



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS
TRANSPLASTÓMICAS DE LA MICROALGA VERDE
Chlamydomonas reinhardtii TRANSFORMADAS
CON EL GEN *phyA* QUE CODIFICA PARA UNA
FITASA DE LA BACTERIA *Selenomonas
ruminantium***

Tesis que presenta

SHIRLEY BERNARDO CANDELERO

En opción al título de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

Junio 2017

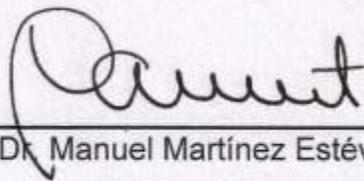
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de Shirley Bernardo Candelero, titulado “GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS TRANSPLASTÓMICAS DE LA MICROALGA VERDE *Chlamydomonas reinhardtii* TRANSFORMADAS CON EL GEN *phyA* QUE CODIFICA PARA UNA FITASA DE LA BACTERIA *Selenomonas ruminantium*”, fue realizado en el laboratorio BT04, Biotecnología de microalgas y cultivos tropicales de la Unidad de Biotecnología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., en la línea de Biotecnología de microalgas, bajo la dirección de la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia y el Dr. Santy Peraza Echeverría, dentro de la opción en Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:



Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 8 de junio de 2017

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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



Firma: _____

I.B.Q. Shirley Bernardo Candelero

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Generación y caracterización de líneas transplastómicas de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* transformadas con el gen *phyA* que codifica para una fitasa de la bacteria *Selenomonas ruminantium*” bajo la dirección de la Dra Virginia Herrera Valencia.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a mis asesores de tesis, a la Dra Virginia Herrera y al Dr. Santy Peraza por todo el apoyo académico, moral, sus consejos, sugerencias y amistad que fueron de gran ayuda durante el transcurso de la maestría.

A mi comité tutorial: Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, Dr. Santy Peraza Echeverría, Dra. Ileana Echevarría Machado, Dr. Juan Tun Garrido por sus grandes aportaciones y comentarios brindados durante el desarrollo de este trabajo de investigación

A mi comité revisor: Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, Dr. Santy Peraza Echeverría, Dra. Ileana Echevarría Machado, Dr. Juan Tun Garrido y el Dr. Luis Felipe Barahona Pérez por su apoyo a la revisión de este trabajo de tesis.

A la Unidad de Biotecnología y al laboratorio de “Biotecnología de Microalgas y Cultivos Tropicales” del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por las instalaciones brindadas para el desarrollo de esta tesis.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas del CICY y a todo el personal que en el labora, por la formación académica.

Agradezco de igual forma al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca No. 407238 otorgada para los estudios de maestría, así como al financiamiento del proyecto de ciencia básica No. 60465 otorgado para la realización de este proyecto.

A la Q.B.A. Ileana C. Borges Argáez por el apoyo técnico y moral brindado a lo largo del desarrollo de esta tesis. Al Dr. Carlos Puch por el apoyo brindado en el la técnica de PCR en Tiempo Real.

Gracias a mis compañeros y amigos del laboratorio “Biotecnología de Microalgas y Cultivos Tropicales”: Merly, Margarita, Melissa, Patricia, Maru, Anny, Yoli, Ángeles, Miguel Ángel, Iván, Rodrigo, Vero, Sergio y Ricardo por su amistad, así como el apoyo moral, académico y todos los momentos compartidos durante la realización del proyecto.

DEDICATORIAS

A mi esposo José R. Novelo Dzul por todo su apoyo, cariño y amor incondicional durante los años que llevamos juntos y por la familia que estamos formando.

A mis padres, la Sra Ma. Lourdes Candeleró Jiménez y el Sr. Paúl Bernardo Olán por todo lo que han enseñado y su apoyo durante toda mi vida.

A la familia Córdova Bernardo por estar siempre echándome porras.

A la familia Bernardo Buenfil y la familia Novelo Dzul por mostrarme su apoyo y estar pendiente de mí.

A mis amigos, que sin mencionar nombres, ellos saben muy bien quienes son.

ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS	IV
LISTADO DE CUADROS	vii
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	3
1. ANTECEDENTES.....	3
1.1 Generalidades de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	3
1.1.1 Núcleo	4
1.1.2 Mitocondria	5
1.1.3 Cloroplasto.....	5
1.2 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> como modelo de estudio	6
1.3 Transformación genética de plástidos	6
1.4 Transformación por biobalística.....	9
1.5 Proteínas recombinantes y biorreactores más comunes.	10
1.6 Plantas como biorreactores para la producción de proteínas recombinantes....	12
1.7 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> como biorreactor para la producción de proteínas recombinantes.	13
1.7.1 Proteínas recombinantes producidas en <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	15
1.8 Enzimas fitasas	18

1.8.1 Características generales de las fitasas.....	18
1.8.2 El sustrato: Ácido fítico.....	19
1.8.3 Clasificación de las enzimas fitasas.....	21
1.8.4 Aplicación de las fitasas en biotecnología.....	22
1.8.5 Fitasas comerciales.....	22
1.8.6 Fitasa de <i>Selenomonas ruminantium</i>	23
1.9 JUSTIFICACIÓN.....	25
1.10 HIPÓTESIS.....	26
1.11 OBJETIVO GENERAL.....	26
1.11.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
1.12 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	27
CAPÍTULO II.....	29
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
2.1 Cepa y cultivo de <i>C. reinhardtii</i>.....	29
2.1.1 Conteo celular.....	29
2.2 Plásmidos de transformación.....	30
2.2.1 Vector pChPhy.....	30
2.2.2 Vector pRH12A.....	31
2.3 Obtención de líneas transplastómicas de <i>C. reinhardtii</i> mediante biobalística.....	32
2.4 Caracterización de la acumulación celular y de biomasa seca.....	32
2.5 Transformación del cloroplasto de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> mediante biobalística.....	33
2.6 Extracción de ADN genómico (ADNg).....	34
2.7 Marcaje y obtención de la sonda de ADN.....	34
2.8 Análisis de expresión de los gen phyASr en las líneas transplastómicas de <i>C.</i>	

<i>reinhardtii</i>	35
2.8.1 Diseño de oligonucleótidos	35
2.9 Extracción de ARN	36
2.9.1 Síntesis de ADNc.....	36
2.10 Análisis de la expresión por medio PCR en tiempo Real	37
CAPÍTULO III	39
3. RESULTADOS	39
3.1 Transformación de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> con el pChPhy mediante biobalística	39
3.2 Evaluación de las colonias transformadas y verificación de homoplasma	42
3.3 Caracterización de la acumulación celular y de biomasa seca	46
3.4 Análisis de expresión del gen <i>phyASr</i> en las líneas transplastómicas	50
3.4.1 Cuantificación absoluta del gen <i>phyASr</i> en las líneas transplastómicas mediante qRT-PCR.....	51
CAPÍTULO IV	55
4. DISCUSIÓN	55
CAPÍTULO V	59
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	59
5.1 CONCLUSIONES	59
5.2 PERSPECTIVAS	60
BIBLIOGRAFIA	61
ANEXOS	68

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Representación esquemática de la morfología de una célula de <i>C. reinhardtii</i> , (tomada de Nickelsen y Kuck, 2000).....	4
Figura 1.2. Mapa del genoma del cloroplasto de <i>C. reinhardtii</i> , (tomado de Maul <i>et al.</i> , 2002).....	8
Figura 1.3. Hidrólisis del fitato por las fitasas en inositol, fosfato y otros elementos divalentes tomado de (Mukhametzhanova <i>et al.</i> , 2012).....	19
Figura 1.4. Efectos del pH y cationes metálicos divalentes en la naturaleza fisiológica de fitato A) El fitato existe como fitato libre de metal o un complejo de metal-fitato, dependiendo del pH y de los cationes de metales divalentes. El grado de unión depende de pH y de la presencia de cationes metálicos divalentes. Además, a pH ácido y alta concentración de cationes, se forma un complejo de metal-fitato debido a la interacción electrostática directa. B) Los cationes metálicos divalentes se unen específicamente a los grupos fosfato del fitato, en función de los radios iónicos de los cationes metálicos. La formación del complejo metal-bidentado prefiere cationes metálicos (tomado de Oh <i>et al.</i> , 2004).....	20
Figura 1.5. Estrategia experimental general.....	27
Figura 2.1. A) Parte central de la Cámara de Neubauer; B) División de la celda de la cámara en los cinco campos visuales utilizados para realizar el conteo de las células de <i>C. reinhardtii</i>	30
Figura 2.2. Esquema estructural del plásmido pChPhy. En el esquema se muestran los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción EcoRI, BamHI, NotI, Sall, EcoRV y SphI.....	31
Figura 2.3. Esquema estructural del plásmido pRH12A. En el esquema se muestran los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción BamHI y EcoRV.....	31
Figura 3.1. Verificación de integridad del vector de transformación. A) Esquema del vector de transformación pChPhy incluyendo sus sitios de restricción y los pesos de los fragmentos de las regiones que lo conforman. B) Comprobación de la integridad del vector pChPhy por digestión. Carril 1 digestión del plásmido pRH12A con EcoRV y BamHI. Carril 2 digestión del plásmido pChPhy con EcoRV y BamHI. Carril 3 digestión del plásmido pChPhy con EcoRV y NotI. Carril 4 digestión del plásmido pChPhy con BamHI y Sall.....	40
Figura 3.2. Cajas de las células recuperadas del proceso de transformación por biobalística.....	41

- Figura 3.3.** Verificación de la integridad del ADN extraído de las líneas CPhy 11 hasta la CPhy B5, en un gel de agarosa al 1.2 % con bromuro de etidio.....**42**
- Figura 3.4.** Estrategia de la transformación del genoma del cloroplasto. En A) se muestra la manera de inserción en el cloroplasto, vía recombinación homóloga, en la cepa silvestre (WT). En B) se muestra el sitio, en el genoma del cloroplasto, donde va dirigida esta construcción.....**42**
- Figura 3.5.** Estrategia para detectar la presencia del gen *phyASr* en el genoma del cloroplasto de *C. reinhardtii*. A) Esquema con los sitios de restricción de NcoI y Sall. En el se muestra también el tamaño esperado del fragmento digerido así como también muestra la zona a la que se debe unir la sonda phy. B) Resultados del Southern blot donde se observa la presencia de la banda con el tamaño esperado (aprox. 6 kb). La cepa silvestre (wt) como control negativo y el plásmido pChPhy (P) como control positivo.....**43**
- Figura 3.6.** Estrategia para detectar la homoplasma en las líneas transplastómicas de *C. reinhardtii*. A) Esquema con los sitios de restricción de NcoI. En el se muestra también el tamaño esperado del fragmento digerido así como también muestra la zona a la que se debe unir la sonda RH1(en amarillo). B) Resultados del Southern blot donde se observa que las 10 colonias elegidas de la línea CPhy 29 son homoplásmicas, el tamaño esperado aproximadamente es de 6 kb. La cepa silvestre (wt) como control positivo al igual que el plásmido pChPhy (P).**45**
- Figura 3.7.** Southern blot de tres clonas de las líneas transplastómicas, CPhy 13, CPhy 21, CPhy 25 y CPhy B3. La sonda usada en este experimento fue la sonda RH1. El tamaño en este experimento es de 6.0 kb. La cepa silvestre (wt) como control positivo al igual que el plásmido pChPhy (P).**46**
- Figura 3.8.** Cultivo de las líneas transplastómicas (C1-C5) y la cepa silvestre (wt) a los siete días. En la parte superior se muestra la parte inferior de los matraces. En la parte inferior se observa una toma al microscopio a 40X.....**47**
- Figura 3.9.** Diferencia en el conteo celular de las líneas transplastómicas (C1-C5) y la cepa silvestre (WT).....**48**
- Figura 3.10.** Promedio de la biomasa seca por 50 mL de medio de cultivo. El eje de las “Y” muestra el peso (mg) que hay en las cinco líneas transplastómicas (C1-C5) respecto a la cepa silvestre (WT). El eje de las “X” muestra las líneas transplastómicas y la cepa silvestre.....**49**

Figura 3.11. Verificación de la integridad del ARN extraído de las líneas C1 hasta la C5 y de la línea silvestre (WT).....	50
Figura 3.12. RT-PCR de las líneas transplastómicas (C1-C5) y la cepa silvestre (WT) con los oligonucleótidos del gen <i>rpl16</i> . Gel de agarosa al 1.2 % con bromuro de etidio. Como control positivo se utilizó ADNg y control negativo se utilizó H ₂ Oup.....	50
Figura 3.13. RT-PCR de las líneas transplastómicas (C1-C5) y la cepa silvestre (WT) con los oligonucleótidos del gen <i>phyASr</i> . El control positivo (C+) es el plásmido pChPhy y como control negativo (C-) H ₂ Oup. El amplicón esperado es de 196 pb.....	51
Figura 3.14. Eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos del gen <i>phyASr</i> . A) Curva estándar, B) curva de disociación.....	52
Figura 3.15. Cuantificación absoluta de la expresión del gen <i>phyASr</i> por qRT-PCR de las cinco líneas transplastómicas de <i>C. reinhardtii</i> . El eje de las “Y” muestra el número de copias que hay en las cinco líneas transplastómicas (C1-C5) respecto a la cepa silvestre (WT). El eje de las “X” muestras las líneas transplastómicas y la cepa silvestre.....	53

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Resumen de las características de los sistemas tradicionales de expresión de PRs.....	12
Cuadro 1.2 Proteínas recombinantes producidas en <i>C. reinhardtii</i>	15
Cuadro 1.3 Proteínas fitasas expresadas en <i>C. reinhardtii</i>	24
Cuadro 2.1 Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR y qRT-PCR.....	37
Cuadro 3.1 Conteo celular de las líneas transplastómicas (C1-C5) y la cepa silvestre (Wt) a los siete días. El experimento se realizó por triplicado y se obtuvo el promedio de células por mL de medio de cultivo.....	47
Cuadro 3.2 Biomasa seca de las líneas transplastómicas (C1-C5) y la cepa silvestre (WT) a los siete días. El experimento se realizó por triplicado y se obtuvo el promedio de la biomasa seca por 50 mL de medio de cultivo.....	49

ABREVIATURAS

3'UTR	Región 3' no traducible
5'UTR	Región 5' no traducible
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNg	ADN genómico
ANOVA	Análisis de varianza/Analysis Of Variance
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosomal
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosin trifosfato
BPII	Buffer de fosfatos II
BPP	Fitasas β -hélice
C-	Control negativo
C+	Control positivo
CHCl ₃ : AIA	Cloroformo: alcohol isoamilico
C _T	Umbral de ciclo (C _T por sus siglas en inglés Cycle Threshold)
dNTP	Deoxinucleósido trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FTU	Unidad de la actividad fitasa por kilogramo/Units of phytase activity
FTU kg ⁻¹	Unidades de fitasa por kilogramo
GRAS	Generalmente considerado como seguro/Generally regarded as safe
H ₂ Oup	Agua ultrapura
HAP	Fosfatasas ácidas de histidina
IP ₆	Fitato
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potasio dibásico
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio monobásico
LSD	Least Sgnificant Difference
mt+	Apareamiento positivo/positive mating-type mt+
NEB	New England Biolabs

nt	Nucleótido
P+5'UTR	Promotor más la región 5' no traducible
PAP	Fosfatasa ácida púrpura
pb	Pares de base
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa/ polymerase chain reaction
Pi	Fósforo inorgánico
PO ₄	Fosfato
PRs	Proteínas recombinantes
PST	Proteína Soluble Total
PTP	Proteínas fosfatasa de tirosina
qRT-PCR	RT-PCR en tiempo real
r ²	Coefficiente de correlación
rpm	Revoluciones por minuto
RRH	Región de recombinación homóloga
RT-	Sin la adición de la transcriptasa reversa
RT+	Adición de la transcriptasa reversa
RT-PCR	Reacción en cadena de polimerasa-transcripción reversa/Reverse transcription polymerase chain reaction
SD	Desviación Estándar
TA	Tris-acetato-sin sales de fósforo
TAP	Tris-acetato-fosfato
T _m	Temperatura de disociación/Melting temperature
UTRs	Regiones no traducibles/Untranslated region

RESUMEN

Las fitasas son enzimas fosfatasa capaces de catalizar la hidrólisis de los enlaces éster fosfato, pueden hidrolizar uno o más grupos fosfatos del ácido fítico (IP6) para producir fósforo inorgánico. Las fitasas son ampliamente utilizadas como aditivos en la alimentación animal, sobre todo en los animales monogástricos como cerdos, pollos y peces, para incrementar la disponibilidad del fósforo y otros minerales. El concepto de fitasa ideal se basa en la capacidad de hidrólisis de una manera eficaz, resistencia a altas temperaturas y que los costos de producción sean baratos. La búsqueda de la fitasa ideal ha tomado dos rutas: la identificación de nuevas fitasas tipo silvestre en la naturaleza y la ingeniería genética sobre los sistemas de expresión para obtener características deseables de las fitasas conocidas.

Por otro lado, *Chlamydomonas reinhardtii*, una microalga verde es considerada un organismo modelo y con un gran potencial como biorreactor para la producción de proteínas recombinantes de interés comercial, incluyendo las fitasas. Las características que posee *C. reinhardtii* son: crecimiento rápido, potencial para escalar el cultivo rápidamente, no requieren tierras cultivables, crece fotosintéticamente usando la energía luminosa y el CO₂ como fuente de carbono. En la actualidad, existen reportes donde el cloroplasto de *C. reinhardtii* ha sido transformado para obtener proteínas de interés farmacéutico, terapéutico, entre otros, demostrando así la capacidad de esta microalga como un biorreactor atractivo para la producción de proteínas recombinantes.

En el presente trabajo de tesis, se transformó el cloroplasto de *C. reinhardtii*, mediante la técnica de biobalística, con el plásmido *pChPhy*, que contiene el gen *phyASr* que codifica para una enzima fitasa de la bacteria ruminal *Selenomonas ruminantium*. Se comprobó la inserción de la construcción en el cloroplasto por medio de la técnica del Southern blot, se evaluó la homoplasma de las líneas transplastómicas obtenidas y se eligieron cinco líneas de manera aleatoria, para el análisis de expresión. A estas líneas transplastómicas homoplásmicas se les realizó un análisis de expresión del gen *phyASr* mediante RT-PCR de punto final, dando como resultado que todas las líneas expresaban dicho gen. Por otro lado, se realizó el análisis cuantitativo mediante qRT-PCR donde dos de las cinco líneas (C1 y C3) presentaron mayor nivel de expresión del gen *phyASr* entre las cinco líneas transplastómicas analizadas.

ABSTRACT

Phytases are phosphatase enzymes capable of catalyzing the hydrolysis of the phosphate ester bonds, they can hydrolyze one or more phosphate groups of phytic acid (IP6) to produce inorganic phosphorus. Phytases are widely used as additives in animal feed, especially in monogastric animals such as pigs, chickens and fish, to increase the availability of phosphorus and other minerals. The ideal phytase concept is based on the ability to hydrolyze in an effective way, resistance to high temperatures and production costs are cheap. The search for the ideal phytase has taken two routes: the identification of new wild type phytases in the nature and the genetic engineering on the expression systems to obtain desirable characteristics of the known phytase

On the other hand, *Chlamydomonas reinhardtii*, a green microalga is considered a model organism and with a great potential as a bioreactor for the production of recombinant proteins of commercial interest, including phytases. The characteristics of *C. reinhardtii* are: fast growth, potential to scale the crop rapidly, do not require arable land, grow photosynthetically using light energy and CO₂ as a carbon source. At present, there are reports where the chloroplast of *C. reinhardtii* has been transformed to obtain proteins of pharmaceutical, therapeutic interest, among others, thus demonstrating the capacity of this microalga as an attractive bioreactor for the production of recombinant proteins.

In the thesis, the chloroplast of *C. reinhardtii* was transformed by the biobalistic technique with the plasmid pChPhy, which contains the *phyASr* gene coding for a phytase enzyme of the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. The insertion of the construct into the chloroplast was verified by Southern blot technique, the homoplasmy of the obtained transplastomic lines was evaluated and five lines were randomly selected for expression analysis. To these homoplasmic transplastomic lines, an expression analysis of the *phyASr* gene was performed by end-point RT-PCR, resulting that all lines expressed the gene. On the other hand, the quantitative analysis was performed by qRT-PCR, where two of the five lines (C1 and C3) presented a higher expression level of the *phyASr* gene among the five transplastomic lines analyzed.

INTRODUCCIÓN

La demanda mundial de proteínas recombinantes para aplicaciones industriales, diagnósticas y terapéuticas va en constante crecimiento y por lo tanto, los sistemas biorreactores, son cada vez más importantes para producir grandes cantidades de proteínas en casos donde las fuentes tradicionales son limitadas debido al costo y/o disponibilidad (Walker *et al.*, 2005).

Las microlagas son una plataforma ideal para la producción a gran escala de productos de alto valor, ya que son de rápido crecimiento, son fotosintéticas y requieren muy pocos nutrientes. Además, son consideradas como seguras y ya existen diversos productos de comercialización para el consumo humano y animal. Las proteínas recombinantes como vacunas, anticuerpos, enzimas industriales pueden ser producidos en microlagas a bajo costo con una gran aplicación (Barrera y Mayfield, 2016).

Dentro de las enzimas con aplicación industrial se encuentran las fitasas, las cuales son utilizadas como aditivos alimenticios en las moliendas usadas para alimentar a los animales monogástricos como cerdos, aves y peces, quienes tienen poca o nula actividad de fitasa en el tracto digestivo. La base de la alimentación de estos animales, son los granos de cereales y leguminosas y el 60-80% del fósforo total en estos granos se encuentra en forma de ácido fítico y su forma de sal, el fitato. Las fitasas catalizan la hidrólisis del fósforo del fitato para obtener fósforo inorgánico Pi.

La pobre digestión del fósforo del fitato en los piensos por animales monogástricos causa tres problemas importantes: la contaminación ambiental del fósforo en las excretas, la necesidad de la suplementación dietética de fósforo inorgánico y el agotamiento de los depósitos naturales de fósforo. El mercado mundial de fitasa ha experimentado una rápida expansión desde 2007-2008 debido al drástico aumento en el precio de la alimentación de fósforo inorgánico y la regulación de la eliminación de fósforo de estiércol (Lei *et al.*, 2013).

Las fitasas son enzimas con una gran importancia y aplicación biotecnológica, tanto en la alimentación humana como en la alimentación animal. La fitasa que ha sido aislada de *Selenomonas ruminantium*, una bacteria que vive en condiciones anaeróbicas del rumen de los rumiantes, puede ser una buena candidata para ser utilizada como aditivo para la

alimentación de los animales monogástricos, a fin de mejorar la absorción de nutrientes y evitar un impacto negativo en el ambiente (Chu *et al.*, 2004).

Por otro lado, *Chlamydomonas reinhardtii* puede considerarse como una alternativa viable para la producción de proteínas recombinantes de interés industrial, como vacunas, anticuerpos, enzimas industriales. La integración de transgenes en el genoma del cloroplasto, tiene importantes ventajas sobre otros sistemas de expresión. Esta microalga posee características como biorreactor, tales como: crecimiento más rápido, potencial para escalar el cultivo rápidamente, se puede cultivar en contención para reducir el riesgo de flujo de genes, no requieren tierras cultivables, crece fotosintéticamente usando la energía luminosa y el CO₂ como fuente de carbono. Las proteínas obtenidas en el cloroplasto de *C. reinhardtii* han demostrado poseer la función biológica, tal como en su sistema original de expresión. Por lo tanto, la producción de proteínas recombinantes con interés biotecnológico pueden ser obtenidas en esta microalga, de manera segura (sin riesgos de contaminación con toxinas por ejemplo) y ayudando a disminuir el costo de producción (Jin *et al.*, 2016; Barrera y Mayfield, 2013).

En el presente trabajo se transformó el cloroplasto de *C. reinhardtii* con el gen *phyASr* de la bacteria ruminal *Selenomonas ruminantium* y se evaluó la expresión de las líneas transplastómicas homoplásmicas.

CAPÍTULO I

1. ANTECEDENTES

Las microalgas son un grupo diverso de organismos unicelulares eucariotas que son de interés para la investigación básica y aplicada. La microalgas están emergiendo como una fuente de compuestos químicos, de proteínas y de metabolitos, además de componentes que se pueden utilizar con fines energéticos, principalmente para la obtención de biodiesel. Para la microalga modelo, *Chlamydomonas reinhardtii*, esto ha impulsado un período de rápido desarrollo y avances en técnicas que le permitan estar preparada para su explotación como una plataforma biotecnológica industrial (Scaife *et al.*, 2015).

1.1 Generalidades de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Chlamydomonas es un género de algas verdes unicelulares (Chlorophyta). Se encuentran en todo el mundo, tanto en el suelo, el agua dulce, océanos e incluso en nieve. Se han descrito más de 500 especies diferentes de *Chlamydomonas*, pero la mayoría de los científicos trabajan con sólo unas pocas (<http://www.chlamy.org/info.html>).

