CICY

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS A FOSFATASAS ÁCIDAS PÚRPURA EN *Chlamydomonas reinhardtii* Y GENERACIÓN DE UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE PARA LA EXPRESIÓN DE UNA FITASA EN EL CLOROPLASTO DE ESTA MICROALGA

Tesis que presenta

RODRIGO ARTURO RIVERA SOLÍS

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México, Diciembre 2013

CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE YUCATAN, A.C.
CICY

RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "Caracterización molecular de secuencias homólogas a fosfatasas ácidas púrpura en *Chlamydomonas reinhardtii* y generación de un plásmido recombinante para la expresión de una fitasa en el cloroplasto de esta microalga", fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia y el Dr. Santy Peraza Echeverría, dentro de la Opción Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota

Coordinador de Docencia

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

Mérida, Yucatán, México, Diciembre de 2013

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca No. 213511 otorgada para los estudios de doctorado, así como al financiamiento del proyecto de ciencia básica No. 60465 otorgado para la realización de este proyecto.

A mis asesores de tesis, la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia y el Dr. Santy Peraza Echeverria, por el apoyo tanto académico como personal que me brindaron durante el transcurso del doctorado, sus consejos, comentarios y sugerencias siempre fueron de gran ayuda.

A mi comité tutorial: Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, Dr. Santy Peraza Echeverria, Dra. Ileana Echevarria Machado y Dr. Ángel G. Alpuche Solís, por el apoyo, sus valiosos comentarios y aportes brindados durante el desarrollo de este trabajo de tesis.

A mi comité revisor: Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, Dr. Santy Peraza Echeverria, Dra. Ileana Echevarría Machado, Dr. Ángel Alpuche Solís, Dr. Jorge Santamaría Fernández, Dra. Luisa López Ochoa, Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell, por su apoyo en 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, A. C. (CICY) por las instalaciones brindadas para el desarrollo de esta tesis.

Al Posgrado en Ciencias Biólogicas del CICY, así como a todo el personal por las facilidades brindadas para realización de esta tesis de doctorado.

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

A mis compañeros y amigos del laboratorio "Biotecnología de Microalgas y Cultivos Tropicales": Melissa, Patricia, Maru, Anny, Miguel Ángel, Merly, Ángeles, Ernesto, Alejandra, Roberto, Laura e Ileana por todos los momentos compartidos, así como por el apoyo moral, personal y académico que me han brindado durante estos años.

DEDICATORIAS

A mi esposa Shirley que es la luz que ilumina mi sendero y que sin su apoyo este logro hubiera sido sumamente complicado.

A mi hijo Diego Arturo que es parte vital de mi ser.

A mis padres Lourdes Solís y Gerardo Rivera por enseñarme que la perseverancia y tenacidad dan grandes satisfacciones y quienes con su ejemplo formaron el hombre que hoy soy.

A mi hermano Gustavo, que ha estado en las buenas y en las malas.

A mi suegra Marlene Cabrera y mis cuñados Sheila y Shubert que también me han brindado su apoyo en los momentos más complicados.

A mi familia

ÍNDICE

ÍNDICE i

Listado de abreviaturas vii

Índice de Figuras x

Índice de Cuadros xiii

RESUMEN 1

ABSTRACT 3

INTRODUCCIÓN 5

CAPÍTULO I 9

1. ANTECEDENTES 9

1.1 *Chlamydomonas reinhardtii* 9

1.1.1 Morfología 9

1.1.2 Fisiología 10

1.1.3 Utilidad de *C. reinhardtii* como modelo de estudio 11

1.2 ENZIMAS FOSFATASAS 12

1.2.1 Enzimas fitasas 13

1.2.2 Clasificación de las fitasas 14

1.2.3 Aplicación industrial de las fitasas 15

1.2.4 Fitasas recombinantes 17

1.2.5 Fitasa de *Selenomonas ruminantium* 18

1.3 PROTEÍNAS RECOMBINANTES 19

1.4 BIORREACTORES PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES 22

1.5 PLANTAS COMO BIORREACTORES PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES 22
1.6 PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN PLÁSTIDOS 25
1.7 MICROALGAS COMO BIORREACTORES PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES 26
1.8 *C. reinhardtii* COMO BIORREACTOR PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES 27
1.8.1 Expresión de proteínas recombinantes en el núcleo de *C. reinhardtii*. 27
1.8.2 Expresión de proteínas recombinantes en el cloroplasto de *C. reinhardtii* 28
1.9 JUSTIFICACIÓN 31
1.10 HIPÓTESIS 32
1.11 OBJETIVOS 32
1.11.1 OBJETIVO GENERAL 32
1.11.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 32
1.13 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 34

CAPÍTULO II 45

2. CARACTERIZACIÓN *in silico* DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS A FOSFATASAS ÁCIDAS PÚRPURA (PAP) EN EL GENOMA DE *C. reinhardtii* 45

2.1 INTRODUCCIÓN 45
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS. 47
2.2.1 Análisis *in silico* de genes tipo PAP en el genoma de *C. reinhardtii* 47
2.2.2 Alineamiento múltiple de secuencias 48
2.2.3 Análisis filogenético 48
2.2.4 Predicción de péptido señal 49
2.2.5 Predicción de elementos de respuesta *cis* en los promotores de las secuencias *CrPAP* 49
2.3 RESULTADOS 50

2.3.1 Identificación de secuencias homólogas a fosfatasas ácidas púrpuras (PAP) en el genoma de *C. reinhardtii* 50

2.3.2 Relación filogenética de las CrPAP de *C. reinhardtii.* 56

2.3.3 Predicción de péptidos señal. 56

2.3.4 Predicción de dominios característicos de las PAP 56

2.3.5 Análisis de los promotores de los genes *CrPAP* 59

2.4 DISCUSIÓN 61

2.5 CONCLUSIONES 64

2.6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 65

CAPÍTULO III 73

3. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL IP_6 COMO FUENTE DE P EN LOS PARÁMETROS DEL CULTIVO Y PERFIL DE PROTEÍNAS DE *C. reinhardtii*, ASÍ COMO EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *CrPAP*1-6 DE ESTA MICROALGA. 73

3.1 INTRODUCCIÓN 73

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS 74

3.2.1 Diseño de oligonucleótidos 74

3.2.2 Extracción de ADN genómico 75

3.2.3 Cepa y condiciones de cultivo 76

3.2.4 Tratamientos de cultivo para *C. reinhardtii* en presencia de IP_6 77

3.2.5 Determinación de la concentración celular 79

3.2.6 Extracción y cuantificación de proteínas 81

3.2.7 SDS-PAGE 81

3.2.8 Extracción de ARN 81

3.2.10 Síntesis de ADNc 83

3.2.11 Análisis de expresión 84

3.3 RESULTADOS 84

3.3.1 Concentración celular de *C. reinhardtii* en respuesta a la presencia de IP_6 en el medio de cultivo 84

3.3.2 Perfil electroforético de proteinas de *C. reinhardtii* en respuesta a la presencia de IP_6 en el medio de cultivo 86

3.3.3 Extracción de ARN y síntesis de ADNc 88

3.3.4 Análisis de expresión de los genes *CrPAP1-6* de *C. reinhardtii* en respuesta a la presencia de IP_6 en el medio de cultivo 89

3.4 DISCUSION 91

3.5 CONCLUSIONES 94

3.6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 96

Capítulo IV 101

4. CONSTRUCCIÓN DE UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE CON EL GEN *phyA* DE *Selenomonas ruminantium* PARA LA TRANSFORMACIÓN DEL CLOROPLASTO DE *C. reinhardtii* 101

4.1 INTRODUCCIÓN 101

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS 103

4.2.1 Estrategia experimental 103

4.2.2 Aislamiento *in silico* de las secuencias del promotor más el 5'UTR del gen *atpA*, 3'UTR del gen *psbA* de *C. reinhardtii* y región codificante del gen *phyASr* de *S. ruminantium* 103

4.2.3 Ensamblaje *in silico* y síntesis de la construcción *atpA/phyASr/psbA* (cphySr) 104

4.2.4 Clonación de la construcción cphySr con los sitios de restricción *Sal*I Y *Asc*I 105

4.2.5 Aislamiento *in silico* de las secuencias promotor más 5'UTR (P+5'UTR) y 3'UTR del gen *rbcL* de *C. reinhardtii* y región codificante del gen *aadA* de *E. coli* 105

4.2.6 Ensamblaje *in silico* y síntesis de la construcción *rbcL/aadA/rbcL* (aadA) 106

4.2.7 Clonación de la región de recombinación homóloga 2 (RRH2) en el vector

pGEM-T-easy 106
4.2.8 Obtención del plásmido de transformación pChPhy 107
4.2.8.1 Transformación de células competentes 107
4.2.8.2 Purificación de fragmentos empleados en la clonación 107
4.2.8.3 Ligación de fragmentos 107
4.2.8.4 Purificación de plásmido 108
4.2.8.5 Clonación de la región de recombinación homóloga 2 (RRH2) en el vector pUC18 108
4.2.8.6 Clonación de la región de recombinación homóloga 1 (RRH1) en el vector pRH2 108
4.2.8.7 Clonación de la construcción de expresión *aadA* en el vector pRH12 109
4.2.8.8 Clonación de la construcción de expresión cphySr en el vector pRH12a ... 110
4.3 RESULTADOS 111
4.3.1 Ensamblaje *in silico* y síntesis de la construcción *atpA/phyASr/psbA* (cphySr) 111
4.3.1.1 Ensamblaje de la construcción de expresión *cphySr* 111
4.3.1.2 Síntesis de la construcción *cphySr* 112
4.3.1.3 Clonación de la construcción cphySr con los sitios de restricción *SalI* y *AscI* 115
4.3.2 Ensamblaje *in silico* y síntesis de la construcción *rbcL/aadA/rbcL* (aadA) 118
4.3.2.1 Ensamblaje *in silico* de la construcción *rbcL/aadA/rbcL* (aadA) 118
4.3.2.2 Síntesis de la construcción *rbcL/aadA/rbcL* (aadA) 119
4.3.3 Clonación de la región de recombinación homóloga 2 (RRH2) en el vector pGEM-T-easy 121
4.3.4 Obtención del plásmido de transformación pchPhy 124
4.4 DISCUSIÓN 132
4.5 CONCLUSIONES 134
4.6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 135

CAPÍTULO V **139**

5.1 DISCUSIÓN GENERAL 139
5.2 CONCLUSIONES GENERALES 150
5.3 PERSPECTIVAS 152
5.4 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 154

Anexo 1 ..... **161**

Anexo 2 ..... **171**

Anexo 3 ..... **173**

Anexo 4 ..... **175**

Anexo 5 ..... **177**

Anexo 6 ..... **179**

LISTADO DE ABREVIATURAS

Pi	Fósforo inorgánico
P	Fósforo
HAP	Fosfatasas ácidas de histidina
BPP	Fitasas β-propela
PTP	Proteínas fosfatasas de tirosina
PAP	Fosfatasas ácidas púrpura
IP_6	Fitato
PR	Proteínas recombinantes
CO_2	Dióxido de carbono
GRAS	Generally regarded as safe
PPP	Fosfoproteinas fosfatasas
PPM	Fosfoproteínas metalodependientes
NCBI	National Center for Biotechnology Information
pI	Punto isoeléctrico
PST	Proteína soluble total
MMD	Miles de millones de doláres
ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
P+5'UTR	Promotor más la región 5' no traducible
3'UTR	Región 3' no traducible
ATP	Adenosin trifosfato
CDD	Conserved domain database

NJ	Neighbor joining
MEGA	Molecular Evolutionary Genetic Analysis
JGI	Joint Genome Institute
PLACE	Plant Cis Acting Regulatory DNA Elements
ORF	Marco de lectura abierto
Cys	Cisteína
Atphy	Fitasa de *Arabidopsis thaliana*
Gmphy	Fitasa de *Glycine max*
Mtphy	Fitasa de *Medicago truncatula*
Ntphy	Fitasa de *Nicotiana tabacum*
aa	Aminoácidos
Metallophos	Dominio metalofosfoesterasa
FN3	Fibronectina tipo 3
AS	Acido salicílico
NaCl	Cloruro de sodio
ADNg	ADN genómico
ADNc	ADN complementario
nt	Nucleótido
pb	Pares de base
$CHCl_3$: AIA	Cloroformo: alcohol isoamilico
TAP	Tris-acetato-fosfato
TA	Tris-acetato-sin sales de fósforo
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
KH_2PO_4	Fosfato de potasio monobásico

K_2HPO_4	Fosfato de potasio dibásico
BPII	Amortiguador de fosfatos II
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
BSA	Albumina sérica bovina
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
$AgNO_3$	Nitrato de plata
Na_2CO_3	Carbonato de sodio
H_2O UP	Agua ultrapura
PEI	Perfil electroforético intracelular
PEE	Perfil electroforético extracelular
ND	No determinado
PSR	Phosphate starvation response
CUGI	Clemson University Genomics Institute
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RRH1	Región de recombinación homóloga 1
RRH2	Región de recombinación homóloga 2

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1.1 Morfología de *C. reinhardtii* 9

Figura 1.2 Modelos moleculares generados por computadora del sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (www.ncbi.nlm.-nih.gov) de las cuatro clases representativas de fosfatasas. 15

Figura 1.3 Ventas totales en el mercado de medicamentos biológicos en Estados Unidos. 20

Figura 1.4 Niveles de venta de medicamentos de origen biológico en los Estados Unidos. 20

Figura 1.5 Estrategia experimental..... 33

CAPÍTULO II

Figura 2.1 Alineamiento de las secuencias CrPAP. 55

Figura 2.2 Árbol filogenético de las secuencias CrPAP..... 57

Figura 2.3 Representación gráfica de las proteínas CrPAP..... 58

CAPÍTULO III

Figura 3.1 Estrategia experimental para la evaluación del efecto del IP_6 como fuente de P. 78

Figura 3.2 División de la celda de la cámara de Neubauer..... 80

Figura 3.3 Efecto del IP_6 sobre el cultivo de *C. reinhardtii*. 85

Figura 3.4 Perfil de proteínas de cultivos de *C. reinhardtii* después de siete días de cultivo en los tratamientos TAP, TAP+IP_6, TA+IP_6. 87

Figura 3.5 Calidad del ARN extraído a partir de de células de *C. reinhardtii* con el kit RNA spin Mini de GE 88

Figura 3.6 Análisis de la expresión de los genes *CrPAP1-6* de *C. reinhardtii* después de siete días de cultivo en los tratamientos TAP, TAP+IP_6, TA+IP_6. 90

CAPÍTULO IV

Figura 4.1 Estrategia experimental para la construcción del vector que contiene el gen *phyA* de *Selenomonas ruminantium* (pChPhy)..... 103

Figura 4.2 Esquema general de la construcción de expresión cphySr. 111

Figura 4.3 Secuencia de la construcción de expresión cphySr ensamblada *in silico*..... 112

Figura 4.4 Alineamiento de la secuencia sintetizada y optimizada con el uso de codón de *C. reinhardtii* por GENEART.. 114

