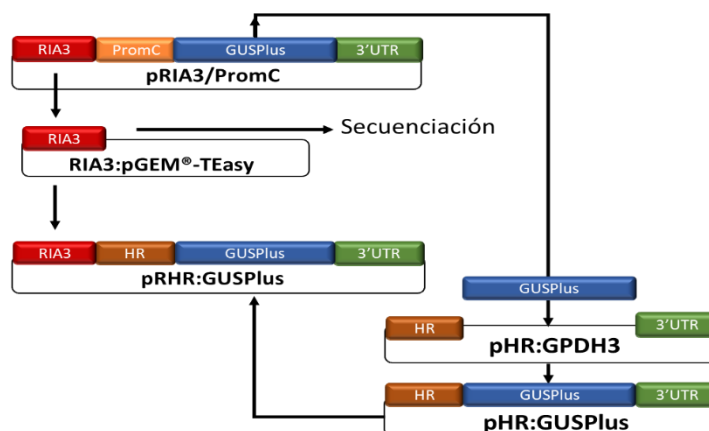


Figura 2.1: Esquema de obtención de pRHR:GUSPlus

2.1.4 Secuenciación de los productos de PCR

Una vez comprobadas las construcciones de interés se procedió con la secuenciación. Para ello de cada construcción se tomó una alícuota con una concentración final de 500 ng de ADNp y 2.5 μ L de oligonucleótido 10 μ M (5 picomoles/ μ L) en un volumen final de 10 μ L para secuenciar. Las muestras fueron enviadas a la compañía MacroGen, Inc. Corea del Sur para su secuenciación. Los cromatogramas resultantes de cada secuencia estudio fueron ensamblados, editados y alineados usando los programas SeqMan, EditSeq y MegAlign, respectivamente, en el paquete de software Lasergene versión 7.2 (DNASTAR, EE. UU.). Para el análisis de secuencias se ensambló una plantilla *in silico* de pRHR: GUSPlus con el programa bioinformático SerialCloner versión 2.6.1.

2.1.5 Electroforesis en gel de agarosa

El análisis de muestras para la obtención de pHR: GUSPlus y pRHR: GUSPlus se realizó por el ensayo cualitativo de electroforesis con gel de agarosa (1.2 %), buffer TAE 1X (Tris-acetato-EDTA) y 1 μ L de GelRed 50X (Biotium). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 85V durante 30 minutos y para la lectura se empleó el transiluminador de luz ultravioleta Bio-Rad Gel Doc™.

2.2 Cepas y condiciones de cultivo

La cepa a emplear de *C. reinhardtii* CC-125 (mt+) proviene del Centro de Chlamydomonas (www.chlamy.org) y actualmente se encuentra depositada en el laboratorio de microalgas y cultivos tropicales de la unidad de Biotecnología del CICY. En los ensayos experimentales del laboratorio se emplearon cepas de *C. reinhardtii* cultivada en medio líquido Tris- Acetato-Fosfato (TAP por sus siglas en inglés) a 25°C ± 2 bajo un ciclo de 16:8 horas (luz/oscuridad). La intensidad luminosa que se aplicó fue de 90 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y la agitación rotatoria de 140 rpm.

2.3 Transformación de *C. reinhardtii* por el método de Biobalística

El método de transformación por biobalística se desarrolló a partir de una colonia de la cepa silvestre de *C. reinhardtii*. La colonia se inoculó en un matraz de 250 mL con 50 mL de medio TAP líquido. A los 7 días de cultivo se tomó una muestra para conteo celular en cámara de Neubauer y una vez conocida la concentración celular se procedió con la centrifugación del cultivo a 4 °C, 3,200 RCF por 5 minutos. Con el valor estimado de concentración celular, se resuspendió la biomasa en medio líquido TAP de manera tal que quedaran 40 x 10⁶ de células totales por placa de Petri. Los platos de Petri que contenían medio TAP semisólido se estriaron con el volumen equivalente a 40 x 10⁶ de células totales, se dejaron secar durante una hora y luego se guardaron 24 horas en oscuridad.

Para el bombardeo se utilizó una solución con partículas de oro de 0.6 μm de diámetro y se prepararon midiprep con las construcciones correspondientes a una concentración deseada de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. La obtención de midipreps se logró a partir de un volumen de trabajo de 50 mL del cultivo de *E. coli* DH10B empleando el kit ZymoPURE Plasmid II Midiprep Kit (Zymo Research); al finalizar las muestras obtenidas se cuantificaron en el espectrofotómetro y almacenaron a -20 °C para su posterior uso. El recubrimiento de las partículas de oro (Au) y preparación de macroacarreadores se realizó el día del evento de transformación, así también como la preparación de los platos de cultivo. El ensayo se realizó de acuerdo al protocolo del **Anexo 3** y como control se empleó el plásmido experimental pSP124S. Los platos que contenían células transformadas y los controles se dejaron en el cuarto de cultivo por 24 horas aproximadamente en exposición de luz

indirecta. Transcurridas las 24 horas se recuperaron las células transformadas mediante el lavado de cada una de los platos con 2.1 mL de medio TAP líquido, recuperando la mayor cantidad de células posibles para posterior plaqueo en platos de Petri con medio TAP semisólido y el antibiótico de selección zeocina 5 mg/L. El plaqueo se realizó con el asa de siembra, esparciendo todas las células por la superficie de los platos de Petri. Luego los platos se dejaron en incubación en el cuarto de cultivo a condiciones de fotoperiodo 16 horas luz/ 8 horas oscuridad hasta la aparición de colonias posiblemente transformadas. De cada plato de transformación se picaron 5 colonias y se pusieron a crecer en medio de selección con antibiótico. Las colonias putativas transformadas se resembraron en nuevos platos y se almacenaron a 16 °C para posterior análisis.



CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Predicción de elementos regulatorios *en cis* de la región RIA3 en relación con la respuesta a sales

Poco se conoce de los elementos regulatorios *en cis* que contiene la región de inducibilidad RIA3. En una predicción anterior del promotor *CrGPDH3*, Aguilar *et al.*, 2013 identificaron elementos regulatorios encontrados previamente en promotores de plantas como la caja TATA y CAAT, pero ningún elemento *en cis* relacionado con la respuesta a sales fue identificado. En un nuevo análisis de la región RIA3 se empleó la plataforma bioinformática New PLACE (versión 30.0) para la búsqueda de elementos regulatorios *en cis*. New PLACE es una herramienta disponible en línea permite la comparación de secuencias contra una base de datos de elementos *cis-acting* identificados en plantas. Debido a la estrecha relación filogenética entre la microalga verde *C. reinhardtii* y las plantas superiores (Merchant *al et.*, 2007), muchas de las secuencias conservadas de plantas se han identificado como secuencias homólogas en *C. reinhardtii*. El análisis comparativo entre la región de inducibilidad RIA3 (577 pb) y la base de datos de New PLACE indicó la presencia de elementos regulatorios *cis-acting* como el motivo CAATBOX1(CAAT) secuencia comúnmente localizada en la región promotora de genes que es reconocida por proteínas tipo CBF generando el complejo CBF-CAAT esencial para una óptima actividad transcripcional (Laloum *et al.*, 2013); el motivo WRKY71OS (TGAC) al cual se unen proteínas WRKY que parecen estar involucrados en la regulación de varios procesos fisiológicos en respuesta a patógenos o diferentes tipos de estrés como sequía y salinidad en plantas (Eulgem *et al.*, 2000). Y por último se identificó el motivo DRE2COREZMRAB17 (ACCGAC) el cual se ha comprobado que participa en el control de respuesta de genes inducibles por estrés como sequía, bajas temperaturas y alta salinidad en plantas (Dubouzet *et al.*, 2003). En la tabla 3.1 se muestran los resultados.

Tabla 3.1 Resultados de la búsqueda de elementos regulatorios en *cis* predichos por el programa New PLACE en la región de inducibilidad RIA3 en relación con la respuesta a sales.

Nombre del elemento <i>cis</i>	Secuencia del elemento <i>cis</i>	Número de elementos	Localización	Referencia
CAATBOX1	CAAT	4	Secuencia común encontrada en promotores de plantas	Busk et al., (1997); Laloum et al., (2013)
WRKY71OS	TGAC	3	Secuencia encontrada en promotores de plantas	Eulgem et al., (2000)
DRE2COREZMRAB17	ACCGAC	1	Secuencia encontrada en promotores de plantas	Dubouzet et al., (2003)

A= Adenina, C= Citocina, G= Guanina, T= Timina

Los motivos CAATBOX1 en color azul y WRKY71OS en color rojo, se localizaron en la secuencia de RIA3, incluso en la ubicación de 389 pb estos elementos se encuentran próximos entre sí como se muestra en la figura 3.1, mientras que el motivo DRE2COREZMRAB17 en color verde, se localizó una sola vez en la posición de 89 pb de la secuencia de RIA3 de 577 pb.

```

TGTCGCAATTCACACATCCACATGTCGCAACCTGACCATGTCAAATAACT < 50
TGCAAGCTGCTATATGTAGCCTGTGCGTGCCGGTGCATACCGACCAAGTG < 100
AGAGTGTTGCGTTTGCCTGTATGCGTTTTTGTCTCACCAGTCATGAAC < 150
TGCCCAACCCTTTC AAGAATGTATGTTCTAATGCCAAGGCGTTGTTATG < 200
CGCCAACCTTCTATGCTTGCTTGAGGCCGGTGCCTTCTGGAACAAGCTG < 250
TTTGAGAGCTTCAACAATTGCGCACTGGCAGCAGGTCTTAGACCAGCGTA < 300
CAGTAGAATCACGAGTGGGTGACGGGCTGATGCCGGATGATGCTCAAGGC < 350
TTGCACAGTGGGGTAGGTGCACATTTTTGAAACACTAATGACAATGATTG < 400
CACACAAAACGCTTGCTGCATGTTGTCAAATGGAAATTCAATCATGGAGC < 450
AACGGGGCTTGGGTGAGGTGGGACTGGTGG AAGGGTGTGCGTGTCTTTG < 500
ATCAAATCGTTTCTCTTTCTG CAGCGCTGGGGGTGTGCCGGGGTTTGG < 550
GGTTTCCGAGCATGGGCGTTAGGCATA < 577

```

Figura 3.1: Localización de los elementos regulatorios en *cis* identificados en RIA3 en relación con la respuesta a sales. Los motivos CAATBOX1 (CAAT) se muestran en color azul, WRKY71OS (TGAC) en color rojo y DRE2COREZMRAB17 (ACCGAC) en color verde.

3.2 Generación de los plásmidos pHR:GUSPlus y pRHR:GUSPlus

3.2.1 Generación del pHR:GUSPlus

Para la obtención del pHR:GUSPlus, es decir, el plásmido que contiene al promotor híbrido HSP70A/RBCS2 unido al gen *GusPlus*, se tomó una alícuota de una muestra original del pHR:GPDH3 de Casais-Molina y colaboradores (2016) que contenía una construcción de expresión que incluye al promotor híbrido *HSP70A/RBCS2* y al gen *CrGPDH3* (HR:GPDH3), así como una alícuota de una muestra original del pRIA3/PromC de Beltran-Aguilar y colaboradores (2019) que contiene una construcción que incluye al promotor *RIA3/PromC* unido al gen reportero GUSPlus. A ambas muestras se les realizaron ensayos de comprobación para la identificación de las secuencias de interés. La muestra correspondiente a pHR:GPDH3 se evaluó mediante ensayos por enzimas de restricción, mientras que la muestra de pRIA3/PromC se evaluó mediante ensayos de PCR. El resultado de concentración del plásmido pHR:GPDH3 indicó un valor de 427 ng/ μ L y $A_{260/280}$ 1.89, mientras que el plásmido pRIA3/PromC presentó una concentración de 221.2 ng/ μ L y $A_{260/280}$ 1.8. En la figura 3.2 se muestran los resultados del análisis de restricción con las enzimas *SwaI*, *EcoRV*, *BamHI* y *NotI*. Por otro lado, en la figura 3.3 se muestran los resultados del ensayo de PCR con los oligonucleótidos GUSPlusAnyFw y GUSPlusAnyRv para la detección del amplicón de 159 pb correspondiente al gen reportero GUSPlus de pRIA3/PromC.