Las especies de *Chlamydomonas* han sido definidas basándose solamente en criterios morfológicos. El género comprende algas unicelulares que poseen clorofila, con dos flagelos anteriores, un cloroplasto basal circundante a uno o más pirenoides y una pared celular distinguible. Las especies se han distinguido dentro del género por diferencias en tamaño y forma de la célula, forma y posición del cloroplasto y pirenoides, longitud de los flagelos, número y posición de vacuolas contráctiles, y más características estructurales sutiles que son visibles a nivel del microscopio óptico. Se cree que las principales cepas de laboratorio se derivan de aislamientos hechos por G.M. Smith en 1945 de una muestra colectada del suelo cerca de Amherst, Massachussets. La especie más utilizada en el laboratorio es *Chlamydomonas reinhardtii* (Harris, 2001).

El alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* muestra muchos de los beneficios como modelo de experimentación que presenta la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, por lo que se le ha denominado “la levadura verde” (Rochaix, 1995). Un ejemplo de esto, es el hecho de que las células de esta especie son haploides y pueden crecer en un medio simple de sales inorgánicas, utilizando la fotosíntesis para obtener energía. También pueden crecer en la oscuridad total, si se provee acetato como una fuente alternativa de carbono.

La formación de meiosporas, similar a la levadura, está controlada por dos “mating types” y puede ser utilizado para análisis genético convencional, por ejemplo, análisis de tétradas y la genética recombinante para generar las cepas con múltiples marcadores genéticos (Nickelsen y Kück 2000). La estructura de la célula de *C. reinhardtii* en segunda y tercera dimensión se puede observar en la figura 1.1.

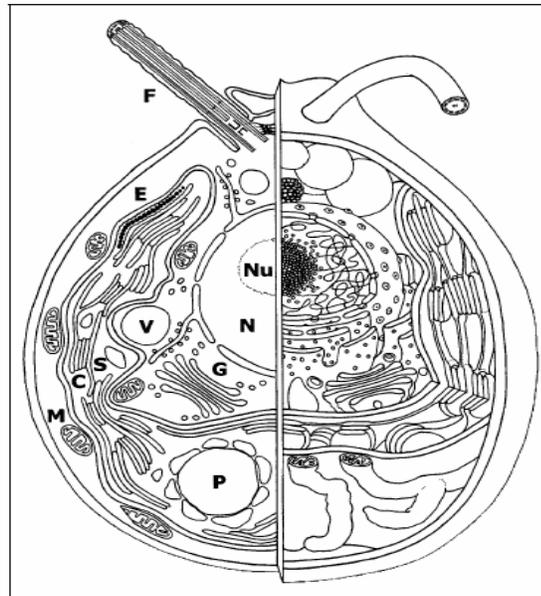


Figura 1.1 Representación esquemática de la morfología de una célula de *C. reinhardtii*, (tomada de Nickelsen y Kück, 2000).

La célula de una cepa silvestre de *C. reinhardtii* mide en promedio unos 10 μm de diámetro (con una variación significativa a través del ciclo celular) y 3 μm de grosor; se encierra dentro de una pared celular la cual es rica en hidroxiprolina y que se asemeja a las glicoproteínas encontradas ampliamente en plantas. La pared celular de *C. reinhardtii* no contiene celulosa; las células contienen un solo cloroplasto en forma de copa que ocupa cerca del 40 al 60 % del volumen total de la célula (Harris, 2001; Rochaix, 1995).

1.1.1 Núcleo

En la célula de *C. reinhardtii* la membrana nuclear es continua con el retículo endoplásmico, y se encuentran cerca de uno a cuatro aparatos de Golgi. Se estima que el genoma nuclear tiene un tamaño de 1×10^8 pares de bases y aproximadamente el 65 % de éstas son G ó

C. Este alto contenido de GCs a veces puede producir dificultades en la clonación de genes. Para mejorar esta condición, se requiere que en la amplificación de los genes, las secuencias de oligonucleótidos elegidos, presenten del 45% al 50% de contenido de G-C (Grossman *et al.*, 2003; Harris, 2001).

1.1.2 Mitocondria

Las mitocondrias se encuentran en el citosol de una manera y en ocasiones son observables en micrografías electrónicas como estructuras alargadas o ramificadas. El genoma mitocondrial de 15.8 Kb, es lineal y muestra secuencias repetidas invertidas en sus extremos que se piensa están implicadas en la estabilización de ADNmt. Sólo contiene unos pocos genes: el *cob*, *cox1*, cinco subunidades de NADH deshidrogenasa mitocondrial, ARN mitocondrial (que se encuentran fragmentados en la secuencia de ADN); tres ARNt, y un marco de lectura abierto que codificada para una proteína que se asemeja a una transcriptasa reversa, además de dos genes codificados para ARNr. Mutantes que eliminan el gen *cob* no son capaces de crecer en el acetato en la oscuridad, pero son viables cuando son cultivados fototróficamente. Mutaciones puntuales en el gen *cob* pueden conferir resistencia a myxothiazol (Nickelsen, 2005; Harris, 2001).

1.1.3 Cloroplasto

C. reinhardtii tiene un único cloroplasto en forma de copa que ocupa el 75% del volumen de la célula. Es sitio de muchas reacciones metabólicas, incluyendo la biosíntesis de aminoácidos, isoprenoides, ácidos grasos y almidón (Rasala *et al.*, 2014). El genoma del cloroplasto (ADNcp o plastoma) es una molécula circular de aproximadamente 203 kpb que contiene 99 genes. Posee una estructura cuatripartita, que consiste en dos regiones invertidas repetidas (IR) de 21,2 kpb separando dos regiones simples de 80 kpb. Cada cloroplasto contiene aproximadamente 80 copias de su genoma (Jin *et al.*, 2016; Purton 2007). El genoma del cloroplasto ya ha sido secuenciado (No. de accesoión del GenBank BK000554) y comprende unos 203.395 Kb, contiene cerca de 99 genes incluyendo cinco genes de ARNr, 17 genes ribosomales para proteína, 30 para ARNt que especifican para todos los aminoácidos y cinco genes que codifican el núcleo catalizador de un tipo de ARN polimerasa de bacterias (Grossman *et al.*, 2003). La mayoría de estos genes codifican las subunidades de cualquiera de los complejos de fotosíntesis o de la maquinaria

transcripcional y/o traduccional (Nickelsen, 2005). El genoma del cloroplasto se encuentra disponible en la dirección electrónica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/32880373>). En la figura 1.2 se puede observar el genoma del cloroplasto, disponible también en la dirección electrónica: <http://www.chlamy.org/chloro/default.html>. El cloroplasto es el organelo más estudiado de *C. reinhardtii*.

1.2 *Chlamydomonas reinhardtii* como modelo de estudio

C. reinhardtii ha sido usada también como modelo para el estudio de respuesta al estrés provocado por modificaciones de nutrientes al medio, como el estrés por carencia de azufre (S) y fósforo (P). Estos estudios han demostrado que la limitación de S y P provoca varias respuestas, por ejemplo la desaceleración del metabolismo general, el cese en la división celular y la reducción en la actividad fotosintética (Irihimovitch y Yehudai-Resheff, 1998). Esta microalga ha servido también como modelo para estudiar otras áreas; debido a que es flagelada y fotosintéticamente activa ha surgido como un organismo experimental preferido para los estudios sobre flagelos y la biogénesis del cloroplasto incluyendo la fotosíntesis, además ha ayudado a nuestra comprensión de: la función del cloroplasto, mecanismos de regulación de los genes así como el ensamble de los mismos y la función del aparato fotosintético (Nickelsen y Kuck, 2000). Una aplicación biotecnológica potencial se relaciona con los estudios concernientes a la producción del gas hidrógeno en el cloroplasto, cuando opta por un metabolismo anaeróbico produciendo este gas (Manuell y Mayfield, 2006). Otra de las aplicaciones biotecnológicas, es el uso de *C. reinhardtii* como biorreactor para la expresión de proteínas recombinantes. Se han expresado varios genes heterólogos tanto en núcleo como en el cloroplasto, siendo el cloroplasto el que tiene el mayor número de reportes (Barrera y Mayfield, 2013).

1.3 Transformación genética de plástidos

Los plástidos son organelos especiales que solo están en las células vegetales o en la de algunos protistas y que se delimitan por una doble membrana. Su membrana interna a diferencia de la membrana interna mitocondrial, no es plegada; sin embargo, los plástidos suelen poseer membranas con arreglos variados en su interior. Los plástidos se producen en una variedad de formas diferenciadas, por ejemplo los cloroplastos involucrados en la

fotosíntesis, los amiloplastos en el almacenamiento de almidón y los cromoplastos en la producción de carotenoides que da el color a las frutas, son las formas más conocidas (Bock y Sarwar, 2004).

El genoma del cloroplasto, es usualmente una molécula circular que se replica por sí mismo y varía en tamaño de 120-220 Kb entre diferentes especies de plantas. Una típica célula de planta contiene aproximadamente 100 cloroplastos y cada cloroplasto posee 100 copias del mismo genoma; esto implica que solo un gen es representado por algunas 10,000 copias en una sola célula de planta. Solo el genoma, de casi todas las especies de plantas, posee dos regiones invertidas repetidas y así el número de copias de genes codificados por esta región es de 20 Kb aproximadamente. Por lo tanto, es muy atractivo introducir un transgen dentro del cloroplasto y obtener altos niveles de expresión, tomando como ventaja el número de copias que posee (Daniell *et al.*, 2005).

El cloroplasto de *C. reinhardtii* ha demostrado ser fácil de transformar. Esta transformación ocurre por recombinación homóloga, a diferencia de la transformación nuclear donde es difícil predecir el sitio de inserción en el genoma. El primer evento de transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii* fue hace casi tres décadas, donde se utilizó el método de biobalística (Boynton *et al.*, 1988).

En la era posgenómica, los genomas del cloroplasto y el nuclear han sido blancos para la manipulación genética para aumentar los rasgos agronómicos o introducir rasgos de valor agregado en las plantas. Entre varios alcances, la ingeniería del genoma del cloroplasto ha emergido como un enfoque exitoso. La manipulación del genoma del cloroplasto se ha vuelto rutina en el sistema modelo de tabaco y ha sido extendido a otros cultivos comestibles como tomate y papa. La expresión de transgenes en este organelo ofrece una única ventaja que da una tecnología segura y aceptable al público (Daniell *et al.*, 2005). Comparado con los sistemas de expresión convencionales, los plástidos ofrecen ciertas ventajas potenciales como son altos niveles de expresión de proteínas, ausencia de efectos epigenéticos (como silenciamiento del gen, efectos de posición y un fácil acomodamiento en operones), lo que hace de ellos un sistema atractivo. En el caso de la perspectiva de bioseguridad en las plantas superiores, esta tecnología incrementa significativamente la

contención del gen, ya que los plástidos son de herencia materna en la mayoría de las especies vegetales y por lo tanto no se transmiten por polen (Bock y Sarwar, 2004).

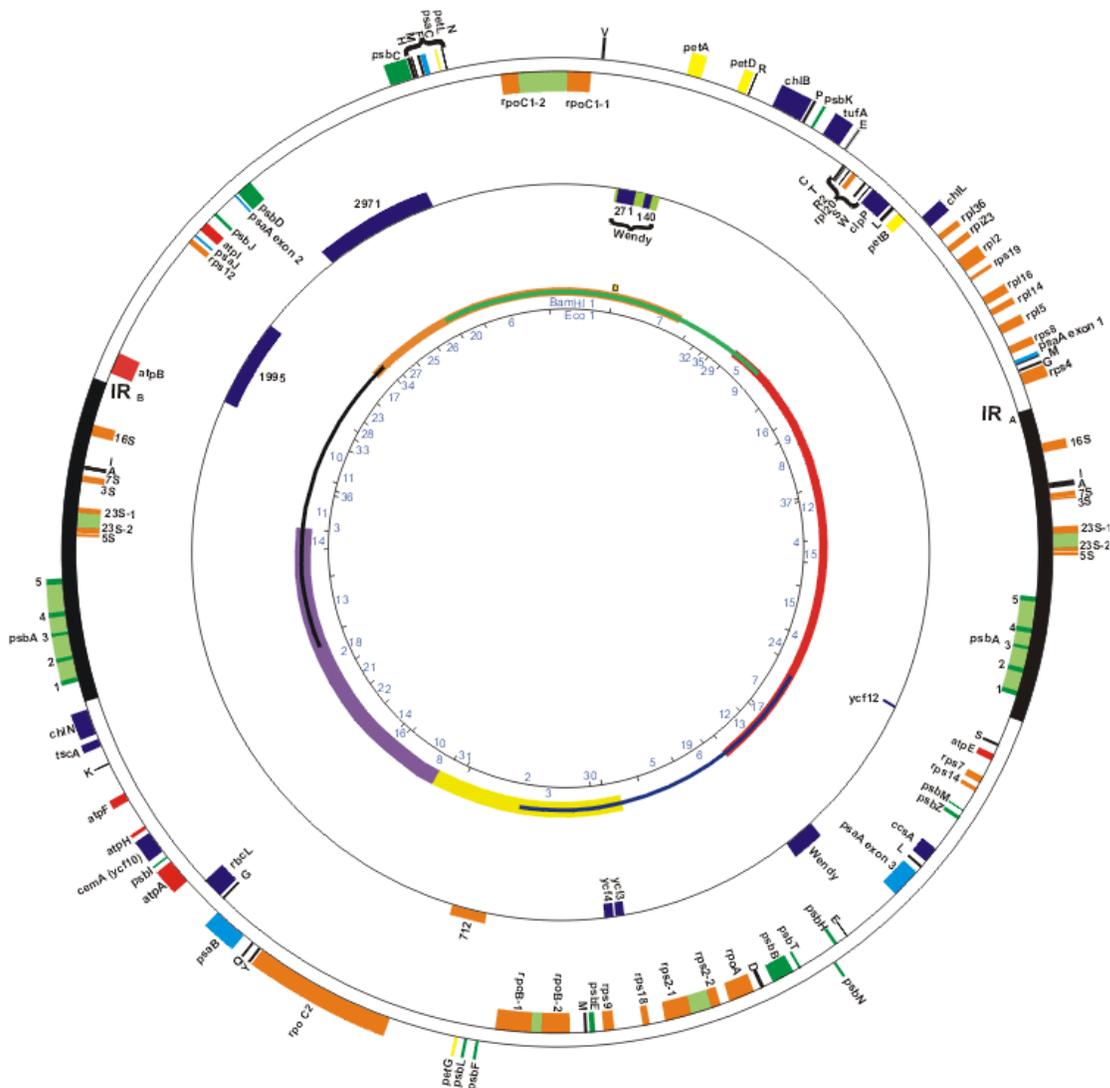


Figura 1.2 Mapa del genoma del cloroplasto de *C. reinhardtii* (tomado de Maul *et al.*, 2002)

En el genoma del cloroplasto se han identificado varios sitios de inserción, incluyendo algunos dentro de la región invertida repetida, que han sido usados para la expresión de genes heterólogos. La integración sitio específica del transgen dentro del genoma del cloroplasto difiere de la integración al azar de la transformación nuclear porque los transgenes en el cloroplasto son integrados por recombinación homóloga (Daniell *et al.*, 2005).

Los vectores de transformación para el cloroplasto son diseñados con secuencias homólogas blanco en cualquier parte del transgen e introducidos dentro del cloroplasto por los métodos de transformación. Sin embargo, la transformación puede ser más eficiente cuando hay secuencias homólogas en ambos lados del gen o el marcador utilizado (Goldschmidt-Clermont, 1998).

1.4 Transformación por biobalística.

La transformación estable de cloroplastos durante mucho tiempo fue obstaculizada porque los métodos no habían sido eficientes para introducir ADN hexógeno, a través de la pared celular y tres membranas, es decir, la membrana plasmática, la exterior y la interior de las membranas que hay en el cloroplasto. Sin embargo, con el desarrollo de un sistema de bombardeo de partículas este problema ha sido superado y los cloroplastos de *C. reinhardtii* fueron los primeros en ser transformados por esta técnica, hace casi tres décadas (Boyton *et al.*, 1988).

En los intentos iniciales exitosos, las partículas recubiertas de ADN fueron aceleradas y liberadas por una fuerte explosión y por expansión de gas comprimido a fin de introducir las a las células, las cuales fueron puestas en la superficie de una caja de Petri con agar. Nuevas mejoras en el bombardeo de partículas llegaron con el desarrollo de la pistola de partículas (Nickelsen y Kück, 2000). Las partículas de tungsteno o de oro recubiertas con ADN, son aceleradas directamente con las partículas de helio y reproducibles en altos rangos de transformación. Como el disparo de helio es controlado, la pistola de flujo de partículas (biobalística) causa menos daños a las células del alga que los sistemas de proyectiles, además puede ser utilizada para transformar el cloroplasto, el núcleo y la mitocondria (Barrera y Mayfield, 2013).

La explotación del cloroplasto como una plataforma biotecnológica para productos recombinantes es atractiva por varias razones: simplicidad del genoma en comparación con el genoma nuclear, el alto nivel de expresión de genes, la capacidad de expresar múltiples genes por la introducción de operones transgénicos y el direccionamiento preciso del ADN heterólogo en cualquier lugar específico del plastoma (Purton *et al.*, 2013). El genoma del cloroplasto puede ser fácilmente alterado por recombinación homóloga y ésta ha sido usada para estudiar aspectos básicos de la expresión génica en el cloroplasto. Esta tecnología

comienza a ser usada ahora para expresar proteínas recombinantes de interés biotecnológico en el cloroplasto (Mayfield *et al.*, 2007; Manuell y Mayfield, 2006). Los avances en la investigación y la transformación del cloroplasto han servido para resaltar el enorme potencial de la tecnología transplastómica tanto en el mejoramiento de cultivos, como en el desarrollo de biorreactores (en plantas) para la producción de farmacéuticos, enzimas y materias primas para la industria química de una manera sustentable y de bajo costo (Bock, 2014).

1.5 Proteínas recombinantes y biorreactores más comunes.

Se considera una proteína recombinante (PR) o heteróloga aquella proteína cuya síntesis se realiza en un organismo distinto al organismo nativo, o que haya sido introducida a éste por medio de la tecnología de ADN recombinante. Actualmente se ofrece en el mercado internacional una gran variedad de proteínas recombinantes para un amplio abanico de aplicaciones, incrementándose día a día la lista de estos productos, la que ha llegado a constituir una revolución en el mercado biotecnológico y a la vez ha impulsado la investigación en este campo (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2004). Las aplicaciones de las proteínas recombinantes están presentes en diversos segmentos de la industria por ejemplo en los detergentes (proteasas, amilasas, lipasas, celulasas), en la panificación (amilasas, xilanasas, lipasas, proteasas), bebidas embotelladas (pectinasas, amilasas, β -glucanasas), en la industria textil (celulasas, catalasas, peroxidases, amilasas), en la industria del papel (xilanasas, proteasas, lipasas, celulasas), en aplicaciones farmacéuticas (anticuerpos, vacunas) y en aplicaciones a la industria alimentaria como aditivos alimenticios (xilanasas, fitasas, glucanasas) (Kirk *et al.*, 2002). Siendo estos últimos de gran importancia por el impacto en la producción de carne y en la reducción de la contaminación del suelo y agua.

Actualmente se emplea una gran variedad de sistemas de expresión de proteínas, que van desde microorganismos tales como bacterias, levaduras, hongos, insectos, líneas celulares de mamíferos, hasta organismos completos como animales y plantas transgénicas y microalgas (Akbari *et al.*, 2014; Guerrero-Olazarán *et al.*, 2004). Cada uno de estos sistemas ofrece distintas ventajas en términos de producción de proteínas, fácil manipulación y costos de operación (Franklin y Mayfield, 2005).

En lo que respecta a los sistemas de bacterias y levaduras, las más utilizadas son la bacteria *Escherichia coli* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Guerrero-Olazarán *et al.*, 2004), y aunque son más económicos en términos de los componentes del medio, tienen varias limitantes en cuanto a la expresión de proteínas recombinantes. Por ejemplo en el caso de bacterias se pueden destacar los problemas en el plegamiento de algunas proteínas, así como alteraciones en el procesamiento proteolítico, ausencia de glucosilación, fosforilación, problemas de secreción, alta posibilidad de contaminación con toxinas, ensamblaje de subunidades, etc. Con respecto a los sistemas de levaduras los costos de producción y calidad del producto podrían ser los inconvenientes, así como de igual forma las hiperglicosilaciones de las proteínas recombinantes podría intervenir en las funciones de las mismas (Akbari *et al.*, 2014).

Por otro lado, la producción de proteínas recombinantes en animales transgénicos, de los cuales se puede obtener productos muy similares a los sintetizados en el organismo animal original, requiere de un tiempo de desarrollo muy largo y costoso, el aumento en la escala de producción es lento y se limita a los ciclos naturales de crecimiento de la especie utilizada. Además, existe el riesgo de contaminación con virus animales y priones (González y Coroas, 2002; Mayfield *et al.*, 2002).

En lo que respecta a la producción de proteínas en insectos, ellos necesitan nutrientes complejos en su medio de cultivo en comparación con los cultivos de mamíferos. Entre los sistemas de excreción en células de insecto, los sistemas de baculovirus pueden expresar un alto nivel y calidad de la proteína recombinante, pero su mecanismo de funcionamiento lítico conduce a disminuir los rendimientos de producción debido a la liberación de proteasas endógenas (Akbari *et al.*, 2014). En el cuadro 1.1 se presenta una comparación de algunas características de los sistemas tradicionales de expresión de PRs.

Cuadro 1.1 Resumen de las características de los sistemas tradicionales de expresión de PRs.

Sistema y características	Bacterias	Levaduras	Cultivos de células de mamíferos	Animales transgénicos
Costo total	Bajo	Medio	Alto	Alto
Tiempo de escala	Corto	Medio	Largo	Muy largo
Capacidad de escala	Alto	Alto	Muy bajo	Bajo
Calidad del producto	Bajo	Medio	Muy alto	Muy alto
Glicosilación	Ninguno	Incorrecto	Correcto	Correcto
Riesgos de contaminación	Endotoxinas	Bajo	Virus, priones y ADN oncogénico	Virus, priones y ADN oncogénico
Costo de almacenamiento	Moderado	Moderado	Caro	Caro

1.6 Plantas como biorreactores para la producción de proteínas recombinantes.

Además de los sistemas tradicionales de expresión de PRs, varios grupos han realizado intentos para explotar la producción de proteínas recombinantes en plantas; la producción de proteínas en células fotosintéticas es inherentemente menos cara que la producción alcanzada por fermentación de otro tipo de células. Por consiguiente, las plantas ofrecen un atractivo sistema para la expresión de proteínas recombinantes y quizá la mejor alternativa económica para la expresión de proteínas complejas multiméricas tal como los anticuerpos. Las PRs son sintetizadas dentro de las células de plantas y depositados en tejidos de hojas o semillas. Un conjunto de proteínas recombinantes con un valor potencial terapéutico se han producido en plantas, incluyendo anticuerpos funcionales, vacunas, enzimas, hormonas y una variedad de otras proteínas (Samuel *et al.*, 2007). Además de los anticuerpos, existen diversos ejemplos de proteínas de uso farmacológico e industrial expresadas en tejidos vegetales.

Las proteínas producidas en los sistemas de plantas son conocidas generalmente como seguras (“GRAS, Generally Regarded As Safe”) ya que poseen un riesgo mínimo de contaminación viral, priones o endotoxinas bacterianas. Las plantas se han empleado para producir proteínas complejas tal como anticuerpos; ofrecen una economía de escala sin

precedentes en la biotecnología industrial y el costo de capitalización de la proteína producida por agricultura es una fracción del costo en los sistemas asociados a la fermentación (Franklin y Mayfield, 2004).

Otras de las ventajas que ofrecen las plantas son la disponibilidad prácticamente ilimitada de biomasa, dado que permiten el almacenamiento estable de la proteína recombinante en semillas y tubérculos, facilitando su conservación, transporte y distribución. El capital de inversión inicial y el costo para el aumento en la escala de producción son relativamente bajos, los mecanismos de síntesis y modificaciones posteriores son los propios de las células de mamíferos, permitiendo la producción y ensamblado de proteínas multiméricas como los anticuerpos. Otro beneficio es que gozarían de una mayor aceptación pública que la utilización de animales transgénicos (Bravo *et al.*, 2005).

Por otra parte, también hay que mencionar que existen ciertos inconvenientes con los sistemas de plantas, en algunos casos es largo el tiempo requerido desde el evento de la transformación inicial hasta el momento de tener cantidades utilizables (de mg a g) de anticuerpo, (esto puede tomar dos años para cultivos tales como tabaco y en otros 3 años para especies como el maíz y el plátano). No existe glucosilación a las proteínas resultantes cuando son producidas en el cloroplasto. Otra preocupación en torno a la expresión de terapéuticos humanos en cultivos de plantas, es el flujo de genes (vía polen) a cultivos de alimentación que se encuentran a su alrededor, como lo es, por ejemplo, lo que ocurre entre los campos de canola transgénica expresando genes de resistencia a herbicidas, aunque esto se puede evitar precisamente con la transformación de cloroplastos (Franklin y Mayfield, 2004).

1.7 *Chlamydomonas reinhardtii* como biorreactor para la producción de proteínas recombinantes.