Figura 4.5 Amplificación por PCR de cphySr (~2.0 Kb).. 115

Figura 4.6 Verificación de la clonación de cphySr (~2.0 Kb) en pGEM-T-easy (~3.0 Kb).. 116

Figura 4.7 Alineamiento de la secuencia de la clona 10 de cphySr.. 118

Figura 4.8 Esquema general de la construcción de expresión aadA. 118

Figura 4.9 Secuencia de la construcción de expresión aadA ensamblada *in silico*..... 119

Figura 4.10 Alineamiento de la construcción de expresión aadA..... 120

Figura 4.11 Amplificación por PCR de la RRH2 (~2.0 Kb)..... 121

Figura 4.12 Digestión *EcoR*I para verificar la clonación de RRH2 (~2.0 Kb) en pGEM-T-easy (~3.0 Kb). 122

Figura 4.13 Alineamiento de la secuencia RRH2. 124

Figura 4.14 Relación Vector:Inserto (pUC18:RRH2). 124

Figura 4.15 Verificación de la clonación de RRH2 (2.0 Kb) en pUC18 (2.7 Kb)..... 125

Figura 4.16 Diagrama del vector pRH2. 125

Figura 4.17 Bandas purificadas de vector e inserto..... 126

Figura 4.18 Verificación de la integridad de vector pRH12.. 126

Figura 4.19 Diagrama del vector pRH12. 127

Figura 4.20 Relación vector inserto (pRH12:aadA).. 127

Figura 4.21 Verificación de la integridad del vector pRH12A..... 128

Figura 4.22 Diagrama del vector pRH12A..... 128

Figura 4.23 Relación Vector:Inserto (pRH12A:cphySr).. 129

Figura 4.24 Verificación de la clonación de cphySr (~2.0 Kb) en pRH12A (~9.6Kb)..... 130

Figura 4.25 Diagrama del vector pChPhy..... 130

Figura 4.26 Verificación de la integridad del plásmido pChPhy. 131

ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO I

Cuadro 1.1 Fitasas disponibles comercialmente. 16

Cuadro 1.2 Algunas fitasas recombinantes producidas en diversos sistemas de biorreactores. 17

Cuadro 1.3 Parámetros cinéticos de la fitasa de *S. ruminantium*. 18

Cuadro 1.4 Ganancias estimadas por año de la venta global de enzimas industriales. ... 21

Cuadro 1.5 Comparación de los sistemas de producción de PR disponibles actualmente 23

Cuadro 1.6 Algunas proteínas recombinantes producidas a nivel nuclear en plantas superiores. 24

Cuadro 1.7 Algunas proteínas recombinantes producidas en el cloroplasto de plantas superiores. 26

Cuadro 1.8 Proteínas recombinantes y los rendimientos proteicos obtenidos en el núcleo de *Chlamydomonas reinhardtii*. 28

Cuadro 1.9 Acumulación relativa del ARN de *gfp* y la proteína GFP en líneas transgénicas. 29

Cuadro 1.10 Proteínas recombinantes y los rendimientos proteicos obtenidos en el cloroplasto de *C. reinhardtii*. 30

CAPÍTULO II

Cuadro 2.1 Secuencias homólogas tipo PAP encontradas en el genoma de *C. reinhardtii.* 50

Cuadro 2.2 PAP homólogas de *C. reinhardtii.* 51

Cuadro 2.3 Porcentaje de identidad de las secuencias CrPAP1-6 comparadas con las fitasas PAP de plantas.. 52

Cuadro 2.4 Motivos consenso encontrados en las PAPs de *C. reinhardtii.* 52

Cuadro 2.5 Predicción del péptido señal de CrPAP1-CrPAP5 generadas con ayuda de los programas signalP 3.0 y TargetP. 58

Cuadro 2.6 Elementos de respuesta *cis* encontrados con el programa PLACE en la región correspondiente al promotor de los genes *CrPAP.* 59

CAPÍTULO III

Cuadro 3.1 Oligonucleótidos para el análisis de la expresión de *CrPAP1-6* de *C. reinhardtii.* 75

Cuadro 3.2 Concentración y pureza del ARN extraído de *C. reinhardtii* cultivado en los diferentes tratamientos. 88

RESUMEN

El fósforo inorgánico (Pi) es un nutrimento de gran importancia para la generación de energía y el desarrollo de los organismos; sin embargo, éste se encuentra en concentraciones limitadas en la naturaleza, a diferencia de las formas orgánicas del fósforo (P) que son abundantes en el medio ambiente. Esta situación ha propiciado que los organismos evolucionen para sobrellevar condiciones de estrés ocasionadas por la falta de P. Entre las estrategias desarrolladas se encuentra la producción de enzimas fosfatasas, especializadas en el reciclaje y recolección de fósforo orgánico, como es el caso de las fitasas, quienes son las encargadas de hidrolizar el fitato (IP_6), el cual es la principal forma de almacenamiento de P en las semillas de las plantas. Las fitasas se agrupan en cuatro clases principales: fosfatasas ácidas de histidina (HAP), fosfatasas de β-propela, proteínas fosfatasas de tirosina (PTP) y fosfatasas ácidas púrpuras (PAP). Las fitasas se han encontrado en diversos organismos, sin embargo hasta la fecha no se sabe de su existencia en microalgas eucariotas. Por otro lado, las fitasas han ganado importancia comercial al ser usadas como aditivo en la alimentación de los animales de granja monogástricos. Estos animales tienen una muy baja capacidad de asimilación del IP_6 que está presente en sus mezclas alimenticias.

Por su parte, *Chlamydomonas reinhardtii* es una microalga eucariota que ha sido ampliamente utilizada como modelo en estudios de fisiología y bioquímica desde hace más de sesenta años. Más recientemente, esta microalga se ha propuesto como biorreactor para la producción de proteínas recombinantes (PRs) de interés comercial, incluyendo las fitasas, ya que presenta un gran potencial para este fin. Sin embargo, el estudio de fosfatasas aún es muy limitado en microalgas, y a la fecha no se han caracterizado PAP con o sin actividad de fitasa en *C. reinhardtii*.

En vista de lo mencionado anteriormente, el objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar molecularmente genes homólogos a fosfatasas tipo fitasa en *C. reinhardtii*. Para lograr este objetivo, se realizó un análisis *in silico* de la secuencia del genoma de *C. reinhardtii* en busca de secuencias homólogas a un gen representativo de cada una de las cuatro clases de fitasas. Se encontraron cinco genes homólogos a fitasas de la clase PAP (*CrPAP1* a *CrPAP5*) y un gen (*CrPAP6*) homólogo a fosfatasas de esta misma clase. Al

realizar el análisis de las secuencias de aminoácidos de CrPAP1 a CrPAP6, se encontró la firma característica de las fosfatasas de la clase PAP, y se hicieron las predicciones de las características bioquímicas de la proteína para la que codifica cada gen. Además, dado que las fosfatasas encontradas en este estudio son homólogas a una fitasa de planta, se investigó la relación filogenética de las CrPAPs con las fitasas de plantas.

Además, se obtuvo evidencia de que *C. reinhardtii* es capaz de crecer usando IP_6 como única fuente de P, por lo que se sugirió que presenta al menos una fitasa endógena que aún no ha sido identificada y caracterizada. Se observó que existen diferencias en los parámetros de crecimiento y en el perfil proteico de *C. reinhardtii* ante esta condición de cultivo. Por otra parte, se analizó la expresión de los seis genes *CrPAP* e interesantemente *CrPAP1* y *CrPAP5* se indujeron, ya sea ante la presencia de IP_6 o la ausencia de P, respectivamente.

Para finalizar, se construyó un plásmido de transformación para el cloroplasto de *C. reinhardtii*: pChPhy. Dicho plásmido contiene el gen *phyA* de la bacteria ruminal *Selenomonas ruminantium* que codifica para una fitasa de la clase PTP, e incluye al gen de selección *aadA* de *Escherichia coli* que confiere resistencia al antibiótico espectinomicina. Este plásmido servirá en futuros estudios para investigar la producción de la fitasa de *S. ruminantium* utilizando a *C. reinhardtii* como biorreactor, con la perspectiva biotecnológica de utilizar esta enzima como suplemento alimenticio en animales de granja monogástricos.

ABSTRACT

Inorganic phosphorus is a vital nutrient for energy generation and development of living organisms; however it exists in limited concentrations in nature, in contrast to organic forms of phosphorus which are abundant in the environment. Therefore, living organisms have developed strategies to cope with stress conditions caused by phosphorus deprivation. Among these strategies, the production of phosphatases specialized in the scavenging and recycling of organic phosphorus, as it is the case of phytases. Phytases are responsible for hydrolyzing phytate, which is the major storage form of phosphorus in plant seeds, and recently have gained commercial importance as food additive for monogastric farm animals, which have a very low absorption capacity of phosphorus from the phytate present in their food mixtures. Four classes of phytases have been described: histidine acid phosphatases (HAP), β-propeller phytases, protein tyrosine phosphatases (PTP) and purple acid phosphatases (PAP). These enzymes are widespread in nature, however to date there is no report about their existence in eukaryotic microalgae.

Chlamydomonas reinhardtii is a eukaryotic microalga that has been widely used as a model in physiological and biochemical studies for over sixty years. More recently, *C. reinhardtii* has been proposed as a bioreactor for the production of recombinant proteins of commercial interest, including phytases, as this microalga has shown great potential for this purpose. However, the study of phosphatases is still very limited in microalgae, and to date no phosphatase with or without phytase activity have been characterized in *C. reinhardtii.*

Therefore, the purpose of this study was the identification and molecular characterization of phytase homologous genes in *C. reinhardtii.* To achieve this goal, an *in silico* analysis was performed in the genome sequence of *C. reinhardtii,* searching for sequences homologous to a representative gene of each of the four phytase classes. As a result, five homologous genes (*CrPAP1* to *CrPAP5*) to PAP phytases and one homologous gene (*CrPAP6*) to PAP phosphatase were found. The characteristic signature of PAP was found in the aminoacidic sequences of CrPAP1 to CrPAP6. Additionally, the biochemical characteristics (molecular weight and isoelectric point) were predicted for all the CrPAPs.

Furthermore, since the phosphatases found in this study are homologous to a plant phytase, the phylogenetic relationship between CrPAPs and the plant phytases was investigated, finding that CrPAPs were clustered independently of any plant PAP.

The first evidence of *C. reinhardtii* growing with phytate as the only source of phosphorus was shown, which suggested that *C. reinhardtii* must have at least one endogenous phytase that has not been yet identified, nor characterized. Differences in growth parameters and protein profile of *C. reinhardtii* were also noticed under this culture condition. Moreover, we analyzed the expression of the six *CrPAP* genes and interestingly noticed that *CrPAP1* and *CrPAP5* were induced either in the presence of phytate or deprivation of phosphorus, respectively.

Finally, a plasmid for the transformation of the chloroplast of *C. reinhardtii* was obtained: pChPhy. This plasmid contained the gene *phyA* from the ruminal bacteria *Selenomonas ruminantium* encoding a phytase of the PTP class, and includes the selection gene *aadA* from *Escherichia coli* which confers resistance to the antibiotic spectinomycin. This plasmid will be used in future studies to investigate the production of the phytase from *S. ruminantium* using *C. reinhardtii* as a bioreactor, with the biotechnological prospect of using this enzyme as food supplement in monogastric farm animals.

INTRODUCCIÓN

El fósforo inorgánico (Pi) es un nutrimento esencial para los organismos vivos, por lo que su baja disponibilidad en el ambiente es una limitante para el desarrollo y el crecimiento de estos organismos. En consecuencia, organismos como bacterias, hongos y plantas han evolucionado generando mecanismos reguladores que les permiten adaptarse a condiciones limitantes de fósforo (P) con la finalidad de optimizar su obtención y asimilación (Nilsson *et al.,* 2010). Entre las adaptaciones que presentan las plantas, se encuentra la producción de enzimas como las fosfatasas, que son capaces de reciclar P mediante la hidrólisis de fuentes intracelulares de P orgánico como son los polifosfatos, ácidos nucleicos, fosfolípidos y algunos metabolitos, o de fuentes extracelulares como el fitato (IP_6) y sus derivados (Plaxton y Tran, 2010; Irhimovitch y Yehudai-Resheff, 2008).

Un grupo de fosfatasas que ha ganado importancia a nivel comercial es el de las fitasas, la cuales son capaces de hidrolizar el IP_6, que es la principal forma de almacenamiento de P en las semillas de las plantas. Estas enzimas han sido encontradas en una gran variedad de organismos, desde bacterias, hongos, plantas y algunos tejidos de animales. Sin embargo, los animales de granja monogástricos carecen de enzimas eficientes para asimilar el IP_6 contenido en las semillas que se les proporciona como alimento, por lo que tradicionalmente se les ha proporcionado Pi de origen mineral dentro las mezclas alimenticias. En tiempos recientes, las fitasas son utilizadas como aditivo alimenticio para estos animales con la finalidad de mejorar la asimilación de P proveniente del IP_6, propiciando un mejor desarrollo de los animales (mayor talla y peso en el mismo período de tiempo) y una menor excreta de P al ambiente. Con ello, se evita la eutrofización de los cuerpos de agua cercanos a los sitios de producción (Yao *et al.*, 2012). Existen cuatro clases de fitasas: fosfatasas ácidas de histidina (HAP), fitasas β-propela, fosfatasas ácidas púrpura (PAP) y las proteínas fosfatasas de tirosina (PTP) (Puhl *et al.,* 2007; Mullaney y Ullah, 2003). En la actualidad la mayoría de las fitasas de uso comercial pertenecen a la clase HAP, son de origen fúngico y son producidas de manera recombinante (Yao *et al.*, 2012; Haefner *et al.*, 2005; Simon e Igbasan, 2002; Zhang *et al.*, 2000). Sin embargo, dada la tendencia del mercado para hacer uso de las fitasas en el área agrícola y pecuaria, se han comenzado a estudiar las fitasas de la clase PAP, como es el caso de la fitasa de *Medicago truncatula* (Xiao *et al.*, 2005), la cual demostró tener

un gran potencial para mejorar la adquisición de P en las plantas y ser usada con fines de fitorremediación (Xiao *et al.*, 2005).

Por su parte, *Chlamydomonas reinhardtii* es una microalga verde eucariota que ha sido utilizada tradicionalmente como modelo de estudio en procesos fisiológicos como la fotosíntesis. Recientemente, se han utilizado como biorreactor para la producción de PRs de interés comercial, como las fitasas, así como de otras sustancias económicamente importantes (Yoon *et al.*, 2010; Manuell y Mayfield, 2006; Pulz et al., 2004). Lo anterior se debe a que esta microalga presenta características atractivas para este fin, como por ejemplo su rápida multiplicación, la rápida obtención de transformantes iniciales, la facilidad de escalamiento, así como su capacidad de crecer fototróficamente, heterotróficamente o mixotróficamente, y además tanto el genoma del núcleo (número de accesión en el GenBank NW_001843987) como el genoma del cloroplasto (Número de accesión en el GenBank BK000554) han sido secuenciados en su totalidad (Merchant *et al.,* 2007; Franklin y Mayfield, 2004; Maul *et al.,* 2002).