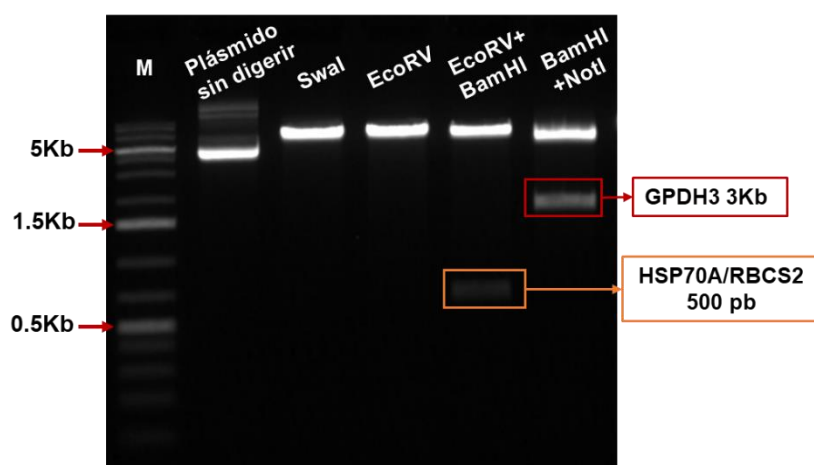


Figura 3.2: Electroforesis del análisis de restricción de pHR:GPDH3 con las enzimas *SwaI*, *EcoRV*, *BamHI* y *NotI*. M= marcador de peso molecular 2 Log (New England Biolabs). Los carriles

con una enzima de restricción muestran el vector linealizado y los carriles con dos enzimas de restricción muestran los fragmentos liberados de *HSP70A/RBCS2* y *CrGPDH3*.

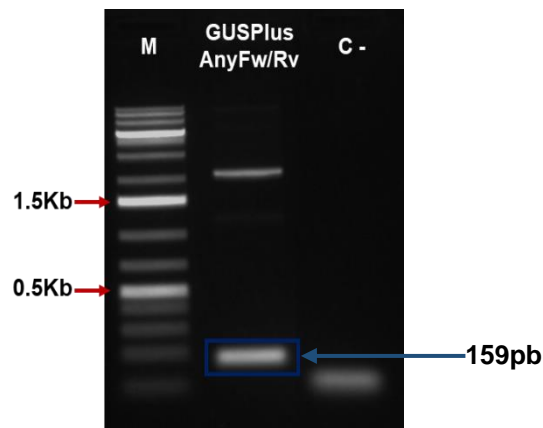


Figura 3.3: Electroforesis del producto de PCR para la detección del gen reportero GUSPlus (amplicón de 159 pb) a partir de pRIA3/PromC con los oligonucleótidos GUSPlusAnyFw y GUSPlusAnyRv. M= marcador de peso molecular 2 Log (New England Biolabs).C- = control negativo con H₂O ultrapura. En el carril del control negativo (C-) se observa una banda muy abajo que corresponde a la formación de dímeros por los oligonucleótidos utilizados.

Una vez verificados los pHR:GPDH3 y pRIA3/PromC, se procedió con la construcción de pHR:GUSPlus a partir de estos plásmidos. Para ello se realizó una doble digestión del pHR: GPDH3 con las enzimas *Bam*HI y *Not*I con el fin de liberar el gen *CrGPDGH3* y obtener el vector linealizado de 5.1 Kb. Igualmente se emplearon *Bam*HI y *Not*I para digerir el plásmido pRIA3/PromC y obtener el gen reportero GUSPlus de 2.0 Kb (2,053 pb). Posteriormente los fragmentos de interés, vector linealizado que contiene al promotor HSP70A/RBCS2 de 5.1 Kb, y gen reportero GUSPlus de 2 Kb, se purificaron, cuantificaron y se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (figura 3.4). Estas muestras se utilizaron para su posterior ligación.

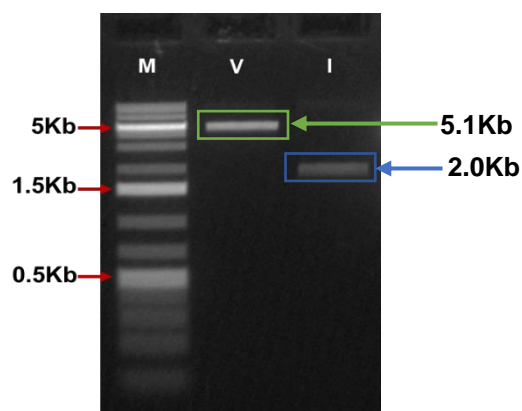


Figura 3.4: Electroforesis de los fragmentos purificados, vector linealizado que contiene al promotor HSP70A/RBCS2, y gen reportero GUSPlus. M= marcador de peso molecular 2 Log (New England Biolabs). V= vector linealizado (5.1 Kb). I= inserto gen reportero GUSPlus (2.0 Kb).

La ligación se realizó con la relación 1:3 vector-inserto con ayuda del soporte en línea NEBioCalculator™ (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>) a partir de los datos de concentración del vector linealizado 8.1 ng/μL y el inserto 9.7 ng/μL. Posteriormente, la transformación de células competentes *E. coli* DH10B se realizó con 6.5 μL de ligación como describe el capítulo de materiales y métodos. De las colonias transformadas se picaron 5 colonias, a partir de las cuales se realizó extracción y cuantificación del ADNp. La concentración promedio de plásmido purificado fue de 266.4 ng/μL y $A_{260/280}$ de 1.87. En la figura 3.5 se muestran los resultados del análisis de restricción con las enzimas *Bam*HI y *Not*I con el que se comprobó la presencia del vector y el gen reportero GUSPlus en todas las muestras evaluadas. Con lo anterior se comprobó que ya contaba con el pHR:GUSPlus.

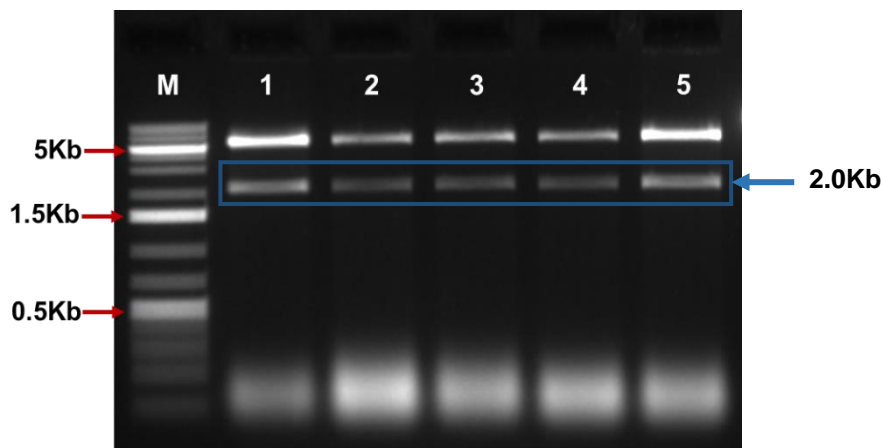


Figura 3.5: Electroforesis del análisis de restricción de cinco muestras del pHR:GUSPlus con las enzimas *Bam*HI y *Not*I. En todas las muestras se puede ver la banda de 5.1 Kb correspondiente al vector que contiene al promotor *HSP70A/RBCS2*, así como la banda de 2.0 Kb correspondiente al gen reportero *GUSPlus*. M= marcador de peso molecular 2 Log (New England Biolabs).

3.2.2 Subclonación de RIA3 en pGEM-T Easy

Para la obtención de la secuencia RIA3 del gen nuclear de *CrGPDH3* primero se verificó su presencia en dos plásmidos que se suponía contenían el fragmento deseado:

pRIA3/PromC y pRIA1, disponibles en el laboratorio (Beltran-Aguilar *et al.*, 2019). Los oligonucleótidos RIA3SFw y RIA3VRv se emplearon para amplificar el fragmento de RIA3 (577 pb) a partir de pRIA3/PromC y pRIA1, mientras que los oligonucleótidos GUSPlusAnyFw y GUSPlusAnyRv se emplearon para detectar el amplicón de 159 pb correspondiente al gen reportero GUSPlus, como control positivo del plásmido pRIA3/PromC (alícuota control). En la figura 3.6 se muestra la electroforesis de la amplificación del fragmento RIA3 y del amplicón de 159 pb correspondiente al gen reportero GUSPlus (control positivo).



Figura 3.6: Electroforesis de la amplificación del fragmento RIA3 del gen nuclear *CrGPDH3* a partir de pRIA3/PromC y pRIA1. M= marcador de peso molecular 2 Log (New England Biolabs). C+= control positivo del gen reportero GUSPlus (amplicón 159 pb) en pRIA3/PromC. C-= control negativo con H₂O ultrapura.

Una vez identificado el fragmento RIA3 se procedió a su amplificación por PCR usando como plantilla a pRIA3/PromC. El producto de PCR se purificó y se visualizó en gel agarosa, en el que se observó el amplicón esperado de 577 pb, como se muestra en la figura 3.7.

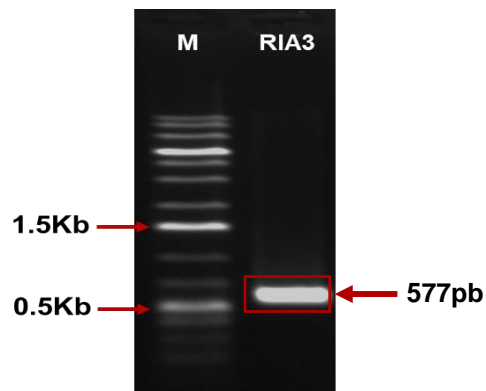


Figura 3.7: Electroforesis del producto de PCR RIA3 purificado. M= marcador de peso molecular 2 Log (New England Biolabs). RIA3= amplicón de 577 pb.

Posteriormente, se continuó con la clonación del fragmento de RIA3 en el vector comercial pGEM-T Easy. La reacción de ligación se efectuó con una relación 1:5 vector-inserto en un volumen de 20 μ L. De las colonias *E. coli* DH10B putativamente transformadas con la reacción de ligación, se seleccionaron 5 clonas al azar para la extracción y evaluación de ADN plasmídico. Las muestras de plásmido purificado resultantes se evaluaron por análisis con enzimas de restricción y por secuenciación. En la figura 3.8 se muestra el resultado del análisis de restricción con las enzimas *Swa*I y *EcoRV*, en la que se observa la presencia del inserto esperado. Los resultados de la secuenciación se muestran en el **Anexo 4**, en el que se encontró que las muestras 1, 2 y 4 tuvieron su secuencia idéntica a la esperada.