La biotecnología aplicada a las microalgas ha logrado importantes avances en los últimos años debido al desarrollo de nuevas tecnologías y varios ejemplos en aplicaciones biotecnológicas de microalgas han mostrado ser una promesa significativa. La mayor parte de los avances en ingeniería genética de microalgas se han realizado en *C. reinhardtii* mediante el uso de la transformación tanto nuclear como de cloroplasto. *C. reinhardtii* es considerada como un buen biorreactor para la producción de muchas proteínas

recombinantes importantes, incluyendo anticuerpos, proteínas terapéuticas, vacunas, enzimas y aditivos (Yan *et al.*, 2016).

C. reinhardtii ha servido como modelo de estudio en genética y como organismo modelo para mecanismos de expresión de genes regulados por luz y nutrientes, así como el ensamblaje y función de flagelos (Franklin y Mayfield, 2004). Esta alga tiene muchos atributos para la producción de proteínas recombinantes, por ejemplo, los ADN de núcleo, cloroplasto y mitocondria pueden ser fácilmente transformados, además de que se encuentran secuenciados (Spech *et al.*, 2010) y existe un tiempo relativamente corto entre la generación de transformantes iniciales y el escalamiento de la producción de PRs. Crece mucho más rápido a un rango de duplicar el número de células en ocho horas, bajo condiciones de fotoperíodo (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad) (Franklin y Mayfield, 2004). Además, *C. reinhardtii* puede ser cultivada heterotróficamente (en oscuridad utilizando acetato como fuente de carbono), mixotróficamente (luz más acetato) y fototróficamente (con luz y con CO₂ como fuente de carbono). Otro aspecto importante es la capacidad de crecer en cultivos que van de unos pocos mililitros a 500, 000 litros en contenedores de manera costo-efectiva (Mayfield, 2003; Harris, 2001).

Por otra parte, el cloroplasto ha mostrado la capacidad de plegar correctamente y ensamblar complejos proteicos de mamíferos. Además como el alga no tiene polen no hay potencial para la introducción de transgenes dentro de cultivos de alimentación (Fletcher *et al.*, 2007).

Las microalgas verdes, entre ellas *C. reinhardtii*, caen dentro de la categoría de GRAS, lo que significa que no son tóxicas, algunas incluso se pueden comer, y por lo tanto representan una fuente potencial de proteínas terapéuticas de uso oral, quizá con poco o nula purificación. Estos atributos pueden hacer a *C. reinhardtii* como un sistema atractivo para la expresión de proteínas terapéuticas humanas (Purton *et al.*, 2013; Manuell y Mayfield, 2007; Franklin y Mayfield, 2004;).

Además de los aspectos mencionados anteriormente, *C. reinhardtii* puede producir proteínas recombinantes a bajos costos de producción y con una capacidad de producción a escala; esto representa una mayor eficiencia que otros sistemas de expresión (Barrera y Mayfield, 2013).

1.7.1 Proteínas recombinantes producidas en *Chlamydomonas reinhardtii*

Como se mencionó anteriormente los trabajos de investigación y de la producción de proteínas recombinantes de *C. reinhardtii* se ha llevado a cabo tanto en núcleo como en cloroplasto. En el cuadro 1.2 se muestra solo algunas de estas proteínas. En el caso de la transformación nuclear, se ha reportado la transferencia exitosa del T-ADN de *Agrobacterium tumefaciens* portando los genes que codifican para la β -glucuronidasa (*uidA*), la proteína verde fluorescente (*gfp*) y la higromicina fosfotransferasa (*hpt*) (Kumar *et al.*, 2003), pero ha sido el cloroplasto quien ha alcanzado mayor atención, principalmente porque se ha demostrado que la acumulación de proteínas en este organelo es factible (Almaraz-Delgado *et al.*, 2014).

Cuadro 1.2 Proteínas recombinantes producidas en *C. reinhardtii*.

Sitio de transformación	Proteína recombinante	Aplicación	Niveles de expresión	Referencia
Núcleo	Eritropoyetina (EPO)	Tratamiento para la anemia	Secreción y acumulación de 100 μ g/L	Eichler-Stahlerg <i>et al.</i> , (2009)
Núcleo	AMA1 (Apical Major Antigen), GBSS (Granule-Gound Starch Synthase)	Vacuna contra la malaria	NR	Dauvillée <i>et al.</i> , (2010)
Núcleo	Xilanasas 1 unida al gen de resistencia <i>ble2A</i>	Enzima industrial	~100 veces que la construcción no ligada.	Rasale <i>et al.</i> , (2012)
Cloroplasto	Alofocianina	anticancerígeno	Acumulación de la proteína de 2-3% del TSP	Su <i>et al.</i> , (2006)
Cloroplasto	M-SAA (mammalian coding region of bovine mammary-associated serum amyloid)	Profilaxis contra infecciones entéricas por bacterias	>5% TSP	Manuell <i>et al.</i> , (2007)
Cloroplasto	Ácido glutámico descarboxilasa humana (<i>hGAD65</i>)	Vacuna contra la diabetes tipo I	0.25-0.3% TSP	Wang <i>et al.</i> , (2008)
Cloroplasto	VP28 (Viral protein 28)	Vacuna contra el virus "White spot syndrome"	Acumulación de proteína >21% del TSP	Surzycki <i>et al.</i> , (2009)

Cloroplasto	Gen de la fitasa (<i>appA</i>) de <i>E. coli</i>	Industrial agropecuaria (alimentación animal)	3.7% TSP	Yoon <i>et al.</i> , (2011)
Cloroplasto	Gen de la fitasa PhyA mE228K de <i>Aspergillus niger</i>	Industria agropecuaria (alimentación animal)	NR	Erpel <i>et al.</i> , (2016)

NR= no reportado; TSP (proteína soluble total por sus siglas inglés)

Además de las proteínas mencionadas en el cuadro 1.2, también se han expresado en el cloroplasto de *C. reinhardtii* proteínas que son de importante aplicación en la salud humana y en aplicaciones veterinarias, algunas de estas proteínas son: la proteína VP1 (del virus de la fiebre aftosa) unida a la subunidad de la toxina B del cólera (Sun *et al.*, 2003), la proteína soluble humana TRAIL (factor de necrosis tumoral relacionados con la inducción de apoptosis ligando) (Zongqi *et al.*, 2006), la proteína diseñada como anclaje fusionada a la proteína endógena Rubisco (Muto *et al.*, 2009), la proteína de bovino asociada con el suero amiloide (encontrado mayormente en el calostro de los mamíferos) (Manuell *et al.*, 2007) y el anticuerpo Isc (un anticuerpo de una cadena larga simple) que actúa sobre la glicoproteína D del virus del herpes simple (Mayfield *et al.*, 2002).

Algunas de la estrategias para obtener una mayor acumulación de proteínas recombinantes en *C. reinhardtii* han sido la optimización del uso del codón y de la secuencias reguladoras como los promotores y las regiones no traducibles 5' y 3'.

El genoma del cloroplasto de *C. reinhardtii* muestra una fuerte tendencia en el uso del codón, con preferencia de A o T en la tercera posición del triplete de aminoácidos, (Franklin *et al.*, 2002). Varios de los trabajos hechos en el cloroplasto de *C. reinhardtii* han confirmado el impacto que tiene optimizar los codones de los transgenes para tener un incremento en la acumulación de la PRs (Rosales-Mendoza *et al.*, 2012).

Franklin y colaboradores (2002), realizaron estudios donde se sintetizó *de novo* el gen de la proteínas reportera GFP (proteína verde fluorescente) con el uso del codón optimizado (GFPct). Este gen fue evaluado en contra de un gen de GFP, el cual resultaba en la misma secuencia de aminoácidos pero que no fue optimizado con el uso del codón, dando como resultado una acumulación de 80 a 100 veces más de proteína para GFPct. Estos resultados indicaron que el uso del codón tiene fuertes efectos sobre la expresión de

proteínas heterólogas en *C. reinhardtii*. Estudios similares fueron realizados por Mayfield y colaboradores (2004), donde desarrollaron el gen reportero que codifica para la proteína luciferasa AB, con el codón optimizado para el cloroplasto. Ellos generaron el gen *luxCt*, el cual permitió la visualización *in situ* de la proteína recombinante expresada en el cloroplasto con relativa facilidad. Estas proteínas reporteras han sido fuertes herramientas para examinar la expresión del gen del cloroplasto y seguirán siendo herramientas de gran valor para descubrir y optimizar la expresión de proteínas recombinantes por diversos promotores y UTRs en el cloroplasto de *C. reinhardtii* (Fletcher *et al.*, 2007; Mayfield *et al.*, 2004; Mayfield y Franklin, 2004; Franklin *et al.*, 2002).

La expresión de genes en el cloroplasto de *C. reinhardtii* es principalmente regulada postranscripcionalmente y por una serie de elementos de ARN, que se encuentran en la región del promotor y en cualquiera de las regiones 5' ó 3' no traducibles (UTRs) de ARNs plastídicos (Rosales-Mendoza, 2012; Barnes *et al.*, 2005). Los promotores y sus respectivos UTRs, utilizados en el cloroplasto de *C. reinhardtii* son *rbcL*, *atpA*, *psbD* y *psbA* (Surzycki *et al.*, 2009; Manuell *et al.*, 2007).

Con las características mencionadas anteriormente, *C. reinhardtii* muestra muchas ventajas comparadas con los sistemas convencionales de expresión de proteínas recombinantes. Dentro de las proteínas que se pueden expresar en cloroplasto de *C. reinhardtii* se encuentran las enzimas que son de gran interés actual, las enzimas que son utilizadas como aditivos alimenticios, ya que al ser una microalga clasificada como segura (GRAS) ésta se puede utilizar de manera directa en los piensos sin que represente algún daño para los animales, además de contribuir adicionalmente, con un alto valor nutricional por los lípidos, carbohidratos y proteínas que la célula posee (Erpel *et al.*, 2016).

Yoon y colaboradores (2011) lograron la producción de la fitasa *appA* de *Escherichia coli* en el cloroplasto de *C. reinhardtii*, con un rendimiento de 10 U de fitasa por gramo de materia seca. Este rendimiento es considerado bajo, cuando se compara con su contraparte endógena, la cual produce de 811,000 a 1,800,000 U de fitasa por gramo. La diferencia en el rendimiento proteico podría deberse a que la proteína original cuenta con un péptido señal al periplasma que podría estar involucrado en proporcionar estabilidad a la proteína.

En un estudio realizado recientemente por Erpel y colaboradores (2016), se transformó el cloroplasto de *C. reinhardtii* con el gen *PhyA* de *Aspergillus niger* (codón optimizado mE228K) con un rendimiento de 5 U de fitasa por gramo de biomasa seca a pH 3.5 y 37 °C. Estas condiciones son similares y económicamente competitivas para su uso en actividades comerciales. Las recomendaciones de productos comerciales para el uso de la fitasa en alimentos de cerdos y pollos están cerca de 250-500 unidades por kg de pienso. Esto significaría que se debería usar de 50-100 g de microalga liofilizada por cada kg de pienso.

1.8 Enzimas fitasas

1.8.1 Características generales de las fitasas

Las proteínas fosfatasa son un grupo diverso de proteínas que se clasifican en función de sus especificidades de sustrato (Barford, 1995). Las fosfatasa se agrupan en cuatro grandes grupos, con base en los dominios o secuencias que les confieren una firma característica y a la preferencia por un sustrato. El primer grupo corresponde a las fosfoproteínas fosfatasa (PPP), el segundo grupo a las fosfoproteínas metalodependientes (PPM), el tercero a las fosfatasa de proteínas de tirosina (PTP) y finalmente el cuarto a las aspartato fosfatasa (Moorhead *et al.*, 2009).

Las fitasas (mio-inositol hexafosfato hidrolasas) son una clase especial de fosfatasa que catalizan la hidrólisis secuencial de fitato a derivados de mioinositol menos fosforilados y fosfato inorgánico. Las fitasas se utilizan como aditivo para la alimentación animal para mejorar la biodisponibilidad de fosfato y para reducir la pérdida de fosfato y cationes divalentes a partir de fitato (Angel *et al.*, 2002). Las fitasas catalizan la escisión de fosfato paso a paso de ácido fítico (IP6) o fitato (derivado del ácido fítico en forma de sal) a inositol y ésteres de fosfatos (IP5-IP1) y fosfato inorgánico (figura 1.3). Un número de genes de fitasa y proteínas han sido identificados a partir de plantas y microorganismos, incluyendo bacterias, levaduras y hongos. La primera y probablemente, la mejor caracterizada es la fitasa de *Aspergillus niger* *PhyA* que está codificada por un fragmento de ADN de 1,4 kb y tiene una masa molecular de 80 kDa, con 10 sitios N-glicosilación (Oh *et al.*, 2004). El promedio de la masa molecular de las fitasas microbianas es más pequeña que las fitasas fúngicas (40-50 vs 80-120 KDa), principalmente se debe a la diferencias de glicosilación.

La masa molecular de las fitasas de plantas aisladas de maíz, trigo, lupino, avena y cebada están en un rango de 47 a 76 KDa (Lei y Porres, 2003).

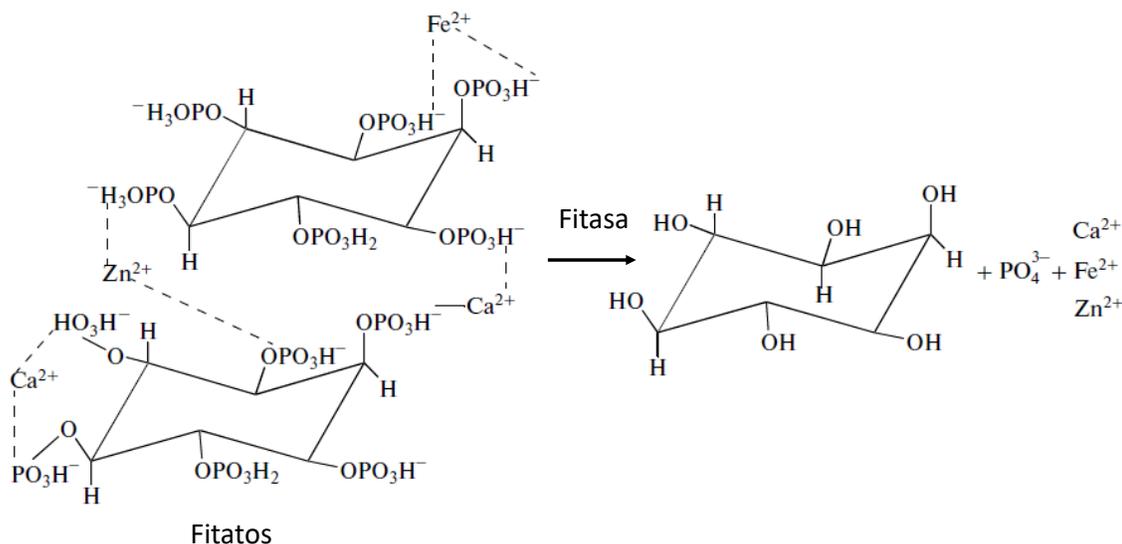


Figura 1.3 Hidrólisis del fitato por las fitasas en inositol, fosfato y otros elementos divalentes. Tomado de (Mukhametzyanova *et al.*, 2012).

1.8.2 El sustrato: Ácido fítico

El fitato (mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis fosfatos; IP6) es la principal forma de almacén de fósforo, inositol y una variedad de minerales en plantas, representando aproximadamente 75-80% del total del fósforo en las semillas. Durante la maduración, cereales y semillas de leguminosas acumulan una cantidad sustancial de ácido fítico (Lei y Porres, 2003). En la naturaleza, el fitato existe principalmente como un complejo fitato-metal con cationes nutricionalmente importantes tales como el Ca^{2+} , Zn^{2+} y Fe^{2+} . Los animales monogástricos son incapaces de utilizar el fitato porque poseen poca o nula actividad de fitasa en su tracto digestivo (Oh *et al.*, 2004). El fitato puede existir en una forma libre de metal o en complejo de metal-fitato, dependiendo del pH de la solución y la concentración de cationes metálicos. A pH ácido, la protonación de los grupos fosfato del fitato genera la forma libre de metal. A pH neutro, en contraste, la desprotonación de los grupos fosfato del fitato mejora la afinidad por cationes metálicos divalentes (figura 1.3) y forma así, complejos metal-fitato con

cationes metálicas divalentes, en su mayoría Mg^{2+} y Ca^{2+} . Por lo tanto, el fosfato inorgánico se añade con frecuencia a su alimentación para facilitar el crecimiento óptimo para estos animales. Este hecho podría estimular la proliferación de algas y la eutrofización de las aguas superficiales, debido al alto contenido de fitato y fosfato inorgánico en la excreción de los animales. Además, el fitato actúa como un factor anti-nutricional por efecto quelantes de cationes divalentes (es decir, hace unión con ellos y por esa razón ya no pueden ser utilizados) y la prevención de la absorción de minerales, tales como el Ca^{2+} , Zn^{2+} y Fe^{2+} (Oh *et al.*, 2004).

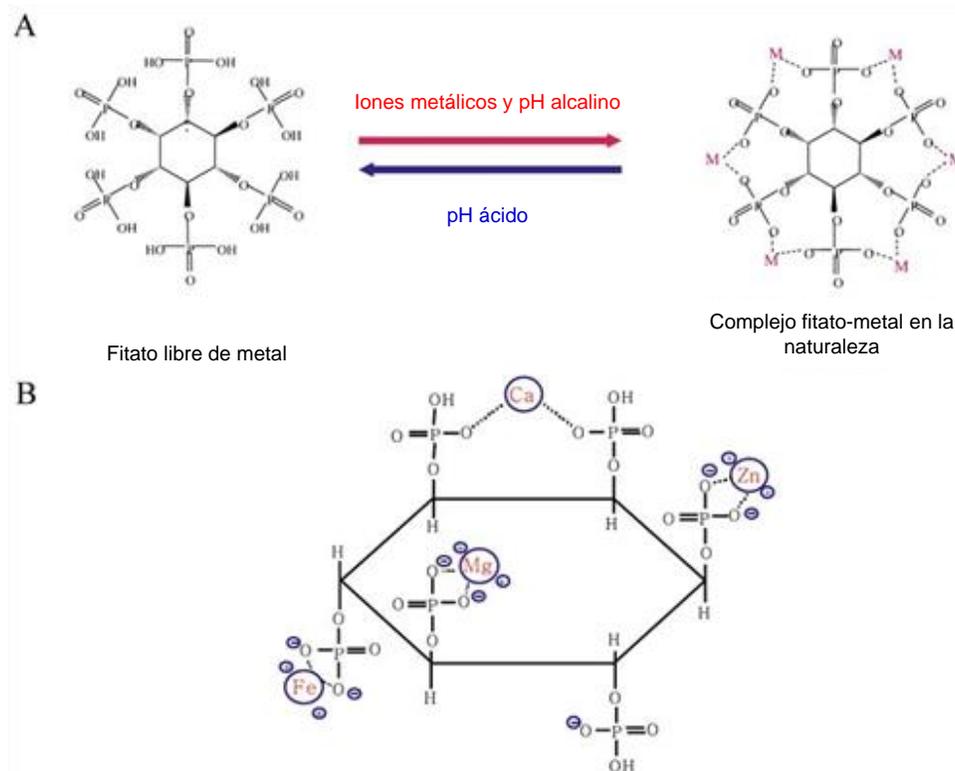


Figura 1.4 Efectos del pH y cationes metálicos divalentes en la naturaleza fisiológica de fitato. **A)** El fitato existe como fitato libre de metal o un complejo de metal-fitato, dependiendo del pH y de los cationes de metales divalentes. El grado de unión depende de pH y de la presencia de cationes metálicos divalentes. Además, a pH ácido y alta concentración de cationes, se forma un complejo de metal-fitato debido a la interacción electrostática directa. **B)** Los cationes metálicos divalentes se unen específicamente a los grupos fosfato del fitato, en función de los radios iónicos de los cationes metálicos. La formación del complejo metal-bidentado prefiere cationes metálicos (tomado de Oh *et al.*, 2004).

1.8.3 Clasificación de las enzimas fitasas

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada y la Unión Internacional de Bioquímica (IUPAC-IUB, por sus siglas en inglés) distinguen dos clases de enzimas que degradan el fitato, la 3-fitasa (E.C.3.1.3.8) y la 6-fitasa (EC 3.1.3.28), iniciando el desfosforilación en las posiciones 3 y 6 de fitato, respectivamente (Haefner *et al.*, 2005).

El número de enzimas descrito como fitasa o enzimas que degradan el fitato, se ha incrementado en la última década. Sin embargo, no todas estas enzimas son estructuralmente similares ni tampoco todos los grupos fosfato son escindidos de fitato con el mismo mecanismo.

Las fitasas se pueden clasificar de acuerdo al pH al que actúan en ácidas, neutras ó alcalinas y de acuerdo a su estructura. En esta última clasificación, se conocen cuatro clases principales de fitasas. 1) Fosfatasas ácidas de histidina (HAP): son características de los hongos y bacterias como *E. coli*. Comparten la misma secuencia para el sitio activo (RHGXRX), un dipéptido catalítico y 10 residuos de cisteína. 2) Fitasas β-propela (BPP): se encuentran principalmente en bacterias del género *Bacillus*, y tienen una arquitectura de propela formada por seis láminas y seis sitios de unión a Ca²⁺ en cada molécula de proteína, por lo que la actividad enzimática es dependiente de Ca²⁺. 3) Fosfatasas ácidas púrpura (PAP): son características de las plantas, aunque se han encontrado en bacterias, hongos y animales, se encuentran como una glucoproteína homodimérica, con un sitio activo de Fe(III)-Zn(II) o Fe(III)-Mn(II), lo cual le proporciona el color púrpura característico de este tipo de enzimas (Puhl *et al.*, 2007; Mullaney y Ullah 2003; Li *et al.*, 2002). 4) Proteínas fosfatasas de tirosina (PTP): llamadas así por su similitud con este tipo de proteínas, ya que contienen en su secuencia aminoacídica la firma característica de las PTP (HCEAGVGR). La primera fitasa de clase PTP fue aislada a partir de la bacteria anaeróbica ruminal *Selenomonas ruminantium*. Se les ha dado también el nombre de fitasas de cisteína, ya que su sitio activo se encuentra cercano a un residuo de cisteína conservado que forma una horquilla, que funciona como sitio de unión al P (P-loop) (Huang *et al.*, 2011; Chu *et al.*, 2004).

1.8.4 Aplicación de las fitasas en biotecnología

Hasta ahora, las fitasas han sido principalmente, si no es que exclusivamente, utilizadas como un suplemento alimenticio en dietas para cerdos en gran medida y las aves de corral, y en cierta medida de los peces. Numerosos experimentos de laboratorios y pruebas de campo han demostrado que 500 a 1000 unidades de fitasa pueden reemplazar aproximadamente 1 g inorgánico de fósforo como suplemento y reducir el total de fósforo excretado en un 30-50% (Liu *et al.*, 1997, Yi *et al.*, 1996). Por lo tanto, los beneficios de la fitasa son de dos tipos: evitar mayor inversión en las cantidades de pienso suministrado y disminuir la explotación de fuentes de los recursos de fósforo inorgánico no renovable, mediante la reducción de la necesidad de su inclusión en las dietas animales, además de contribuir con la disminución del impacto negativo al medio ambiente frente a la contaminación excesiva por escorrentía de fósforo del estiércol (Lei *et al.*, 1994; Sandberg *et al.*, 1993).

Si la conciencia ambiental sobre la elevada contaminación procedente del fósforo de los residuos animales creó la necesidad de utilizar fitasas, la biotecnología ha llevado su rápido desarrollo a la etapa actual. A pesar de que fitasa se demostró inicialmente para hidrolizar el fosforo del fitato, en dietas para pollos hace más 30 años (Nelson *et al.* 1976), la aplicación comercial no había sido factible por muchos años, debido a la baja actividad de producción y el alto costo de los sistemas convencionales de fermentación de la fitasa. Con el desarrollo de sistemas de expresión heterólogos, grandes cantidades de la enzima pueden ser producidos para usarse en la alimentación animal a costos relativamente bajos (Lei y Porres 2003).

1.8.5 Fitasas comerciales

Las fitasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, se pueden encontrar en animales, plantas y microorganismos. La mayoría de los trabajos científicos se han hecho con fitasas microbianas. Actualmente, la mayor parte de las fitasas producidas para la comercialización, son enzimas modificadas genéticamente y producidas en hongos filamentosos recombinantes, entre ellos *Aspergillus niger* (comercializado por *Natuphos*, *Novo phytase* y *Finase*). La información genética usada para la obtención de las fitasas hechas por *Natuphos* y *Novo phytase* procede específicamente del *Aspergillus ficuum*, con

posterior transferencia a *Aspergillus niger* o al *Aspergillus oryzae*, respectivamente (Haefner *et al.*, 2005).

La utilización de las fitasas en la industria de piensos, se ha visto favorecida por lo atractivo de sus precios (descenso de los costos de producción por la aplicación de la biotecnología), la mejora en la utilización de una variedad de nutrientes (minerales, aminoácidos, etc.), el aumento del rendimiento animal (carne) y la disminución del grado de contaminación ambiental (menor eliminación de efluentes) (Dahiya, 2016).