Hasta la fecha, no se ha reportado la presencia de fitasas endógenas en alguna microalga eucariota. Sin embargo, un reporte previo menciona datos no publicados acerca de la capacidad de *C. reinhardtii* para crecer en presencia de IP_6 como única fuente de P (Quisel *et al.*, 1996), lo que sugiere la presencia de al menos una fitasa, hasta ahora no identificada y caracterizada, en esta microalga. Estudios previos han identificado fosfatasas alcalinas en *C. reinhardtii*, pero ninguna de ellas presentó afinidad por el IP_6 (Patni *et al.*, 1977; .Matagne *et al.*, 1976; Loppes y Matagne, 1973). De encontrarse una fosfatasa con actividad de fitasa en *C. reinhardtii*, permitiría explorar la posibilidad de usarla como aditivo alimenticio, sin necesidad de purificarla, dado que *C. reinhardtii* es considerada como un organismo adecuado para su consumo (Mayfield *et al.,* 2007). Además, se abriría un área de investigación inexplorada las microalgas, ya que el conocimiento que se tiene de fosfatasas es todavía muy limitado en estos organismos.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar molecularmente secuencias homólogas a PAP en *C. reinhardtii*. Como parte de esta caracterización, se propuso el análisis de la expresión de los genes identificados ante la presencia de IP_6 como única fuente de P en el medio. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis

permitirán que se investigue en estudios posteriores si alguna de las secuencias estudiadas presenta actividad de fitasa, así como su función en el metabolismo del P y en la respuesta al estrés por déficit de P en *C. reinhardtii.* También, se podría evaluar su potencial como aditivo en la alimentación de animales de granja monogástricos.

Por otro lado, se propuso la generación de un plásmido recombinante para la expresión de la fitasa phyASr de *Selenomonas ruminantium* en el cloroplasto de *C. reinhardtii.* En la actualidad, la transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii,* depende de una estrategia de co-transformación, por lo que la recuperación de clonas transformadas, es un proceso laborioso. El vector propuesto, permitirá agilizar el proceso de transformación al no requerir de otro vector para la recuperación de la clonas transformadas.

CAPÍTULO I

1. ANTECEDENTES

1.1 *Chlamydomonas reinhardtii*

1.1.1 Morfología

Chlamydomonas reinhardtii es una microalga verde unicelular que pertenece al grupo de las clorofitas (Harris, 2001). Las células del tipo silvestre presentan una morfología ovoide con un diámetro aproximado de 10 µm por 3 µm de ancho. En el extremo anterior poseen dos flagelos que están involucrados en proporcionarle movilidad, así como en el reconocimiento sexual (Figura 1.1 A). En su interior se puede observar un cloroplasto único con forma de copa que ocupa aproximadamente entre el 40 y el 60% del volumen celular (Rochaix, 1995). Además, podemos encontrar una o varias estructuras denominadas pirenoides, las cuales se encargan de la fijación de dióxido de carbono (CO_2). En la periferia de la célula, se encuentra la mancha ocular, la cual es rica en carotenos y se cree que es la encargada de percibir y dirigir la luz hacia el foto-receptor verdadero de la microalga (Figura 1.1 B) (Harris, 2001).

A) B)

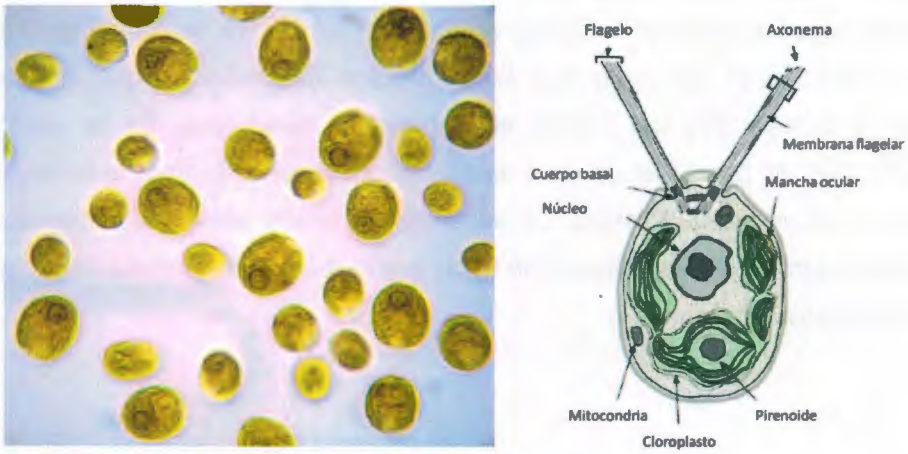

Figura 1.1 Morfología de *C. reinhardtii* A) Imagen de microscopio óptico (100X). B) Estructura interna (Tomado de Merchant, *et al.* 2008).

1.1.2 Fisiología

C. reinhardtii es capaz de crecer con relativa facilidad en un medio definido, ya sea líquido o agar, siempre y cuando se encuentre a un pH neutro (pH 7.00) y no requiere de vitaminas suplementarias o cofactores adicionales para su crecimiento. Esta microalga es capaz de asimilar el acetato como fuente de carbono, lo que le permite continuar su crecimiento en condiciones de oscuridad además de acelerar su crecimiento, ya sea en presencia o ausencia de luz.

La temperatura óptima para su crecimiento se encuentra en el rango entre los 20 y 25 °C, son capaces de soportar temperaturas de hasta 15 °C por debajo de su nivel óptimo, en tanto que solo pueden soportar 2 °C por arriba de este (Mata *et al.*, 2010). Pueden llegar a duplicarse en promedio cada 6 u 8 horas. La división celular ocurre generalmente durante la fase oscura del foto-período, con dos o tres divisiones mitóticas consecutivas rápidas. En cada división, a partir de una sola célula madre se producen cuatro células hijas, las cuales son liberadas al mismo tiempo. El número de divisiones que se den por cada ciclo depende del tamaño que haya alcanzado la célula madre durante la fase G1.

Normalmente, las células de *C. reinhardtii* son haploides y corresponden a uno de los dos tipos de apareamiento (mt+ o mt-). Cuando estas células entran en un estado de privación de nitrógeno, ambos mating types, se diferencian en gametos sexuales competentes. *C. reinhardtii* es capaz de asimilar nitrógeno en diversas formas; ya sea como nitrato, nitrito, amonio e incluso urea, en tanto que la asimilación de carbono sigue una vía muy complicada e incluye diversas formas de anhidrasas carbónicas. Se ha visto que la limitación de CO_2, en presencia de luz o de acetato en oscuridad, propicia la acumulación de grandes cantidades de almidón. La ausencia de azufre induce la expresión de un sistema de transporte de alta afinidad, en tanto que la de fosfatos, induce la expresión de diversas fosfatasas (Harris, 2001).

1.1.3 Utilidad de *C. reinhardtii* como modelo de estudio

Esta microalga tradicionalmente ha sido utilizada como modelo para estudiar procesos fisiológicos como la fotosíntesis, la biogénesis del cloroplasto y la función de los flagelos. Recientemente, el valor de este organismo se ha incrementado gracias al desarrollo de técnicas para llevar a cabo la transformación nuclear, del cloroplasto y de la mitocondria (Remacle *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2004; Kindle *et al.*, 1991). En la actualidad *C. reinhardtii* está siendo evaluada como posible biorreactor para la producción de PRs, ya que presenta varias ventajas que la hacen muy atractiva para este fin. Entre éstas ventajas se encuentran:

1. La facilidad para realizar la transformación tanto a nivel nuclear como del cloroplasto.
2. El tiempo relativamente corto desde la transformación inicial hasta la obtención de grandes volúmenes de proteína para la industria.
3. La rápida multiplicación que la hace un organismo de fácil propagación.
4. La habilidad de crecer fototróficamente o heterotróficamente utilizando acetato como fuente de carbono.
5. La capacidad de producir y secretar proteínas plegadas de manera adecuada para llevar a cabo su actividad biológica.
6. La habilidad de obtener cultivos a escalas que van desde pocos mL hasta 500, 000 L de una manera poco costosa.
7. Los genomas, tanto del cloroplasto como del núcleo, han sido secuenciados en su totalidad.

Todas estas características, aunadas al hecho de que *C. reinhardtii* es considerado como un organismo generalmente recomendado como seguro (GRAS: Generally regarded as safe) (Harris, 2001), hacen de ella un sistema atractivo para la obtención ya sea de productos endógenos de alto valor agregado como enzimas técnicas, o productos heterólogos como las PRs (Mayfield & Schultz, 2004).

1.2 ENZIMAS FOSFATASAS

El fósforo (P) es conocido por ser un nutrimento esencial en los procesos metabólicos y componente vital de la estructura de las biomoléculas de los seres vivos; sin embargo, la mayoría del P se encuentra en forma de compuestos orgánicos y solo puede ser asimilado por estos organismos después de haber sido hidrolizado por medio de fosfatasas (Yadav y Tarafdar 2001; Tarafdar y Jugk 1987).

Las fosfatasas han sido encontradas en todos los organismos eucariotas y representan uno de los grupos de proteínas funcionales más grandes (Luan, 1998). Las funciones de las fosfatasas son proveer el P durante la germinación de las semillas (Brinch-Pedersen *et al.*, 2002); la movilización interna de P (Duff *et al.*, 1991) y la liberación del P en los suelos en forma de esteres orgánicos mediante la exudación de enzimas en la rizosfera (Miller *et al.*, 2001). Además, se sabe que son un componente muy importante de las cascadas de señalización en todos los organismos eucariotas (Luan, 1998).

Este tipo de enzimas son generadas como una respuesta universal de las plantas ante condiciones de deficiencia de P y se ha visto que esta clase de enzimas se encuentran distribuidas en todos los órganos de las plantas y su actividad puede ser detectada a lo largo del desarrollo (Duff *et al.,* 1994).

Las fosfatasas 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 fosfoproteinas fosfatasas (PPP), el segundo grupo a las fosfoproteínas metalodependientes (PPM), el tercero a las fosfatasas de proteínas de tirosina (PTP) y finalmente el cuarto a las aspartato fosfatasas (Moorhead *et al.,* 2009).

Existen fosfatasas cuya función está relacionada con la obtención de P a partir de substratos orgánicos y entre ellas se encuentran las conocidas como fitasas.

1.2.1 Enzimas fitasas

El término fitasa se usa de manera genérica para describir a una enzima fosfatasa capaz de hidrolizar los enlaces fosfomonoéster del IP_6, también conocido como ácido fítico [*myo*-inositol (1, 2, 3, 4, 5, 6) hexakisfosfato]. Este compuesto es un constituyente común de los alimentos derivados de las plantas, ya que es la principal forma de almacenamiento de P e inositol en los cereales, leguminosas y semillas oleaginosas, representando aproximadamente entre el 60 y el 90% del P total contenido en las plantas y entre el 50 y 80% de P orgánico presente en el suelo. Las plantas adquieren el P por medio de las raíces, y la forma preferida es la del Pi; sin embargo, el P orgánico se encuentra presente en el suelo en mayor concentración (Rao *et al.,* 2009; Tang *et al.,* 2006).

Se ha reportado que plantas como la soya sintetizan enzimas fosfatasas en las raíces, con el fin de hidrolizar el IP_6 presente en el suelo y que el P liberado por esta hidrólisis pueda ser asimilado por la planta (Kuang *et al.,* 2009). Por otro lado, el IP_6 puede formar complejos con iones de Ca^{+2} o Mg^{+2}, conocidos como fitina, disminuyendo de esta manera la disponibilidad de nutrimentos en el suelo para las plantas (Rao *et al.,* 2009).

Las fitasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, ya que pueden ser encontradas en bacterias, hongos, plantas y algunos tejidos de animales. En el caso particular de las microalgas, no se conoce si poseen esta clase de enzimas. Quisel y colaboradores (1996) mencionaron, la observación de que *C. reinhardtii* era capaz de crecer en un medio suplementado únicamente con IP_6 como fuente de P, pero a la fecha no se han reportado evidencias que corroboren esta observación.

Las fitasas, como su nombre lo dice, están involucradas en hidrolizar principalmente el IP_6; sin embargo, algunas fitasas son capaces de utilizar otros sustratos orgánicos ricos en P como la glucosa-6-fosfato, ATP, fenil-fosfato, entre otros a partir de los cuales se libera Pi. Estas enzimas recientemente han ganado importancia en la industria agropecuaria, ya que al ser proporcionadas en la dieta de los animales monogástricos propician una mejor asimilación de los nutrimentos presentes en los alimentos. De esta manera, las fitasas llevan a cabo una doble función en el campo, disminuyendo el costo económico para los productores al disminuir la cantidad de Pi que normalmente adicionan a la mezcla alimenticia y que además de caro es un recurso no renovable y por otro lado

protegen al medio ambiente de la contaminación que resulta de las excretas de los animales (ricas en P por el IP_6 no asimilado) evitando así la eutrofización de los cuerpos de agua (Yao *et al.*, 2012).

1.2.2 Clasificación de las fitasas

Las fitasas se pueden clasificar de acuerdo al pH al que actúan (ácidas, neutras ó alcalinas) y de acuerdo a su estructura. En esta última clasificación, se conocen cuatro clases principales de fitasas (Rao *et al.*, 2009; Puhl *et al.*, 2007; Mullaney y Ullah 2003; Li *et al.*, 2002).

- Fosfatasas ácidas de Histidina (HAP): son características de los hongos y bacterias como *E. coli.* Comparten la misma secuencia para el sitio activo (RHGXRXP), un dipéptido catalítico y 10 residuos de cisteína.

- Fitasas β-propela (BPP): pertenecen principalmente a bacterias del género *Bacillus.* Estas enzimas tienen una arquitectura de propela formada por seis láminas y seis sitios de unión a Ca^{+2} en cada molécula de proteína, por lo que la actividad enzimática es dependiente de Ca^{+2}.

- 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.

- Proteínas fosfatasas de tirosina (PTP): se les llamó así por su similitud con las proteínas fosfatasas de tirosina (PTP), 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 ruminiantum*. 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).

En la Figura 1.2 se pueden observar las conformaciones estructurales de las enzimas antes mencionadas.

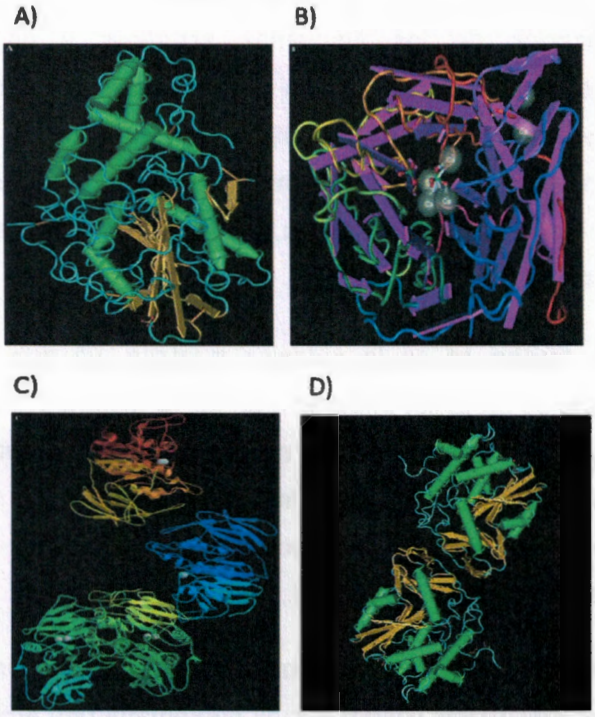

Figura 1.2 Modelos moleculares generados por computadora del sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (www.ncbi.nlm.-nih.gov) de las cuatro clases representativas de fosfatasas. A) 1IHP, PhyA, Fosfatasa ácida de histidina (HAP). B) 1H6L, Ts-Phy, fitasa de β-propela; (C) 1KBP, KSPAP fosfatasa de ácido purpúrico (Mullaney y Ullah, 2003). D) Estructura tridimensional de la fitasa (PhyA) expresada por *Selenomonas ruminantium* (Tomado de Puhl *et al.*, 2007).