Figura 3.8: Electroforesis del análisis de restricción de las muestras de plásmido purificado, pGEM-T Easy/RIA3 con las enzimas *Swa*I y *EcoRV*. M= marcador de peso molecular 2 Log

(New England Biolabs). Los carriles marcados con asterisco indica las muestras cuya secuencia fue idéntica a la secuencia reportada por Beltran-Aguilar (2018).

3.2.3 Obtención de pHR: GUSPlus

La clonación del fragmento RIA3 corriente arriba del promotor constitutivo *HSP70A/RBCS2* en la construcción pHR:GUSPlus se realizó utilizando el protocolo comercial In-Fusion HD Cloning Kits. Primero se llevó a cabo la reacción de PCR para amplificar RIA3 con los oligonucleótidos RIA3SFwPlus y RIA3VRvPlus. El amplicón esperado de 577 pb se purificó con el kit comercial de High Pure PCR Product Purification Kit y se visualizó en el gel de agarosa. Este producto de PCR presentó una concentración de 170.9 ng/ μ L y $A_{260/280}$ de 1.86. Luego se procedió con la digestión de pHR:GUSPlus empleando las enzimas *SwaI* y *EcoRV*. El vector linealizado de 7.1 Kb se purificó con el kit comercial de High Pure PCR Product Purification Kit y se visualizó en el gel de agarosa. La concentración final del vector linealizado fue de 6.5 ng/ μ L y $A_{260/280}$ de 1.73. En la figura 3.9 se muestran los resultados de los productos purificados del vector linealizado y el fragmento RIA3.

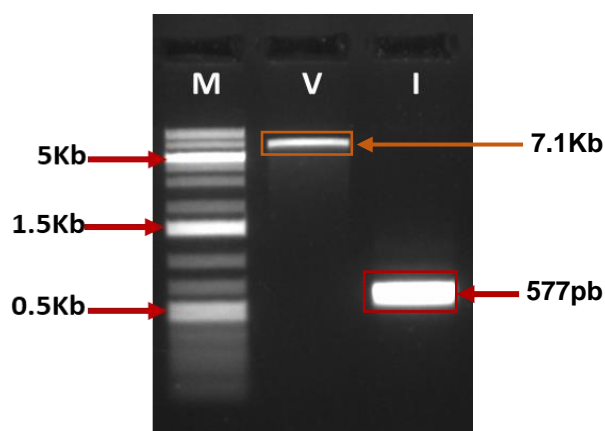


Figura 3.9: Electroforesis de los fragmentos purificados del análisis de restricción (vector linealizado pHR:GUSPlus) y del PCR (inserto RIA3). M= marcador de peso molecular 2 Log (New England Biolabs). V= vector linealizado pHR: GUSPlus (7.1 Kb). I= inserto RIA3 (577 pb).

La reacción de recombinación de los fragmentos se realizó de acuerdo al protocolo de In-Fusion HD Cloning Kits en la relación 1:2 vector-inserto. De las colonias transformadas se analizaron 5 clonas, las cuales se evaluaron por digestión enzimática con las enzimas *SwaI* y *EcoRV* para comprobar la presencia del fragmento RIA3. En la

figura 3.10 se muestran los resultados del análisis de restricción de las clonas evaluadas. La concentración promedio de las muestras de los plásmidos fue de 610.8 ng/ μ L y $A_{260/280}$ de 1.80.

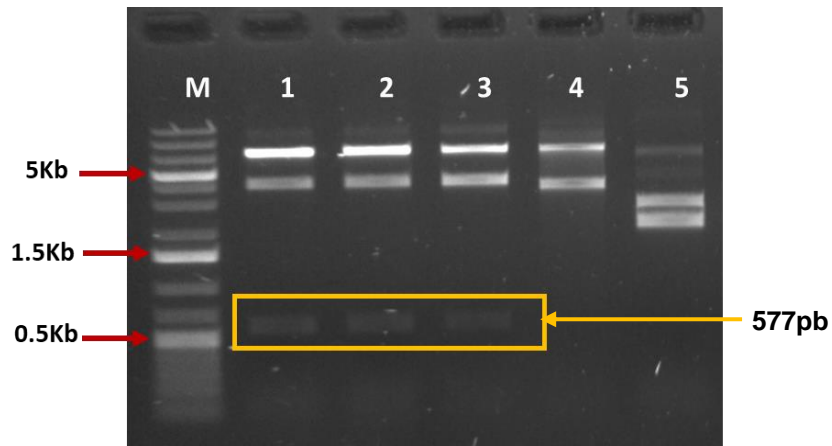


Figura 3.10: Electroforesis del análisis de restricción de la clonas transformadas RHR: GUSPlus con las enzimas *SwaI* y *EcoRV*. M= marcador de peso molecular 2 Log (New England Biolabs). De las clonas evaluadas solo las clonas 1, 2 y 3 presentaron la banda de 577 pb correspondiente al fragmento RIA3.

De los plásmidos que presentaron el fragmento RIA3 se tomó la muestra 1 para una evaluación por PCR de las secuencias de interés. En la figura 3.11 se muestran los resultados de los productos de PCR para pRHR: GUSPlus. Los oligonucleótidos empleados para la detección de las secuencias de interés se muestran en el **Anexo 1**.

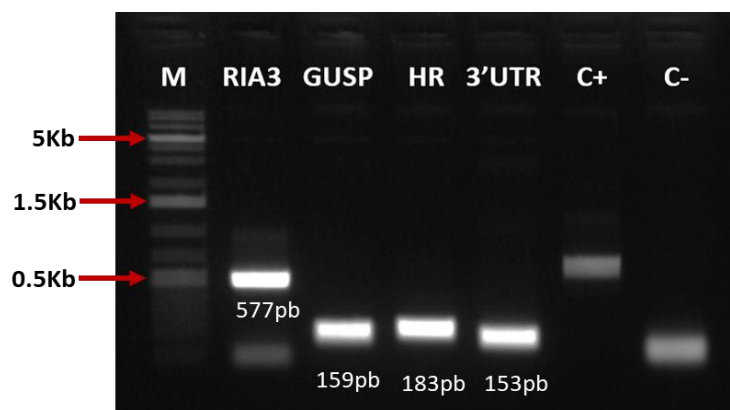


Figura 3.11: Electroforesis de las distintas partes que conforman al pRHR: GUSPlus (muestra 1) amplificadas por PCR. M= marcador de peso molecular 2 Log (New England Biolabs). HR = promotor constitutivo *HSP70A/RBCS2*. GUSP = gen reportero GUSPlus. 3'UTR = región no

traducible 3' del RBCS. C+ = control positivo del fragmento RIA3 (amplicón 577 pb). C- = control negativo con H₂O ultrapura.

Los resultados de secuenciación de pHR:GUSPlus y pRHR: GUSPlus fueron validados con la herramienta bioinformática SerialCloner versión 2.6.1, mediante el ensamblado *in silico* de las secuencias de interés (Anexo 5). Una vez confirmadas las plantillas de pHR:GUSPlus y pRHR: GUSPlus se procedió con el evento de transformación por biobalística de *C. reinhardtii*.

3.3 Obtención de clonas de *C. reinhardtii* bombardeadas por biobalística

El bombardeo por biobalística de *C. reinhardtii* se realizó empleando los plásmidos obtenidos en la sección anterior. Se obtuvo la concentración apropiada para cada plásmido, como se presenta en la tabla 3.3.

Tabla 3.3: Resultado de cuantificación de midipreps

Midiprep	Conc. (µg/µL)	A _{260/280}
pSP124S	1.19	1.98
pHR: GUSplus	1.03	1.99
pRHR: GUSplus	1.16	1.83

Por su parte, el cultivo de la cepa silvestre de *C. reinhardtii* se realizó como se describe en materiales y métodos, en un volumen de trabajo de 300 mL medio TAP en un matraz de 1 L. A los 7 días del cultivo se tomó una muestra para conteo celular, y se determinó una concentración de 5.4×10^6 cel/mL. En total se prepararon 20 platos de Petri, cada una con inóculo de 40×10^6 células totales. Para esto se requirió un volumen de 148 mL, correspondiente a 800×10^6 de células totales. El número de réplicas por cada plásmido consistió de 5 platos para pRHR:GUSplus, 5 platos para pHR:GUSplus y 3 platos para pSP124S (vector vacío) como control positivo. Adicionalmente, se colocaron dos controles de la cepa silvestre sin transformar, para el control positivo del cultivo se prepararon dos platos con medio TAP sin antibiótico, y para el control negativo se prepararon dos platos con medio TAP + zeocina 5 mg/L. Los platos restantes se conservaron hasta culminado el evento de transformación y luego se descartaron. Después del bombardeo los platos se guardaron en oscuridad durante 24 horas. Al siguiente día se sacaron de la oscuridad y se lavaron con 2.1 mL de medio TAP líquido.

Las células recuperadas del bombardeo se colocaron en nuevos platos de Petri con medio TAP + zeocina 5 mg/L y se guardaron en el cuarto de cultivo a 25 ± 2 °C, bajo un ciclo de 16:8 horas (luz/oscuridad) y una intensidad luminosa de $90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Las primeras colonias se detectaron a los 6 días después del evento de transformación y se aislaron para su posterior análisis. En la figura 3.12 se muestran los resultados del evento de transformación a los 6 días de cultivo.

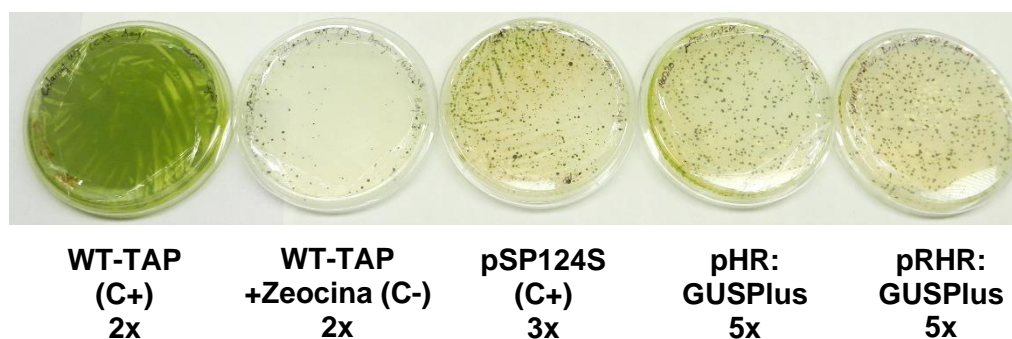


Figura 3.12: Resultados del evento de transformación por biobalística de *C. reinhardtii* (réplica representativa por plato). WT= Cepa silvestre (*en inglés*: white type). C+ = control positivo. C- = control negativo.

Por cada plato transformado se picaron 5 colonias y colocaron en un tubo tipo Falcon con 3 mL de medio TAP líquido con 5 mg/L de zeocina (medio de selección). A los 7 días de cultivo las colonias que presentaron crecimiento se resembraron en nuevos platos de Petri con medio TAP sólido más zeocina (5 mg/L) y se almacenaron a 16° C para su posterior análisis. De cada plato de Petri bombardeado se logró obtener de 1 a 3 colonias putativamente transformadas, que representó un total de 22 clonas: 9 clonas de la línea SP124S (vector vacío), 7 clonas de la línea HR:GUSPlus y 6 clonas de la línea RHR:GUSPlus. Los resultados obtenidos por cada plato de bombardeo se muestran a continuación en la tabla 3.4.

Tabla3.4: Resultados de clonas putativamente transformadas por plato de transformación.