1.8.6 Fitasa de *Selenomonas ruminantium*

La proteína PhyA de una bacteria ruminal, *Selenomonas ruminantium* es una proteína de la clase de proteínas fosfatasas de tirosina, contiene en el sitio activo una secuencia motivo (HCX5RS/T) (Gruninger *et al.*, 2008). Esta enzima fue caracterizada bioquímicamente, dando como resultado una actividad en un rango de pH que va de 4.0 a 6.0, a una temperatura de 37 °C en la cepa silvestre de *S. ruminantium* (Cheng *et al.*, 1999). Su peso molecular es de aproximadamente 39 KDa y su punto isoeléctrico (pI) calculado es de 8.54. Los parámetros cinéticos de esta enzima son k_{cat} (s^{-1}) de 264 ± 19 , K_m (μM) de 425 ± 28 y k_{cat}/K_m ($\mu M^{-1}/s^{-1}$) de 621 ± 61 (Puhl *et al.*, 2007).

Esta enzima ha sido sobre expresada de manera recombinante en semillas de arroz, observándose actividad en un rango de pH que va de 3.0 a 5.5 con dos picos de actividad óptima en 3.0 y 5.0. La temperatura óptima en este caso fue de 60 °C (Hong *et al.*, 2004). Estas características la hacen muy atractiva para ser utilizada en aplicaciones industriales, como la alimentación animal de los animales monogástricos, en los cuales el pH de su estómago se encuentra entre 2.0 y 3.0, en tanto que el pH de su intestino delgado está entre 4.0 y 7.0 (Cheng *et al.*, 1999).

Otras enzimas utilizadas comúnmente en la alimentación animal presentan actividad en un rango muy restringido de pH, por lo que su actividad se restringe a una zona en específico del aparato digestivo. Aunque parámetros de pH y temperatura mencionados anteriormente la hacen atractiva para su uso en la alimentación animal, el rendimiento obtenido tan solo fue del 0.5 % de proteína soluble total (PST), el cual no cumple con el 1 % necesario para que una PR sea viable para su comercialización (Kusnadi *et al.*, 1997). Por esta razón, es

importante analizar otros sistemas de expresión que permitan obtener mejores resultados y tal es el caso de *C. reinhardtii* para tratar de alcanzar el porcentaje de proteína necesario para su comercialización.

Se han expresado dos fitasas en *C. reinhardtii*, la primera fue la fitasa (AppA) de *E. coli* por Yoon y colaboradores en el 2011 y la segunda fitasa fue PhyA mE228K de *Aspergillus niger* por Erpel y colaboradores en el 2016. Las características de estas proteínas se muestran en el cuadro 1.3.

Cuadro 1.3 Proteínas fitasas expresadas en *C. reinhardtii*.

Organismo donador	Peso molecular kDa	pH Óptimo	Temp. Óptima	Referencias
<i>Escherichia coli</i> AppA	47	4.5	60 °C	Yoon <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus niger</i> PhyA mE228K	49	3.5-5.5	65 °C	Erpel <i>et al.</i> , 2016; Lei <i>et al.</i> , 2013
Fitsa presentada en este trabajo				
<i>Selenomas ruminantium</i> PhyASr	39	4.5-5.5	60 °C	Puhl <i>et al.</i> , 2007; Lei <i>et al.</i> , 2013

1.9 JUSTIFICACIÓN

La relevancia biotecnológica de las enzimas fitasas como complemento nutricional en la industria agropecuaria (avícola, porcícola y piscícola), para aumentar el aprovechamiento del P en los granos y harinas que se usan como alimento se ha incrementado recientemente. Se sabe que el uso de estas enzimas como complemento alimenticio, es dirigido a la desfosforilación del IP₆, dando como resultado el Pi que puede ser asimilado con mayor facilidad para los animales monogástricos, repercutiendo en una mayor ganancia de peso de los animales. Otro resultado del uso de estas enzimas, es la reducción en la excreción del P al medio y por lo tanto la disminución de la contaminación del suelo y agua con el exceso de nutriente. Las fitasas, al igual que muchas otras proteínas utilizadas en la industria agropecuaria, ya se producen en sistemas de expresión convencionales para su comercialización. Sin embargo, es deseable obtener un sistema de expresión, que nos permita obtener estas enzimas a un bajo costo de inversión, mayor rendimiento, sin riesgo de manejo y contaminación, que pueda estar al alcance adquisitivo de más personas.

Por otra parte, como bien se sabe, *C. reinhardtii* presenta ventajas que la hacen atractiva como biorreactor para la producción de PR. En la actualidad existen ejemplos de la producción PRs en el cloroplasto de *C. reinhardtii*, donde la mayoría son de interés médico, pero hay muy pocos ejemplos de proteínas técnicas destinadas a la industria agropecuaria. Dada la relevancia de las fitasas para esta industria, la producción de una fitasa en el cloroplasto de *C. reinhardtii* podría ser una buena alternativa para su uso como aditivo alimenticio, ya que esta microalga posee características que permitirán la expresión de proteína de manera correcta y de una manera más económica.

Por lo tanto, en este trabajo se llevó a cabo la transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii* con una construcción de expresión con el gen *phyASr*, que codifica para una fitasa, de la bacteria ruminal *Selenomonas ruminantium* y se evaluó la expresión del gen en las líneas transplastómicas homoplásmicas.

1.10 HIPÓTESIS

El cloroplasto de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* transformado con el gen *phyA* que codifica para una fitasa de la bacteria *Selenomonas ruminantium*, permitirá la expresión heteróloga de este gen.

1.11 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la integración y expresión del gen *phyA* de *Selenomonas ruminantium* en el cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii*.

1.11.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* con el gen *phyA* de la bacteria *Selenomonas ruminantium*.
2. Evaluar la homoplasma de la líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* transformadas con el gen *phyA* de la bacteria *Selenomonas ruminantium*.
3. Evaluar la expresión del gen *phyA* en las líneas transplastómicas homoplásmicas de *C. reinhardtii*.

1.12 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En la figura 1.5 se presenta la estrategia experimental general del presente trabajo.

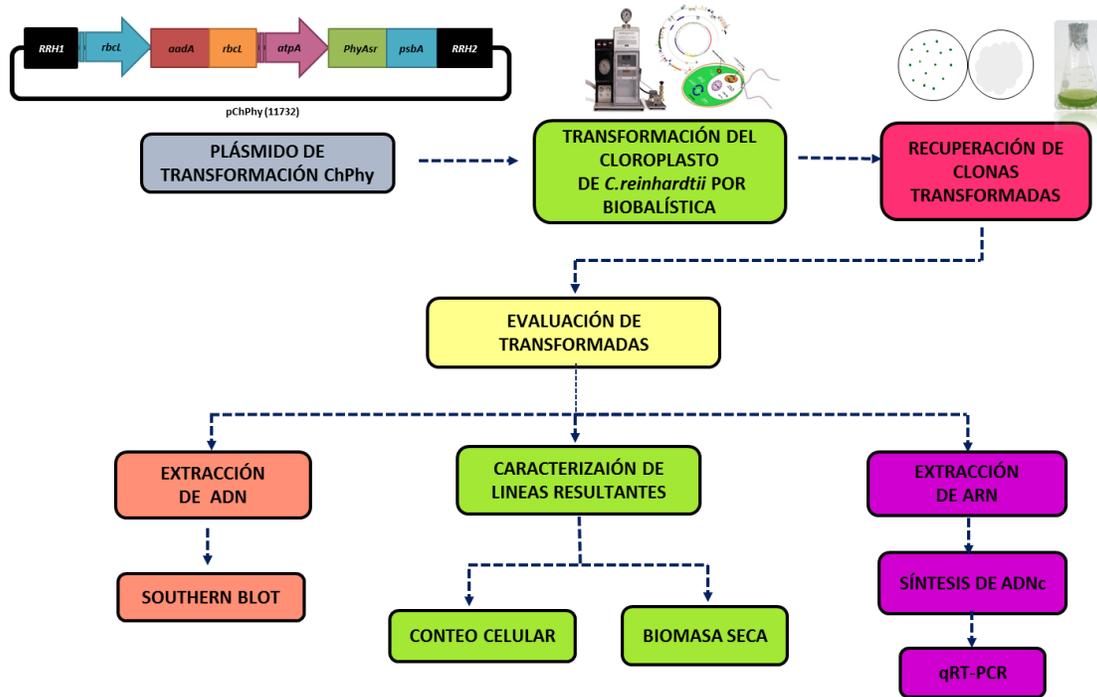


Figura 1.5 Estrategia experimental general.

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepa y cultivo de *C. reinhardtii*

La cepa silvestre de *C. reinhardtii* 137c (mt+), del Centro de Chlamydomonas (www.chlamy.org) fue originalmente proporcionada por la Dra. Elizabeth Harris (Universidad de Duke, Durham, Carolina del Norte USA). *C. reinhardtii* fue cultivada bajo condiciones de fotoperiodo 16h-8h (luz/oscuridad) a una temperatura de 25°C en medio TAP (Tris-Acetato-Fosfato) (Gorman y Levine, 1965). El cultivo en medio semisólido se realizó en cajas de Petri con un volumen de 25 mL de TAP y agar bacteriológico al 1.5% (P/V). El cultivo en medio líquido se realizó en matraces de 250 mL de capacidad con un volumen de 50 mL de medio, en agitación constante a 100 rpm en un agitador orbital marca Thermo Scientific modelo MAXQ 4450. El medio de cultivo (semisólido ó líquido) se esterilizó por autoclave; cuando se requirió medio TAP con antibiótico, éste se añadió en condiciones asépticas después de la esterilización del medio. El antibiótico utilizado fue espectinomicina a una concentración de 150 µg/mL. El medio TAP y sus componentes se describen en el anexo A.1.

2.1.1 Conteo celular

Para calcular el número de cel/mL se usó la cámara de Neubauer (hemocitómetro). Se usó el siguiente procedimiento:

Se recolectaron 900 µL del cultivo de células con 100 µL de una solución de yoduro de lugol al 10% (P/V), para fijar la muestra, colocándola por cinco minutos en el orbitador a 100 rpm, tomando 15 µL de la muestra fijada para el conteo.

Posteriormente, se contaron todas las células contenidas en los cinco campos visuales situados en la cuadrícula pequeña, siguiendo siempre las manecillas del reloj. Se realizaron dos conteos por muestra (uno por cámara) y se obtuvo el promedio. Se hicieron los cálculos para determinar número de células por mL de cultivo de la manera siguiente, usando el promedio del conteo (número de células):

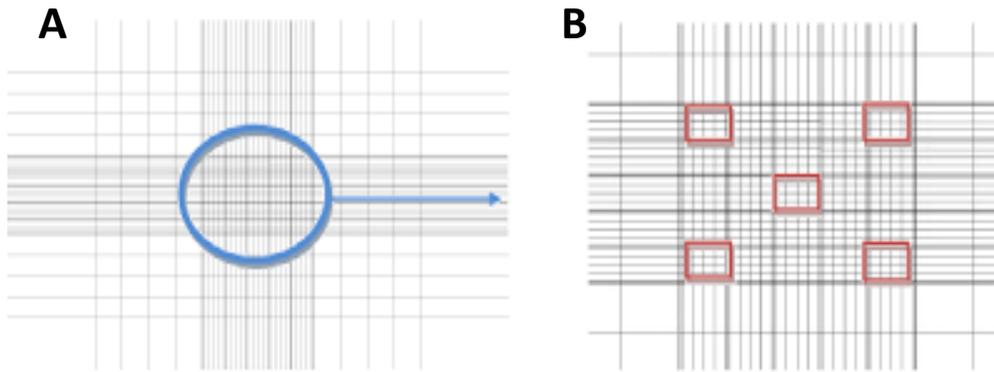


Figura 2.1 A) Parte central de la Cámara de Neubauer; B) División de la celda de la cámara en los cinco campos visuales utilizados para realizar el conteo de las células de *C. reinhardtii*.

Fórmula:

$$C = (N) (50000) (F)$$

C = cantidad de cel/mL

N = promedio de número de células contadas.

F = factor de dilución

2.2 Plásmidos de transformación

2.2.1 Vector pChPhy

El vector pChPhy fue proporcionado por Rivera-Solís (2011) y está conformado por un plásmido esqueleto (pUC18) que contiene el gen de resistencia a ampicilina, la región de recombinación homóloga de ~3.5 Kb (RRH1), una construcción de expresión que comprende a la región P+5'UTR del gen *rbcL* del cloroplasto de *C. reinhardtii*, el gen *aadA* que codifica para el gen de resistencia estreptomicina adeniltransferasa, la región 3'UTR del gen *rbcL* del cloroplasto de *C. reinhardtii* y la región de recombinación homóloga de ~2.0 Kb (RRH2). Por otro lado, contiene la secuencia de la fitasa de *Selenomonas ruminantium* que fue clonada bajo la regulación del P+5'UTR de *atpA* y la región 3'UTR de *psbA*. Además, la secuencia de la fitasa de *S. ruminantium* fue clonada incluyendo a la péptido señal, la bandera de purificación FLAG, la cuál ha sido usado previamente para la purificación de proteínas producidas en el cloroplasto de *C. reinhardtii*. La estructura del

plásmido pChPhy y los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción de EcoRI, BamHI, NotI, Sall, EcoRV y SphI, se muestra en la figura 2.2.

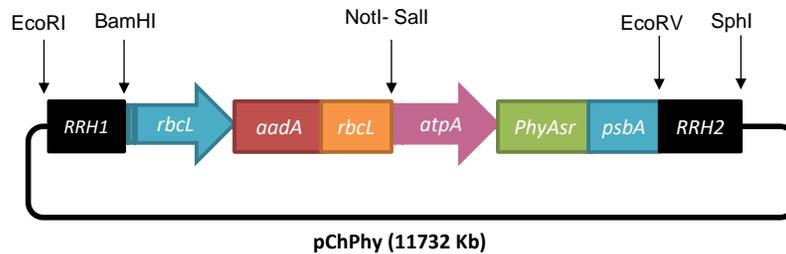


Figura 2.2 Esquema estructural del plásmido pChPhy. En el esquema se muestran los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción EcoRI, BamHI, NotI, Sall, EcoRV y SphI.

2.2.2 Vector pRH12A

El vector pRH12A fue proporcionado de igual manera por Rivera-Solís (2011) y está formado de manera similar que el pChPhy con la excepción de la construcción P+5'UTR del *atpA*, el gen *phyA* y el 3'UTR del *psbA*. Solo contiene la construcción de la región P+5'UTR del gen *rbcL*, el gen *aadA* y la región 3'UTR del gen *rbcL*, así como las regiones de recombinación homóloga RHH1 y RHH2. La estructura del plásmido pRH12A y los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción de BamHI, EcoRV, se muestra en la figura 2.3.

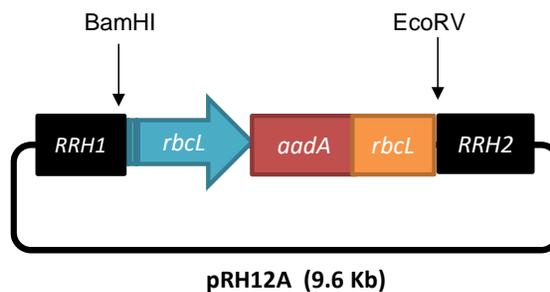


Figura 2.3 Esquema estructural del plásmido pRH12A. En el esquema se muestran los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción BamHI y EcoRV.

Se multiplicó y purificó cada plásmido a utilizar, como se describe en el anexo G. Se empleó el cultivo de la bacteria *E. coli* DH10B en cajas de Petri con medio LB semisólido ó en tubos de ensayo con medio LB líquido (anexo A.2), o en medio SOC (anexo A.3). El cultivo de de *E. coli*, se empleó para la multiplicación de cada plásmido a utilizar.

2.3 Obtención de líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* mediante biobalística

Se realizó la obtención de las líneas transplastómicas de *C. reinhardtii*, mediante biobalística. Las células bombardeadas fueron crecidas en medio TAP con el agente de selección (espectinomicina 150 µg/mL) por aproximadamente 10 días, una vez que las colonias resultantes de la transformación comenzaron a crecer, se tomaron e inocularon en medio líquido TAP/espectinomicina y se colocaron en agitación por siete días.

Pasando este tiempo, se tomó muestra para contar y para extraer el ADN como se describe en el anexo C. El ADN obtenido se utilizó para detectar la presencia del gen *phyAsr* por medio de Southern blot como se describe en el anexo E. Para detectar la presencia del gen *phyASr* se realizó una doble digestión con las enzimas NcoI y Sall, la sonda utilizada en este experimento fue la sonda phy. Para detectar la homoplasma solo realizó una sola digestión con la enzima NcoI, ya que esta enzima corta en dos puntos del genoma cerca de las regiones de recombinación homóloga, en ambos casos el plásmido pChPhy (5 ng/µL) fue linearizado con Sall como control positivo. La sonda utilizada para este experimento fue la RRH1.

2.4 Caracterización de la acumulación celular y de biomasa seca

Parte de los análisis de estas líneas transplastómicas y homoplásmicas es el conteo celular y la biomasa seca. Para ello se inocularon matraces de 250 mL con 50 mL de TAP y el agente de selección espectinomicina (150 µg/mL), con una colonia de las líneas transplastómicas/homoplásmicas y se colocaron en agitación por siete días. Posteriormente se realizó un conteo de células para inocular los matraces, por triplicado, con 50 mL de TAP y el agente de selección espectinomicina (150 µg/mL). Cada uno de ellos se inoculó con 10,000 cel/mL de cada una de las líneas transplastómicas y de igual manera se inocularon los tres matraces para cepa silvestre. A los siete días de crecimiento se tomó una muestra para realizar el conteo de cada una de ellas, como se especifica en el apartado 2.3. La otra parte del cultivo se recuperó a través de centrifugación a 3200 g por cinco minutos a 4 °C y se procedió a liofilizarlas por 48 horas en un equipo de FreeZone 4.5/LABCONCO. La biomasa obtenida fue pesada y se consideró como peso seco. Las muestras se mantuvieron en el desecador.

2.5 Transformación del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* mediante biobalística

Se obtuvo un cultivo de *C. reinhardtii* en medio TAP líquido y a los siete días (fin de la fase exponencial) se calculó la densidad celular (cel/mL), mediante conteo celular usando una cámara de Neubauer, como se describió anteriormente. Se tomó la cantidad de cultivo necesaria para concentrar 491×10^6 células por centrifugación a 3220 g por cinco minutos a 4 °C. En campana de flujo laminar, se resuspendió la pastilla resultante en 1.5 mL de medio TAP líquido y se sembraron 300 µL (aproximadamente 98.2×10^6 células) en cada caja de Petri con medio TAP semisólido. Con la ayuda de un asa de siembra se dispersaron las células en el centro del caja asegurándose que no se concentraran en ninguna parte, y se dejaron secar justo hasta que ya no se corriera el medio al inclinar la caja.

Se sembraron cinco cajas de Petri, tres se usaron para los experimentos de bombardeo con el plásmido y dos como controles. Uno de los controles fue para la cepa 137 (mt +) usada en los experimentos y que no se bombardeó y se sembró posteriormente en medio sin antibiótico para confirmar que la línea se encontraba en buenas condiciones y presentaba buen crecimiento. El otro control fue para el antibiótico y tampoco fue bombardeado, por lo que el cultivo debía morir por completo al ser sembrado en medio de selección con espectinomicina (150 µg/mL).

Para los experimentos de bombardeo por biobalística se usaron micropartículas de oro (0.6 µm de diámetro, BioRad), las cuales fueron recubiertas con el plásmido pChPhy y el plásmido pRH12A (que fue el control vacío) siguiendo un protocolo basado en Daniell *et al.*, (2005) con algunas modificaciones como se describe a continuación. Cabe señalar que todo este proceso se llevó a cabo en una campana de flujo laminar. La suspensión de oro se preparó como se describe en el anexo B.3, se homogenizó por agitación usando un vórtex y se agregaron los componentes siguientes, mezclando vigorosamente por cinco segundos en un vórtex después de añadir 2.99 µg del plásmido pChPhy y 2.79 µg del plásmido pRH12A (como ambos plásmidos contienen el gen de selección *aadA*, no fue necesario agregar otro plásmido para una co-transformación), 50 µL de CaCl₂·2H₂O (2.5 M), 20 µL de espermidina (0.1 M). Posteriormente se incubó la muestra en hielo por 20 minutos con agitación cada cuatro minutos en un vórtex. Al finalizar la incubación, se añadieron 200 µL de etanol absoluto a temperatura ambiente, se homogenizó en un vórtex por cinco segundos, se centrifugó a 13000 rpm por 45 segundos, y se removió el

sobrenadante. Se repitió este paso cuatro veces y al final se resuspendió la pastilla en 30 μL de etanol absoluto, y se mantuvo en hielo hasta su uso. Para el bombardeo se depositaron 5 μL de la solución de micropartículas en cada membrana macroacarreadora.

El bombardeo de las muestras de *C. reinhardtii* se llevó a cabo en una cámara de biobalística, a una distancia de 10 cm del cañón, usando el gas helio para generar una presión de 1300 psi, y una membrana de ruptura de 1100 psi, a un vacío de 25 mm Hg. Se obtuvieron cinco cajas experimentales.

Todas las cajas, las que fueron bombardeadas y las controles, se incubaron por 24 horas en un cuarto de cultivo con luz indirecta dentro de un recipiente para evitar el paso directo de luz a las células. Posteriormente, se recuperaron los cultivos mediante un lavado de las cajas en campana de flujo laminar, usando de 750 a 1000 μL de medio TAP líquido con espectinomicina (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por caja, excepto el control de la cepa que se lavó con medio TAP líquido sin antibiótico. Los cultivos recuperados fueron plaqueados en placas con medio TAP semisólido con espectinomicina, excepto el control de la cepa que se plaqueó en medio sin antibiótico. Las placas se mantuvieron en un cuarto de cultivo con fotoperíodo 16 horas luz/8 horas oscuridad y 25 °C de temperatura.

Las colonias que aparecieron en las cajas experimentales se consideraron como posibles transformadas, por lo que fueron subcultivadas, transfiriéndolas a medio TAP líquido con espectinomicina (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en agitación a 100 rpm por siete días. En este punto se tomó una muestra de 50 μL del cultivo para plaquear en medio TAP sólido con espectinomicina (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se consideró como una resiembra. La parte restante del cultivo se tomó para llevar a cabo una extracción de ADN.

2.6 Extracción de ADN genómico (ADNg).

Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo comercial de Illustra Nucleon Phytopure Genomic DNA Extraction Kit (GE Healthcare), siguiendo las indicaciones del proveedor, a partir de una concentración de 40 millones de células aproximadamente.

2.7 Marcaje y obtención de la sonda de ADN

Se obtuvo una sonda de ADN marcada con digoxigenina mediante PCR. Para esto fue necesario introducir en la reacción de PCR uno de los desoxirribonucleótidos precursores marcado. Se utilizó dUTP unido a digoxigenina (Dig-dUTP) (Roche). Para la obtención de

la sonda del gen *phyA* se utilizó 25 ng del plásmido pChPhy como templado y los oligonucleótidos forward 5'-TGATGCTGCTAAAGCTCCAG -3' y el reverse 5'-ACGACCAACACCAGCTTCCACAGTG -3' dando como resultado un fragmento de aproximadamente ~707 pb y para la sonda RRH1 se utilizó, de igual manera 25 ng del plásmido pChPhy como templado y los oligonucleótidos forward 5'-AACGTTTCAGAGACTAGAGC-3' y el reverse 5'- TTGTGAGCGTTACGCTCGTGC-3' dando como resultado un fragmento de ~ 414 pb. El volumen de la reacción fue de 20 µL y la proporción de precursor marcado a no marcado (Dig-dUTP: dTTP) fue 1:3. Los componentes de la reacción fueron los siguientes 50 ng de ADN plasmídico; amortiguador de reacción de Expand 1x; 0.2 mM de una mezcla de dATP, dGTP y dCTP; 130 µM de dTTP; 70 µM de Dig-dUTP; 0.5 µM de cada oligo y 1U de Expand long template.

El programa de PCR utilizado para la sonda *phy*, fue de un ciclo de desnaturalización a 94 °C por 3 min, seguido por 25 ciclos a 94 °C por 30 s, 55 °C (para los oligonucleótidos del gen *phyA*) por 30 s y 68 °C por 60 s, con una extensión final de 68°C por 10 minutos. El programa de PCR utilizado para la sonda RH1, fue de un ciclo de desnaturalización a 94 °C por 3 min, seguido por 30 ciclos a 94 °C por 30 s, 50 °C (para los oligonucleótidos de la región de recombinación 1) por 30 s y 68 °C por 60 s, con una extensión final de 68°C por 10 minutos.

El producto de PCR fue separado en un gel de agarosa al 1.2% (p/v) por 30 minutos a 85 volts, posteriormente se procedió a escindir la banda correspondiente de la sonda y fue purificado con el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN), ya que la presencia de nucleótidos DIG-dUTP no incorporados en el ADN podría generar un exceso de señal de fondo tras las hibridaciones.