1.2.3 Aplicación industrial de las fitasas

La cantidad de P contenido en los granos de cereal y de oleaginosas, debería ser suficiente para satisfacer los requerimientos para el crecimiento óptimo de los animales, esto es, si todo el P del IP_6 estuviera disponible para su consumo. En el caso de los animales monogástricos como las aves, los cerdos y los peces, apenas pueden utilizar el IP_6 como fuente de P, debido a que tienen poca o nula actividad de fitasa en sus tractos digestivos. Este hecho provoca dos situaciones: 1) la necesidad de suplementar las

mezclas alimenticias con Pi para lograr un crecimiento óptimo de los animales, y 2) que los desechos producidos por estos animales contengan altos niveles de IP_6, lo que contribuye de manera significativa a la contaminación de los cuerpos de agua, provocando la eutrofización de los ambientes acuáticos y en consecuencia la sobrepoblación de algas, lo que a su vez podría causar problemas ambientales, así como afectar a la industria acuícola (Rao *et al.,* 2009; Chen *et al.,* 2008). Una solución a la problemática antes mencionada es la producción de fitasas con características adecuadas para ser adicionadas a las mezclas alimenticias, es decir, que sean capaces de actuar a pH ácidos y con alta afinidad por su sustrato.

Otra aplicación de las fitasas es en la nutrición humana, ya que en los países en desarrollo, la desnutrición es un factor imperante en estas regiones, por lo que la ingesta de minerales disminuye. El ser humano, al no contar con una fuente adecuada de minerales, necesita de la adición de suplementos y en este sentido las fitasas podrían jugar un rol muy importante, aliviando la necesidad de minerales en la dieta de la población de los países en desarrollo (Rao *et al.,* 2009).

La primera fitasa en entrar al mercado de la alimentación animal fue producida a partir de una cepa modificada de *Aspergillus ficuum* la cual presentaba una actividad de al menos 50 veces mayor que su contraparte nativa. Esta fitasa en la actualidad es vendida por BASF, bajo el nombre Natuphos (Haefner *et al.,* 2005). En el Cuadro 1.1 se muestran algunas de las fitasas disponibles en el mercado.

Cuadro 1.1 Fitasas disponibles comercialmente.

Nombre comercial	Origen	Organismo productor	Empresa
Natuphos	*Aspergillus ficum*	*Aspergillus niger*	BASF
Finase	*Escherichia coli*	*Trichoderma reesei*	AB Vista
Quantum	*E. coli*	*Pichia pastoris*	AB Vista
Biofeed	*Peniophora lycii*	*Aspergillus oryzae*	Novozymes
Phyzyme	*E. coli*	*Schizosacharomyces pombe*	Danisco
Optiphos	*E. coli*	*P. Pastoris*	Huvepharma
Ronozyme	*P. lycii*	*Aspergillus oryzae*	DSM

1.2.4 Fitasas recombinantes

Las fitasas han sido expresadas de forma recombinante, tanto en plantas como en animales. Algunas plantas que han sido utilizadas como biorreactor son dicotiledóneas, como tabaco (Zhang *et al.,* 2005), *Arabidopsis* (Xiao *et al.,* 2005), alfalfa (Ullah *et al.*, 2002) y soya (Li *et al.,* 1997). En cambio, en el caso de animales, se han expresado en ratones y cerdos (Golovan *et al.*, 2001[a]; Golovan *et al.*, 2001[b]). También, se han hecho esfuerzos por producir este tipo de enzimas en organismos como levaduras o bacterias (Yang *et al.*, 2012.; Tran *et al.,* 2010).

Recientemente, 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 el Cuadro 1.2 se enlistan algunas de las fitasas que han sido producidas de manera recombinante.

Cuadro 1.2 Algunas fitasas recombinantes producidas en diversos sistemas de biorreactores. PST= Proteína soluble total; U= Unidades enzimáticas.

Fuente de la fitasa	Organismo heterólogo	Rendimiento	Referencia
E. coli	Cerdo	2-5 U/mL	Golovan *et al.*, 2001[a]
E. coli	Ratón	---	Golovan *et al.*, 2001[b]
S. ruminantium	Semillas de Arroz	0.5 % PST	Hong *et al.*, 2004
Aspergillus	Semillas de Canola	1.0 PST%	Peng *et al.*, 2006
Citrobacter braaki	*Pichia pastoris*	3.2 mg/mL	Huang *et al.*, 2006
E. coli	*Chlamydomonas reinhardtii*	10 U/mg	Yoon *et al.*, 2011,

1.2.5 Fitasa de *Selenomonas ruminantium*

Una fitasa que presenta características interesantes para ser expresada de forma heteróloga es la fitasa de *S. ruminantium*. Esta fitasa, como se mencionó anteriormente, pertenece a la clase de proteínas fosfatasas de tirosina (PTP), ya que contiene en su sitio activo la secuencia característica de este tipo de enzimas (HCX_5RS/T) y además su estructura y mecanismo de hidrólisis es similar a las PTP (Puhl *et al.*, 2007 Chu *et al.*, 2004;).

Al ser caracterizada bioquímicamente, se observó que esta enzima tiene 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 fueron determinados por Puhl y colaboradores (2007), como se presenta en el Cuadro 1.3.

Cuadro 1.3 Parámetros cinéticos de la fitasa de *S. ruminantium* (Tomado de Puhl *et al.*, 2007).

	kcat (s^{-1})	**Km (μM)**	**kcat/Km ($\mu M^{-1}/s^{-1}$)**
phyAs	264 ± 19	425 ± 28	621 ± 61

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 sus 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 como es el caso de *C. reinhardtii* para tratar de alcanzar el porcentaje de proteína necesario para su comercialización.

1.3 PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Una PR o proteína heteróloga es aquella proteína cuya síntesis se realiza en un organismo distinto al de su origen nativo, o a aquella propia del organismo, pero que se encuentra bajo la regulación de un promotor diferente al original. Estas proteínas presentan la ventaja de que pueden ser producidas en grandes cantidades, en comparación con las proteínas que son producidas de manera natural.

Actualmente, se ofrecen en el mercado internacional una gran cantidad de PR con aplicaciones diversas (Walsh & Headon, 1995) como el interferón humano α, obtenido a partir de *E. coli* (Daniell *et al.,* 2005[b]) que es empleado en el área de la salud como agente antitumoral; la tripsina obtenida del maíz (Horn *et al.,* 2004, que es empleada en el área de la investigación científica como enzima proteolítica; las α-amilasas obtenidas a partir de *Nicotiana benthamina* (Biesgen *et al.,* 2002), que son empleadas en el área industrial para el procesamiento de alcohol o las fitasas en el área de la alimentación animal (Rao *et al.*, 2009).

La comercialización de PR, es liderada por la venta de medicamentos de origen biológico (hormonas, factores de crecimiento, anticuerpos, enzimas) empleadas en el tratamiento de diversas enfermedades. En el año 2006, estas proteínas generaron ventas por aproximadamente 40 mil millones de dólares en los Estados Unidos (Aggarwall, 2008) y se esperaba que para finales de 2010 las ventas de esta clase de productos hayan alcanzado los 53 mil millones de dólares (Pavlou 2004). En la Figura 1.3 se muestra la tasa de crecimiento anual.

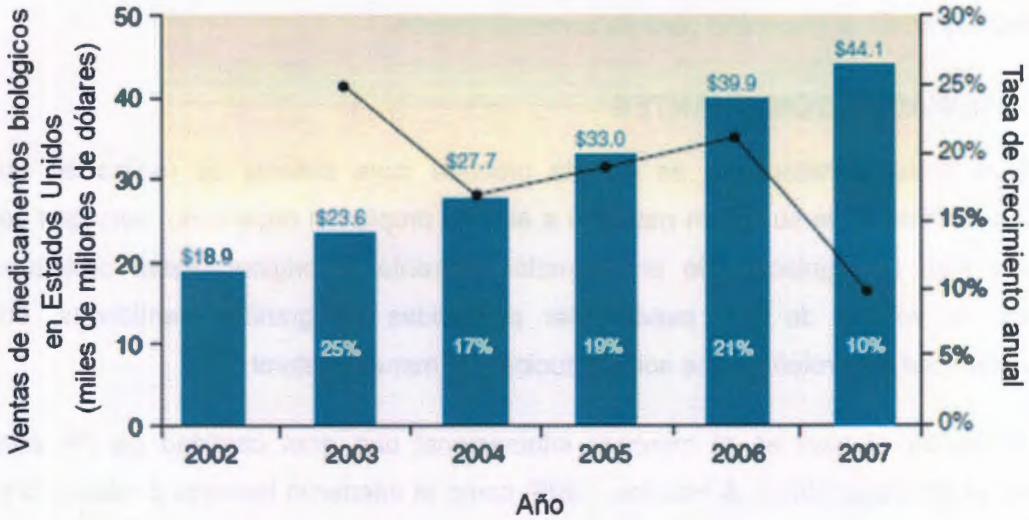

Figura 1.3 Ventas totales en el mercado de medicamentos biológicos en Estados Unidos (2002-2006) (Aggarwall, 2008).

El primer lugar en ventas le corresponden a los anticuerpos monoclonales, el segundo lugar a los factores de crecimiento y el tercer lugar lo ocupan las hormonas (Aggarwal 2008). Lo anterior se observa en la Figura 1.4.

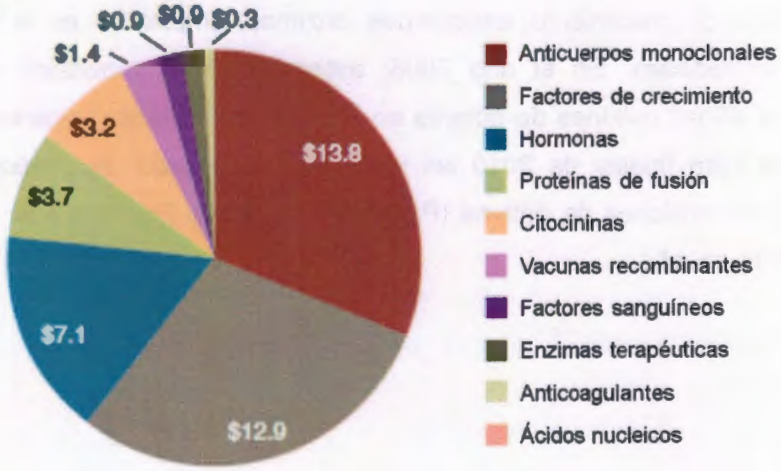

Figura 1.4 Niveles de venta de medicamentos de origen biológico en los Estados Unidos (Aggarwall, 2008).

Las enzimas industriales son otro grupo de PR y permiten un mejor aprovechamiento de la materia cruda que se procesa para obtener un determinado compuesto. Estas enzimas se pueden dividir en cuatro categorías: enzimas detergentes, enzimas técnicas, enzimas alimentarias, y enzimas para alimentación animal. (http://www.prnewswire.com/news-releases/reportlinker-adds-global-industrial-enzymes-market-an-analysis-108979419.html) NEW YORK, Nov. 18, 2010 /PRNewswire/. Reportlinker.com announces that a new market research report is available in its catalogue:

El mercado global de las enzimas industriales se ha incrementado de 2.2 mil millones de dólares en el 2006 a aproximadamente 2.3 mil millones de dólares al final del 2007 y para el 2010, las ventas de este tipo de enzimas se estimaron en 3.3 mil millones de dólares, superando en 600 millones de dólares el estimado para el año 2012, que era de 2.7 mil millones de dólares. Para el año 2015, se estima que este tipo de enzimas, alcance los 4.4 mil millones de dólares. El mayor incremento se espera en el sector de las enzimas utilizadas en la alimentación animal, con una tasa de crecimiento del 6 % entre los años 2007 y 2012. Dicho incremento será impulsado principalmente por la venta de fitasas, que son utilizadas para propiciar la digestión del fitato en lo animales monogástricos (Report Code: BIO030E, Published: January 2008, Report Code: BIO030F Published: January 2011).

En el Cuadro 1.4 se pueden ver las ganancias estimadas para el mercado global de las enzimas industriales.

Cuadro 1.4 Ganancias estimadas por año de la venta global de enzimas industriales (BCC research 2008). MMD: Miles de Millones de Dólares.

Tipo de enzimas	2005 (MMD)	2006 (MMD)	2007 (MMD)	2012 (MMD)
Técnicas	1,075	1,105	1,140	1,355
Alimentarias	775	800	830	1,010
Alimentación animal	240	260	280	375
Total	2090	2,165	2,250	2,740

1.4 BIORREACTORES PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

La tecnología del ADN recombinante ha permitido modificar genéticamente diferentes clases de organismos que actúan como reactores biológicos para la producción de PR con aplicaciones terapéuticas o industriales. Para ello, se hace uso de varios sistemas de expresión disponibles comercialmente o de aquellos desarrollados con fines de investigación. También, se pueden diseñar según las necesidades específicas de cada proteína y para ello se debe tener en cuenta parámetros como el origen biológico, las propiedades químicas y biológicas de proteínas así como la aplicación final y el bioproceso (Guerrero-Olazarán *et al.,* 2004). El sistema de expresión ideal es aquel que ofrece la producción de material biológicamente activo, de una manera segura y al más bajo costo (Daniell *et al.,* 2001).

En la actualidad se utiliza una gran variedad de hospederos, que van desde bacterias, levaduras, insectos, hasta plantas y mamíferos, así como líneas celulares derivadas de estos mismos organismos. Cada uno de estos sistemas ofrece diferentes ventajas en términos de rendimiento proteico, facilidad de manipulación, así como costos de producción. En el Cuadro 1.5 se realiza la comparación de las características que ofrecen algunos de ellos.

1.5 PLANTAS COMO BIORREACTORES PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

La tecnología del ADN recombinante ha hecho factible la modificación del genoma vegetal con la adición o reemplazo de genes específicos y secuencias reguladoras de ADN, para la producción de PR (Boehm, 2006), ya sea de interés farmacéutico o industrial. Ejemplo de ello es la producción de endoglucanasas o xilanasas en el cloroplasto de tabaco (Verma *et al.*, 2010)

Cuadro 1.5 Comparación de los sistemas de producción de PR disponibles actualmente (Walker *et al.*, 2005; Gomord *et* al., 2004; Ma *et al.*, 2003).