Línea	Plato - Clona		
SP124S (V)	V1-1	V6-1	V5-1
	V1-2	V6-2	V5-1
	V1-3	V6-3	V5-3
HR: GUSPlus (C)	C5-5	C6-5	C8-4
	C5-8		
	C5-10	C7-3	C9-1
RHR: GUSPlus (I)	I6-2	I9-1	I10-1
			I10-2
	I8-3		I10-4

V (vacío), C (constitutivo) I (inducible)

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN GENERAL

Recientemente se demostró que una región denominada RIA3 en el promotor del gen *CrGPDH3*, era la responsable de la inducibilidad de la expresión de este gen como respuesta a la exposición a sales como NaCl y KCl (Beltran-Aguilar *et al.*, 2019). Debido a lo anterior, se sugirió que RIA3 debía contener al menos un elemento de respuesta en *cis* a estas sales, sin embargo, hasta la fecha no se ha identificado alguna secuencia de este tipo. En este trabajo, se realizó la búsqueda *in silico* de posibles elementos reguladores en *cis* en la región RIA3 mediante la plataforma bioinformática New PLACE, con la que se observó la presencia de motivos que podrían estar relacionados con esta actividad, como por ejemplo los motivos CAATBOX1, WRKY71OS y DRE2COREZMRAB17. La secuencia consenso CAATBOX1 se localizó en cuatro repeticiones a partir de los 6 pb, 265 pb, 392 pb y 439 pb, respectivamente. La localización del motivo CAAT en la secuencia del promotor no solo se ha asociado con la transcripción de genes sino también con la fortaleza del promotor (Lodha *et al.*, 2008). En plantas superiores la secuencia conservada CAAT se encuentra aproximadamente en el 30% de las secuencias promotoras de genes, ubicada a 60 ~100 pb corriente arriba del sitio de inicio de transcripción o en regiones distales que actúan como potenciadores ('*enhancer*') (Romier *et al.*, 2003). La caja CAAT al igual que la caja TATA es esencial para la transcripción de genes, algunos reportes reconocen a la caja CAAT como el principal determinante en la eficiencia del promotor debido a su susceptibilidad a mutaciones, como se menciona en el estudio de genes *Cab* en *Petunia* que presentaron una disminución en el acumulado de transcritos a causa de una mutación en la secuencia conservada CCACCAATT (Gidoni *et al.*, 1989). Los experimentos de mutaciones en el motivo CAAT producen una pérdida de unión a elementos *trans-acting* (proteínas de unión a la caja CAAT o CBF) y como consecuencia disminuyen la actividad transcripcional en estos promotores, lo que sugiere que los complejos CBF-CAAT son esenciales para una actividad transcripcional óptima (Kusnetsov *et al.*, 1999). Otro elemento *trans-acting* que interactúa con la caja CAAT son las proteínas potenciadoras tipo C/EBP (proteínas de unión a regiones *enhancer*). Estas proteínas interactúan con otros factores de transcripción que favorecen la unión a la caja CAAT y

consecuentemente la actividad reguladora de la transcripción, como la formación de dímeros de la proteína ATHB5 en *Arabidopsis thaliana* (Johannesson *et al.*, 2001).

En la región RIA3 también se identificaron tres repeticiones del motivo WRKY71OS (TGAC) ubicados a 33 pb, 320 pb y 389 pb. El elemento *cis-acting* TGAC frecuentemente se localiza en promotores y regiones no codificantes de genes y es reconocido por proteínas WRKY que modulan la respuesta transcripcional en plantas. Los genes WRKY codifican para un gran número de factores de transcripción (FTs), que en su mayoría han sido estudiados en *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*; Dong *et al.*, 2003) y arroz (*Oryza sativa*; Zhang *et al.*, 2004). Los FTs WRKY desempeñan una variedad de funciones fisiológicas en las plantas, participando en diferentes vías de señalización y mecanismos de defensa contra patógenos, estrés oxidativo, repuestas a diferentes tipos de estrés como congelación, sequía, calor y salinidad (Xie *et al.*, 2005). En microalgas poco se ha estudiado de los genes WRKY, aunque en *C. reinhardtii* se logró identificar una familia de genes WRKY gracias a un análisis comparativo BLAST entre genomas de microalgas, cianobacterias y plantas (Thiriet-Rupert *et al.*, 2016). Una observación importante de la predicción de elementos *cis* en RIA3 es la proximidad que existe entre los elementos *cis-acting* TGAC y CAAT, similar a la proximidad que se identificó en *Arabidopsis thaliana* entre un motivo de la caja CAAT y el motivo AAAAT de un segmento del promotor *AtpC* donde la formación del complejo FT-ADN es controlado por el impedimento estérico que se produce entre las proteínas de unión y elementos *cis-acting* (Bezhani *et al.*, 2001).

Además de la predicción de motivos CAATBOX1 y WRKY71OS, se identificó el motivo DRE2COREZMRAB17 (ACCGAC) en la posición de 89 pb de RIA3. La secuencia consenso ACCGAC es un elemento *cis-acting* sensible a deshidratación que interactúa con factores de transcripción tipo DREB (proteínas de unión a elementos responsivos a deshidratación) regulando la respuesta de muchos genes inducibles a estrés en *Arabidopsis* y maíz (Busk *et al.*, 1997). En un estudio de Dubouzet y colaboradores (2003) se identificaron cinco genes homólogos de DREB en arroz: *OsDREB1A*, *OsDREB1B*, *OsDREB1C*, *OsDREB1D* y *OsDREB2A*. La expresión de *OsDREB1A* y *OsDREB1B* fue inducida por frío, mientras que la expresión de *OsDREB2A* fue inducida por deshidratación y estrés por alto contenido de sal. Las proteínas de *OsDREB1A* y

OsDREB2A se unieron específicamente a DRE y activaron la transcripción del gen indicador GUS impulsado por DRE en protoplastos de arroz. La sobreexpresión de *OsDREB1A* en *Arabidopsis* transgénica condujo al aumento en la expresión de genes inducibles por estrés, y dio como resultado plantas con mayor tolerancia al estrés por sequía, alto contenido de sal y congelación, indicando una similitud funcional entre genes *OsDREB1A* de arroz y genes *DREB1A* de *Arabidopsis* (Dubouzet *et al.*, 2003). Sin embargo, en microalgas poco se conoce de las vías de señalización entre FTs DREB y mecanismos de regulación de genes diana. En este sentido, algunas predicciones *in silico* y avances en genómica comparativa han sido el camino inicial para identificar familias de factores de transcripción en microalgas y la posible interacción en las vías de señalización y genes de respuesta (Thiriet-Rupert *et al.*, 2016). Es posible que la presencia de los motivos CAATBOX1, WRKY71OS y DRE2COREZMRAB17 junto a otras secuencias aún desconocidas participen en la respuesta reguladora de genes inducibles en presencia de sales y variación osmótica.

En gran medida, la comprensión y predicción de elementos *cis-acting* y *trans-acting* en los mecanismos de regulación transcripcional contribuyen a la expresión transgénica estable y eficiente en *C. reinhardtii*, especialmente en el núcleo, donde ha sido notoriamente difícil; y aunque el cloroplasto puede acumular efectivamente altos niveles de proteína recombinante, se requiere tecnología de transformación nuclear para manipular completamente las algas (Neupert *et al.* 2009). La expresión nuclear permite el direccionamiento entre orgánulos, la secreción de proteínas y las modificaciones postraduccionales de proteínas más complejas, como la glicosilación. En particular, se requiere una adecuada localización de proteínas para la ingeniería del metabolismo, basada en la compartimentalización para algunos pasos de síntesis. Los bajos niveles de acumulación de proteínas como resultado de la transformación nuclear se deben en parte a la diferencia del uso de codón (Heitzer *et al.*, 2007), el silenciamiento epigenético de transgenes (Cerutti *et al.* 1997), efectos posicionales, estructura de la cromatina (Specht *et al.*, 2015), procesamiento aberrante y potencialmente otros mecanismos actualmente desconocidos (Mussnug, 2015). Sin embargo, una expresión transgénica eficiente se ha logrado en algunos casos, en gran medida por el uso de elementos regulatorios en *cis* como intrones, promotores y terminadores (3' y 5' UTR) (Schroda, 2019). La combinación de varias secuencias regulatorias en *cis* para la construcción un

sistema de transcripción nuclear sintético controlable es necesario para desarrollar todo el potencial biotecnológico de *C. reinhardtii*.

En este sentido, el uso de promotores híbridos inducibles representa una herramienta potencial para lograr la expresión eficaz y controlada en núcleo, además previenen los efectos negativos de la sobreexpresión constitutiva en el metabolismo celular de las algas. Hasta la fecha, el mejor promotor híbrido de *C. reinhardtii* es el promotor híbrido constitutivo *HSP70A/RBCS2* (Sproles *et al.*, 2021; Vavitsas *et al.*, 2019). Sin embargo, la expresión de proteínas recombinantes conducida por el promotor de *HSP70A/RBCS2* no ha podido superar el 1% de PST (Rasala *et al.*, 2012). Por otra parte, no existen precedentes para un promotor híbrido de tres fragmentos diferentes y fundamentalmente de carácter inducible. Por lo que en la presente tesis de maestría se planteó la generación de un nuevo promotor híbrido como alternativa para la expresión de transgenes en *C. reinhardtii*. El nuevo promotor híbrido *RIA3/HSP70A/RBCS2* en pRHR:GUSPlus se generó a partir de los plásmidos pRIA3/PromC (Beltran-Aguilar *et al.*, 2019) y pHR:GPDH3 (Casais-Molina *et al.*, 2016). La fusión entre la región de inducibilidad *RIA3* y el promotor comercial *HSP70A/RBCS2* no solo podría aportar el carácter inducible sino también fortaleza al nuevo promotor, tal como ocurrió al fusionar la región *RIA3* corriente arriba del promotor mínimo inducible PromC (*RIA3/PromC*), logrando un acumulado de proteínas superior en comparación con PromC en tratamientos de NaCl (Beltran-Aguilar *et al.*, 2019). Igualmente sería interesante elucidar el efecto de distanciamiento entre secuencias y como esto podría favorecer la transcripción de genes producto de los cambios conformacionales que transcurren en la interacción de elementos *cis-acting* y *trans-acting*, como el efecto de distanciamiento producido entre *HSP70A* y *RBCS2* (Schroda *et al.*, 2002).

Para poder entender el comportamiento de este nuevo promotor *RIA3/HSP70A/RBCS2* con respecto a otros promotores ya existentes se procedió al bombardeo por biobalística de *C. reinhardtii*. Las clonas putativamente transformadas se mantienen en medio TAP con zeocina hasta su posterior análisis. En el presente trabajo de tesis de maestría fue posible la construcción del promotor híbrido *RIA3/HSP70A/RBCS2* y la generación de clonas putativamente transformadas, sin embargo, aún queda pendiente por responder

si *RIA3/HSP70A/RBCS2* es de fuerte expresión al igual o más que el promotor *HSP70A/RBCS2*, y si es inducible por sales al igual o más fuerte que *RIA3/PromC*.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones

En la predicción de elementos regulatorios *en cis* de la region RIA3 del promotor de *CrGPDH3* se identifican los motivos CAATBOX1, WRKY71OS y DRE2COREZMRAB17, y se sugiere que podrían estar relacionados con el carácter fuerte e inducible en presencia de sales de este promotor y por tanto del *RIA3/PromC*.

El motivo CAATBOX1 (CAAT) se localiza en cuatro repeticiones de la secuencia RIA3 (posición 6 pb, 265 pb, 392 pb y 439 pb respectivamente) y su presencia sugiere una asociación potencial con la eficiencia y fortaleza del promotor.