2.8 Análisis de expresión de los gen *phyASr* en las líneas transplastómicas de *C. reinhardtii*

2.8.1 Diseño de oligonucleótidos

Para llevar a cabo los análisis de expresión del gen *phyASr* en el cloroplasto de *C. reinhardtii*, se diseñaron oligonucleótidos específicos para esta secuencia. Se solicitó su síntesis a Sigma-Aldrich. Las secuencias de los oligonucleótidos fueron diseñadas en regiones interna de la secuencia y se presentan en el cuadro 2.1. Estos oligonucleótidos también fueron utilizados para el análisis por PCR en tiempo real y se diseñaron a partir de

la secuencia de phyASr en la parte interna. Estos tuvieron una longitud aproximada de 20 pb y una Tm de 60 °C y 64 °C y una proporción de GC cerca del 50%. Estos oligonucleótidos fueron diseñados en el programa en línea primers3:<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>. Estos datos se muestran en el cuadro 2.1.

Para analizar la integridad del ADNc, se llevó a cabo experimentos de RT-PCR donde se empleó el gen del cloroplasto *rpl16*, cuyos oligonucleótidos se encontraban disponibles (cuadro 2.1) por Casais Molina (2011), del cual se obtiene un amplicón de 210 pb. Al ser un gen constitutivo se utilizó como control positivo para corroborar que al realizar la síntesis del ADNc la muestra siguió íntegra y no hubo degradación de ARN en el proceso. Además, para verificar que los componentes de la reacción de RT-PCR funcionaran adecuadamente. Estos oligonucleótidos también se usaron como control negativo en la muestra sin retrotranscriptasa donde no se debe observar amplificación, ya que la presencia de un amplicón indicaría contaminación con ADNg.

2.9 Extracción de ARN

La extracción de ARN se utilizó el protocolo modificado basado en el reactivo del TRIZOL, descrito en el anexo F.

2.9.1 Síntesis de ADNc

La síntesis del ADNc se realizó con una cantidad inicial de cinco µg de ARN total como molde. El ARN se mezcló con 1 µL de hexanucleótidos (hexámeros) (100 ng, Invitrogen) y H₂O up estéril en un volumen final de 10 µL incubados a 75 °C por cinco minutos y después en hielo durante tres minutos. Posteriormente, se realizó la reacción de la transcriptasa reversa, empleando la enzima Superscript III, siguiendo las especificaciones del fabricante (Invitrogen), para lo cual se dividió la muestra anterior en dos tubos, el primero como muestra experimental y el segundo como control negativo (sin adición de la transcriptasa reversa). La mezcla de reacción para la RT-PCR quedó compuesta de la siguiente manera: 5 µL de muestra (ARN+oligodT, Invitrogen), amortiguador First Strand (1X), 10 mM de DTT (0.1 M, Invitrogen), 1 mM de dNTPs (10 mM), 40 U del inhibidor de ARNasa (40 U/µL, Invitrogen), 200 U de la enzima Superscript III (200 U/µL, Invitrogen), y finalmente H₂O up, para tener un volumen final de 20 µL por muestra. Se incubó a 50 °C durante 90 minutos, posteriormente se inactivó la reacción a 75 °C durante 15 minutos, se añadió 4 µL de

ARNasa A (100 mg/mL, Sigma). Se incubó a 37 °C durante 30 minutos y el volumen se llevó a un volumen total de 100 µL.

Cuadro 2.1 Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR y qRT-PCR.

Gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencias del oligonucleótido (5'-3')	Tm (°C)	%GC	Tamaño del amplicón
<i>rpl16</i>	rpl16rtF	TTCCGTAACCACACCGTG	64.4	52.6	210
	rpl16rtRn	AGCAGGACGCATAGTAACAG	59.5	50.0	
<i>phyA</i>	FwPhyA196	CACGAGGCTTTAGCTGATGA	63.1	50.0	196
	RvPhyA196	GCCAAACGTGATCTGTAGCA	63.9	50.0	

La reacción de RT-PCR se llevó a cabo con dos µL de ADNc sintetizado como se menciona en el apartado anterior, 1 µL de cada oligonucleótido 10 µM (forward, reverse) (0.2 µM), 1 µL de dNTP's 10 mM (0.2 mM dNTP's), 2 µL MgCl₂ 50 mM (2 mM MgCl₂), 0.2 µL de Taq polimerasa (1 U), cinco µL de buffer de reacción 10X (1X buffer de reacción) y agua ultrapura en un volumen final de 50 µL. Para el programa de PCR se realizaron ensayos experimentales hasta encontrar el programa adecuado para la amplificación de cada uno de los pares de oligonucleótidos empleados. El ciclo óptimo elegido para la amplificación de cada gen fue aquel que se encontró en la fase exponencial pero sin llegar al punto de saturación de la reacción, con el fin de identificar alguna variación en cuanto a la expresión del gen. El programa de PCR utilizado fue de un ciclo de desnaturalización a 95 °C por tres minutos, seguido por 35 ciclos a 95 °C por 30 s, 62 °C (para los oligonucleótidos del gen *phyA* y 55 °C para los oligos del gen *rpl16*) por 30 s y 72 °C por 30 s, con 10 minutos de ciclo final de extensión.

2.10 Análisis de la expresión por medio PCR en tiempo Real

La PCR cuantitativa (PCR en tiempo real o qPCR) por su capacidad para detectar y medir pequeñas cantidades de ácidos nucleicos en un amplio rango de muestras de numerosas fuentes, es una tecnología usada en diagnósticos moleculares, en ciencias de la vida, la agricultura y la medicina (Bustin *et al.*, 2009).

Para el análisis de PCR en tiempo real (qRT-PCR) se llevó a cabo la validación de los oligonucleótidos, y se realizó la cuantificación absoluta de las líneas transplastómicas. Para ello, fue necesario realizar una curva estándar que permitirá la cuantificación de la expresión del gen *phyASr* en las líneas transplastómicas. Para los puntos de la curva estándar se realizó a partir de diluciones seriadas del plásmido, siendo la concentración más alta 1 ng/ μL y la más baja 0.0001 ng/ μL , por cada concentración (que equivale a cada punto de la curva) se realizó por triplicado. La reacción de qRT-PCR para los oligos del gen *phyASr* fue a un volumen total de 20 μL y consistió en lo siguiente: 1 μL de template de la dilución del plásmido, 10 μL de Power SYBR Green PCR Master Mix (Invitrogen/Life Technologies), 200 nM del oligo Fw (0.4 μL), 200 nM del oligo Rv (0.4 μL) y H_2O UP (5.2 μL). Para la reacción de las líneas transplastómicas se realizó: 6 μL de template de ADNc (600 ng) de diluciones previamente generadas, 10 μL de Power SYBR Green PCR Master Mix (Invitrogen/Life Technologies), 200 nM del oligo Fw (0.4 μL), 200 nM del oligo Rv (0.4 μL) y H_2O UP (5.2 μL).

Para establecer el programa de reacción fue necesario realizar ensayos evaluando diferentes tiempos y temperatura de alineamiento. El programa que se usó fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95 °C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos a 95 °C por 30 segundos, fase de alineamiento fue a 62 °C por 30 segundos para los oligonucleótidos para los oligonucleótidos *phyASr* por un minuto; y una extensión final a 72 °C por 30 segundos. La reacción de qRT-PCR se llevó a cabo utilizando un v2.3 StepOne™ Real-Time PCR System y StepOne Software (Invitrogen/Life Technologies).

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS

3.1 Transformación de *Chlamydomonas reinhardtii* con el pChPhy mediante biobalística

Se verificó la integridad del pChPhy con enzimas de restricción, como se describe en el apartado de Materiales y métodos. Los resultados se muestran en la figura 3.1. En el carril número 1 se observan los fragmentos de 1602 pb, que corresponde a la digestión del plásmido pRH12A (vector vacío, el cual no contiene la construcción del gen *phyA*) con las enzimas EcoRV y BamHI. En el carril 2 se muestra la digestión del plásmido pChPhy, igual con las enzimas EcoRV y BamHI dando como resultado una banda de tamaño de 3550 pb, como muestra de que la construcción del gen *phyA* se insertó entre la construcción del gen *aadA* y al región de recombinación homóloga RRH2. En el carril 3 se muestra el tamaño del plásmido digerido con las enzimas EcoRV y NotI, dando como resultado un tamaño de 1948 que corresponde la construcción del gen *phyA*. En el carril 4 se observa la digestión con las enzimas BamHI y Sall que da como resultado la extracción del fragmento del gen *aadA* que pesa aproximadamente 1602 pb.

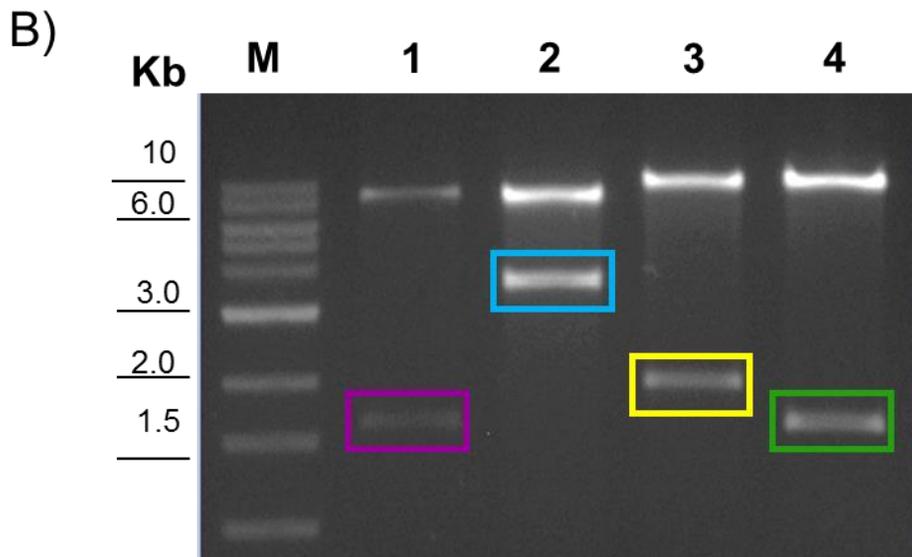
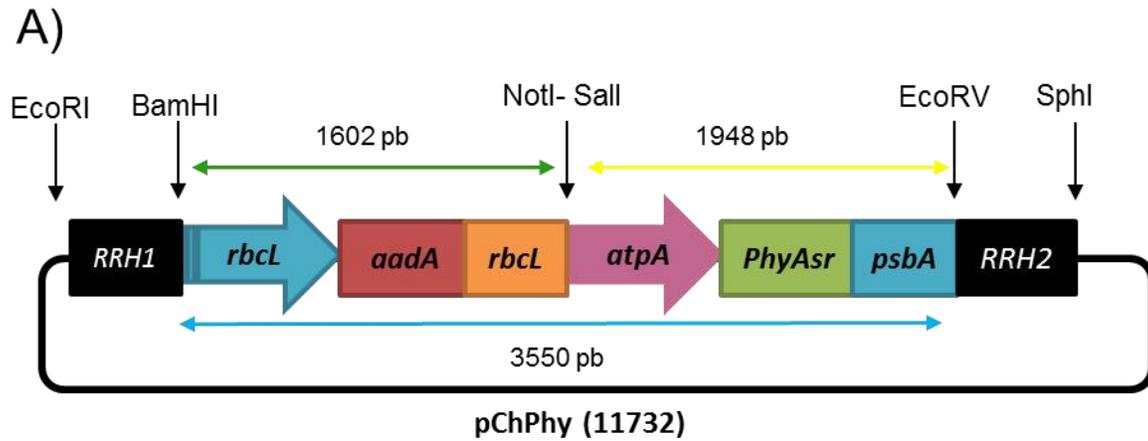


Figura 3.1 Verificación de integridad del vector de transformación. A) Esquema del vector de transformación pChPhy incluyendo sus sitios de restricción y los pesos de los fragmentos de las regiones que lo conforman. B) Comprobación de la integridad del vector pChPhy por digestión. Carril 1: digestión del plásmido pRH12A con EcoRV y BamHI. Carril 2: digestión del plásmido pChPhy con EcoRV y BamHI. Carril 3: digestión del plásmido pChPhy con EcoRV y NotI. Carril 4: digestión del plásmido pChPhy con BamHI y Sall.

Una vez concluida la verificación de la integridad del plásmido se llevó a cabo la transformación por biobalística y el crecimiento de las células transformadas se observa en la figura 3.2.

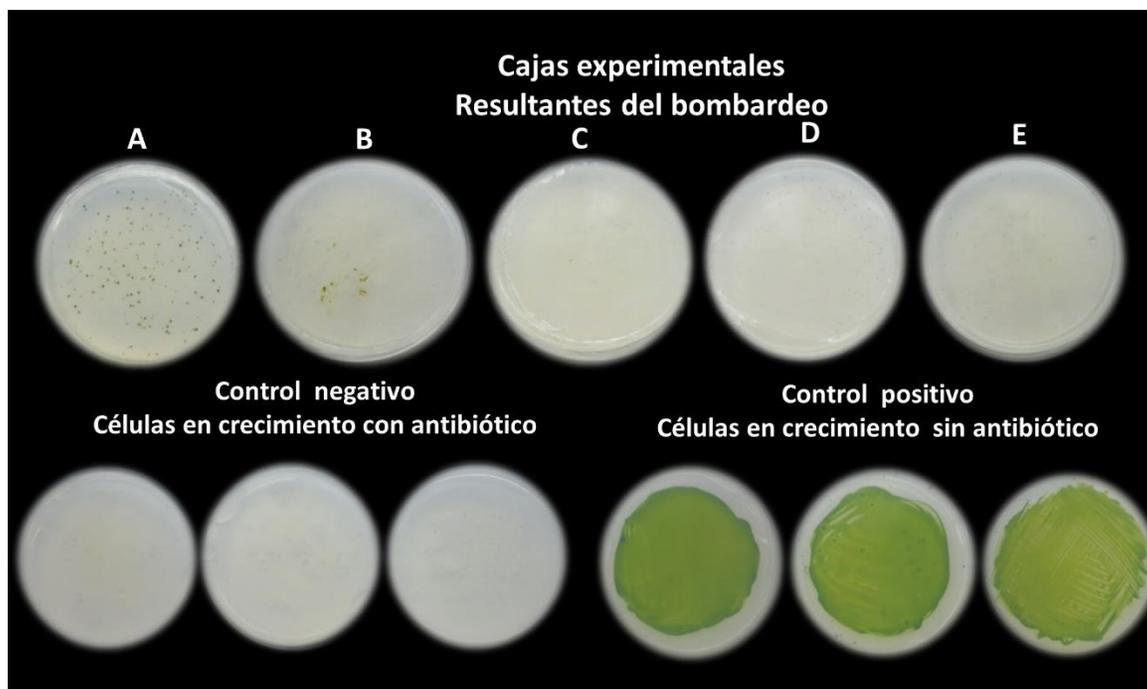


Figura 3.2 Cajas de las células recuperadas del proceso de transformación por biobalística.

Las primeras colonias, posiblemente transformadas, se comenzaron a observar a los siete días después de la transformación. Sin embargo, fue hasta la segunda semana cuando se lograron ver las colonias con mayor claridad y definición de contorno. Al final de la tercera semana se obtuvieron alrededor de 120 colonias en la caja A, 50 colonias en otra caja y entre un promedio de 20 en las cajas restantes después de 3 semanas del experimento. Para verificar si las colonias recuperadas estaban transformadas, se realizó una resiembra en la que se colocó una colonia en medio TAP líquido con espectinomicina (150 µg/mL) para multiplicar esa colonia, hacer una colecta y realizar una extracción de ADN. Las líneas se llamaron CPhy con el número de colonia según el orden de recuperación. Se realizó la extracción de ADN de las líneas CPhy 11- hasta la CPhy 19. De igual forma, se extrajo el ADN de las líneas CPhy 20 hasta la CPhy 29 y las CPhy B1 hasta la CPhy B5 (éstas son nombradas de esta manera ya que fueron recuperadas de la segunda caja del bombardeo que presentó más colonias). La integridad del ADN extraído se puede observar en la figura 3.3.

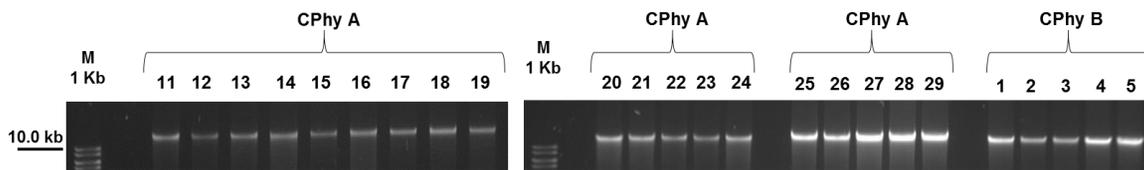


Figura 3.3. Verificación de la integridad del ADN extraído de las líneas CPhy 11 hasta la CPhy B5, en un gel de agarosa al 1.2 % con bromuro de etidio.

La construcción del gen *phyASr*, en el plásmido pChPhy, fue dirigida al cloroplasto en la región invertida repetida entre intrón 4 del gen *psbA* y el extremo 3' del gen ribosomal 23S. La estrategia de inserción se muestra en la figura 3.4.

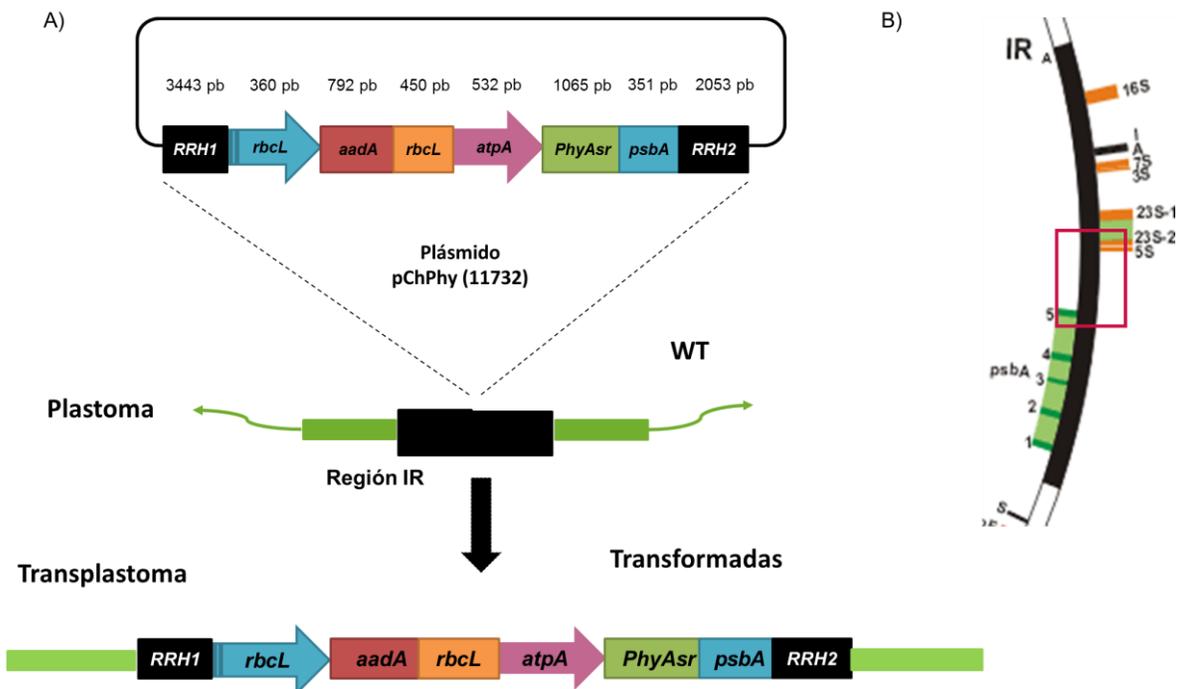


Figura 3.4 Estrategia de la transformación del genoma del cloroplasto. En A) se muestra la manera de inserción en el cloroplasto, vía recombinación homóloga, en la cepa silvestre (WT). En B) se muestra el sitio, en el genoma del cloroplasto, donde va dirigida esta construcción.

3.2 Evaluación de las colonias transformadas y verificación de homoplasma

Una vez realizado la extracción de ADN, de cada una de las muestras, se procedió a detectar el gen *phyA* en el cloroplasto de *C. reinhardtii* mediante la técnica de Southern blot.

Para el Southern blot se realizó una doble digestión con las enzimas Sall y NcoI para las líneas transformadas, para la cepa silvestre (Wt) una digestión con NcoI y para el plásmido pChPhy una digestión con Sall para linearizarlo. La enzima NcoI corta en el genoma del cloroplasto, fuera de las regiones de recombinación homóloga que están incluidas en el vector de transformación; por lo tanto, estos sitios no están incluidos en construcción del plásmido pChPhy. La construcción en el plásmido pChPhy posee un sitio de restricción para enzima Sall, como se muestra en la figura 3.1 A, dando como resultado el plásmido linearizado. En la figura 3.5 se muestra el resultado del Southern blot, para las líneas transformadas en el cual se esperaba un fragmento de alrededor 6.0 kb en donde se debe unir la sonda phy que está diseñada en un fragmento de la secuencia del gen *phyA* (banda en color rojo en la figura 3.5 A). Para el caso del control positivo (plásmido pChPhy) se esperaba un tamaño de 11.732 kb. En este resultado no esperaba visualizar alguna banda en la cepa silvestre ya que no existe sitio en el que la sonda se pueda unir.

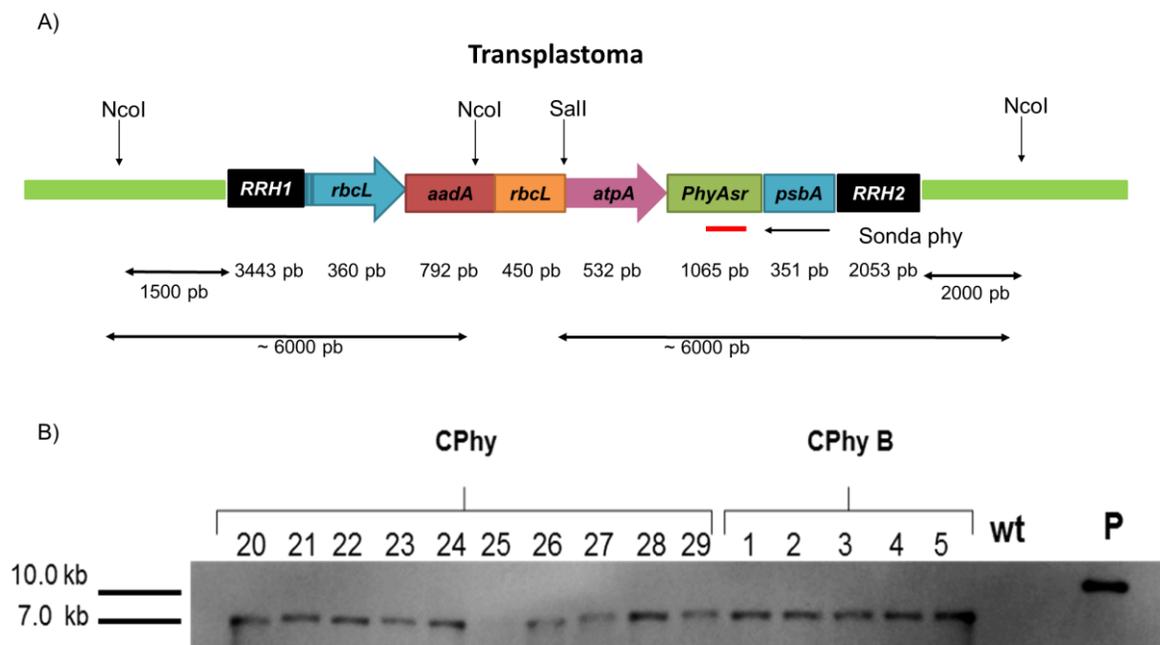


Figura 3.5 Estrategia para detectar la presencia del gen *phyASr* en el genoma del cloroplasto de *C. reinhardtii*. A) Esquema con los sitios de restricción de NcoI y Sall. En el se muestra también el tamaño esperado del fragmento digerido así como también muestra la zona a la que se debe unir la sonda phy. B) Resultados del Southern blot donde se observa la presencia de la banda con el tamaño esperado (aprox. 6 kb). La cepa silvestre (wt) como control negativo y el plásmido pChPhy (P) como control positivo.

El patrón presentado en la figura 3.5 B, indica que cada líneas evaluada presentó el gen de la fitasa y con este resultado se puede decir que las líneas son transplastómicas, es decir, que la construcción fue capaz de integrarse al genoma del cloroplasto, ya que se observa una banda (resultado de la digestión del ADN del cloroplasto de *C. reinhardtii*), con un tamaño de 6.0 kb que es donde se encuentra el gen de la fitasa.

Una vez realizada la comprobación de la transformación de *C. reinhardtii*, el siguiente paso fue verificar que las líneas obtenidas fueran homoplásmicas, es decir, que todas las copias del genoma del cloroplasto presentaran el gen de la fitasa. Para ello fue necesario realizar otro Southern blot pero ahora con una sonda diferente; en este caso fue una sonda diseñada en la región de recombinación homóloga de la cepa silvestre y que también está incluida en la región RRH1 en el vector de transformación.