Características / Organismo	Producción		Capacidad de escalamiento	Calidad del producto	Capacidad de glucosilación	Riesgo de contaminación	Costo de almacenamiento
	Costo	Tiempo					
Bacterias	Bajo	Corto	Alto	Bajo	No	Endotoxinas	Moderado
Levaduras	Medio	Medio	Alto	Medio	Si	Bajo	Moderado
Células de Insectos	Alto	Medio	Medio	Alto	Si	Alto	Costoso
Células de Mamíferos	Alto	Largo	Muy bajo	Muy alto	Si	Virus-Priones	Costoso
Animales	Alto	Muy largo	Bajo	Muy alto	Si	Virus-Priones	Costoso
Células de Plantas	Bajo	Corto	Alto	Alto	Si	Bajo	Poco costoso
Plantas	Muy Bajo	Largo	Muy alto	Alto	Núcleo: Si Cloroplasto: No	Bajo	Poco costoso
Microalgas unicelulares	Muy Bajo	Corto	Muy alto	Alto	Núcleo: Si Cloroplasto: No	Bajo	Poco Costoso

Las plantas tienen un gran potencial para la producción de PR de relevancia para la industria actual. Entre las ventajas que presentan dichos organismos para este fin se encuentra la economía de los sistemas vegetales en comparación con las instalaciones de biorreactores para uso industrial; la disponibilidad de la tecnología de cosecha y procesamiento de las plantas, así como para sus productos; la capacidad de dirigir las proteínas hacia compartimentos donde éstas pueden ser más estables; la cantidad de proteína que puede ser producida, se aproxima a niveles de escala industrial y en el caso particular de las PR dirigidas al consumo humano, los riesgos a la salud por contaminación potencial con patógenos o toxinas son minimizados, por lo que usualmente son clasificadas como GRAS (Mayfield *et al.*, 2007).

En el Cuadro 1.6 se muestran algunos ejemplos de PR producidas en plantas.

Cuadro 1.6 Algunas proteínas recombinantes producidas a nivel nuclear en plantas superiores. PST= Proteína soluble total (Modificado de Daniell *et al.*, 2009)

Proteína recombinante	Sistema de expresión	Nivel de Expresión	Referencia
Factor de crecimiento de fibroblasto básico humano	Soya	2.3 % PST	Ding *et al.*, 2006
Avidina	Maíz	20% PST	Hood *et al.*,1997
Tripsina	Maíz	---	Horn *et al.*, 2004
Proteína de la seda de araña	Tabaco Papa	2% PST	Scheller *et al.*, 2001
Hormona del crecimiento humano	Suspensión de células de arroz	57 mg/L	Kim *et al.*, 2008
Vacuna contra Rotavirus	Tubérculo de papa	0.4 % PST	Li *et al.*, 2006
Subunidad B de la toxina del cólera	Arroz	2.1% PST	Nochi *et al.*, 2007

El potencial flujo génico vía polen hacia los cultivos adyacentes en la transformación a nivel nuclear (Franklin & Mayfield, 2004), ha causado preocupación a nivel social acerca de la liberación de organismos genéticamente modificados al medio ambiente. Por esta razón, se han creado nuevas metodologías para la producción de PR, como la creada por la compañía Large Scale Biology Corp., y que consiste en asperjar plantas de tabaco con el virus del mosaico, el cual acarrea el gen de interés con la ventaja de producir grandes cantidades de la proteína recombinante, exclusivamente durante el período que tardan las hojas en caer (Kaiser, 2008). Icon Genetics desarrolló la metodología conocida como Magnifection, en la cual se sumergen las plantas en una solución conteniendo una cepa de *A. tumefaciens* modificada con el gen de interés, y aplicando vacío en un área de contención total (Gleba *et al.*, 2005). Esta metodología ha demostrado ser sumamente efectiva para la producción de PR, por lo que fue adquirida por la compañía Bayer en el año de 2006.

La transplastómica es otra herramienta que permite la contención del transgen para evitar el flujo génico. Esta metodología fue desarrollada por Boynton y colaboradores (1988)

usando a *C. reinhardtii* como modelo de estudio; sin embargo, no fue sino hasta 1990 cuando Svab y colaboradores propusieron el término transplastómica, refiriéndose a las líneas de plantas que tienen un plastoma transgénico. Entre las ventajas que presenta esta herramienta sobre la transformación nuclear se encuentra que ofrecen cierto grado de contención a los genes expresados en el cloroplasto, debido a su estricta herencia materna. Algunas ventajas adicionales de la transplastómica son el elevado número de ploidías del genoma del plástido (plastoma), que permite altos niveles de expresión debido a que éste es un organelo poliploide. Además, la integración del transgen en el plastoma ocurre vía recombinación homóloga, minimizando los efectos de inserción del transgen en zonas desconocidas del genoma, o la interrupción de algún gen vital para el ciclo de vida de la planta causado por el transposicionamiento (Zidenga, 2007).

A pesar de todas las ventajas mencionadas anteriormente, también presentan algunas desventajas, como el ya mencionado flujo génico vía polen hacia los cultivos adyacentes, al realizar la transformación a nivel nuclear y el largo tiempo necesario desde el momento de la transformación inicial hasta el momento de tener cantidades suficientes de proteína para ser usada (Franklin & Mayfield, 2004).

1.6 PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN PLÁSTIDOS

A pesar de que la transformación genética en los cloroplastos se logró hace ya casi dos décadas, muchos investigadores se enfocaron a la tarea de silenciar genes para posteriormente estudiar el mecanismo de expresión de los plástidos *in vivo;* sin embargo, muy pocos pensaron desde el punto de vista de la aplicación biotecnológica (Bock, 2007). El primer avance en este sentido ocurrió cuando se logró expresar el gen *CrylA* que confiere resistencia a insectos en tabaco. Previamente, dicho gen, se había tratado de expresar en el núcleo con resultados muy poco alentadores, lo cual llevó a introducirlo en el genoma del cloroplasto logrando acumular grandes cantidades de proteína (McBride *et al.,* 1995). Algunas proteínas que se han expresado en plástidos confieren resistencia a herbicidas o al ataque de insectos. Por otro lado, también se han producido biofármacos, como la vacunas del tétanos y del ántrax (Bock, 2007), interferones, IGF-1 y péptidos antimicrobianos (Daniell *et al.,* 2005). En el Cuadro 1.7 se muestran ejemplos de algunas PR producidas en el cloroplasto de algunas plantas.

Cuadro 1.7 Algunas proteínas recombinantes producidas en el cloroplasto de plantas superiores.

Proteína recombinante	Sistema de Expresión	Nivel de Expresión	Referencia
Toxina crylAc	Tabaco	5% PST	McBride *et al.*, 1995
Xilanasa	Tabaco	----	Verma *et al.*, 2010
Toxina B del cólera	Lechuga	9.4% PST	Davoodi-Semiromi *et al.*, 2009
Antígeno protector contra el ántrax	Tabaco	14.2% PST	Koya *et al.*, 2005
Toxina del tétanos	Tabaco	7.0% PST	Tregoning *et al.*, 2005
Antibiótico proteico contra *Streptococcus*	Tabaco	>70 % PST	Oey *et al.*, 2009

PST= Proteína soluble total

1.7 MICROALGAS COMO BIORREACTORES PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Las algas verdes han sido utilizadas desde principios del siglo XX como modelo para entender los mecanismos que regulan la expresión de genes relacionados con la luz, los nutrientes y el aparato fotosintético (Harris, 1989) y constituyen un grupo diverso, que incluye tanto microorganismos procariotas como eucariotas, con una gran importancia biológica, ya que el 50 % de la fijación global de carbono se debe a ellas (Field *et al.*, 1998). Estos organismos han sido explotados para obtener diversos compuestos de interés biotecnológico (Apt y Brekens, 1999), entre los que se encuentran pigmentos como el β-caroteno (Borowitzka *et al.*, 1999) y ácidos grasos, como los omega-3 (Pulz y Gross, 2004).

A diferencia de organismos como bacterias, levaduras y plantas solo algunas especies de microalgas han sido exitosamente transformadas, a pesar del gran potencial que presentan para ser manipuladas genéticamente. Dicho potencial abre todo un abanico de posibilidades para el incremento en la producción de los compuestos con aplicaciones biotecnológicas (León-Bañares *et al.*, 2004), como en el caso de los biocombustibles (Dunahay, 1996), la biorremediación (Cai *et al.*, 1999), así como la producción de sustancias bioactivas de uso farmacéutico (Sun *et al.*, 2003). Por otro lado, las microalgas pueden ser utilizadas como hospederos de genes específicos que codifican para

proteínas de origen animal, como hormonas y anticuerpos, que no se producen de manera eficiente en levaduras y esto traería como ventaja la producción de proteínas de alta calidad.

Una de la microalgas que más ha llamado la atención es *C. reinhardtii*, también nombrada por Rochaix (1995) como la levadura verde debido a su rápida multiplicación, así como su fácil manipulación para mantener en cultivos de laboratorio.

1.8 *C. reinhardtii* COMO BIORREACTOR PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Las ventajas mencionadas anteriormente de *C. reinhardtii* han hecho que en tiempos recientes haya ganado importancia en el área de la producción de PR, y sea considerada como un sistema adecuado para la producción de éstas. En este sentido se han hecho intentos para producir PR, tanto a nivel nuclear como del cloroplasto. En los subsiguentes apartados se hace una breve descripción de la producción de PR en *C. reinhardtii.*

1.8.1 Expresión de proteínas recombinantes en el núcleo de *C. reinhardtii*.

La expresión de PRs en el núcleo de *C. reinhardtii* ha sido explorada en diferentes reportes; sin embargo, a pesar de contar con una gran variedad de herramientas para lograr la transformación de manera eficiente, aún no se ha logrado la expresión del transgen a niveles razonables, y en consecuencia no se ha logrado una adecuada producción de PR (Schroda *et al.*, 2000). Las razones moleculares de este hecho, no son bien entendidas hasta la fecha, aunque se cree que pudiera ser causado por un mecanismo epigenético de supresión no convencional o por una compactación excepcional de la estructura de la cromatina, la cual no permite la transcripción activa de los transgenes (Neupert *et al.*, 2009).

La selección de secuencias reguladoras de la expresión génica (promotores, secuencias potenciadoras, elementos *cis*-reguladores) es uno de los pasos más importantes para poder llevar a cabo la producción de una PR.

Los promotores que han sido empleados para llevar a cabo la transformación de *C. reinhardtii* a nivel nuclear se pueden dividir en dos clases, la primera clase son considerados como de tipo constitutivo y son el promotor *RBCS2*, el promotor en tandem *HSP70A-RBCS2*, así como el promotor *PSAD*. La segunda clase de promotores corresponde a los de tipo inducible, y entre ellos encontramos, el promotor *NIT1*, que es capaz de ser inducido por medio de la privación de amonio, el promotor *CA1* es inducido por las bajas concentraciones de CO_2, y el promotor *CYC6*, el cual es inducido por la disminución en las concentraciones de cobre en el medio, así como por la adición de níquel o cobalto (Ferrante *et al.*, 2008). En el Cuadro 1.8 se muestran algunos ejemplos de PR producidas en el núcleo de *C. reinhardtii.*

Cuadro 1.8 Proteínas recombinantes y los rendimientos proteicos obtenidos en el núcleo de *Chlamydomonas reinhardtii.*

P+5'UTR	Proteína	3'UTR	Rendimiento	Referencia
Par4	Xyn1	*rbcs2*	0.25% PST	Rasala *et al.*, 2012
Hsp70A/rbcS2	crEpo	*rbcs2*	0.03% PST	Eichler-Stahlberg *et al.*, 2009
rbcS2	aadA	*rbcS2*	----------	Cerutti *et al.*, 1997
Hsp70A/rbcS2	gluc	*rbcS2*	10mg L^{-1}	Lauersen *et al.*, 2012

PST= Proteína soluble total; P= PromotorM; UTR= Región no traducible

1.8.2 Expresión de proteínas recombinantes en el cloroplasto de *C. reinhardtii*

Al igual que en el caso del núcleo, las PR han sido producidas en el cloroplasto de esta microalga y se ha demostrado que la acumulación de proteínas en el cloroplasto es afectada por diversos factores, tales como la tasa de transcripción, el procesamiento del ARN, la estabilidad de los mensajeros, la traducción y la conversión de la proteína. En este sentido, la regulación de la traducción ha sido identificada como el paso limitante en el ajuste para la acumulación de proteínas en el cloroplasto, en respuesta a cambios del desarrollo y ambientales (Barnes *et al.*, 2005).

Coragliotti y colaboradores (2011) encontraron que la acumulación de ARNm ocurría a niveles similares que las de su contraparte endógena; sin embargo, durante el proceso de traducción, no se obtenía la cantidad de proteína esperada. Estos autores concluyeron que la traducción de la proteínas es el factor limitante para la producción de PR en el cloroplasto de *C. reinhardtii* y que dependiendo de la PR que se desee producir será el rendimiento proteico que se obtenga.

Barnes y colaboradores (2005) encontraron mediante la fusión del gen reportero *gfp,* en combinación con las regiones P+5'UTR y 3'UTR de diferentes genes del cloroplasto, que la expresión de genes del cloroplasto es regulada post-transcripcionalmente y que es influenciada por una variedad de elementos presentes en las regiones 5'UTR como 3'UTR de los ARNm. En el Cuadro 1.9 se observan las combinaciones de la fusión de *gfp* con los UTRs del reporte de Barnes y colaboradores (2005).

Cuadro 1.9 Acumulación relativa del ARN de *gfp* y la proteína GFP en líneas transgénicas. Los números representan los porcentajes de los niveles más altos de acumulación de ARN y de proteína con relación a *psbD/gfp/psbA* y *atpA/gfp/psbA*, respectivamente (Tomado de Barnes *et al.*, 2005).

Construcción	Acumulación relativa de ARN (%)	Acumulación relativa de Proteína (%)
atpA-gfp-atpA	53±3	77±5
atpA-gfp-rbcL	72±3	65±3
atpA-gfp-psbA	94±5	100
rbcL-gfp-rbcL	51±2	14±7
rbcL-gfp-psbA	11±1	18±1
rbcL-gfp-tRNA	2±1	5±1
psbA-gfp-psbA	27±2	10±5
psbA-gfp-rbcL	9±2	0
psbD-gfp-psbA	100	72±7
16S-gfp-rbcL	71±5	0

Estos autores proponen que las mejores combinaciones fueron las que incluían el P+5'UTR del gen *atpA* con el 3'UTR del gen *psbA* y el P+5'UTR del gen *psbD* y el 3'UTR del gen *psbA*.

En el Cuadro 1.10 se pueden observar algunos de los rendimientos proteicos obtenidos, así como las regiones reguladoras empleadas en el cloroplasto de *C. reinhardtii* como sistema de expresión de PR.