El motivo WRKY71OS (TGAC) se localiza en tres repeticiones (posición 33 pb, 320 pb y 389 pb) y su presencia sugiere una asociación potencial con la respuesta inducible a sales. Además, se observó una proximidad entre uno de los motivos WRKY71OS y la caja CAAT, lo que podría estar asociado con una actividad reguladora entre elementos *cis-acting* y *trans-acting*.

El motivo DRE2COREZMRAB17 (ACCGAC) se localiza en la posición 89 pb de RIA3 y su presencia se sugiere que podría estar asociada con el carácter inducible en presencia de sales del promotor.

Es posible amplificar la región de inducibilidad RIA3 de pRIA3/PromC y clonarla corriente arriba del promotor comercial *HSP70A/RBCS2*, generando los plásmidos pRHR:GUSPlus y pHR:GUSPlus.

Se cuentan con clonas putativamente transformadas de *C. reinhardtii* después del bombardeo por biobalística con los plásmidos pRHR:GUSPlus, pHR:GUSPlus y pSP124S.

5.2 Perspectivas

Con este estudio se establecen las bases para la caracterización del promotor híbrido *RIA3/HSP70A/RBCS2*. El promotor de *CrGPDH3* y el promotor híbrido *RIA3/PromC* ha sido descritos anteriormente como promotores con gran potencial para conducir una respuesta fuerte e inducible. En el presente estudio sugerimos que los elementos responsivos predichos CAATBOX1, WRKY71OS Y DRE2COREZMRAB17 tiene alguna relación con las características de fortaleza e inducibilidad de este promotor. La continuación de este estudio permitirá la completa caracterización y validación de las líneas transgénicas por ensayos de Southern blot, para determinar el número de copias del transgén, la comprobación del carácter inducible por análisis de RT-PCR y la cuantificación de proteínas por el ensayo de actividad enzimática de GUSPlus de las clonas putativamente transformadas con el promotor híbrido *RIA3/HSP70A/RBCS2* así como la comparación de su desempeño con los promotores promotor híbrido *HSP70A/RBCS2* y *RIA3/PromC*.

Además, este trabajo sienta las bases para la comprensión de los mecanismos de regulación y abre paso a la identificación de nuevos elementos *cis-acting* y *trans-acting* asociados con la respuesta inducible, así como la posibilidad de identificar otros agentes inductores que activen la respuesta transcripcional en *C. reinhardtii*.

También una vez que *RIA3/HSP70A/RBCS2* esté completamente caracterizado se puede combinar con otras secuencias o elementos responsivos para evaluar su respuesta en la expresión de genes heterólogos.

BIBLIOGRAFÍA

- An, G., Costa, M. A. & Ha, S. B., 1990. Nopaline synthase promoter is wound inducible and auxin inducible. *The Plant Cell*, 2(3), 225-233.
- Auchincloss, A. H., Loroch, A. I. & Rochaix, J. D., 1999. Auchincloss, A. H., Loroch, A. I., & Rochaix, J. D. The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: cloning of the cDNA and its characterization as a selectable shuttle marker. *Molecular and General Genetics MGG*, 261(1), 21-30.
- Beltran-Aguilar, A. G. , Peraza-Echeverria, S. & Herrera-Valencia, V. A. , 2013. Caracterización del promotor del gen *CrGPDH3* de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* y su potencial para conducir la expresión de un gen reportero de manera inducible. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, México, pp. 14-39.
- Beltran-Aguilar, A. G. y otros, 2019. A novel salt-inducible *CrGPDH3* promoter of the microalga *Chlamydomonas reinhardtii* for transgene overexpression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-13.
- Berthold, P., Schmitt, R. & Mages, W., 2002. An engineered *Streptomyces hygroscopicus* aph 7" gene mediates dominant resistance against hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protist*, 153(4), 401.
- Bezhani, S., Sherameti, I., Pfannschmidt, T. & Oelmüller, R., 2001. A repressor with similarities to prokaryotic and eukaryotic DNA helicases controls the assembly of the CAAT box binding complex at a photosynthesis gene promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 276(26), 23785-23789.
- Biłas, R., Szafran, K., Hnatuszko-Konka, K. & Kononowicz, A. K., 2016. Cis-regulatory elements used to control gene expression in plants.. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 127(2), 269-287.
- Blazeck, J. & Alper, H. S., 2013. Blazeck, J., & Alper, H. S. Promoter engineering: recent advances in controlling transcription at the most fundamental level. *Biotechnology Journal*, 8(1), 46-58.
- Busk, P. K., Jensen, A. B. & Pagès, M., 1997. Busk, P. K., Jensen, A. B., & Pagès, M. Regulatory elements *in vivo* in the promoter of the abscisic acid responsive gene *rab17* from maize. *The Plant Journal*, 11(6), 1285-1295.
- Casais-Molina, M. L., Peraza-Echeverria, S., Echevarría-Machado, I. & Herrera-Valencia, V. A., 2016. Expression of *Chlamydomonas reinhardtii* *CrGPDH2* and *CrGPDH3* cDNAs in yeast reveals that they encode functional glycerol-3-phosphate dehydrogenases involved in glicerol production and osmotic stress tolerance. *Journal of Applied Phycology*, 28(1), 219-226.

- Cerutti, H., Johnson, A. M., Gillham, N. W. & Boynton, J. E., 1997. Epigenetic silencing of a foreign gene in nuclear transformants of *Chlamydomonas*. *The Plant Cell*, 9(6), 925-945.
- Christensen, A., Sharrock, R. & Quail, P., 1992. Genes de poliubiquitina del maíz: estructura, perturbación térmica de la expresión y empalme de transcripciones, y actividad promotora después de la transferencia a protoplastos por electroporación. *Biología Molecular de Plantas*, 18(4), 675-689.
- Coutinho, P., 2017. Comparative analysis of two inducible promoters for controlled nuclear expression in *Chlamydomonas reinhardtii*: activation and deactivation kinetics of the nit1 and the fea1 promoters. Póster, *ResearchGate*.
- Davies, J., Weeks, D. & Grossman, A., 1992. Expression of the arylsulfatase gene from the β 2-tubulin promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nucleic Acids Research*, 20(12), 2959-2965.
- De Guglielmo C, Z. & Fernandez Da Silva, R., 2016. Principales promotores utilizados en la transformación genética de plantas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 119-128.
- Dong, J., Chen, C. & Chen, Z., 2003.. Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Molecular Biology*, 51(1), 21-37.
- Driver, T. y otros, 2017. Two glycerol-3-phosphate dehydrogenases from *Chlamydomonas* have distinct roles in lipid metabolism. *Plant physiology*, 174(4), 2083-2097.
- Duarte-Coello, M. E. y otros, 2019. Molecular cloning and functional characterization of two glycerol-3-phosphate acyltransferases from the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phycological Research*, 67(2), 102-111.
- Dubouzet, J. G. y otros, 2003. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa L.*, encode transcription activators that function in drought-, high-salt-and cold-responsive gene expression. *The Plant Journal*, 33(4), 751-763.
- Eichler-Stahlberg, A., Weisheit, W., Ruecker, O. & Heitzer, M., 2009. Strategies to facilitate transgene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*, 229(4), 873-883.
- Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S. & Somssich, I. E., 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, 5(5), 199-206.
- Fei, X., Yu, J., Li, Y. & Deng, X., 2017. CrMAPK3 regulates the expression of iron-deficiency-responsive genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Biochemistry*, 18(1), 6.

- Fischer, N. & Rochaix, J. D., 2001. The flanking regions of PsaD drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Genetics and Genomics*, 265(5), 888-894.
- Folch-Mallol, J. L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F. & Robles, A. A. C., 2004. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 46(1-2), 24-46.
- Franklin, S. E. & Mayfield, S. P., 2004. Prospects for molecular farming in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current opinion in Plant Biology*, 7(2), 159-165.
- Gidoni, D. y otros, 1989. Novel cis-acting elements in Petunia Cab gene promoters. *Molecular and General Genetics MGG*, 215(2), 337-344.
- Gómez Luna, L., 2007. Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista Cubana de Química*, XIX(2), pp. 3-20. [Online] (actualizado 2007). Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443543707001>. [Acceso 10 abril 2020].
- González Cantó, E. V. A., 2018. Modulación de la adaptación a estrés por el metabolismo respiratorio y el envejecimiento. (*Doctoral dissertation*). Universitat Politècnica de València, España. 1-2.
- Goodenough, U. y otros, 2014. The path to triacylglyceride obesity in the sta6 strain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 13(5), 591-613.
- Griesbeck, C., Kobl, I. & Heitzer, M., 2006. *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Biotechnology*, 34(2), 213-223.
- Harris, E. H., 2001. *Chlamydomonas* as a model organism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52(1), 363-406.
- Heitzer, M., Eckert, A., Fuhrmann, M. & Griesbeck, C., 2007. Influence of codon bias on the expression of foreign genes in microalgae. En: R. León, A. Galván & E. Fernández, edits. *In Transgenic microalgae as green cell factories*. New York: s.n., pp. 46-53.
- Heitzer, M. & Zschoernig, B., 2007. Construction of modular tandem expression vectors for the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* using the Cre/lox-system. *Biotechniques*, 43(3), 324-332.
- Helliwell, K. E. y otros, 2014. Unraveling vitamin B12-responsive gene regulation in algae. *Plant Physiology*, 165(1), 388-397.
- Herrera-Valencia, V. A. y otros, 2012. In silico cloning and characterization of the Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase (GPDH) gene family in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current Microbiology*, 64(5), 477-485.

- Hiwasa-Tanase, K. y otros, 2012. Novel promoters that induce specific transgene expression during the green to ripening stages of tomato fruit development. *Plant Cell Reports*, 31(8), 1415-1424.
- Hull, R., Covey, S. N. & Dale, P., 2000. Genetically modified plants and the 35S promoter: assessing the risks and enhancing the debate. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12(1), 1-5.
- Husic, H. D. & Tolbert, N. E., 1986. Effect of osmotic stress on carbon metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*: accumulation of glycerol as an osmoregulatory solute. *Plant Physiology*, 82(2), 594-596.
- Iwai, M., Ikeda, K., Shimojima, M. & Ohta, H., 2014. Enhancement of extraplastidic oil synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* using a type-2 diacylglycerol acyltransferase with a phosphorus starvation-inducible promoter. *Plant Biotechnology Journal*, 12(6), 808-819.
- Jiménez, C. y otros, 2004. Phosphorylation of MAP kinase-like proteins mediate the response of the halotolerant alga *Dunaliella viridis* to hypertonic shock. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1644(1), 61-69.
- Johannesson, H., Wang, Y. & Engström, P., 2001. DNA-binding and dimerization preferences of Arabidopsis homeodomain-leucine zipper transcription factors in vitro. *Plant Molecular Biology*, 45(1), 63-73.
- Karlusich, P., José, J. & Carrillo, N. J., 2014. Combatiendo la sequía con flavodoxina. *Ciencia e Investigación*, 64(1), 23-30.
- Kucho, K. I., Ohyama, K. & Fukuzawa, H., 1999. CO₂-responsive transcriptional regulation of CAH1 encoding carbonic anhydrase is mediated by enhancer and silencer regions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 121(4), 1329-1337.
- Kusnetsov, V., Landsberger, M., Meurer, J. & Oelmüller, R., 1999. The assembly of the CAAT-box binding complex at a photosynthesis gene promoter is regulated by light, cytokinin, and the stage of the plastids. *Journal of Biological Chemistry*, 274(50), 36009-36014.
- Laloum, T. y otros, 2013. CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many?. *Trends in Plant Science*, 18(3), 157-166.
- Lei, G. y otros, 2008. Isolation and characterization of a mitogen-activated protein kinase gene in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Phycology*, 20(1), 13-17.
- León, R. & Galván, F., 1994. Halotolerance studies on *Chlamydomonas reinhardtii*: glycerol excretion by free and immobilized cells. *Journal of Applied Phycology*, 6(1), 13-20.