Este experimento se realizó haciendo la digestión, solo con la enzima NcoI, ya que como se mencionó anteriormente, esta enzima corta fuera de las regiones de recombinación homóloga y nos permitirá ver la inserción completa de toda la construcción dentro del genoma del cloroplasto y de esta manera ver también la homoplasma de las líneas. Para este análisis, se eligió a la línea CPhy 29, ya que ese momento se necesitaban 10 colonias y esta línea presentaba este número de colonias. Se eligieron 10 colonias para tener una mayor probabilidad de encontrar una colonia cuya células fueran homoplásmicas. Se tomaron estas colonias y se inocularon en medio TAP líquido con espectinomicina (150 µg/mL) para multiplicarlas, hacer la colecta y realizar una extracción de ADN. Un posible resultado es que en las líneas transformadas, se presente dos patrones de banda; el primero, donde las líneas sean homoplásmicas, mostraría una sola banda de 6.0 kb y el segundo, donde las líneas sean heteroplásmicas, un patrón que podría presentar dos bandas, tanto de 6.5 kb (que sería la otra parte de la construcción) y 9.0 kb (que corresponde al tamaño de la región sin la construcción). En la figura 3.6 se puede observar que se cumple la posibilidad de una sola banda, la de 6.0 kb, de lo que se puede discutir que las líneas transplastómicas también son homoplásmicas. En el caso de la cepa silvestre muestra el tamaño esperado en su caso de 9.0 kb (que no posee la construcción).

En los resultados de este experimento se mostró la banda de aproximadamente 6.0 kb ya que la enzima NcoI corta en dos lugares del genoma y en un lugar de la construcción (en el gen *aadA*), generando dos fragmentos aproximadamente del mismo tamaño. Por tal razón el tamaño es diferente al tamaño mostrado en la cepa silvestre, cuyo peso es

aproximadamente de 9.0 kb. Si las líneas fueran heteroplásmicas presentarían ambos patrones de banda

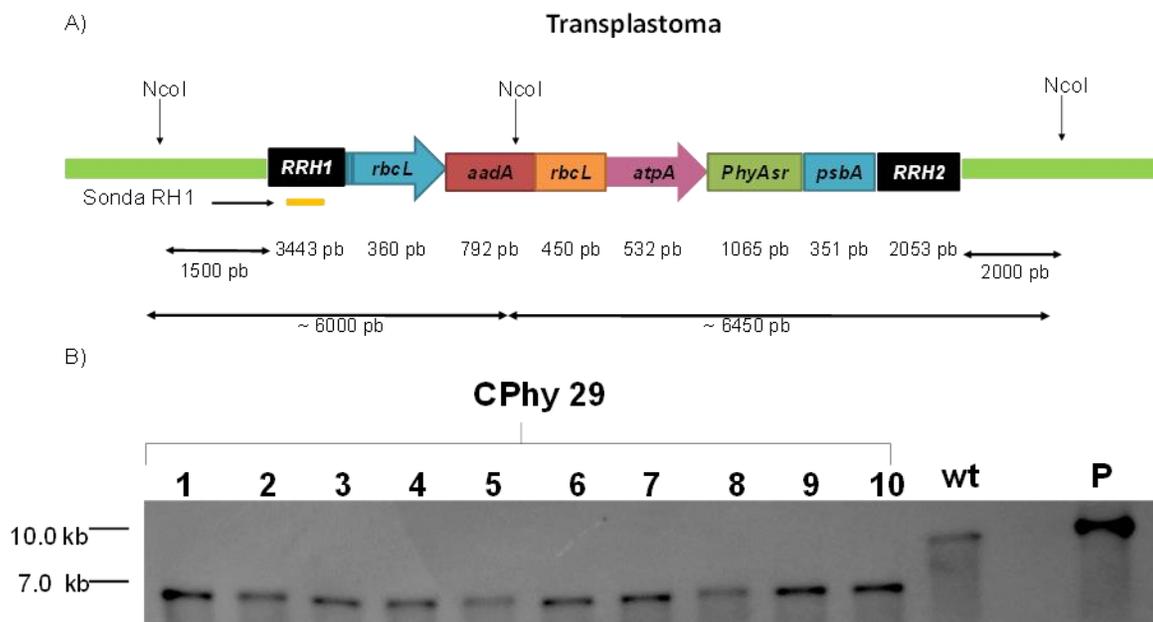


Figura 3.6. Estrategia para detectar la homoplasma en las líneas transplastómicas de *C. reinhardtii*. A) Esquema con los sitios de restricción de NcoI. En el se muestra también el tamaño esperado del fragmento digerido así como también muestra la zona a la que se debe unir la sonda RH1(en amarillo). B) Resultados del Southern blot donde se observa que las 10 colonias elegidas de la línea CPhy 29 son homoplásmicas, el tamaño esperado aproximadamente es de 6 kb. La cepa silvestre (wt) como control positivo al igual que el plásmido pChPhy (P).

Una vez verificada la homoplasma en las clonas de la CPhy 29 se procedió a verificar la homoplasma en otras de las líneas que resultaron transplastómicas, se repitió el Southern blot con la misma sonda RH1. Se tomaron tres colonias de cada una de las líneas anteriormente analizadas e incluyendo la línea CPhy 13 (una línea que resultó en la transformación pero aún no se había analizado) para verificar si presentan homoplasma o heteroplasma. Las líneas que se tomaron fueron las líneas CPhy 13, 21, 25 y B3. En la figura 3.7 se muestra el resultado de este experimento. Las tres clonas de cada línea presentan el patrón de la homoplasma, lo que se concluye que estas líneas también son homoplásmicas.

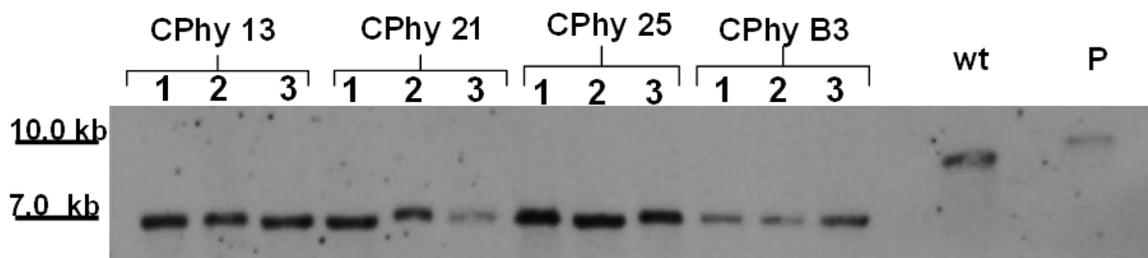


Figura 3.7. Southern blot de tres clonas de las líneas transplastómicas, CPhy 13, CPhy 21, CPhy 25 y CPhy B3. La sonda usada en este experimento fue la sonda RH1. El tamaño en este experimento es de 6.0 kb. La cepa silvestre (wt) como control positivo al igual que el plásmido pChPhy (P).

De todas las líneas analizadas se eligieron, de manera aleatoria, cinco de ellas para seguir con los siguientes experimentos. Se eligió la CPhy 13-1, CPhy 21-1, CPhy 25-2, CPhy 29-7 y la CPhy B3-3. Para un manejo más sencillo de la información, la nomenclatura de las líneas cambió de nombre: CPhy 13-1 se convirtió en C1, CPhy 21-1 en C2, CPhy 25-2 en C3, CPhy 29-7 en C4 y la CPhy B3-3 en C5.

3.3 Caracterización de la acumulación celular y de biomasa seca

Como se describió en materiales y métodos, se realizó el conteo de células y la determinación de la biomasa seca como parte de la caracterización de estas líneas transplastómicas homoplásmicas y en la figura 3.8 se muestra el cultivo líquido de las líneas transplastómicas. El color del cultivo es el característico de *C. reinhardtii*, sin embargo, las líneas transplastómicas presentaron una característica al crecer que no se observó en la cepa silvestre, ya que crecen formando agregados o palmeloides como se observa en la figura 3.8 en la vista del microscopio a 40X.

Con respecto al conteo celular, la línea que resultó con mayor número de células fue la línea C3, presentando una diferencia significativa con respecto a la línea silvestre, éstos resultados se muestran en el cuadro 3.1 y en la figura 3.9.

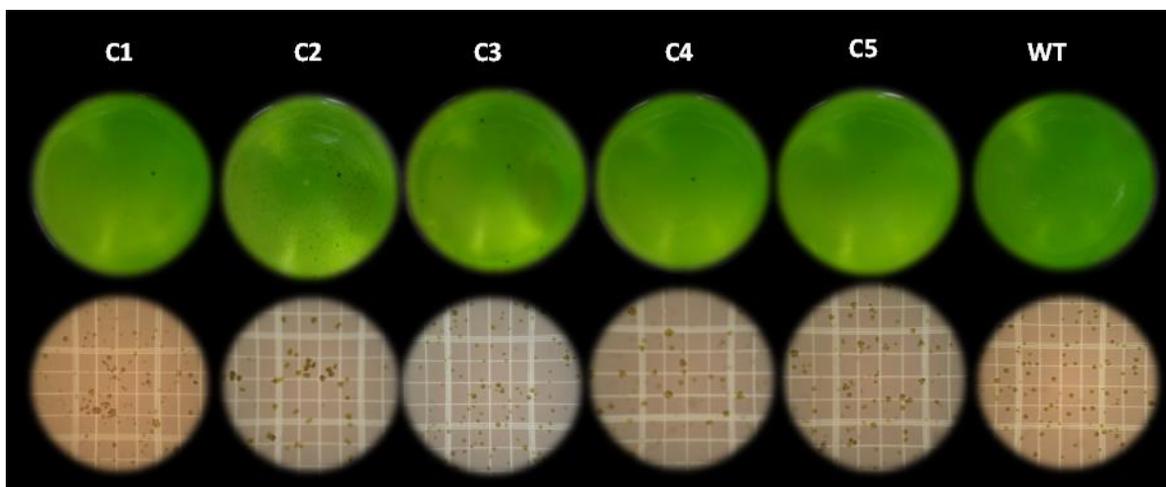


Figura 3.8 Cultivo de las líneas transplastómicas (C1-C5) y la cepa silvestre (wt) a los siete días. En la parte superior se muestra la parte inferior de los matraces. En la parte inferior se observa una toma al microscopio a 40X.

Los resultados muestran el promedio de número de células por mL de medio de cultivo. El número de células de la línea C3 fue mayor a la línea silvestre; sin embargo, el tamaño de las células transplastómicas fue menor.

Cuadro 3.1 Conteo celular de las líneas transplastómicas (C1-C5) y la cepa silvestre (Wt) a los siete días. El experimento se realizó por triplicado y se obtuvo el promedio de células por mL de medio de cultivo.

Líneas experimentales	Millones de células/mL			
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
WT	6200000	6825000	9875000	7633333.33
C1	6075000	7575000	6275000	6641666.67
C2	8700000	8950000	7800000	8483333.33
C3	11550000	11450000	12025000	11675000
C4	8150000	5550000	8075000	7258333.33
C5	8425000	8525000	10675000	9208333.33

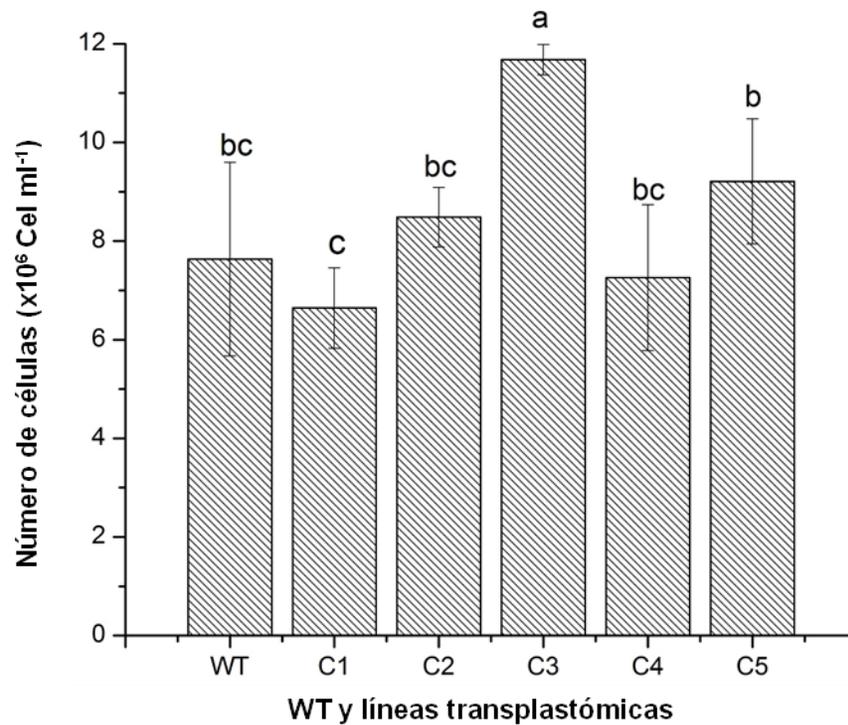


Figura 3.9 Diferencia en el conteo celular de las líneas transplastómicas (C1-C5) y la cepa silvestre (WT).

Los resultados de la biomasa seca se muestran en el cuadro 3.2 y en la figura 3.10, donde se observa que entre las líneas no hubo diferencias significativas en comparación con la línea silvestre, manteniéndose entre una rango de 26-29.8 mg por cada 50 mL de medio de cultivo.

Cuadro 3.2 Biomasa seca de las líneas transplastómicas (C1-C5) y la cepa silvestre (WT) a los siete días. El experimento se realizó por triplicado y se obtuvo el promedio de la biomasa seca por 50 mL de medio de cultivo.

Líneas experimentales	Peso seco (mg)			
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
WT	21.8	30	32.6	28.13
C1	27	25.2	25.1	25.76
C2	31.1	28.1	27.8	29.00
C3	29.6	30.7	29.1	29.80
C4	28.7	23	31.2	27.63
C5	28.9	28	23.5	26.80

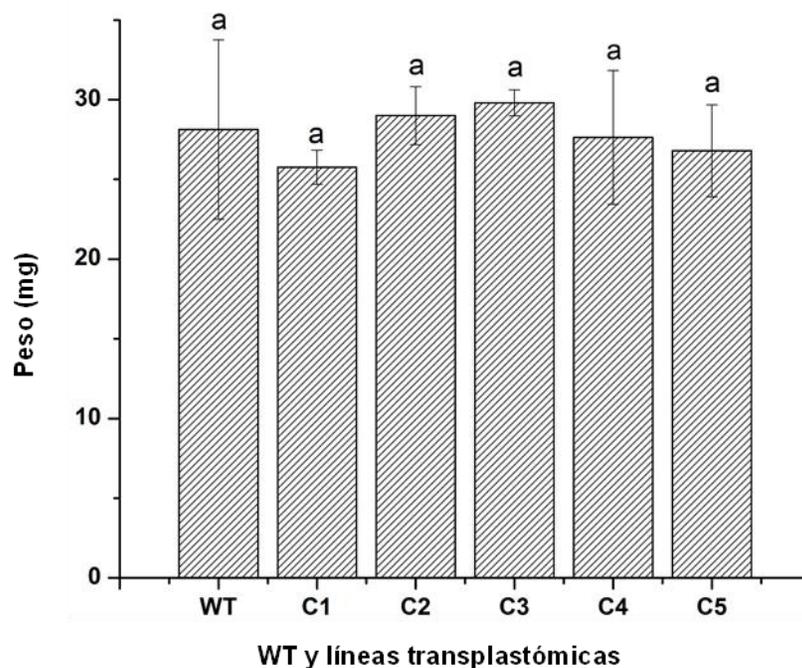


Figura 3.10 Promedio de la biomasa seca por 50 mL de medio de cultivo. El eje de las “Y” muestra el peso (mg) que hay en las cinco líneas transplastómicas (C1-C5) respecto a la cepa silvestre (WT). El eje de las “X” muestras las líneas transplastómicas y la cepa silvestre.

3.4 Análisis de expresión del gen *phyASr* en las líneas transplastómicas

Para realizar el análisis de expresión, primero fue necesario extraer el ARN de las líneas transplastómicas y la cepa silvestre. La calidad del ARN extraído se muestra en la figura 3.11, la concentración mostrada en el gel de agarosa fue de aproximadamente dos μg de ARN para cada muestra. Se tomaron cinco μg para la síntesis de ADNc, especificada en materiales y métodos. Posterior a la síntesis se confirmó por medio de RT-PCR la expresión del gen *rpl16*, como nuestro gen control y del gen *phyASr*.

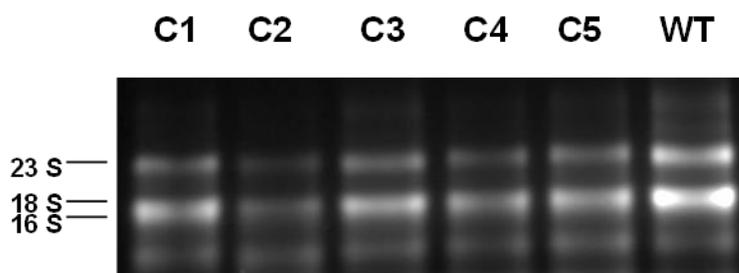


Figura 3.11 Verificación de la integridad del ARN extraído de las líneas C1 hasta la C5 y de la línea silvestre (WT).

Se realizó la RT-PCR con los oligonucleótidos del gen *rpl16*, para verificar que en la síntesis no hubiera contaminación del ADN genómico y el ARN no sufrió degradación en el proceso, además de verificar que los transcritos estaban íntegros. Dicha RT-PCR se puede observar en la figura 3.12, el tamaño del amplicón esperado fue de 200 pb aproximadamente.

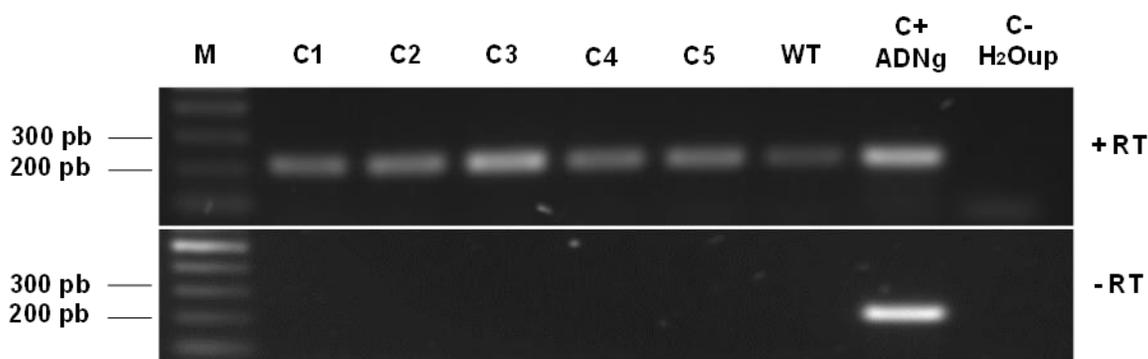


Figura 3.12 RT-PCR de las líneas transplastómicas (C1-C5) y la cepa silvestre (WT) con los oligonucleótidos del gen *rpl16*. Gel de agarosa al 1.2 % con bromuro de etidio. Como control positivo se utilizó ADNg y control negativo se utilizó H₂Oup.

Para verificar los transcritos del gen *phyA* se realizó una RT-PCR con los oligos que amplifican 196 pb de esta secuencia. En la figura 3.13 se puede observar los resultados, donde la cepa silvestre funciona como control negativo ya que al no estar transformada no presenta este fragmento, como control positivo se tiene al plásmido pChPhy. Los resultados muestran, una vez más, que el gen *phyAsr* se mantiene en las líneas y que se está dando la expresión del mismo en las líneas experimentales.

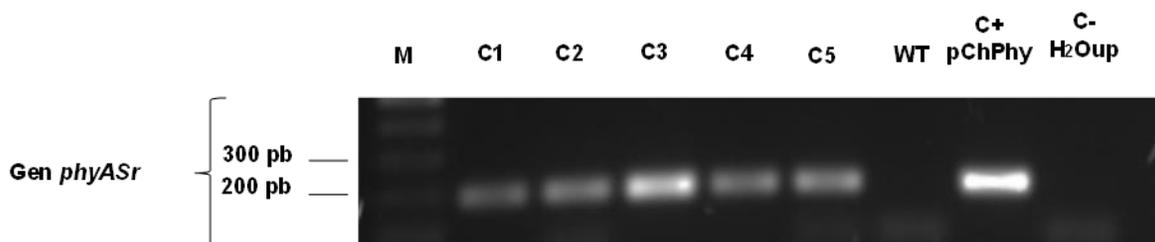


Figura 3.13 RT-PCR de las líneas transplastómicas (C1-C5) y la cepa silvestre (WT) con los oligonucleótidos del gen *phyASr*. El control positivo (C+) es el plásmido pChPhy y como control negativo (C-) H₂Oup. El amplicón esperado es de 196 pb.

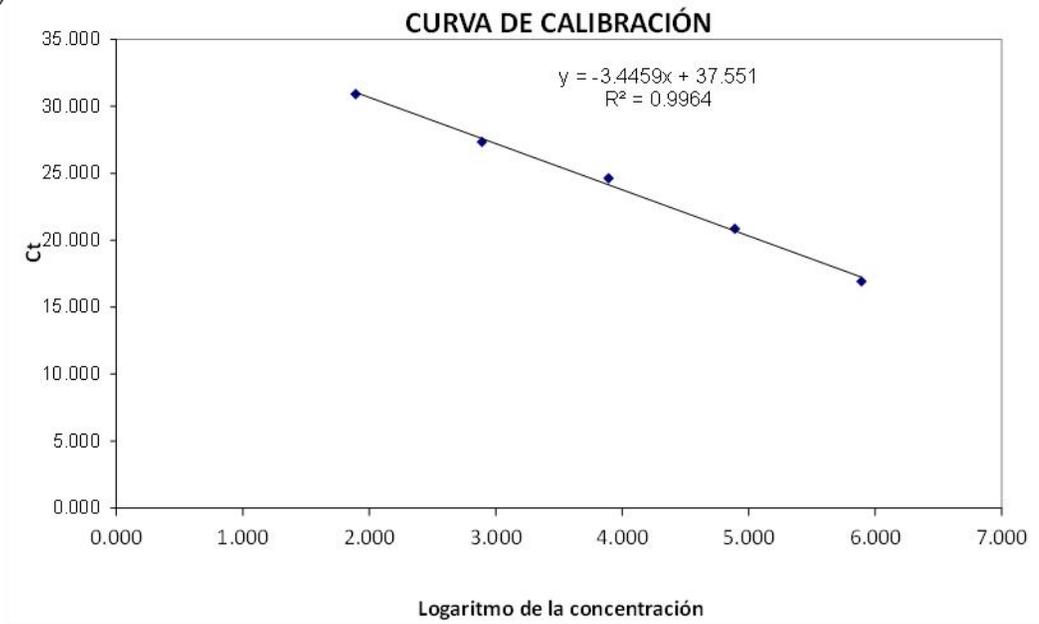
Una vez que se verificó la expresión del gen *phyASr*, fue necesario verificar la expresión del gen *phyASr*, de una manera más sensible. Para esto se realizó un experimento con la RT-PCR en tiempo real.

3.4.1 Cuantificación absoluta del gen *phyASr* en las líneas transplastómicas mediante qRT-PCR

La expresión cuantitativa del gen *phyASr* en las líneas transplastómicas se llevó a cabo mediante RT-PCR en tiempo real. En este experimento, se realizó una cuantificación absoluta, donde el objetivo fue determinar de una manera más exacta, el número de moléculas de ADN, en este caso del gen *phyASr* en las líneas transplastómicas. Para esto fue necesario hacer diluciones seriadas conocidas del plásmido pChphy, para generar una curva estándar. La concentración más alta fue de 10 pg hasta la menor que fue 0.001 pg. La curva se realizó con los oligonucleótidos del gen *phyASr*, donde se obtuvo una R^2 de 0.9964 y una pendiente (slope) de -3.4459 y una eficiencia de amplificación del 95%. La curva produce una relación lineal entre el Ct y las cantidades iniciales de ADNc permitiendo la determinación de la concentración. Una vez obtenida la curva, se calculó la concentración del gen *phyASr* en las líneas transplastómicas. Esta curva se puede observar en la figura 3.14, donde se observa la curva de disociación de los oligonucleótidos que amplifican el gen

phyASr.