Cuadro 1.10 Proteínas recombinantes y los rendimientos proteicos obtenidos en el cloroplasto de *C. reinhardtii.*

P+5'UTR	Proteína	3'UTR	Aplicación	Rendimiento PST (%)	Referencia
atpA	HSV8-lsc	*rbcL*	anticuerpo monoclonal	0.5	Mayfield *et al.*, 2003
*psbD**	M-SAA	*psbA*	Terapeútico	5	Manuel *et al.*, 2007
atpA	CSFV	*rbcL*	Vacuna oral	2	He *et al.*, 2007
rbcL	hGAD-65	*rbcL*	Terapeútico	0.25-0.3	Wang *et al.*, 2008
*psbA**	14NF3	*psbA*	Terapeútico	3	Rasala *et al.*, 2010
rbcL	CTB-D2	*rbcL*	Vacuna oral	0.7	Dressen *et al.*, 2010
psaA-exon1	AcrV	*rbcL*	Vacuna	0.8	Michelet *et al.*, 2011

PST= Proteína soluble total. * Sustitución del gen *psbA* endógeno.

1.9 JUSTIFICACIÓN

El estudio de fosfatasas en general, y de fitasas en particular, es muy limitado en *C. reinhardtii,* sin embargo, la relevancia biotecnológica de las enzimas fitasas como complemento nutrimental en la industria avícola, porcícola y piscícola, para aumentar el aprovechamiento del P en los granos y harinas que se usan como alimento en esta industria se ha incrementado recientemente. Debido a que las microalgas verdes y sus productos ya se utilizan como suplementos alimenticios, es relevante conocer si una microalga verde como *C. reinhardtii* produce alguna fitasa endógena que pudiera ser utilizada también con propósitos de nutrición animal. 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 PR 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. Por lo tanto, en este trabajo se propuso la identificación y la caracterización molecular de genes nucleares homólogos a fosfatasas de tipo fitasa en esta microalga así como la obtención de un plásmido de transformación que contenga una construcción de expresión con el gen de una fitasa PTP de la bacteria *S. ruminiantum* que posteriormente pueda ser utilizado para la transformación de *C. reinhardtii* y la producción de dicha fitasa en el cloroplasto de esta microalga.

1.10 HIPÓTESIS

C. reinhardtii presenta en su genoma secuencias homólogas a fosfatasas ácidas púrpura, y alguno de estos genes se expresa diferencialmente en respuesta a la presencia de fitato en el medio de cultivo.

1.11 OBJETIVOS

1.11.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar molecularmente secuencias homólogas a fosfatasas ácidas púrpura en *C. reinhardtii*, así como generar un plásmido que permita la transformación del cloroplasto con el gen de *phyA* de *Selenomonas ruminantium.*

1.11.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar y caracterizar *in silico* secuencias homólogas a fosfatasas ácidas púrpura (*CrPAP*) en el genoma de *C. reinhardtii.*

2. Evaluar el efecto del IP_6 como única fuente de P en los parámetros de cultivo y perfil de proteínas de *C. reinhardtii.*

3. Evaluar el efecto del IP_6 como única fuente de P en la expresión de los genes *CrPAP* identificados en *C. reinhardtii.*

4. Generar un plásmido recombinante para la transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii* que contenga una construcción con el gen *phyA* que codifica para la fitasa PTP de *S. ruminantium.*

1.12 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia general de este trabajo se resume en la Figura 1.5.

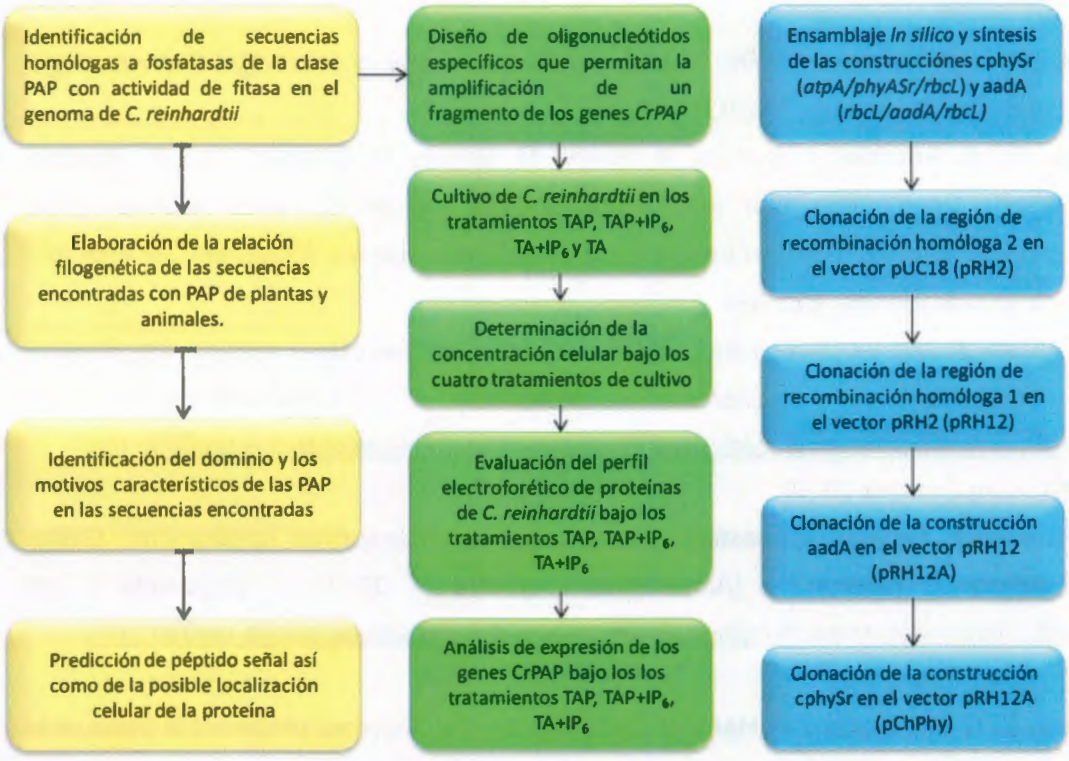

Figura 1.5 Estrategia experimental.

Los resultados correspondientes al sombreado amarillo se reportan en el capítulo II, los del sombreado en color verde se reportan en el capítulo III y los del sombreado en color azul, se reportan en el capítulo IV.

1.13 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aggarwal, S. (2008). What's fueling the biotech engine? Nature Biotechnology 26 (11), 1227-1233.

Apt, K.E. y P.W. Brekens (1999). Comercial developments in microalgal biotechnology. Journal of Phycology. 35 (2), 215-226.

Barnes, D., S. Franklin, J. Schultz, R. Henry, M. Brown, A. Coragliotti y S.P. Mayfield (2005). Contribution of 5' and 3'-unstranslated regions of plastid mRNAs to the expression of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast genes. Molecular Genetics and Genomics. 274 (6), 625-636.

BBC Research Market Forecasting (2008) Enzymes for insdustrial applications [Online] (Actualizado Enero 2008) Disponible en: http://www.bccresearch.com/report/enzymes-industrial-applications-bio030e.html [Acceso Octubre 2010]

BBC Research Market Forecasting (2011) Enzymes in Industrial Applications: Global Markets [Online] (Actualizado Enero 2011) Disponible en http://www.bccresearch.com/report/enzymes-industrial-applications-bio030f.html [Acceso Febrero 2011].

Biesgen, C. H. Hillebrand y K. Herbers (2002). Technical enzymes produced in transgenic plants. Phytochemistry Reviews. 1 (1), 79-85.

Bock, R. (2007). Plastid biotechnology: prospects for herbicide and insect resistance, metabolic engineering and molecular farming. Current Opinion in Biotechnology. 18 (2), 100-106.

Boehm, R. (2006). The use of plants and plant cell cultures for the bioproduction of proteins. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. 1, 120-125.

Borowitzka, M.A. (1999) Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. Journal of Biotechnology. 70 (1-3), 313-321.

Boynton, J., N. Gillham, E. Harris, J. Hosler, A. Johnson, A. Jones, B. Randolph-Anderson, D. Robertson, T. Klein, K. Shark y J. Sanford (1988). Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. Science. 240(4858), 1534-1538.

Brinch-Pedersen, H., L. D. Sørensen y P. B. Holm (2002). Engineering crop plants: getting a handle on phosphate. Trends in Plant Science. 7(3), 118-125.

Cai, X., C. Brown, J. Adhiya, S.J. Traina y R.T. Sayre (1999). Growth and heavy metal binding properties of transgenic *Chlamydomonas* expressing a foreign metallothionein gene. International Journal of Phytorremediation. 1(1), 53-65.

Cerutti, H., A. M. Johnson, N. W. Gillham y J. E. Boynton (1997). A eubacterial gene conferring spectinomycin resistance on *Chlamydomonas reinhardtii*: Integration into the nuclear genome and gene expression. Genetics. 145(1), 97-110.

Chen, R., G. Xue, P. Chen, B. Yao, W. Yang, Q. Ma, Y. Fan, Z. Zhao, M. Tarczynski y J. Shi (2008). Transgenic maize plants expressing a fungal phytase gene. Transgenic Research. 17 (4), 633–643.

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 *Selenomonas ruminantium* phytase in complex with persulfated phytate: DSP phytase fold and mechanism for sequential substrate hydrolysis. Structure 12(11), 2015-2024.

Coragliotti, A., M. Beligni, S. Franklin y S. Mayfield (2011). Molecular factors affecting the accumulation of recombinant proteins in the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. Molecular Biotechnology 48(1), 60-75.

Daniell, H., N. D. Singh, H. Mason y S. J. Streatfield (2009). Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. Trends in Plant Science. 14(12), 669-679.

Daniell[a], H., O.N. Ruiz, O.N. y A. Dhingra (2005). Chloroplast genetic engineering to improve agronomic traits, en: Methods in Molecular Biology, Peña, L. (ed). Humana Press Inc., New Jersey. pp. 111-136.

Daniell, H., S.J. Streatfield y K. Wycoff (2001). Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. Trends in Plant Science. 6(5), 219-226.

Daniell[b], H., S. Chebolu, S. Kumar, M. Singleton y R. Falconer (2005). Chloroplast-derived vaccine antigens and other therapeutic proteins. Vaccine. 23 (15), 1779-1783.

Davoodi-Semiromi, A., N. Samson y H. Daniell (2009). The green vaccine: A global strategy to combat infectious and autoimmune diseases. Human Vaccines. 5(7), 488-493.

Ding, S.-H., L.-Y. Huang, Y.-D. Wang, H.-C. Sun y Z.-H. Xiang. (2006). High-level expression of basic fibroblast growth factor in transgenic soybean seeds and characterization of its biological activity. Biotechnology Letters. 28(12), 869-875.

Duff, S. M. G., G. Sarath y W. C. Plaxton (1994). The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. Physiologia Plantarum. 90(4), 791-800.

Duff, S. M., W. C. Plaxton y D. D. Lefebvre (1991). Phosphate-starvation response in plant cells: de novo synthesis and degradation of acid phosphatases. Proceedings of the National Academy of Sciences. 88(21), 9538-9542.

Dunahay, T., E. Jarvis, S. Dais y P. Roessler (1996). Manipulation of microalgal lipid production using genetic engineering. Applied Biochemistry and Biotechnology 57-58(1), 223-231.

Ferrante, P., C. Catalanotti, G. Bonente y G. Giuliano (2008). An optimized, chemycally regulated gene expression system for *Chlamydomonas*. Plos One. 3(9), 1-9.

Field, C.B., M.J. Behrenfeld, J.T. Randerson y P. Falkowski (1998). Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. Science. 281(5374), 237-240.

Franklin, S.E. y S.P. Mayfield (2004). Prospects for molecular farming in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Current Opinion in Plant Biology. 7(2), 159-165.

Gleba, Y., V. Klimyuk y S. Marillonnet (2005). Magnifection a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. Vaccine. 23(17-18), 2042-2048.

Golovan[a], S. P., M. A. Hayes, J. P. Phillips y C. W. Forsberg (2001). Transgenic mice expressing bacterial phytase as a model for phosphorus pollution control. Nature Biotechnology. 19(5), 429-433.

Golovan[b], S. P., R. G. Meidinger, A. Ajakaiye, M. Cottrill, M. Z. Wiederkehr, D. J. Barney, C. Plante, J. W. Pollard, M. Z. Fan, M. A. Hayes, J. Laursen, J. P. Hjorth, R. R. Hacker, J. P. Phillips y C. W. Forsberg (2001). Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. Nature Biotechnology 19(8), 741-745.

Gomord, V., C. Sourrouille, A.-C. Fitchette, M. Bardor, S. Pagny, P. Lerouge y L. Faye (2004). Production and glycosylation of plant-made pharmaceuticals: the antibodies as a challenge. Plant Biotechnology Journal. 2(2), 83-100.

Guerrero-Olazarán, M., E.L. Cab-Barrera, L.J. Galán-Wong y J.M. Viader-Salvadó (2004). Biotecnología de PRs para la aplicación en acuacultura, en Avances en Nutrición Acuícola VII, Cruz-Suárez, L.E., Ricque, M., Nieto-López, M. G., Villarreal, D., Scholz, U., González, M. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 418-440.

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.

Harris, E. (1989). The *Chlamydomonas* sourcebook. Academic New York.

Harris, E. (2001). *Chlamydomonas* as a model organism. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 52(1), 363-406.

He, D.-M., K.-X. Qian, G.-F. Shen, Z.-F. Zhang, Y.-N. Li, Z.-L. Su y H.-B. Shao (2007). Recombination and expression of classical swine fever virus (CSFV) structural protein E2 gene in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 55(1), 26-30.

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.

Hood, E. E., D. R. Witcher, S. Maddock, T. Meyer, C. Baszczynski, M. Bailey, P. Flynn, J. Register, L. Marshall, D. Bond, E. Kulisek, A. Kusnadi, R. Evangelista, Z. Nikolov, C. Wooge, R. J. Mehigh, R. Hernan, W. K. Kappel, D. Ritland, C. Ping Li y J. A. Howard (1997). Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. Molecular Breeding. 3(4), 291-306.

Horn, M. E., S. L. Woodard y J. A. Howard (2004). Plant molecular farming: systems and products. Plant Cell Reports. 22(10), 711-720.

Huang, H., H. Luo, P. Yang, K. Meng, Y. Wang, T. Yuan, Y. Bai y B. Yao (2006). A novel phytase with preferable characteristics from *Yersinia intermedia*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 350(4), 884-889.

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 S. Yehudai-Resheff (2008). Phosphate and sulfur limitation responses in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. FEMS Microbiology Letters. 283(1), 1-8.

Kaiser, J. (2008). Is the drought over for pharming?. Science. 320(5875), 473-475.

Kim, T.-G., M.-Y. Baek, E.-K. Lee, T.-H. Kwon y M.-S. Yang (2008). Expression of human growth hormone in transgenic rice cell suspension culture. Plant Cell Reports. 27(5), 885-891.

Kindle, K. L., K. L. Richards y D. B. Stern (1991). Engineering the chloroplast genome: techniques and capabilities for chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 88(5), 1721-1725.

Koya, V., M. Moayeri, S. H. Leppla y H. Daniell (2005). plant-based vaccine: mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge. Infection and Immunity. 73(12), 8266-8274.