- Llopis, S. & Loreto, M., 2007. *Estabilidad del mRNA de rbcL en el cloroplasto de Chlamydomonas reinhardtii: Papel de la 5'UTR*, Tesis de doctorado. Valencia: Universitat de València, 10.
- Lodha, M., Schulz-Raffelt, M. & Schroda, M., 2008. A new assay for promoter analysis in *Chlamydomonas* reveals roles for heat shock elements and the TATA box in HSP70A promoter-mediated activation of transgene expression. *Eukaryotic Cell*, 7(1), 172-176.
- Manuell, A. L. y otros, 2007. Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas* chloroplast. *Plant Biotechnology Journal*, 5(3), 402-412.
- McElroy, D., Zhang, W., Cao, J. & Wu, R., 1990. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *The Plant Cell*, 2(2), 163-171.
- Merchant, S. S. P. S. E. V. O. y otros, 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 318(5848), 245-250.
- Michelet, L. y otros, 2011. Enhanced chloroplast transgene expression in a nuclear mutant of *Chlamydomonas*. *Plant Biotechnology journal*, 9(5), 565-574.
- Morikawa, T. y otros, 2018. Overexpression of DnaJ-like chaperone enhances carotenoid synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184(1), 80-91.
- Mussnug, J. H., 2015. Genetic tools and techniques for *Chlamydomonas reinhardtii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(13), 5407-5418..
- Neupert, J., Karcher, D. & Bock, R., 2009. Generation of *Chlamydomonas* strains that efficiently express nuclear transgenes. *The Plant Journal*, 57(6), 1140-1150.
- Nguyen, A. & Shiozaki, K., 2002. MAPping Stress Survival in Yeasts: From the Cell Surface to the Nucleus. *Sensing, signaling and cell adaptation*, p. 75.
- Ohresser, M., Matagne, R. F. & Loppes, R., 1997. Expression of the arylsulphatase reporter gene under the control of the nit1 promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current Genetics*, 31(3), 264-271.
- Perrineau, M. M. y otros, 2014. Evolution of salt tolerance in a laboratory reared population of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Microbiology*, 16(6), 1755-1766.
- Plesse, B. y otros, 2001. Effects of the polyubiquitin gene Ubi. U4 leader intron and first ubiquitin monomer on reporter gene expression in *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology*, 45(6), 655-667.
- Quinn, J. M. & Merchant, S., 1995. Two copper-responsive elements associated with the *Chlamydomonas* Cyc6 gene function as targets for transcriptional activators. *The Plant Cell*, 7(5), 623-628.

- Rasala, B. A. y otros, 2012. Robust expression and secretion of Xylanase1 in *Chlamydomonas reinhardtii* by fusion to a selection gene and processing with the FMDV 2A peptide. *PLoS ONE*, 7(8), e43349.
- Rivera, R. A., Peraza-Echevarria, S. & Herrera-Valencia, V. A., 2011. La microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*: nueva alternativa para la producción de proteínas recombinantes de interés médico. *Ciencia*, 2-9.
- Rochaix, J. D., Fischer, N. & Hippler, M., 2000. Chloroplast site-directed mutagenesis of photosystem I in *Chlamydomonas*: electron transfer reactions and light sensitivity. *Biochimie*, 82(6-7), 635-645.
- Romero-Campero, F. J. y otros, 2016. ChlamyNET: a *Chlamydomonas* gene co-expression network reveals global properties of the transcriptome and the early setup of key co-expression patterns in the green lineage. *BMC Genomics*, 17(1), 227.
- Romier, C., Cocchiarella, F., Mantovani, R. & Moras, D., 2003. The NF-YB/NF-YC structure gives insight into DNA binding and transcription regulation by CCAAT factor NF-Y. *Journal of Biological Chemistry*, 278(2), 1336-1345.
- Rosales-Mendoza, S., Paz-Maldonado, L. M. T. & Soria-Guerra, R. E., 2012. *Chlamydomonas reinhardtii* as a viable platform for the production of recombinant proteins: current status and perspectives. *Plant Cell Reports*, 31(3), 479-494.
- Rushton, P. J. y otros, 2002. Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen-and wound-induced signaling. *The Plant Cell*, 14(4), 749-762.
- Saidi, Y. y otros, 2005. Controlled expression of recombinant protein in *Physcomitrella patens* by a conditional heat-shock promoter: a tool for plant research and biotechnology. *Plant Molecular Biology*, 59(1), 697-711.
- Sasaki, K. y otros, 2007. Characterization of two rice peroxidase promoters that respond to blast fungus infection. *Molecular Genetics and Genomics*, 278(1), 709-722.
- Sawyer, A. L., Hankamer, B. D. & Ross, I. L., 2015. Sulphur responsiveness of the *Chlamydomonas reinhardtii* LHCBM9 promoter. *Planta*, 241(5), 1287-1302.
- Schroda, M., 2019. Good News for nuclear transgene expression in *Chlamydomonas*. *Cells*, 8(12), 1534.
- Schroda, M., Beck, C. F. & Vallon, O., 2002. Sequence elements within an HSP70 promoter counteract transcriptional transgene silencing in *Chlamydomonas*. *The Plant Journal*, 31(4), 445-455.
- Schroda, M., Blöcker, D. & Beck, C. F., 2000. The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*. *The Plant Journal*, 21(2), 121-131.

- Scranton, M. A. y otros, 2016. Synthetic promoters capable of driving robust nuclear gene expression in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Research*, Volumen 15, 135-142.
- Shimizu, Y., 1996. Microalgal metabolites: a new perspective. *Annual Reviews in Microbiology*, 50(1), 431-465.
- Specht, E. A., Nour-Eldin, H. H., Hoang, K. T. & Mayfield, S. P., 2015. An improved ARS2-derived nuclear reporter enhances the efficiency and ease of genetic engineering in *Chlamydomonas*. *Biotechnology Journal*, 10(3), 473-479.
- Sproles, A. E. y otros, 2021. Recent advancements in the genetic engineering of microalgae.. *Algal Research*, Volumen 53, 102158.
- Stevens, D. R., Purton, S. & Rochaix, J. D., 1996. The bacterial phleomycin resistance gene as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*. *Molecular and General Genetics MGG*, 251(1), 23-30.
- Suescún-Bolívar, L. P. & Thomé, P. E., 2015. Osmosensing and osmoregulation in unicellular eukaryotes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(3), 435-443.
- Surzycki, R. y otros, 2009. Factors effecting expression of vaccines in microalgae. *Biologicals*, 37(3), 133-138.
- Thiriet-Rupert, S. y otros, 2016. Transcription factors in microalgae: genome-wide prediction and comparative analysis. *BMC Genomics*, 17(1), 282.
- Tran, M. y otros, 2009. Tran, M., Zhou, B., Pettersson, P. L., Gonzalez, M. J., & Mayfield, S. P. Synthesis and assembly of a full-length human monoclonal antibody in algal chloroplasts. *Biotechnology and Bioengineering*, 104(4), 663-673.
- Vavitsas, K. y otros, 2019. The synthetic biology toolkit for photosynthetic microorganisms. *Plant Physiology*, 181(1), 14-27.
- Venter, M., 2007. Synthetic promoters: genetic control through cis engineering. *Trends in plant science*, 12(3), 118-124.
- Wang, X. y otros, 2008. A novel expression platform for the production of diabetes-associated autoantigen human glutamic acid decarboxylase (hGAD65). *BMC Biotechnology*, 8(1), 87.
- Wu, J. y otros, 2008. Efficient expression of green fluorescent protein (GFP) mediated by a chimeric promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 26(3), 242.
- Xie, Z. y otros, 2005. Annotations and functional analyses of the rice WRKY gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells. *Plant Physiology*, 137(1), 176-189.

-
- Yang, A. y otros, 2018. Yang, A., Suh, W. I., Kang, N. K., Lee, B., & Chang, Y. K. MAPK/ERK and JNK pathways regulate lipid synthesis and cell growth of *Chlamydomonas reinhardtii* under osmotic stress, respectively. *Scientific Reports*, 8(1), 1-12.
- Yoon, S. M. y otros, 2011. Transgenic microalgae expressing *Escherichia coli* AppA phytase as feed additive to reduce phytate excretion in the manure of young broiler chicks. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(3), 553-563.
- Zhang, Z. L. y otros, 2004. A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells. *Plant Physiology*, 134(4), 1500-1513.
- Zhao, R. y otros, 2016. MAPK in *Dunaliella tertiolecta* regulates glycerol production in response to osmotic shock. *European Journal of Phycology*, 51(2), 119-128.



ANEXOS

Anexo 1: Oligonucleótidos empleados en la obtención de construcciones pHR: GUSPlus y pRHR: GUSPlus

Oligo nombre	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Amplicón (pb)
RIA3Sfw	TAAATTTAAATTGTCGCAATTCACACATCCAC	71	RIA3 (577pb)
RIA3Rv	CTAGATATCTATGCCTAACGCCCATGCTCGG	74.7	
RIA3SfwPlus	CTCCTTCTGGCATTAAATTGTCGCAATTCACACATCCAC	80.7	
RIA3RvPlus	CAGCGAGGTACCGATATCTATGCCTAACGCCCATGCTCGG	84.7	
HRbFw	ACGGTGACCTCCACTTTCAG	64.2	HR (183pb)
HRbRv	CGGATAAGGGTTGCAAGTGCTC	68.6	
3'UTRbFw	CGGTGGATGGAAGATACTGC	64.4	3'UTR (153pb)
3'UTRbRv	ATGGAGAAAGAGGCCAAAATC	63.1	
GUSPlusAnyFw	ACGTGGAGATTCCGAATGTC	63.9	GUSPlus (159pb)
GUSPlusAnyRv	TGTTGATGAGGAAGTGGCCG	66.2	

Anexo 2: Transformación de células competentes *E. coli* DH10B mediante choque térmico

- A.** Para multiplicación de plásmido de rutina utilizar 1 μ L de ADN plasmídico.
 - B.** Para reacciones de ligación utilizar 10-50 ng de ADN plasmídico.
1. Tomar 1 μ L del volumen de ADN plasmídico o la reacción de ligación y hacer una mezcla con los 100 μ L de células competentes.
 2. Inmediatamente, incubar en hielo durante 30 minutos y terminado el tiempo someter a un choque térmico de 42°C durante 45 segundos e inmediatamente pasar a hielo por 3 minutos.
 3. Seguidamente, adicionar 900 μ L de medio LB (Luria-Bertani) sin antibiótico e incubar a 37°C por 90 minutos a 150 rpm en el horno orbital del cuarto de campanas.