A)



B)

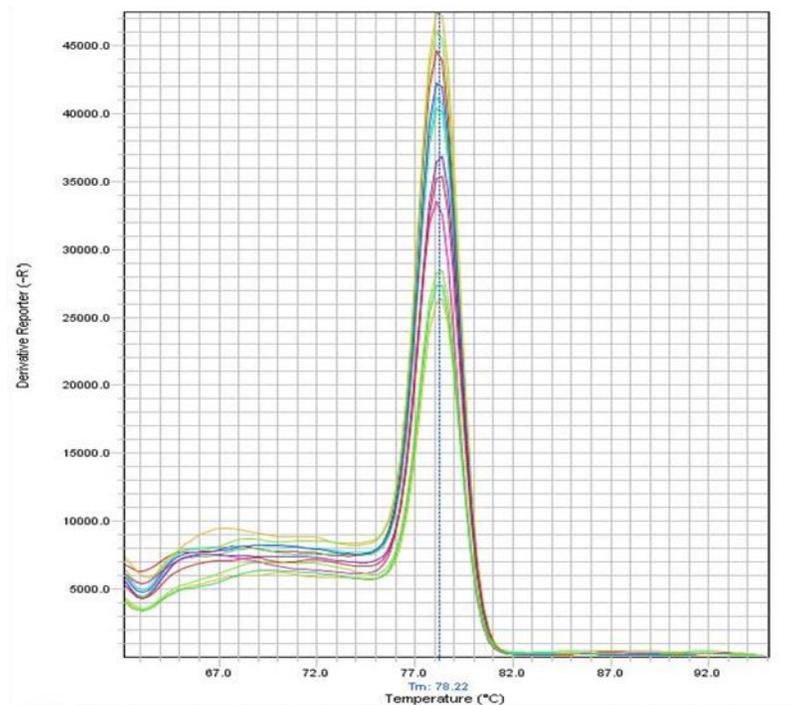


Figura 3.14 Eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos del gen *phyASr*. A) Curva estándar, B) curva de disociación.

En la figura 3.15 se muestra el número de copias aproximado del gen *phyASr* de las cinco líneas transplastómicas. Como se puede observar todas las líneas transplastómicas presentaron expresión del gen *phyASr*; sin embargo, los niveles de expresión variaron entre cada línea. La línea C3 fue quien presentó mayor número de copias del gen con aproximadamente, 22,578 copias por 600 ng de ADNc utilizado, seguido por la segunda línea que presentó un número alto de copias, la C1 con 20801 copias por cada 600 ng de ADNc. La línea C2 presentó un número de 7,929 copias, la C4 2,775 copias y la C5 11,458 copias, por cada 600 ng de ADNc utilizado. La línea C4, fue quien presentó la menor cantidad de número de copias del gen *phyASr*.

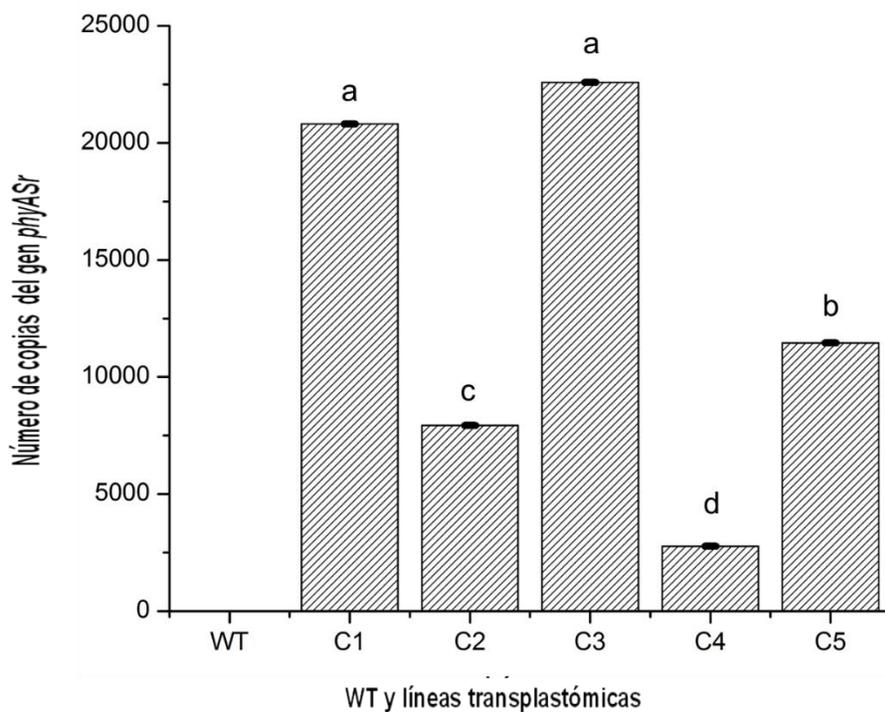


Figura 3.15. Cuantificación absoluta de la expresión del gen *phyASr* por qRT-PCR de las cinco líneas transplastómicas de *C. reinhardtii*. El eje de las “Y” muestra el número de copias que hay en las cinco líneas transplastómicas (C1-C5) respecto a la cepa silvestre (WT). El eje de las “X” muestran las líneas transplastómicas y la cepa silvestre.

CAPÍTULO IV

4. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se transformó, por medio de biobalística, el cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* con el gen *phyA* de la bacteria ruminal *Selenomonas ruminantium*, cuyo codón fue optimizado para el uso de codón del cloroplasto de *C. reinhardtii*. El gen *phyASr*, produce una proteína con actividad de fitasa.

El plásmido pChPhy, el vector de transformación, contenía el gen *phyASr*, flanqueado con las secuencias del promotor del 5'UTR del *atpA* y la región 3'UTR del *psbA*. En el vector también se encuentra una construcción con el gen *aadA* que confiere resistencia a la estreptomicina/ espectinomicina, que permite seleccionar las colonias resultantes de la transformación (Rivera-Solís, 2011). Estas secuencias fueron reportadas por Barnes (2005) con un porcentaje en los niveles de expresión del transgen con $94 \pm 5 \%$ y un alto porcentaje en producción de la proteína, cerca del 100 %. En dicho vector se encuentran dos partes de la región invertida repetida (RRH) flaqueando las dos construcciones (la del gen *aadA* y la del gen *phyASr*), para permitir la inserción de la construcción en el plastoma de *C. reinhardtii*. Tener la construcción del gen de resistencia junto con la construcción de interés, evitará tener falso positivos (como en el caso una co-transformación).

El resultado de la transformación fueron, aproximadamente, 200 colonias posiblemente transformadas a las tres semanas después del proceso de bombardeo. Los segmentos de las regiones invertidas repetidas, que flaquean a la construcción, permitieron la inserción de la construcción dentro del cloroplasto de *C. reinhardtii*. De las colonias resultantes, se analizaron 16 de estas colonias por medio de la técnica de Southern blot para detectar la presencia del gen *phyASr* y se confirmó que las líneas evaluadas eran transplastómicas. Para evaluar la homoplasma se eligió una de las líneas transplastómicas, la CPhy 29, y se evaluaron 10 colonias de esta línea para tener un número considerable y tener al menos una de ellas que presente la homoplasma; sin embargo, los resultados arrojaron que las 10 colonias eran homoplásmicas, la línea elegida para los posteriores análisis fue la Cphy 29-7. Con estos resultados se demostró que al tener integrada la construcción del gen de resistencia en el mismo vector donde se encuentra la construcción de interés disminuyó la posibilidad de tener falsos positivos y se aumentaría la probabilidad de detectar las líneas homoplásmicas en menos tiempo.

Posterior a este paso se eligieron cuatro colonias más (Cphy 13, Cphy 21, Cphy 25, Cphy B3) para evaluarles la homoplasma y en base a los resultados anteriores se eligieron solo tres colonias de cada línea, resultando de igual manera que todas eran homoplásmicas. Las líneas que fueron seleccionadas para los siguientes análisis fueron Cphy 13-1, Cphy 21-1, Cphy 25-2, Cphy B3-3. Los análisis para evaluar el proceso de transformación, permitieron establecer que las líneas eran transplastómicas y homoplásmicas después del segundo subcultivo de estas líneas.

Estas líneas fueron renombradas Cphy 13-1 como C1, Cphy 21-1 como C2, Cphy 25-2 como C3, Cphy 29-7 como C4 y Cphy B3-3 como C5. Parte de los análisis de los resultados fue la caracterización del crecimiento celular y la biomasa seca, las cinco líneas homoplásmicas transplastómicas fueron analizadas y se observó que las características del cultivo de las líneas transformadas con las cepa silvestre (WT), fue muy similar en cuanto a coloración, crecimiento en los siete días del cultivo; sin embargo, las líneas transplastómicas homoplásmicas presentaron un patrón diferente en el cultivo líquido, las células crecieron en aglomeraciones, llamadas palmeloides.

Se ha demostrado en estudios que *C. reinhardtii* puede vivir en estos grupos pequeños llamados palmeloides (Harris, 1989). Como se sabe, el P es un componente integral de los ácidos nucleicos y fosfolípidos, un modificador esencial de la función proteica y es fundamental para la circulación de la energía de la célula. Además es un componente fundamental en la división celular, en la regulación de procesos metabólicos como la fotosíntesis, entre otros. La forma principal de almacenamiento de P en *Chlamydomonas* es polifosfato, un polímero lineal de ortofosfato. El polifosfato también se encuentra en la pared celular, y su abundancia cambia durante el ciclo celular, alcanzando un máximo durante la citocinesis (Stern, 2008). Por esta razón, se deduce que al estar presente la fitasa de *Selenomonas ruminantium* en *C. reinhardtii*, es probable que la disposición de los grupos fosfatos sea mayor debido a la actividad de dicha enzima, generando un cambio (aceleración) en la división celular y provocando de esta manera el incremento en el número de células, como se observó en la línea C3.

Por otra parte, en un estudio realizado por Lurling y Beekman (2006), observaron que este tipo de crecimiento es una respuesta derivada de la interacción con el rotífero *Brachionus calyciflorus*. Multon y Bell (2012), mencionan que el fenotipo palmeloide es una respuesta plástica, es decir, que ciertos estímulos desencadenan este tipo de cambio fenotípico. Por

otra parte, esto podría deberse a una características muy particular de cada línea, por el evento de transformación, ya que no todas presentaban ese patrón en la misma proporción (Surczuki *et al.*, 2009).

En los resultados del crecimiento celular fue la línea C3 quien presentó una diferencia significativa, con un mayor número de células en comparación con la línea silvestre. Las otras cuatro líneas no presentaron diferencia alguna; sin embargo, al observarse en el microscopio, el tamaño de las células de la líneas transformadas fueron más pequeñas que la líneas silvestre. Este resultado está relacionado con el fenotipo del crecimiento de las líneas transplastómicas, ya que la línea que presenta con un patrón más fuerte de palmeloides es la línea C3. La biomasa seca, se tomó de las líneas ya liofilizadas y en este caso las líneas transplastómicas no mostraron diferencia significativa en comparación con la línea silvestre.

La transformación del cloroplasto va dirigida a la región invertida repetida, por lo tanto, podría esperarse que todas las líneas obtenidas al ser homoplásmicas posean las mismas características, y como se discutió anteriormente no sucedió de esa forma, ya que no todas las líneas presentan el mismo fenotipo. Por otra parte, se podría especular que la expresión del gen *phyASr*, fuera muy similar entre las líneas transplastómicas homoplásmicas. Los análisis de RT-PCR, confirmaron la expresión del gen *phyASr* en todas las líneas transplastómicas; sin embargo, el análisis cuantitativo realizado por medio de una RT-PCR de tiempo real, mostraron que las líneas C3 y la línea C1 fueron las que presentaron la mayor expresión del gen. En un trabajo similar, reportado por Erpel y colaboradores (2016), donde transformaron el cloroplasto de *C. reinhardtii* con la fitasa PhyA E228K de *Aspergillus niger*, mostraron tener líneas transformadas cuyo nivel de expresión del gen *mE228K* (gen ya optimizado con el uso del codón del cloroplasto) fue diferente, teniendo como normalizador al gen *rbcL*. La expresión del transgen puede verse afectada por factores como la velocidad de la transcripción del gen, la estabilidad del RNA mensajero y, en menor proporción, el número de copias del gen.

Existen numerosos reportes de la expresión de proteínas recombinantes en *C. reinhardtii* con enfoques terapéuticos; sin embargo, existen pocos reportes con proteínas utilizadas para la industria agropecuaria. En un estudio realizado por Yoon y colaboradores (2011) proporcionó evidencia de la expresión de una fitasa microbiana en *C. reinhardtii*. El gen utilizado para transformar el cloroplasto de *C. reinhardtii* fue el gen *appA* de *Escherichia coli*

y con las líneas resultantes, se demostró la funcionalidad de esta fitasa microbiana en microalgas, además de mostrar el uso de las microalgas transgénicas como aditivo alimenticio, ya que estas líneas se pueden utilizar para adicionar las enzimas a la dieta sin la necesidad de purificar la proteína.

En el estudio realizado por Erpel y colaboradores (2016), mencionado anteriormente, confirmaron que las líneas presentaban actividad enzimática, aproximadamente cinco unidades de fitasa por gramo de biomasa seca, a pH 3,5 y 37 °C, similar a las condiciones fisiológicas y económicamente competitivas para su uso en actividades comerciales. Con los trabajos anteriores, se puede tener una referencia para una futura aplicación biotecnológica de las microalgas y en especial de *C. reinhardtii*. Ya que la biomasa de las mismas puede ser considerada para utilizarse directamente en los piensos de los animales monogástricos sin necesidad de purificar la proteína y sin el riesgo de ser tóxicos para estos animales.

Los resultados obtenidos en este trabajo, son útiles para continuar con la investigación de la producción de la proteína PhyASr en las líneas transplastómicas homoplásmicas de *C. reinhardtii*, a fin de proporcionar líneas que expresen una fitasa de origen bacteriana. Las características fisiológicas originales de esta enzima, le permiten trabajar en las condiciones del rumen de los animales monogástricos, con el propósito de abordar los problemas nutricionales relacionados con la deficiencia de P y la nutrición general de los animales, además de tener un impacto positivo al medio ambiente.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSIONES

1. La transformación por biobalística de *C. reinhardtii* permitió la inserción del gen *phyASr* que codifica a la enzima fitasa de *Selenomonas ruminantium* en el cloroplasto de esta microalga, mismo que confirmó por medio de la técnica del Southern blot en 16 de las 200 colonias obtenidas.
2. La homoplasma se determinó en 10 colonias de una clona previamente confirmada que era transplastómica. Este paso se extendió a cuatro clonas más, de las cuales se tomaron tres colonias de cada una y se demostró que estas líneas también eran homoplásmicas. La homoplasma se alcanzó en el segundo subcultivo, dichas líneas fueron nombradas C1, C2, C3, C4, y C5.
3. Se observó una diferencia significativa en la concentración celular de la línea C3 en comparación con las otras cuatro líneas transplastómicas homoplásmicas y la línea silvestre. Se determinaron que las colonias C2 y C3 muestran un patrón fenotípico diferente a las otras 3 colonias y la línea silvestre.
4. No se observó diferencia significativa en la biomasa seca (cultivo liofilizado) entre las líneas transplastómicas homoplásmicas y la línea silvestre.
5. La expresión del el gen *phyASr* se determinó por medio de RT-PCR, mostrando que las cinco líneas transplastómicas homoplásmicas (C1, C2, C3, C4, y C5) expresaban el gen.
6. Se cuantificó la expresión del gen *phyAsr* en todas las líneas transplastómicas, por medio de una cuantificación absoluta a través de la PCR en tiempo real y se determinó el número de copias del gen. Esta expresión cuantitativa indicó que la línea con mayor número de copias fue la línea C3 seguida de la línea C1. En cambio, la línea C4 fue la que presentó menor cantidad de número de copias.

5.2 PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que las líneas transplastómicas homoplásmicas seleccionadas de *C. reinhardtii* expresan el gen phyASr. Sin embargo, para continuar con la investigación será necesario evaluar acumulación de la proteína PhyASr. De igual manera será interesante evaluar la actividad de la misma y determinar si las cinco líneas transplastómicas presentan una proteína fitasa activa o cuál de ellas presenta una fitasa con mayor activa.

Una vez identificada la línea con mayor actividad de la fitasa, será importante realizar la caracterización cinética de la enzima para determinar las condiciones de temperatura, pH, y concentración de sustrato más adecuadas para que lleve a cabo su actividad. Al comprobarse estas condiciones, la línea o las líneas transplastómicas homoplásmicas, que muestren los mejores resultados, pueden ser utilizadas en pruebas posteriores, in vivo.

Por ejemplo, que las células liofilizadas sean utilizadas como alimentos de animales monogástricos (como pollos, cerdos, peces) y evaluar el cambio que ocurra en ellos. Estos cambios se pueden observar específicamente en crecimiento, ganancia de peso en un tiempo determinado y el contenido de P liberado en las excretas de estos animales, para confirmar la disminución de éste al ambiente y disminuir del impacto negativo.

Con estos estudios se podría demostrar que líneas transplastómicas de *C. reinhardtii* que contienen la fitasa PhyA de *S. ruminantium* y que muestran actividad de la misma, pueden ser consideradas y utilizadas como aditivo alimenticio sin la necesidad del proceso de purificación de la proteína, teniendo un impacto positivo para la alimentación de los animales monogástricos y en la disminución en la contaminación de agua por el P liberado.

BIBLIOGRAFIA

- Angel R. Tamim N. M. Applegate T. J. Dhandu A.S. and Ellested L. E. (2002). Phytic Acid Chemistry: Influence on Phytin-Phosphorus Availability and Phytase Efficacy. Poultry Science Association. Inc.
- Barford David (1995). Protein Phosphatases. Current Opinion in Structural Biology 1995, 5:728-734
- Barnes D., Franklin S., Schultz J., Henry R., Brown E., Coragliotti A. y Mayfield S. P., (2005). Contribution of 5'- and 3'-untranslated regions of plastid mRNAs to the expression of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast genes. Mol Gen Genomics. 274: 625-623.
- Bock R. y Sarwar M.,(2004): Taming plastids for a green future. Review TRENDS in Biotechnology 22:311-318.
- Boynton J. E., Gillman N. W., Harris E. H., Hosler J. P., Johnson A. M., Jones A. R., Randolph-Anderson B. L., Robertson D., Klein T. M., Shark K. B. y Sanford J. C. (1988). Chloroplast Transformation in *Chlamydomonas* with High Velocity Microprojectiles. SCIENCE 240: 1534-1538.
- Bravo F., Wirth S., Segretin M. E. y Morgenfeld M. (2005). Las plantas como fábricas de proteínas terapéuticas. Biotecnología 40-43.
- Bustin Stephen A., Vladimir Benes, Jeremy A. Garson, Jan Hellemans, Jim Huggett, Mikael Kubista, Reinhold Mueller, Tania Nolan, Michael W. Pfaffl, Gregory L. Shipley, Jo Vandesompele, and Carl T. Wittwer. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clinical Chemistry 55:4 611–622.
- Cheng, K.J., L.B. Selinger, L.J. Yanke, H.D. Bae, L. Zhou y L.W. Forsberg (1999). Phytases of ruminal microorganism. US5939303.

- Chu, H.-M., R.-T. Guo, T.-W. Lin, C.-C. Chou, H.-L. Shr, H.-L. Lai, T.-Y. Tang, K.-J.Cheng, B. L. Selinger y A. H. J. Wang (2004). Structures of *Selenomonasruminantium* phytase in complex with persulfated phytate: DSP phytase fold and mechanism for sequential substrate hydrolysis. *Structure* 12(11), 2015-2024.
- Daniell H., Ruiz O. N. y Dhingra A. (2005). Capítulo 8. "Chloroplast Genetic Engineering to Improve Agronomic Traits" en *Transgenic Plants: Methods and Protocols*. 286: 111-137.
- Dellaporta, S., J. Wood y J. Hicks (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1(4), 19-21.
- European Molecular Biology Organization. (2005). Molecular farming for new drugs and vaccines *EMBO reports*. 6 (7):593-599.
- Erpel Fernanda, Franko Restovic y Patricio Arce-Johnson. (2016). Development of phytase-expressing *Chlamydomonas reinhardtii* for monogastric animal nutrition. *BMC Biotechnology*16:29 DOI 10.1186/s12896-016-0258-9
- Fletcher S. P., Muto M. and Mayfield S. P. (2007). Chapter 8: "Optimization of recombinant protein Expression" en *The Chloroplast of Green Algae in Transgenic Microalgae as Green Cell Factories*. Landes bioscience and Springer Science+Business Media.
- Franklin S., Ngo B., Efuet E. Y Mayfield S. P. (2002). Development of a GFP reporter gene for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *The Plant Journal* 30:733-744.
- Franklin S. E. y Mayfield S. P. (2004). Prospects for molecular farming in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 159- 165.
- Franklin S. E. y Mayfield S. P. (2005). Recent developments in the production of human therapeutic proteins in eukaryotic algae. *Expert Opin.Biol Ther.* 5(2): 225-235.

- Gerhard Nolard Lerchundi Monje (2006). Obtención de enzima fitasa a partir de una cepa del hongo *Aspergillus ficuum*, por medio de fermentación en sustrato sólido y sumergido. Valdivia – Chile.
- Goldschmidt-Clermont M., (1998). Capítulo 8 “Chloroplast Transformation and Reverse Genetics” en *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*. Kluwer Academic Publishers. Impreso en The Netherlands pp. 139–149.
- González M y Coroas L. (2002). Expresión de genes recombinantes en células de mamíferos. *Rev. Salud Anim.* 24(1): 1-10.
- Gorman D.S. y Levine R.P.(1965). Cytochrome f and plastocyanin: Their Sequence in the photosynthetic electron Transport Chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 54: 1665-1669.
- Grossman A. R., Harris E. H., Hauser C., Lefebvre P. A., Martinez D., Rokhsar D., Shrager J., Silflow C. D., Stern D., Vallon O. y Zhang Z. (2003). *Chlamydomonas reinhardtii* at the Crossroads of Genomics. *EUKARYOTIC CELL* 2: 1137-1150.
- Guerrero-Olazarán M., Cab-Barrera E. L., Galán-Wong L.J. y Viader-Salvado J.M. (2004). Biotecnología de proteínas recombinantes para la aplicación en acuicultura. *Avances en nutrición Acuícola VII*: 418-440.
- Harris E. H., (2001). *Chlamydomonas* as a model organism. *Plant Mol. Biol.* 52:363- 406.
- Haefner, S., A. Knietsch, E. Scholten, J. Braun, M. Lohscheidt y O. Zelder (2005). Biotechnological production and applications of phytases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 68(5), 588-597.
- Heukeshoven, J. y R. Dernick (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*. 6(3), 103-112.

- Hong, C.-Y., K.-J. Cheng, T.-H. Tseng, C.-S. Wang, L.-F. Liu y S.-M. Yu (2004). Production of two highly active bacterial phytases with broad pH optima in germinated transgenic rice seeds. *Transgenic Research*. 13(1), 29-39.
- Huang, H., R. Zhang, D. Fu, J. Luo, Z. Li, H. Luo, P. Shi, P. Yang, Q. Diao y B. Yao (2011). Diversity, abundance and characterization of ruminal cysteine phytases suggest their important role in phytate degradation. *Environmental Microbiology*. 13(3), 747-757.
- Irihimovitch V. y Yehudai-Resheff S. (1998). Phosphate and sulfur limitation responses in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEMS Microbiol Lett* 283:1–8.
- Kumar S. V., Misquitta R. W., Reddy V. S., Rao B. J. y Rajam M. V. (2003). Genetic transformation of the green alga- *Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* 166: 731-738.
- Kusnadi, A. R., Z. L. Nikolov y J. A. Howard (1997). Production of recombinant proteins in transgenic plants: Practical considerations. *Biotechnology and Bioengineering*. 56(5), 473-484.
- Lei, X.G., Ku, P.K., Miller, E.R., Yokohama, M.T. y Ullrey, D.E. (1994) Calcium level affects the efficacy of supplemental microbial phytase in corn-soybean meal diets of weanling pigs. *J. Anim. Sci.*, 72, 139-143. Sandberg *et al.* 1993
- Lei Xin Gen and Porres Jesús M (2003). Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnology Letters* 25: 1787-1794.
- Li, D., H. Zhu, K. Liu, X. Liu, G. Leggewie, M. Udvardi y D. Wang (2002). Purple Acid Phosphatases of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*. 277(31), 27772-27781.
- Liu, J., Bollinger, D.W., Ledoux, D.R., Eilersieck, M.R. y Veum, T.L. (1997) Soaking increases the efficacy of supplemental microbial phytase in a low-phosphorus corn-soybean meal diet for growing pigs. *J. Anim. Sci.*, 75, 1292-1298

- Manuell A. L., Mayfield S. P. (2006). A bright future for *Chlamydomonas*. *Genome Biology* 7: 327.
- Manuell A. L., Beligni M.V., Elder J. H., Siefker D. T., Tran M., Weber A., McDonald T. L. y Mayfield S.P. (2007). Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas* chloroplast. *Plant Biotechnology Journal*. 5:000-000
- Mayfield S.P., Franklin S. E. y Lerner R. (2002). Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *PNAS*.100:438-442.
- Mayfield S. P. , Manuell A. L., Chen S., Wu J. , Tran M., Siefker D., Muto M. y Marin-Navarro J. (2007). *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. *Current Opinion in Biotechnology*, 18:1-8.
- Moorhead, G. B. G., V. De wever, G. Templeton y D. Kerk (2009). Evolution of protein phosphatases in plants and animals. *Biochemical Journal*. 417(2), 401-409.
- Muto M., Henry R. E., y Mayfield S. P. (2009). Accumulation and processing of a recombinant protein designed as a cleavable fusion to the endogenous Rubisco LSU protein in *Chlamydomonas* chloroplast. *BMC Biotechnology* 9:26.
- Mullaney, E. J. y A. H. J. Ullah (2003). The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 312(1), 179-184.
- Nelson, T.S., Shieh, T.R., Wodzinski, R.J. y Ware, J.H. (1971) Effect of supplemental phytase on the utilization of phytate phosphorus by chicks. *J. Nutr.*, 101, 1289.
- Nickelsen J. (2005). *Cell Biology: The Green Algae Chlamydomonas reinhardtii- A Genetic Model Organism*. *Progress in Botany*.66: 68-89.
- Nickelsen J. y KÜck U. (2000). The Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* as an experimental System to Study Chloroplast RNA Metabolism. *Naturwissenschaften* 87: 97-107.