Kuang, R., K.-H. Chan, E. Yeung y B. L. Lim (2009). molecular and biochemical characterization of AtPAP15, a purple acid phosphatase with phytase activity, in *Arabidopsis*. Plant Physiology. 151(1), 199-209.

Kumar, S. V., R. W. Misquitta, V. S. Reddy, B. J. Rao y M. V. Rajam (2004). Genetic transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Science. 166(3), 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.

Lauersen, K. J., H. Berger, J. H. Mussgnug y O. Kruse (2013). Efficient recombinant protein production and secretion from nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii*. Journal of Biotechnology. 167(2), 101-110.

León-Bañares, R., D. González-Ballester, A. Galván y E. Fernández (2004). Transgenic microalgae as green cell-factories. Trends in Biotechnology. 22(1), 45-52.

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.

Li, J., C. E. Hegeman, R. W. Hanlon, G. H. Lacy, D. M. Denbow y E. A. Grabau (1997). Secretion of active recombinant phytase from soybean cell-suspension cultures. Plant Physiology. 114(3), 1103-1111.

Li, J.-T., L. Fei, Z.-R. Mou, J. Wei, Y. Tang, H.-Y. He, L. Wang y Y.-Z. Wu (2006). Immunogenicity of a plant-derived edible rotavirus subunit vaccine transformed over fifty generations. Virology. 356(1-2), 171-178.

Loppes, R. and R. E. Matagne (1973). Acid phosphatase mutants in *Chlamydomonas*: isolation and characterization by biochemical, electrophoretic and genetic analysis. Genetics. 75(4), 593-604.

Luan, S. (1998). Protein phosphatases and signaling cascades in higher plants. Trends in Plant Science. 3(7), 271-275.

Lung, S.-C., A. Leung, R. Kuang, Y. Wang, P. Leung y B.-L. Lim (2008). Phytase activity in tobacco (*Nicotiana tabacum*) root exudates is exhibited by a purple acid phosphatase. Phytochemistry. 69(2), 365-373.

Ma, Julian K. C., Pascal M. W. Drake, y Paul Christou (2003) The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. Nature Reviews Genetics 4(10), 794-805.

Manuell, A. y S. Mayfield (2006). A bright future for *Chlamydomonas*. Genome Biology. 7(9), 327.

Mata, T. M., A. A. Martins y N. S. Caetano (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14(1), 217-232.

Matagne, R. F., R. Loppes y R. Deltour (1976). Phosphatase of *Chlamydomonas reinhardi*: biochemical and cytochemical approach with specific mutants. J. Bacteriol. 126(2), 937-950.

Maul, J. E., J. W. Lilly, L. Cui, C. W. dePamphilis, W. Miller, E. H. Harris y D. B. Stern (2002). The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats. The Plant Cell Online. 14(11), 2659-2679.

Mayfield, S. P., A. L. Manuell, S. Chen, J. Wu, M. Tran, D. Siefker, M. Muto y J. Marin-Navarro (2007). *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. Current Opinion in Biotechnology. 18(2), 126-133.

Mayfield, S. P., S. E. Franklin y R. A. Lerner (2003). Expression and assembly of a fully active antibody in algae. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 100(2), 438-442.

McBride, K. E., Z. Svab, D. J. Schaaf, P. S. Hogan, D. M. Stalker y P. Maliga (1995). Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. Nature Biotechnology. 13(4), 362-365.

Merchant, S. S., S. E. Prochnik, O. Vallon, E. H. Harris, S. J. Karpowicz, G. B. Witman, A. Terry, A. Salamov, L. K. Fritz-Laylin, L. Maréchal-Drouard, W. F. Marshall, L.-H. Qu, D. R. Nelson, A. A. Sanderfoot, M. H. Spalding, V. V. Kapitonov, Q. Ren, P. Ferris, E. Lindquist, H. Shapiro, S. M. Lucas, J. Grimwood, J. Schmutz, P. Cardol, H. Cerutti, G. Chanfreau, C.-L. Chen, V. Cognat, M. T. Croft, R. Dent, S. Dutcher, E. Fernández, H. Fukuzawa, D. González-Ballester, D. González-Halphen, A. Hallmann, M. Hanikenne, M. Hippler, W. Inwood, K. Jabbari, M. Kalanon, R. Kuras, P. A. Lefebvre, S. D. Lemaire, A. V. Lobanov, M. Lohr, A. Manuell, I. Meier, L. Mets, M. Mittag, T. Mittelmeier, J. V. Moroney, J. Moseley, C. Napoli, A. M. Nedelcu, K. Niyogi, S. V. Novoselov, I. T. Paulsen, G. Pazour, S. Purton, J.-P. Ral, D. M. Riaño-Pachón, W. Riekhof, L. Rymarquis, M. Schroda, D. Stern, J. Umen, R. Willows, N. Wilson, S. L. Zimmer, J. Allmer, J. Balk, K. Bisova, C.-J. Chen, M. Elias, K. Gendler, C. Hauser, M. R. Lamb, H. Ledford, J. C. Long, J. Minagawa, M. D. Page, J. Pan, W. Pootakham, S. Roje, A. Rose, E. Stahlberg, A. M. Terauchi, P. Yang, S. Ball, C. Bowler, C. L. Dieckmann, V. N. Gladyshev, P. Green, R. Jorgensen, S. Mayfield, B. Mueller-Roeber, S. Rajamani, R. T. Sayre, P. Brokstein, I. Dubchak, D. Goodstein, L. Hornick, Y. W. Huang, J. Jhaveri, Y. Luo, D. Martínez, W. C. A. Ngau, B. Otillar, A. Poliakov, A. Porter, L. Szajkowski, G. Werner, K. Zhou, I. V. Grigoriev, D. S. Rokhsar y A. R. Grossman (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions.

Science. 318(5848), 245-250.

Michelet, L., L. Lefebvre-Legendre, S. E. Burr, J.-D. Rochaix y M. Goldschmidt-Clermont (2011). Enhanced chloroplast transgene expression in a nuclear mutant of *Chlamydomonas*. Plant Biotechnology Journal. 9(5), 565-574.

Miller, S. S., J. Liu, D. L. Allan, C. J. Menzhuber, M. Fedorova y C. P. Vance (2001). Molecular Control of Acid Phosphatase Secretion into the Rhizosphere of Proteoid Roots from Phosphorus-Stressed White Lupin. Plant Physiology. 127(2), 594-606.

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.

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.

Nilsson, L., R. Müller y T. H. Nielsen (2010). Dissecting the plant transcriptome and the regulatory responses to phosphate deprivation. Physiologia Plantarum. 139(2), 129-143.

Nochi, T., H. Takagi, Y. Yuki, L. Yang, T. Masumura, M. Mejima, U. Nakanishi, A. Matsumura, A. Uozumi, T. Hiroi, S. Morita, K. Tanaka, F. Takaiwa y H. Kiyono (2007). Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination. Proceedings of the National Academy of Sciences. 104(26), 10986-10991.

Oey, M., M. Lohse, B. Kreikemeyer y R. Bock (2009). Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. The Plant Journal. 57(3), 436-445.

Pavlou, A. K. (2004). The market of therapeutic recombinant proteins to 2010. Journal of Commercial Biotechnology. 10(4), 363-367.

Patni, N. J., S. W. Dhawale y S. Aaronson (1977). Extracellular phosphatases of *Chlamydomonas reinhardi* and their regulation. Journal of Bacteriology. 130(1), 205-211.

Peng, R.-H., Q.-H. Yao, A.-S. Xiong, Z.-M. Cheng y Y. Li (2006). Codon-modifications and an endoplasmic reticulum-targeting sequence additively enhance expression of an *Aspergillus* phytase gene in transgenic canola. Plant Cell Reports. 25(2), 124-132.

Plaxton, W. C. y H. T. Tran (2011). Metabolic adaptations of phosphate-starved plants. Plant Physiology. 156(3), 1006-1015.

PR Newswire (2010) Reportlinker Adds Global Industrial Enzymes Market: An Analysis [Online] (Actualizado 18 Noviembre 2010) Disponible en: http://www.prnewswire.com/news-releases/reportlinker-adds-global-industrial-enzymes-market-an-analysis-108979419.htmlhttp://www.biopharma.com/approvals.html [Acceso Octubre 2011]

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.

Pulz, O. y W. Gross (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology. 65(6), 635-648.

Quisel, J. D., D. D. Wykoff y A. R. Grossman (1996). Biochemical characterization of the extracellular phosphatases produced by phosphorus-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiology. 111(3), 839-848.

Rao, D. E. C. S., K. V. Rao, T. P. Reddy y V. D. Reddy (2009). Molecular characterization, physicochemical properties, known and potential applications of phytases: An overview. Critical Reviews in Biotechnology. 29(2), 182-198.

Rasala, B. A., M. Muto, P. A. Lee, M. Jager, R. M. F. Cardoso, C. A. Behnke, P. Kirk, C. A. Hokanson, R. Crea, M. Mendez y S. P. Mayfield (2010). Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Biotechnology Journal. 8(6), 719-733.

Rasala, B. A., P. A. Lee, Z. Shen, S. P. Briggs, M. Mendez y S. P. Mayfield (2012). Robust expression and secretion of xylanase1 in *Chlamydomonas reinhardtii* by fusion to a selection gene and processing with the FMDV 2A peptide. PLoS ONE. 7(8), e43349.

Remacle, C., P. Cardol, N. Coosemans, M. Gaisne y N. Bonnefoy (2006). High-efficiency biolistic transformation of *Chlamydomonas* mitochondria can be used to insert mutations in complex I genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 103(12), 4771-4776.

Rochaix, J. (1995). *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. Annual Review of Genetics. 29(1), 209-230.

Scheller, J., K.-H. Guhrs, F. Grosse y U. Conrad (2001). Production of spider silk proteins in tobacco and potato. Nature Biotechnology. 19(6), 573-577.

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

Simon, O. y F. Igbasan (2002). *In vitro* properties of phytases from various microbial origins. International Journal of Food Science & Technology. 37(7), 813-822.

Sun, M., K. Qian, N. Su, H. Chang, J. Liu y G. Shen (2003). Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. Biotechnology Letters. 25(13), 1087-1092.

Svab, Z., P. Hajdukiewicz y P. Maliga (1990). Stable transformation of plastids in higher plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 87(21), 8526-8530.

Tang, J., A. Leung, C. Leung y B. L. Lim (2006). Hydrolysis of precipitated phytate by three distinct families of phytases. Soil Biology and Biochemistry. 38(6), 1316-1324.

Tran, T., G. Mamo, B. Mattiasson y R. Hatti-Kaul (2010). A thermostable phytase from *Bacillus* sp. MD2: cloning, expression and high-level production in *Escherichia coli*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 37(3), 279-287.

Tregoning, J. S., S. Clare, F. Bowe, L. Edwards, N. Fairweather, O. Qazi, P. J. Nixon, P. Maliga, G. Dougan y T. Hussell (2005). Protection against tetanus toxin using a plant-based vaccine. European Journal of Immunology. 35(4), 1320-1326.

Ullah, A. H. J., K. Sethumadhavan, E. J. Mullaney, T. Ziegelhoffer y S. Austin-Phillips (2002). Cloned and expressed fungal *phyA* gene in alfalfa produces a stable phytase. Biochemical and Biophysical Research Communications. 290(4), 1343-1348.

Verma, D., A. Kanagaraj, S. Jin, N. D. Singh, P. E. Kolattukudy y H. Daniell (2010). Chloroplast-derived enzyme cocktails hydrolyse lignocellulosic biomass and release fermentable sugars. Plant Biotechnology Journal. 8(3), 332-350.

Walker, T., S. Purton, D. Becker y C. Collet (2005). Microalgae as bioreactors. Plant Cell Reports. 24(11), 629-641.

Wang, X., M. Brandsma, R. Tremblay, D. Maxwell, A. Jevnikar, N. Huner y S. Ma (2008). A novel expression platform for the production of diabetes-associated autoantigen human glutamic acid decarboxylase (hGAD65). BMC Biotechnology. 8(1), 87.

Xiao, K., M. J. Harrison y Z. Y. Wang (2005). Transgenic expression of a novel M. truncatula phytase gene results in improved acquisition of organic phosphorus by Arabidopsis. Planta. 222(1), 27-36.

Yao, M. Z., Y. H. Zhang, W. L. Lu, M. Q. Hu, W. Wang y A. H. Liang (2012). Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications. Journal of Applied Microbiology. 112(1), 1-14.

Yang, M., S. C. Johnson y P. P. N. Murthy (2012). Enhancement of alkaline phytase production in *Pichia pastoris*: Influence of gene dosage, sequence optimization and expression temperature. Protein Expression and Purification. 84(2), 247-254.

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.

Zhang, L., L. An, X. Gao and Y. Wang (2005). Properties of *A. ficuum* AS3.324 phytase expressed in tobacco. Process Biochemistry. 40(1), 213-216.

Zhang, Z. B., E. T. Kornegay, J. S. Radcliffe, J. H. Wilson y H. P. Veit (2000). Comparison of phytase from genetically engineered *Aspergillus* and canola in weanling pig diets. Journal of Animal Science. 78(11), 2868-2878.

Zidenga, T. (2007). Metabolic engineering through plastid transformation. ISB News Report. June.

CAPÍTULO II

2. CARACTERIZACIÓN *in silico* DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS A FOSFATASAS ÁCIDAS PÚRPURA (PAP) EN EL GENOMA DE *C. reinhardtii*

Parte de los resultados de este capítulo fueron publicados en: Rivera-Solís, R., S. Peraza-Echeverria, I. Echevarría-Machado y V. Herrera-Valencia (2013). *Chlamydomonas reinhardtii* has a small family of purple acid phosphatase homologue genes that are differentially expressed in response to phytate. Annals of Microbiology.1-9 (Anexo 1).

2.1 INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es un nutrimento esencial en los procesos metabólicos y componente vital de la estructura de las biomoléculas tanto en organismos terrestres como acuáticos. Sin embargo, la mayoría del P se encuentra en forma de compuestos orgánicos y solo puede ser asimilado por estos organismos después de haber sido hidrolizados en fosfato inorgánico (ortofosfato, Pi) por medio de fosfatasas (Yadav y Tarafdar 2001; Tarafdar y Jugk 1987). El fitato (*myo*-inositol hexakisfosfato; IP_6), es la principal forma de almacenamiento de P en los granos de cereales y leguminosas representando entre el 60 y el 90% del P contenido en las plantas (Rao *et al.,* 2009) y en la mayoría de los suelos es el componente principal del P orgánico contenido en ellos (Turner *et al.,* 2002).

Las fitasas (*myo*-inositol hexakisfosfato fosfohidrolasa; EC 3.1.3.8, EC 3.1.3.72 y EC 3.1.3.26) son enzimas hidrolíticas que catalizan la ruptura de los enlaces fosfomonoester en el IP_6 para liberar Pi (Mullaney y Ullah 2003), y han sido encontradas en microorganismos, plantas y animales (Konietzny y Greiner 2002). Las fitasas de algunos microorganismos son empleadas en la actualidad como suplementos alimenticios para animales monogástricos (cerdos y aves), ya que éstos presentan poca o nula actividad de fitasa para digerir el IP_6 contenido en los granos utilizados para su alimentación. Esta práctica no solo permite tener una mayor cantidad de P disponible para el consumo de los animales, sino que además disminuye la excreta del IP_6 hacia el medio ambiente (Dionisio *et al.,* 2011, Cheng *et al.*, 1999). Interesantemente, algunas fitasas son capaces de utilizar substratos diferentes para liberar Pi, incluyendo glucosa-6-fosfato, ATP y fenil-fosfato (Rao *et al.,* 2009).