En el caso de multiplicación de rutina

4. Plaquear 100 μ L de la mezcla en platos de Petri con medio LB sólido + 100 mg/L de ampicilina.

En el caso de ligaciones

5. Centrifugar a 3,000 rpm por 5 minutos la muestra y descartar el sobrenadante y con los 100 μ L restantes resuspender la pastilla y plaquear en platos de Petri con medio LB sólido+ 100 mg/L de ampicilina. En caso de tratarse de ligaciones en pGEMT-Easy emplear platos con medio LB sólido + 0.5mM de isopropil-tio- β -Dgalactósido (IPTG) + 80 mg/L de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D galactósido (X-Gal) + 100 mg/L de ampicilina.
6. Seguido se debe incubar los platos de Petri a 37°C por 16 horas. Las colonias transformadas (colonias blancas) se pican con palillos estériles y se cultivan en tubos de falcón con 4 mL de medio LB + 100 mg/L de ampicilina.
7. Finalmente incubar las colonias cultivadas en medio LB líquido+ 100 mg/L de ampicilina a 37 °C en agitación a 220 rpm durante 16 horas.

Anexo 3: Transformación de *C. reinhardtii* por biobalística

- A.** Obtención del ADNp para transformar
- B.** Preparación del material estéril
- C.** Evento de transformación
- D.** Recuperación de células
- E.** Obtención de posibles líneas transgénicas

A. Obtención de ADNp para transformar

Los plásmidos a emplear en el evento de transformación deben tener una concentración mínima de 1 µg/µL. Para alcanzar la concentración deseada es necesario extraer ADNp con un kit de MIDIPREP de ZymoPURE Plasmid II Midiprep Kit (Zymo Research). Esto se debe realizar después de comprobar la integridad del ADNp.

Con el ADNp MIDIPREP se procede al recubrimiento de las partículas de oro (Au) el día del bombardeo. Los reactivos a emplear son: CaCl₂ 2.5 M, espermidina 0.1 M y suspensión de partículas Au 0.6 µm.

1. Inicialmente se añaden 10 µg de ADNp (sin exceder 10 µL), 50 µL de CaCl₂ 2.5 M y 20 µL de espermidina 0.1 M a las partículas de Au 0.6 µm y se agita en vórtex por 3 minutos.
2. Se deja reposar las partículas por 1 minuto y posteriormente se da un pequeño spin en la picofuga para facilitar la sedimentación.
3. Luego se remueve el líquido y se agregan 140 µL de etanol al 70% (grado HPLC). Se resuspende la pastilla con pequeños golpes y posteriormente se da un spin de 3 segundos en la picofuga y se descarta el sobrenadante.
4. Luego se adicionan 140 µL de etanol al 100% (grado HPLC) y se resuspende la pastilla con pequeños golpes, posteriormente se da un spin de 3 segundos en la picofuga y se descarta el sobrenadante.
5. Finalmente se agregan 30 µL de etanol al 100% (grado HPLC) y se resuspende la pastilla con vortex a baja velocidad (5/10) por 3 segundos.
6. Después de resuspender la muestra se toman 5 µL de la suspensión de Au 0.6 µm y se colocan en el centro del macroacarreador con la precaución de distribuirlo uniformemente sobre la superficie.
7. Luego se deja secar en la campana de flujo hasta que el alcohol se haya evaporado completamente.
8. Cada preparación de Au+ADNp (30 µL) es suficiente para bombardear 5 platos y llevar a cabo una comprobación del ADNp por electroforesis.

B. Preparación del material estéril

El evento de transformación es un proceso que requiere una cantidad considerable de materiales y que debe llevarse a cabo en condiciones de esterilidad, para ello se emplean los siguientes materiales:

- Pinzas metálicas envueltas en aluminio.
- Mallas de retención
- Los portamacroacareadores con los macroacarreadores en posición
- Pañuelos o sanitas delgadas envuelto en papel aluminio (sobres)
- Puntas de 1,000 μ L de punta ancha con bordes redondeados y filtro de algodón
- Tubos de microcentrífuga de 2 mL.
- Membrana de ruptura esterilizadas en alcohol isopropílico

Adicionalmente se requiere la preparación de medio sólido TAP y TAP+zeocina, el medio TAP se prepara con anterioridad, mientras que el medio TAP+zeocina debe ser fresco, debido a que la zeocina es un antibiótico fotosensible. Además, se requiere una solución de isopropanol al 70% para la esterilización de las membranas de ruptura; y alcohol 70% y 100% (grado HPLC) para la preparación del ADNp.

En el caso de *C. reinhardtii*, se debe inocular una colonia de medio sólido a medio líquido 7 días antes del evento de transformación. Se debe realizar en un volumen suficiente que garantice la cantidad de células necesarias. Transcurrido los 7 días se toma una muestra del cultivo para conteo celular de acuerdo a las prácticas del laboratorio; una vez estimada la concentración celular, se centrifuga el cultivo a 4 °C, 3,200 RCF por 5 minutos. Con el valor estimado de concentración celular se resuspende la biomasa en medio TAP líquido, de tal manera que queden 40,000'000 de células en 200 μ L (contenido por plato de Petri). Opcionalmente, se sugiere tomar una alícuota de la suspensión celular y diluirla en medio TAP líquido, para corroborar la concentración celular por conteo al microscopio.

El material biológico para el bombardeo se prepara en la campana de flujo y se realiza mediante la adición de 200 μ L (40'000,000 células) de suspensión celular en los platos de Petri. La suspensión celular se inocula y se esparce con el asa en la parte central del plato de Petri (área efectiva del bombardeo) y posteriormente se dejan abiertas aproximadamente 1 hora para garantizar su secado.

C. Evento de transformación

Inicialmente se limpia el interior de la campana de flujo con solución de hipoclorito al 5% (producto comercial), una vez seca, se procede a una segunda limpieza con etanol al 70%. Posteriormente se limpia la cámara de biobalística con etanol al 70%, incluyendo las piezas interiores y se depositan sobre una sanita estéril en la campana de flujo.

Las condiciones estandarizadas para el bombardeo son una presión de vacío de 29 in Hg y membranas de ruptura de 1100 psi, con helio (He) como gas acarreador. Al momento del bombardeo se debe contar con los platos de Petri secas con 40'000,000

de células, los macroacarreadores secos con las partículas de Au impregnadas con ADNp y las membranas de ruptura estériles. La forma de proceder es la siguiente:

1. Primero se enciende la cámara de biobalística y la bomba de vacío, se abre la llave de paso del tanque de He y se ajusta la válvula reguladora de He hasta que el manómetro marque aproximadamente 1,300 psi.
2. Luego se deposita una membrana de ruptura en el cañón de la cámara y se atornilla en su lugar.
3. Se desatornilla el objetivo de la cámara y se deposita una malla de retención en el fondo, y justo sobre ella el portamacroacarreador (incluyendo macroacarreador) boca abajo y se atornilla nuevamente todo el conjunto y se deposita en la cámara bajo el cañón a una altura de ¼ in.
4. Luego se introduce la bandeja dos niveles por debajo del objetivo y se deposita un plato de Petri con las microalgas. Se cierra la puerta de la cámara de biobalística y se oprime el interruptor VAC para empezar a producir vacío. Cuando se llega a alcanzar una presión de vacío de 29 in de Hg se oprime rápidamente el interruptor a la posición de **HOLD**.
5. Luego se deja oprimido el botón de **FIRE** hasta que se rompa la membrana de ruptura (1,100 psi), posteriormente se regresa el interruptor a la posición **VENT** y se abre la puerta cuando el manómetro alcance una presión de 0 psi, por último, se saca el plato de Petri, se sella y guarda en oscuridad por 24 horas.
6. Finalmente se retiran el macroacarreador, la membrana de ruptura rota y la malla de retención y se repiten los pasos para cada una de los platos a bombardear.
7. Los platos recién bombardeados se almacenan en una caja oscura por 24 horas, para evitar los mecanismos de fotorreparación de la microalga.

D. Recuperación de células

Transcurrido 24 horas se retiran los platos de Petri de la caja oscura, y se inicia el proceso de recuperación. En primer lugar, se realiza el lavado de los platos con 2.1 mL de medio TAP (3 x 700 µL). Este procedimiento se debe realizar gentilmente por medio de pipeteo con puntas de boca ancha de 1mL. Una vez recuperada las células en medio TAP, se deposita en un tubo de microcentrífuga de 2 mL y se centrifuga a 3,200 RCF por 5 minutos. Luego la biomasa obtenida se resuspende gentilmente en 100 µL de medio TAP y se plaquea en un nuevo plato de Petri con TAP sólido + zeocina (5 µg/mL). El plaqueo se realiza con ayuda del asa 'loop' favoreciendo la dispersión por toda la superficie del plato. Después del secado de los platos se sellan y transfieren al cuarto de cultivo. Los platos de Petri se cultivan bajo fotoperiodo a 25 °C con una intensidad luminosa de 50 µmoles/ms; las posibles transformadas se pueden observar a partir de los 4-6 días, dependiendo de la eficiencia del evento de transformación. Para conservación de las posibles transformadas los platos se envuelven en papel aluminio y se almacenan en la cámara de 16 °C.

E. Obtención de posibles líneas transgénicas

Cada colonia en los platos de Petri (TAP+zeocina) es una posible línea transgénica, obviando el hecho de que a causa del procedimiento se pueden generar colonias diferentes con el mismo origen (misma línea); para descartar que efectivamente son colonias transformadas y no escapes se procede a picar colonias individuales e inocularlas en medio líquido TAP+zeocina y monitorear el crecimiento de 7 a 9 días, si se observa crecimiento en ese lapso de tiempo se considerará como una potencial línea transgénica y se procederá a hacer un cultivo axénico en un nuevo plato de Petri TAP+zeocina para su almacenamiento a corto/mediano plazo.