- Oh B.-C., Choi W.-C., Park S., Kim Y.-O., Oh T.-K. (2004). Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 362–372.
- Puhl, A. A., R. J. Gruninger, R. Greiner, T. W. Janzen, S. C. Mosimann y L. B. Selinger (2007). Kinetic and structural analysis of a bacterial protein tyrosine phosphatase-like myo-inositol polyphosphatase. *Protein Science*. 16(7), 1368-1378.
- Purton S. (2007). “Tools and Techniques for Chloroplast Transformation of *Chlamydomonas*” en *Transgenic Microalgae as Green Cell Factories*. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media. 34-45.
- Pfaffl Michael (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1; 29(9): e45.
- Rochaix J. D. (1995). *Chlamydomonas reinhardtii* as the Photosynthetic Yeast. *Annu Rev. Genet.* 29: 209-230.
- Rosales M.S.; Paz Maldonado L.M.T y Guerra S. R.E. (2012) *Chlamydomonas reinhardtii* as a viable platform for the production of recombinant proteins: current status and perspectives. *Plan Cell Rep* 31:479-494.
- Sambrook J y Rusell D. W. “Molecular cloning a laboratory manual”. 2001. Cold Spring Harbor, New York; Third edition, Vol 1: 1.31-1.34.
- Sun M., Qian Kaixian, Su Ning, Chang Huiyun, Liu Jixing y Chen Guifang. (2003). Foot and mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Biotechnology Letters* 25: 1087-1092.
- Yi, Z. y Kornegay, E.T. (1996) Sites of phytase activity in the gastrointestinal tract of young pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 61, 361-368.
- Yoon, S.-M., S. Kim, K. Li, B. Yoon, S. Choe y M. Kuo (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.

Zongqi Y., Yinu L., Feng C., Dong L., Zhifang Z., Yanxin L., Dexian Z., Yong W. y Guifang S. (2006). Expression of human soluble TRAIL in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Chinese Science Bulletin* 51: 1703-1709.

ANEXOS

A. MEDIOS DE CULTIVO

A.1 Medio TAP (Gorman y Levine, 1965).

Soluciones stock	Para 1 litro
-------------------------	---------------------

1M Tris base	20 ml
--------------	-------

Buffer de Fosfato II	1 ml
----------------------	------

Metales traza de Hutner	1 ml
-------------------------	------

Solución A	10 ml
------------	-------

Ácido acético glacial	1 ml
-----------------------	------

Ajustar el pH a 7.0

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

Solución A	
Componentes	Para 500 ml
NH_4Cl	20 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2.5 g

Solución de metales traza de Hutner	
Componentes	Para 100 ml
H ₃ BO ₃	5.7 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	11g
MnCl ₂ .4H ₂ O	2.53 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	2.495 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.805 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.785 g
Mo ₇ O ₂₄ (NH ₄) ₆ .H ₂ O	0.5 g

A.2 Medio LB

Para preparar medio semisólido, se pesan 40 g de Luria Broth agar (Sigma) por litro de medio semisólido. Se disuelve parte del medio en un poco de agua destilada; una vez disuelto, se afora hasta un volumen deseado. Se esteriliza en autoclave a 121 °C y 15 lb/cm²

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

Para preparar medio líquido se pesan 25 g de Luria Broth (Sigma) por litro de medio líquido. Se disuelve parte del medio en aproximadamente tres cuartos de agua destilada; una vez disuelto, se afora al volumen deseado. Se esteriliza en autoclave a 121 °C y 15 lb/cm² y se dosifica según la cantidad deseada; una vez que el medio llega a una temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) se le agrega el antibiótico ampicilina (a una concentración de 100 mg/L).

A.3 Medio SOC.

Para 100 mL de medio SOC

2.0 g Bacto-tryptone

0.5 g Bacto extracto de levadura

1 mL 1M NaCl,

0.25 mL 1M KCl

1 mL 2 mM Mg²⁺ (esta solución es esterilizada por filtración)

1 mL 2M glucosa (esta solución es esterilizada por filtración)

Añadir Bacto-tryptone, bacto extracto de levadura, NaCl y KCl a 97 mL de agua destilada. Agitar para disolver, esterilizar y enfriar a temperatura ambiente. Añadir 2 M Mg²⁺ de la solución stock y 2 M de glucosa, cada uno hasta una concentración de 20 mM. Llevar a 100 ml con agua estéril. Filtrar el medio completo por una unidad de filtro de 0.2 µm con pH final 7.0.

B. SOLUCIONES UTILIZADAS PARA LOS EXPERIMENTOS DE BIOBALISTICA.

B.1. CaCl₂ 2.5 M Marca Sigma C8106-500 g (Sambrook and Russell, 2001)

Pesar 1.835 g de cloruro de calcio y disolverlo en cinco ml de agua ultra pura. Esterilizar la solución por autoclave. Una vez estéril, hacer alícuotas y guardarlas en tubos eppendorf estériles. Almacenar las alícuotas a 4°C.

B.2. Espermidina 0.1 M Marca Sigma S0266 (Sambrook and Russell, 2001)

Disolver un g de espermidina en un volumen de 69 ml de agua ultra pura. En condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar), esterilizar la solución por filtración utilizando un filtro millipore de 0.22 µm. Hacer alícuotas y guardarlas en tubos eppendorf estériles. Almacenar las alícuotas a -20 °C (Congelador)

B.3. Suspensión de oro de acuerdo a Daniell *et al.* (2005)

Antes de utilizar las partículas de oro (marca Bio-Rad) para la transformación por Biobalística, éstas requieren un tratamiento previo para ser recubiertas por el plásmido, el cual se describe a continuación:

- 1.- Pesar 50 mg de partículas de oro (0.6 μm) dentro de un tubo eppendorf de 1.5 mL.
- 2.- Adicionar un mL de Etanol al 100 % (v/v) (Grado Biología Molecular) y vortexear por tres minutos.
- 3.- Centrifugar la pastilla de partículas de oro por cinco minutos a 13,500 rpm y descartar el sobrenadante.
- 4.- Adicionar un ml de etanol al 70 % (v/v) y vortexear la mezcla por dos minutos
- 5.- Incubar por 15 min. Mezclar el contenido del tubo tres veces durante el período de incubación
- 6.- Centrifugar el tubo a velocidad máxima de 13500 rpm durante tres minutos. Descartar el sobrenadante.
- 7.- Adicionar un ml de agua destilada a la mezcla y vortexear por dos minutos o hasta que las partículas se resuspendan completamente.
- 8.- Esperar que las partículas precipiten por un minuto. Centrifugar por dos minutos. Descartar el sobrenadante
- 9.- Repetir el paso 8 y 9 por cinco veces
- 10.- Resuspender en 833 μl de glicerol al 50 % (v/v) a una concentración final de 60 mg/mL
- 11.- Hacer alícuotas de 50 μL de la suspensión de oro y almacenar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

C. Método de extracción de AND de Ilustra TM Plant DNA Extraction Kit Nucleon Resin (modificado para la extracción de ADN de *C. reinhardtii*) Protocolo 1 (Product No SL8510)

Se colectan aproximadamente 5×10^7 células de *C. reinhardtii*, a los siete días de cultivo y se congelan con nitrógeno líquido.

Lisis celular

1. Se añaden 600 μL del reactivo 1, asegurarse que todos los ingredientes del reactivo estén completamente disueltos. Mezclar muy bien.
2. En este paso se puede añadir 10 μL del betamercaptoetanol.
3. Añadir 200 μL del reactivo 2
4. Invertir varias veces hasta obtener una mezcla homogénea
5. Incubar la mezcla a 65 °C en un baño maría por 10 minutos. Alternativamente, agitar manualmente durante la incubación.
6. una vez terminada la incubación, poner la muestra en hielo por 20 minutos.

Desproteización

1. Remover la muestra del hielo y añadir 500 μL del cloroformo (previamente enfriado a 2-8 °C)
2. Añadir 100 μL de la PhytoPure Resin (asegurarse que la resina esté completamente resuspendida antes de usarse).
3. Homogenizar a temperatura ambiente sobre un agitador inclinado por 10 minutos. Alternativamente, agitar manualmente durante el periodo.
4. Centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos.
- 5.- Sin tocar la capa de la resina, transferir, usando una pipeta, la fase superior que contiene el ADN por encima de la resina PhytoPure (esta es de color café). Colocar en un tubo fresco.

Precipitación del ADN

1. Añadir un volumen equivalente, aproximadamente de 600-800 μL de isopropanol frío.
- 2.- invertir gentilmente el tubo hasta que el ADN precipita.

Lavado del ADN

1. Centrifugar a 14000 rpm por cinco minutos para formar la pastilla de ADN
2. Lavar la pastilla de ADN con un mL de etanol al 70% (v/v).
3. Centrifugar a 14000 rpm por cinco minutos.

4. Descartar el sobrenadante.
5. Secar a temperatura ambiente la pastilla de ADN por 10 minutos (en campana de flujo laminar). No excederse de este tiempo porque se podría tener dificultad para resuspender la pastilla.
6. Con cuidado remover las gotas de etanol del tubo y resuspender en 40 μ L de H₂Oup

D. Protocolo modificado de Dellaporta y colaboradores (1983) para la extracción del ADN.

La extracción de ADN se llevó a cabo, como se describe a continuación.

En un tubo Falcon se colectó un volumen de 20 a 30 mL de un cultivo de *C. reinhardtii* de siete días (al final de la fase logarítmica, aproximadamente 40 millones de células), y se centrifugaron a 3220 g en una centrífuga eppendorf modelo 5810R durante cinco minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante dejando una cantidad mínima de medio de cultivo para resuspender la pastilla obtenida. Se transfirió el cultivo resuspendido a un tubo de microcentrífuga "eppendorf" estéril de 1.5 mL de capacidad y se centrifugó nuevamente a 3,000 rpm durante cinco minutos en una microcentrífuga marca Eppendorf modelo 5424. Se preparó la mezcla de extracción: 650 μ L de Buffer TEN + 0.014 vol. de β -mercaptoetanol (precalentado a 65°C) por cada muestra y cada una se agitó en un vórtex (marca Daigger Genie 2) para mezclar y posteriormente incubar a 65°C por 10 minutos. En la campana de extracción, se agregó la mezcla de Buffer TEN+ β -mercaptoetanol a cada muestra y se agitó vigorosamente con ayuda de un micropistilo durante 4 minutos. A cada muestra se le añadieron 43 μ L de SDS al 20%, se agitaron en un vórtex y se incubaron a 65 °C durante 25 minutos, con agitaciones periódicas (vórtex a velocidad # 9) cada dos-tres minutos durante la incubación. Posteriormente se adicionaron 700 μ l de CHCH3: AIA (mezcla 24:1 de cloroformo: alcohol isoamílico) a cada muestra y se agitó en el vórtex. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante cinco minutos, se recuperó el sobrenadante y fue transferido a un tubo "eppendorf" de 1.5 mL. Para repetir la extracción, a cada muestra se le añadió un volumen de CHCH3: AIA igual al del sobrenadante y se mezcló por agitación en vórtex. A continuación se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm durante cinco minutos, se recuperó el sobrenadante y fue transferido a un nuevo tubo "eppendorf" de 1.5 mL. Esta extracción se repitió hasta tres veces, con el fin de conseguir el sobrenadante de un color lo más claro posible. Para precipitar los ácidos nucleicos del sobrenadante, a cada

muestra se le adicionó un volumen de isopropanol (100%) igual al del sobrenadante, se mezcló gentilmente por inversión del tubo durante 3 minutos, y se centrifugó a 13,500 rpm durante 5 minutos. La pastilla obtenida fue lavada dos veces con 800 μ L de etanol frío al 70 %, centrifugando a 13,500 rpm durante 5 minutos, y desechando el sobrenadante. La pastilla se secó a temperatura ambiente durante 10 minutos, y posteriormente se resuspendió en 40 μ L de Buffer TE (pH 8.0), incubando a 65 °C por 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo de microcentrífuga “eppendorf” nuevo. Posteriormente se agregó 1 μ L de ARNasa (1 mg/mL) y se incubó a 37° C por media hora. Las muestras se almacenaron a 4°C.

La concentración de ADN se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm (A) en un espectrofotómetro (SmartSpec™Plus, Bio-Rad), se realizó una dilución 1:20 tomando 5 μ L de ADN en 95 μ L de agua ultrapura, posteriormente la integridad del ADN se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% en buffer TAE y bromuro de etidio (10 μ g/ μ L) y se visualizó en un transluminador de luz UV.

E. Southern blot

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

Digestión con la enzima Sall y NcoI

La extracción de ADN se llevó a cabo como se describe en el anexo c, tanto de las líneas transgénicas como de la silvestre. La enzima de restricción con la que se digirió el ADN fue Sall y NcoI. Se digirieron 15 μ g de ADN empleando 1U de enzima por cada 3 μ g de ADN en un volumen de 30 μ L con el buffer adecuado para la enzima, para el control positivo se usó el plásmido pChPhy (5ng/ μ L) linearizado con Sall. Las digestiones se llevaron a cabo a 37 ° durante aproximadamente 16 horas. Para visualizar el producto de la digestión, se corrió una electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% (p/v) a un voltaje de 85 durante 90 minutos.

Tras la electroforesis, se introdujo el gel de agarosa en una solución de depurinación (1.1% HCl) durante 10 minutos, a continuación se trató en una solución de desnaturalización (1.5 M NaCl; 0.5 M NaOH) por 30 minutos y después en una solución de neutralización (1.5 M

NaCl; 0.5 M Trizma base) por 30 minutos. La transferencia del ADN a la membrana de nailon (Roche) se realizó con citrato de tri-sodio 0.3M y 3 M NaCl (20x SSC) toda la noche. A continuación se lavó la membrana con 2x SSC y el ADN se fijó a esta adicionándola de carga positiva con ayuda de luz ultravioleta en un equipo CL-1000 crosslinker (UVP).

Pre-hibridación e hibridación.

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

Detección por quimioluminiscencia

Tras la hibridación se sacó la membrana de la botella y se colocó en una cubeta de tamaño similar a la membrana. La membrana se sometió a los siguientes lavados de post-hibridación: dos lavados de cinco minutos en solución lavado de baja astringencia (2x SSC + SDS al 0,1%) a temperatura ambiente, y dos lavados de 15 min en la solución de lavado de alta astringencia a 68 °C (0.1 X SSC, 0.1% SDS). A continuación se sumergió la membrana en solución de lavado (0.1 M ácido maleico + 0.15 M NaCl pH 7.5; 0.3% Tween 20) durante cinco minutos para equilibrarla. Posteriormente se sumergió la membrana en la solución de bloqueo (dilución 10x solución de bloqueo 1:10 con la solución de ácido maleico) durante 30 min, bloqueándose así los sitios inespecíficos de unión al anticuerpo. Después se preparó una solución del anticuerpo (anti-Digoxigenina-AP) (Roche) a una dilución 1:10 en la solución de bloqueo y se sumergió la membrana durante 30 min con agitación suave.

La eliminación del anticuerpo no unido al ADN se realizó mediante dos lavados en buffer de lavado durante 15 min. A continuación, se sumergió la membrana en solución de detección (0.1 M Tris-HCl; 0.1 M NaCl, pH 9.5) durante cinco minutos. Se preparó una solución del sustrato CDP-star (Roche) en la solución de detección diluyendo 1:100 y se puso en contacto con la membrana durante cinco minutos. Finalmente se eliminó el exceso de solución y selló la membrana en una bolsa de plástico y se colocó en un casete con una película sensible a la luz visible, por diferentes tiempos y se reveló la película empleando el revelador (RP X-OMAT) y el fijador (RP X-OMAT).

F. Protocolo modificado basado en el reactivo del TRIZOL para la extracción de ARN, empleando una centrífuga sin refrigeración con el tratamiento de ADNasa incluido en la extracción.

1. Homogenización

A cada muestra con aproximadamente 5×10^7 células de *C. reinhardtii* congeladas en nitrógeno líquido se le adicionaron 1000 μ L del reactivo de TRIZOL y se mezclaron por pipeteo seguido de una agitación con vortex (velocidad #10) durante 15 segundos. Posteriormente se centrifugaron a 10,700 rpm durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo (evitando tomar el pellet formado en el fondo del tubo).

2. Fase de Separación

Las muestras se incubaron durante cinco minutos a 20 °C. Transcurrido ese tiempo a cada muestra se le adicionaron 200 μ L de la mezcla cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) (CHCH3: AIA), con posterior agitación con vortex (velocidad #10) durante 15 segundos y se incubaron a 20 °C durante tres minutos. Después se centrifugaron a 10,700 rpm durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo.

3. Precipitación del ARN

Al sobrenadante recuperado de cada muestra se le adicionó un volumen igual de isopropanol (100%) y 0.1 volumen de 3 M de NaAc pH 7.0, y se agitó gentilmente por inversión durante 20 segundos. Posteriormente las muestras se incubaron a 20 °C durante 10 minutos con posterior precipitación del ARN por centrifugación a 10,700 rpm durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y se conservó la pastilla.

4. Lavado del ARN

La pastilla de cada muestra se lavó adicionando 1000 μ L de etanol al 70% (v/v), con posterior centrifugación a 8,400 rpm durante cinco minutos y desechando sobrenadante.

5. Digestión con ADNasa

La pastilla de ARN se secó en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos. Una vez seca la pastilla se resuspendió en 39 μ L de

agua ultra pura y se le adicionaron 5 μL de buffer de DNAsa, 1 μL de RNAsa out y 5 μL de DNAsa (1 U/ μL) y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos.

6. Fase de separación

A cada muestra se le adicionaron 700 μL de SSTE plus y 700 μL de la mezcla cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) (CHCH3: AIA), con posterior agitación con vortex durante 15 segundos, y después se centrifugaron a 10,700rpm durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo.

7. Precipitación del ARN

Al sobrenadante recuperado de cada muestra se le adicionó un volumen igual de isopropanol (100 %) y 0.1 volumen de 3 M de NaAc pH 7.0, y se agitó gentilmente por inversión durante 20 segundos y se incubó a 20°C durante 10 minutos con posterior precipitación del ARN por centrifugación a 10,700 rpm durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y se conservó la pastilla.

8. Lavado del ARN

La pastilla de cada muestra se lavó adicionando 1000 μL de etanol al 70 %, con posterior centrifugación a 8,400 rpm durante 5 minutos y desechando sobrenadante.

9. Resuspensión del ARN

La pastilla de ARN se secó en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos. Una vez seca la pastilla se resuspendió en 40 μL de agua ultra pura. La integridad y pureza del ARN se evaluó por electroforesis en un gel de agarosa-TAE1X al 1.2 %.

10. Cuantificación del ARN

La concentración de ARN se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm (A) en un espectrofotómetro (SmartSpec™Plus, Bio-Rad). Una absorbancia de una unidad a 260 nm corresponde a 40 μg de ARN por mL, ($A_{260} = 1$ es igual a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Esta relación es válida cuando el ARN está eluído en agua. Es decir, si el volumen de ARN es 40 μL y la dilución es 5 μL de ARN en 95 μL de agua ultra pura (dilución 1:20), y la absorbancia de la muestra diluida es de 1.23, la concentración de ARN es: $40 \times A_{260} \times \text{Factor de dilución} = 40 \times 1.23$

$x 20=984 \mu\text{g}/\text{mL} =0.984 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Es decir, en 40 μL de muestra hay 39.36 μg de ARN (Sambrook y Rusell, 2001).

G. Multiplicación y purificación del ADN plasmídico.

La extracción y purificación del ADN plasmídico de rutina se llevó a cabo mediante el protocolo de lisis alcalina descrito en Sambrook y Russell (2000), con algunas modificaciones como se describe a continuación.

Se tomaron cultivos bacterianos inoculados con una colonia cada uno e incubados por 16 h en agitación en medio LB líquido con ampicilina. Se sedimentó cada muestra (dos mL de cultivo) en un tubo de microcentrifuga tipo “eppendorf” centrifugando a 13500 rpm-14000 rpm por un minuto, y se removió el sobrenadante con una micropipeta. La pastilla fue resuspendida en 500 μL de STE frío usando una micropipeta, se centrifugó a 13500rpm-14000rpm por un minuto, y se removió el sobrenadante. Posteriormente se resuspendió la pastilla en 100 μL de la solución I, se añadieron 200 μL de la solución II, se mezcló por completo invirtiendo el tubo gentilmente y se realizó una incubación a temperatura ambiente por tres minutos. A continuación se añadieron 150 μL de la solución III fría, se mezcló por completo invirtiendo el tubo gentilmente y se incubó en hielo por cinco minutos. Después se centrifugó a 13500 rpm-14000 rpm por cinco minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL de capacidad. Se le añadieron 900 μL de etanol absoluto frío y 0.1 vol. de NaAc (acetato de sodio 3 M pH 7.0), se mezcló gentilmente invirtiendo el tubo varias veces y se centrifugó a 13500 rpm-14000 rpm por cinco minutos. Posteriormente se removió el sobrenadante y se agregaron 600 μL de una solución de SSTE y se incubó a 70° C por 10 minutos. Después de la incubación se agregaron 600 μL de CHCH3:AIA 24:1, se mezcló invirtiendo el tubo varias veces, se agitó en un vórtex y se centrifugó a 13500 rpm- 14000 rpm por cinco minutos. Se tomó el sobrenadante evitando la interfase y se transfirió a un tubo nuevo. Se realizó la precipitación del ADN plasmídico agregando 2 vol. de etanol absoluto frío y 0.1 vol. de NaAc y se incubó a temperatura ambiente por cinco minutos. A continuación se centrifugó a 14000 rpm- 13500 rpm por cinco minutos, y se removió el sobrenadante. Posteriormente se lavó la pastilla con un mL de etanol al 70% (v/v) y centrifugación a 13500 rpm-14000 rpm por un minuto. Se removió el sobrenadante y se secó la pastilla al aire a temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos. A continuación se resuspendió la pastilla en 35 μL de H₂O ultrapura y se incubó a 65° C por cinco minutos. Posteriormente se agregó un μL de ARNasa A (1 mg/mL) y se

incubó a 37° C por media hora. Las muestras se almacenaron a 4°C para su uso inmediato ó a -20° C para su uso posterior.

La extracción y purificación del ADN plasmídico usado para la transformación de *C. reinhardtii* por biobalística, se llevó a cabo utilizando el estuche comercial “High Pure Plasmid Isolation Kit” (Roche Applied Science) siguiendo las instrucciones del proveedor.

H. Soluciones utilizadas en la extracción y purificación del plásmido por Lisis Alcalina (Sambrook y Russell, 2001).

STE

10 mM Tris HCl (pH 8.0)

0.1 M de NaCl

1 mM de EDTA (pH 8.0)

Asegúrese que el pH del STE es 8.0 después de añadir todos los ingredientes.

Solución I

50 mM Glucosa

25 mM tris-HCl (pH 8.0)

10mM EDTA (pH 8.0)

Preparar la solución de Stock estándar en lotes de ~100 ml y esterilizar por 15 minutos a 1.05 Kg/cm² y guardar a 4°C.

Solución II

0.2 N NaOH (diluir de un stock de 10 N)

1% (w/v) de SDS

Preparar la solución II en fresco y condiciones asépticas y usarla a temperatura ambiente.

Solución III

5 M de acetato de potasio 60.0 mL

Ácido acético glacial 11.5 mL

H₂O up 28.5 mL

La solución resultante es 3M con respecto a potasio y 5 M con respecto al acetato. Guardar la solución a 4°C y transferirlo a hielo justo antes de usar.

SSTE

0.1 M NaCl

10 mM pH 8.0 Tris-HCl

EDTA 1 mM pH 8.0

0.5 % de SDS

Agua destilada

Asegurarse que el pH de la solución es 8.0 después de que todos los ingredientes son añadidos. Esta solución no se necesita esterilizar antes de usar.

Cloroformo:AIA 24:1

48 ml de cloroformo

2 ml alcohol isoamílico (AIA)

En campana de extracción se toman 48 ml de cloroformo y se le añaden dos ml de alcohol isoamílico para obtener una solución con 50 ml de volumen final.

Etanol al 70% (v/v)

Para preparar 100 ml de una solución de etanol (grado biología molecular) al 70% (v/v), se toman 70 ml etanol y se añaden 30 ml de H₂O ultrapura, se mezcla y se guarda a temperatura ambiente.