Anexo 4: Resultados de la secuenciación de RIA3 en pGEM -T Easy

```

clona-3.seq      1  TTAAATTTAAATTTGTCGCAATTCACACATCCACATGTCGCAACCTGACCATGTCAAATA
clona-4.seq      1  -----TGTGCGCAATTCACACATCCACATGTCGCAACCTGACCATGTCAAATA
clona-2.seq      1  -----TGTGCGCAATTCACACATCCACATGTCGCAACCTGACCATGTCAAATA
clona-1.seq      1  -----TGTGCGCAATTCACACATCCACATGTCGCAACCTGACCATGTCAAATA
RIA3.seq         1  -----TGTGCGCAATTCACACATCCACATGTCGCAACCTGACCATGTCAAATA
clona-5.seq      1  -----TGTGCGCAATTCACACATCCACATGTCGCAACCTGACCATGTCAAATA

clona-3.seq     61  ACTTGCAAGCTGCTATATGTAGCCTGTGCGTGCCGGTGCATACCGACCAAGTGAGAGTGT
clona-4.seq     48  ACTTGCAAGCTGCTATATGTAGCCTGTGCGTGCCGGTGCATACCGACCAAGTGAGAGTGT
clona-2.seq     48  ACTTGCAAGCTGCTATATGTAGCCTGTGCGTGCCGGTGCATACCGACCAAGTGAGAGTGT
clona-1.seq     48  ACTTGCAAGCTGCTATATGTAGCCTGTGCGTGCCGGTGCATACCGACCAAGTGAGAGTGT
RIA3.seq        48  ACTTGCAAGCTGCTATATGTAGCCTGTGCGTGCCGGTGCATACCGACCAAGTGAGAGTGT
clona-5.seq     48  ACTTGCAAGCTGCTATATGTAGCCTGTGCGTGCCGGTGCATACCGACCAAGTGAGAGTGT

clona-3.seq    121  TGCCTTTGCGTGTATGCGTTTTTGTCTCACCGCAGTCATGAACTGCCCAACCCTTTCCAA
clona-4.seq    108  TGCCTTTGCGTGTATGCGTTTTTGTCTCACCGCAGTCATGAACTGCCCAACCCTTTCCAA
clona-2.seq    108  TGCCTTTGCGTGTATGCGTTTTTGTCTCACCGCAGTCATGAACTGCCCAACCCTTTCCAA
clona-1.seq    108  TGCCTTTGCGTGTATGCGTTTTTGTCTCACCGCAGTCATGAACTGCCCAACCCTTTCCAA
RIA3.seq       108  TGCCTTTGCGTGTATGCGTTTTTGTCTCACCGCAGTCATGAACTGCCCAACCCTTTCCAA
clona-5.seq    108  TGCCTTTGCGTGTATGCGTTTTTGTCTCACCGCAGTCATGAACTGCCCAACCCTTTCCAA

clona-3.seq    181  GAATGTATGTTCTAATGCCAAGGCGTTGTTATGCGCCAACCTTCTATGCTTGCTTGAGGCC
clona-4.seq    168  GAATGTATGTTCTAATGCCAAGGCGTTGTTATGCGCCAACCTTCTATGCTTGCTTGAGGCC
clona-2.seq    168  GAATGTATGTTCTAATGCCAAGGCGTTGTTATGCGCCAACCTTCTATGCTTGCTTGAGGCC
clona-1.seq    168  GAATGTATGTTCTAATGCCAAGGCGTTGTTATGCGCCAACCTTCTATGCTTGCTTGAGGCC
RIA3.seq       168  GAATGTATGTTCTAATGCCAAGGCGTTGTTATGCGCCAACCTTCTATGCTTGCTTGAGGCC
clona-5.seq    168  GAATGTATGTTCTAATGCCAAGGCGTTGTTATGCGCCAACCTTCTATGCTTGCTTGAGGCC

clona-3.seq    241  GGGTGCCTTCTGGAACAAGCTGTTTGGAGAGCTTCAACAATTGCGCACTGGCAGCAGGTC
clona-4.seq    228  GGGTGCCTTCTGGAACAAGCTGTTTGGAGAGCTTCAACAATTGCGCACTGGCAGCAGGTC
clona-2.seq    228  GGGTGCCTTCTGGAACAAGCTGTTTGGAGAGCTTCAACAATTGCGCACTGGCAGCAGGTC
clona-1.seq    228  GGGTGCCTTCTGGAACAAGCTGTTTGGAGAGCTTCAACAATTGCGCACTGGCAGCAGGTC
RIA3.seq       228  GGGTGCCTTCTGGAACAAGCTGTTTGGAGAGCTTCAACAATTGCGCACTGGCAGCAGGTC
clona-5.seq    228  GGGTGCCTTCTGGAACAAGCTGTTTGGAGAGCTTCAACAATTGCGCACTGGCAGCAGGTC

clona-3.seq    301  TTAGACCAGCGTACAGTAGAATCACGAGTGGGTGACGGGCTGATGCCGGATGATGCTCAA
clona-4.seq    288  TTAGACCAGCGTACAGTAGAATCACGAGTGGGTGACGGGCTGATGCCGGATGATGCTCAA
clona-2.seq    288  TTAGACCAGCGTACAGTAGAATCACGAGTGGGTGACGGGCTGATGCCGGATGATGCTCAA
clona-1.seq    288  TTAGACCAGCGTACAGTAGAATCACGAGTGGGTGACGGGCTGATGCCGGATGATGCTCAA
RIA3.seq       288  TTAGACCAGCGTACAGTAGAATCACGAGTGGGTGACGGGCTGATGCCGGATGATGCTCAA
clona-5.seq    288  TTAGACCAGCGTACAGTAGAATCACGAGTGGGTGACGGGCTGATGCCGGATGATGCTCAA

clona-3.seq    361  GGCTTGCACAGTGGGGTAGGTGCACATTTTTGAAACACTAATGACAATGATTGCACACAA
clona-4.seq    348  GGCTTGCACAGTGGGGTAGGTGCACATTTTTGAAACACTAATGACAATGATTGCACACAA
clona-2.seq    348  GGCTTGCACAGTGGGGTAGGTGCACATTTTTGAAACACTAATGACAATGATTGCACACAA
clona-1.seq    348  GGCTTGCACAGTGGGGTAGGTGCACATTTTTGAAACACTAATGACAATGATTGCACACAA
RIA3.seq       348  GGCTTGCACAGTGGGGTAGGTGCACATTTTTGAAACACTAATGACAATGATTGCACACAA
clona-5.seq    348  GGCTTGCACAGTGGGGTAGGTGCACATTTTTGAAACACTAATGACAATGATTGCACACAA

```

Anexo 4: Resultados de la secuenciación de RIA3 en pGEM -T Easy (continuación)

```

clona-3.seq 421 AACGCTTGCTGCATGTTGTCAAATGGAAATTCAATCATGGAGCAACGGGGCTTGGGTGAG
clona-4.seq 408 AACGCTTGCTGCATGTTGTCAAATGGAAATTCAATCATGGAGCAACGGGGCTTGGGTGAG
clona-2.seq 408 AACGCTTGCTGCATGTTGTCAAATGGAAATTCAATCATGGAGCAACGGGGCTTGGGTGAG
clona-1.seq 408 AACGCTTGCTGCATGTTGTCAAATGGAAATTCAATCATGGAGCAACGGGGCTTGGGTGAG
RIA3.seq 408 AACGCTTGCTGCATGTTGTCAAATGGAAATTCAATCATGGAGCAACGGGGCTTGGGTGAG
clona-5.seq 408 AACGCTTGCTGCATGTTGTCAAATGGAAATTCAATCATGGAGCAACGGGGCTTGGGTGAG

clona-3.seq 481 GTGGGACTGGTGAAGGGTGTGCGTGTTCCTTTGATCAAATCGTTTCCTCTTTCTGCAGCG
clona-4.seq 468 GTGGGACTGGTGAAGGGTGTGCGTGTTCCTTTGATCAAATCGTTTCCTCTTTCTGCAGCG
clona-2.seq 468 GTGGGACTGGTGAAGGGTGTGCGTGTTCCTTTGATCAAATCGTTTCCTCTTTCTGCAGCG

clona-1.seq 468 GTGGGACTGGTGAAGGGTGTGCGTGTTCCTTTGATCAAATCGTTTCCTCTTTCTGCAGCG
RIA3.seq 468 GTGGGACTGGTGAAGGGTGTGCGTGTTCCTTTGATCAAATCGTTTCCTCTTTCTGCAGCG
clona-5.seq 468 GTGGGACTGGTGAAGGGTGTGCGTGTTCCTTTGATCAAATCGTTTCCTCTTTCTGCAGCG

clona-3.seq 541 GCTGGGGGTGTGCCGGGTTTGGGGTTTCCGAGCATGGGCGTTAGGCATA-----
clona-4.seq 528 GCTGGGGGTGTGCCGGGTTTGGGGTTTCCGAGCATGGGCGTTAGGCATA-----
clona-2.seq 528 GCTGGGGGTGTGCCGGGTTTGGGGTTTCCGAGCATGGGCGTTAGGCATA-----
clona-1.seq 528 GCTGGGGGTGTGCCGGGTTTGGGGTTTCCGAGCATGGGCGTTAGGCATA-----
RIA3.seq 528 GCTGGGGGTGTGCCGGGTTTGGGGTTTCCGAGCATGGGCGTTAGGCATA-----
clona-5.seq 528 GCTGGGGGTGTGCCGGG--TTGGGGTTTC--AATCATGG--CGTT--GGCATA-----

```

Anexo 5: Análisis de secuencias *in silico* de pHR: GUSPlus y pRHR: GUSPlus

SerialCloner 2.6.1

File Edit Sequence Features Restriction Protein Function Window Help

The screenshot shows the 'Align Two Sequences' window in SerialCloner 2.6.1. The window is titled 'Align Two Sequences' and has a menu bar with 'File', 'Edit', 'Sequence', 'Features', 'Restriction', 'Protein', 'Function', 'Window', and 'Help'. The window contains two sequence input fields: 'Sequence 1' and 'Sequence 2'. 'Sequence 1' is set to 'Sequence Window #8' and 'Sequence 2' is set to 'pRHR-GUSPlus.xdna'. Both sequences have 'anti-parallel' alignment options checked. The 'Local Align' button is visible. Below the input fields, there are tabs for 'Local Align Sequences' and 'NCBI BLAST 2 Sequences'. The 'Local Align Sequences' tab is active, showing a sequence alignment. The alignment is displayed in a grid format with sequence coordinates on the left and right. The sequences are color-coded: black for the reference sequence (Seq_1) and various colors (red, orange, green) for the target sequence (Seq_2). The alignment shows a high degree of similarity between the two sequences, with some gaps indicated by vertical lines. The window includes a menu bar, a toolbar, and a status bar at the bottom.

Seq_1	390	TIGCTGCAITGTGTCAAATGGAAATTC AATCATGGAGCAACGGGGCTTGGGTGAGGTGGG	449
Seq_2	7021	TIGCTGCAITGTGTCAAATGGAAATTC AATCATGGAGCAACGGGGCTTGGGTGAGGTGGG	7080
Seq_1	450	ACTGGTGGAAAGGGTGTGCGTGTTC TTIGATCAAATCGTTCCTTTCTGCAGCGGCTGG	509
Seq_2	7081	ACTGGTGGAAAGGGTGTGCGTGTTC TTIGATCAAATCGTTCCTTTCTGCAGCGGCTGG	7140
Seq_1	510	GGGTGTGCCGGGGTTTGGGGTTCCGAGCATGGGCGTTAGGCATAGATATCGGTACCTCG	569
Seq_2	7141	GGGTGTGCCGGGGTTTGGGGTTCCGAGCATGGGCGTTAGGCATAGATATCGGTACCTCG	7200
Seq_1	570	CTGAGGCTTGACATGATTGGTGCATGTTTGTATGAAGCTACAGGACTGATTGGCGGG	629
Seq_2	7201	CTGAGGCTTGACATGATTGGTGCATGTTTGTATGAAGCTACAGGACTGATTGGCGGG	7260
Seq_1	630	CTATGAGGGCGGGGAAGCTCTGGAAGGGCCGCGATGGGGCGCGGGGCTCCAGAAGCG	689
Seq_2	7261	CTATGAGGGCGGGGAAGCTCTGGAAGGGCCGCGATGGGGCGCGGGGCTCCAGAAGCG	7320
Seq_1	690	CCATACGGCCCGCTGGCGGCACCCATCCGGTATAAAGCCCGGACCCCGAACGGTGACC	749
Seq_2	7321	CCATACGGCCCGCTGGCGGCACCCATCCGGTATAAAGCCCGGACCCCGAACGGTGACC	7380

Character Size: Screen size 12 pts, Print size 11 pts. Buttons: Copy to Clipboard, Page Setup, Print.

*En el resultado de secuenciación se aprecian las secuencias de interés considerando que el plásmido pHR: GUSPlus se empleó como plantilla en la obtención de pRHR: GUSPlus. Las secuencias en colores se corresponden con la plantilla ensamblada *in silico* y las secuencias en negro se corresponde con el resultado de la secuenciación de pRHR: GUSPlus.

Anexo 5: Análisis de secuencias *in silico* de pHR: GUSPlus y pRHR: GUSPlus
(Continuación)

*Mapa gráfico de la plantilla ensamblada *in silico* de pRHR: GUSPlus.

RIA3 (rojo). HSP70A/RBCS2 (HR) (naranja). GUSPlus (rosa). 3'UTR (violeta). El resto de las secuencias se corresponde al plásmido pSP124S.