De acuerdo a su estructura molecular, las fitasas pueden ser clasificadas en cuatro clases: 1) Fosfatasas ácidas de histidina (HAP), 2) Fitasas β-propela (BPP) 3) Fosfatasas de tirosina (PTP) y 4) fosfatasas ácidas púrpura (PAP) (Puhl *et al.*, 2007; Mullaney y Ullah 2003). Las fitasas de la clase BPP son consideradas como fitasas alcalinas, en tanto que las de las clases HAPs, PTPs y las PAPs son consideradas como fitasas ácidas (Yao *et al.*, 2011). Únicamente las fitasas clase HAP y PAP han sido reportadas en plantas (Dionisio *et al.*, 2011). Los genes de las fitasas PAP que han sido aislados a partir de plantas incluyen especies como *Glycine max* (Hegeman y Grabau 2001), *Arabidopsis thaliana* (Kuang *et al.*, 2009), *Nicotiana tabacum* (Lung *et al.*, 2008) y *Medicago truncatula* (Xiao *et al.*, 2005).

Las enzimas PAP, han sido encontradas en varios hongos, plantas y animales (Schenk *et al.*, 2000), y secuencias tipo PAP han sido identificadas en genomas de tipo procariota (Yeung *et al.*, 2009). Estas enzimas en el caso de las plantas se ha reportado que participan en la adquisición de P (Lung *et al.*, 2008), en la generación de especies reactivas de oxígeno (Liao *et al.*, 2003), en el desarrollo floral (Zhu *et al.*, 2005) y en la biosíntesis de pared celular (Kaida *et al.*, 2010). En el caso de los animales, se cree que están involucradas en el transporte de hierro (Nuttleman y Roberts, 1990) y en la reabsorción ósea (Ek-Rylander *et al.*, 1994)

Las PAPs son glucoproteínas que contienen un centro metálico binuclear compuesto por Fe(III)-Fe(II), Fe(III)-Zn(II) o Fe(III)-Mn(II) (Schenk *et al.*, 1999; Klabunde *et al.*, 1995) y se caracterizan por su intenso color rosado o violeta, su pH bajo para llevar a cabo su actividad enzimática y por su resistencia a la inhibición por tartrato (Vincent *et al.*, 1990). Los sitios de unión a los metales se encuentran en siete residuos aminoacídicos distribuidos dentro de cinco bloques conservados [DXG, GDXXY, GNHE/D, VXXH, GHXH] los cuales dan lugar a la firma característica de las PAPs (Schenk *et al.*, 2000).

C. reinhardtii es una microalga verde que ha sido usada como organismo modelo tanto para estudios fisiológicos como genéticos (Harris 2001), incluyendo el estudio del metabolismo del P (Shimogawara *et al.*, 1999). Se ha sugerido que el genoma poliploide del cloroplasto de esta microalga pudiera ser empleado como almacén de P en *C. reinhardtii*, y que el cloroplasto pudiera contribuir a la movilización del P durante la

limitación de este elemento (Yehudai-Resheff *et al.,* 2007). No se han identificado y caracterizado genes que codifiquen para una fitasa en esta microalga; sin embargo, se ha reportado la existencia de algunas fosfatasas en *C. reinhardtii*, incluyendo la presencia de fosfatasas extracelulares inducibles por la privación de P (Quisel *et al.,* 1996; Patni *et al.,* 1977; Matagne *et al.,* 1976). A pesar de lo anterior, ninguna de estas fosfatasas ha sido caracterizada con respecto a su composición polipeptídica, ni a sus genes.

El objetivo de este capítulo fue identificar y caracterizar *in sílico* genes homólogos a fosfatasas de la clase PAP de plantas en el genoma de *C. reinhardtii*, con el fin de sentar las bases para el estudio de su potencial como fitasas.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.

2.2.1 Análisis *in silico* de genes tipo PAP en el genoma de *C. reinhardtii*

En la búsqueda realizada con el programa BLASTP (Altschul *et al.,* 1997) se emplearon como referencia secuencias proteicas de fitasas PAP de las de *G. max* (GenBank AAK49438.1), *A. thaliana* (GenBank AAN74650.1) *N. tabacum* (GenBank ABP96799.1) y *M. truncatula* (GenBank AAX71115.1). Este análisis se realizó con el finde encontrar homólogos a esta enzima en la secuencia del genoma de *C. reinhardtii* versión 4.3 que se encuentra disponible en la base de datos Phytozome v8.0 (http://www.phytozome.net/search.php).

Con la finalidad de evitar la omision de alguna secuencia de fosfatasa presente en el genoma de *C. reinhardtii,* las secuencias homólogas encontradas inicialmente en el genoma de *C. reinhardtii*, fueron usadas como nueva referencia para llevar a cabo un segundo rastreo de posibles fosfatasas en el genoma nuclear de *C. reinhardtii.* Adicionalmente, fueron utilizadas otras secuencias proteicas tipo PAP para llevar a cabo esta búsqueda. Las secuencias utilizadas fueron de *G. max* (GenBank: AAF19820.1, AAN85416.1 y AAF60316.1).

Además, fueron seleccionadas secuencias peptídicas pertenecientes a cada una de las tres clases de fitasas restantes y que han sido reportados previamente en la literatura. Las secuencias seleccionadas fueron las siguientes:

- Fitasa clase HAP: *Aspergillus niger phyA* (CAA78904.1)
- Fitasa clase β-propela: *Bacillus subtillis phyC* (ACR78677.1)
- Fitasa clase PTP: *Selenomonas ruminantium* (AAQ13669.1)

Los porcentajes de identidad entre los aminoácidos de las proteínas predichas fueron determinados con el programa MegAlign del paquete bioinformático Lasergene versión 7.2 (DNASTAR, Madison, WI). Los dominios conservados fueron predichos con la base de datos SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/) (Letunic *et al.,* 2012), y con la base de datos de dominios conservados (CDD) del NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd).

2.2.2 Alineamiento múltiple de secuencias

Las proteínas predichas fueron alineadas con el programa ClustalX v2.0 con los parámetros pre-establecidos (Larkin *et al.,* 2007). Los residuos aminoacídicos idénticos fueron sombreados en el alineamiento con color negro y las substituciones conservativas con color gris usando el programa en línea Boxshade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Con la finalidad de identificar la firma característica de las metalofosfoesterasas PAP presentes en la secuencias CrPAP, se incluyeron secuencias proteicas de fitasas PAP de *G. max* (Gmphy) (GenBank AAK49438.1), *A. thaliana* (Atphy) (GenBank AAN74650.1), *N. tabacum* (Ntphy) (GenBank ABP96799.1) y *M. truncatula* (Mtphy) (GenBank AAX71115.1).

2.2.3 Análisis filogenético

El árbol filogenético fue construido empleando el método de "Neighbor Joining" (NJ) (Saitou y Nei 1987) con una corrección de tipo Poisson (Zuckerkandl y Pauling 1965) y empleando el algoritmo de NJ incluido en el programa bioinformático "Molecular Evolutionary Genetic Analysis" (MEGA) versión 5 (Tamura *et al.*, 2011).

Se empleó un Bootstrap de 1000 réplicas para evaluar el grado de soporte para los patrones de agrupamiento dentro del árbol filogenético. Para el análisis filogenético fueron incluidas secuencias de fitasas PAP ya caracterizadas y secuencias tipo PAP de las plantas usadas por Dionisio y colaboradores (2011). De manera adicional, la secuencia proteica Gmphy fue usada como referencia para llevar a cabo un análisis en BLASTP con

la finalidad de obtener secuencias tipo PAP fitasa a partir de los genomas de diferentes especies de microalgas como: *Ostreococcus tauri*, *Ostreococcus lucimarinus*, *Ostreococcus* sp. *RCC809*, *Micromonas pusilla CCMP 1545*, *Micromonas sp. RCC299*, *Coccomixa sp. C-169*, *Chlorella variabilis NC64A* y *Volvox carteri f. nagariensis*, disponibles en el portal de genomas del Joint Genome Institute (JGI, http://genome.jgi.doe.gov/). Además, se incluyeron secuencias de proteínas PAP de organismos tales como *Sus scrofa* (GenBank P09889), *Homo sapiens* (GenBank P13686), *Mus musculus* (GenBank Q05117) y *Ratus norvergicus* (GenBank P29288). Para la construcción del árbol filogenético únicamente se consideró la región entre el primer motivo conservado de las PAPs (DXG) (Schenk *et al.*, 2000) y el bloque conservado que contiene el octavo residuo de Cys, reportado por Kuang y colaboradores (2009) en la secuencia de Atphy.

2.2.4 Predicción de péptido señal

La predicción de péptidos señal en las secuencias CrPAP se realizó con el programa bioinformático SignalP 3.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) que predice la existencia de péptidos señal, la longitud y el sitio de corte de este. Para determinar en qué sitio era probable que las secuencias tipo PAP encontradas en el genoma de *C. reinhardtii* llevaran a cabo su actividad catalítica se predijo su ubicación intracelular, empleando el programa TargetP (http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/). Ambos programas fueron utilizados con los parámetros predeterminados.

2.2.5 Predicción de elementos de respuesta *cis* en los promotores de las secuencias *CrPAP*

La predicción de elementos de respuesta en *cis* de los promotores de las secuencias CrPAP fue realizada con el programa PLACE (Plant Cis Acting Regulatory DNA Elements) (http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/) (Higo *et al.*, 1999). Para ello se analizaron 1000 bases previas al sitio de inicio de la traducción. PLACE es una base de datos que recopila a partir de reportes previos los elementos reguladores de ADN responsivos encontrados en *cis* en plantas. Esta base de datos proporciona una breve descripción de cada uno de los motivos, así como la literatura relacionada con dicho elemento.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Identificación de secuencias homólogas a fosfatasas ácidas púrpuras (PAP) en el genoma de *C. reinhardtii*

La búsqueda de secuencias clase PAP en el genoma de *C. reinhardtii* mediante el programa BLASTP se realizó empleando como referencia las secuencias de fitasas clase PAP mencionadas previamente en materiales y métodos.

La búsqueda por similitud usando la secuencia proteica de la fitasa PAP Gmphy dio como resultado cinco secuencias homólogas, la cuales fueron nombradas como CrPAP1, CrPAP2, CrPAP3, CrPAP4 y CrPAP5. En el caso de CrPAP1 fue la secuencia con el menor valor de E ($1.3e^{-77}$) y CrPAP5 el valor de E más elevado ($9.6e^{-17}$). Se obtuvo una secuencia más usando la secuencia PAP de *G. max* (GenBank AAF60316.1), con un valor de E de $2.4e^{-34}$, y fue nombrada como CrPAP6. No se encontraron más secuencias homólogas al realizar la búsqueda con las seis secuencias CrPAP encontradas previamente. Los datos anteriores se pueden visualizar en el Cuadro 2.1.

Cuadro 2.1 Secuencias homólogas tipo PAP encontradas en el genoma de *C. reinhardtii.*

Locus	Código	Score	E	Similitud	Cobertura de la secuencia
Cre16.g672250	CrPAP1	287.3	$1.3e^{-77}$	36.3%	83.5%
Cre13.g578350	CrPAP2	259.6	$2.6e^{-69}$	33.0%	80.4%
Cre11.g476700	CrPAP3	248.8	$4.7e^{-66}$	33.1%	80.4%
Cre11.g468500	CrPAP4	98.2	$1.0e^{-20}$	25.7%	52.4%
Cre12.g500200	CrPAP5	85.1	$9.6e^{-17}$	43.3%	17.1%
Cre06.g259650	CrPAP6	142.9	$2.4e^{-34}$	29.7%	90.3%

Cabe señalar que la búsqueda con las secuencias de *Aspergillus niger phyA* (CAA78904.1) de la clase HAP, *Bacillus subtillis phyC* (ACR78677.1) de la clase β-propela y *Selenomonas ruminantium* (AAQ13669.1) de la clase PTP, no arrojó resultados significativos, por lo tanto se consideró que no existen esta clase de secuencias en el genoma de *C. reinhardtii.*

Todas las secuencias CrPAP encontradas fueron analizadas con la finalidad de predecir sus características bioquímicas, como su peso molecular y su punto isoeléctrico (pI). En este sentido el peso molecular de las seis CrPAPs estuvo entre 47.92 KDa en el caso de la CrPAP6 y 75.29 para la CrPAP4. Por otro lado, los puntos isoeléctricos de la mayoría de las CrPAPs, con excepción de CrPAP5, fueron mayor que el de Gmphy (Cuadro 2.2).

El porcentaje de identidad de la secuencias proteicas predichas para las CrPAPs de *C. reinhardtii,* en comparación con las fitasas de plantas denominadas Atphy, NtPhy, Mtphy y Gmphy estuvo entre el 26.8% (CrPAP4 vs Gmphy) y 55.1% (CrPAP1 vs Atphy), mientras que el porcentaje de identidad entre los homólogos de *C. reinhardtii* fue de 15.4% (CrPAP4 vs CrPAP5) hasta 90.2% (CrPAP2 vs CrPAP3) (Cuadro 2.3).

Cuadro 2.2 PAP homólogas de *C. reinhardtii.* Predicción del tamaño del marco de lectura abierto (ORF), así como la longitud, peso molecular y punto isoeléctrico de las proteínas correspondientes. Gmphy: fitasa de *Glycine max*.

Secuencia	ORF (pb)	Proteína (a.a)	Peso molecular (kDa)	Punto isoeléctrico (pI)
CrPAP1	1674	557	60.84	8.50
CrPAP2	1899	632	69.73	6.32
CrPAP3	1890	629	69.22	6.54
CrPAP4	2076	691	75.29	5.85
CrPAP5	1914	637	70.22	4.46
CrPAP6	1308	435	47.92	6.07
Gmphy	1644	547	62.25	5.21

En las seis secuencias CrPAP se identificaron los siete aminoácidos que sirven de sitio de unión a metales dentro de los cinco motivos consenso presentes en las metalofosfoesterasas tipo PAP. Estos motivos consenso se pueden observar en el Cuadro 2.4 y la ubicación de los mismos se indica en la Figura 2.1.

Cuadro 2.3 Porcentaje de identidad de las secuencias CrPAP1-6 comparadas con las fitasas PAP de plantas. Atphy: fitasa de *Arabidopsis thaliana*; Ntphy: fitasa de *Nicotiana tabacum*; Mtphy: fitasa de *Medicago truncatula*; Gmphy: fitasa de *Glycine max*.

	CrPAP1	CrPAP2	CrPAP3	CrPAP4	CrPAP5	CrPAP6	Atphy	Ntphy	Mtphy	Gmphy
CrPAP1		43.2	44.1	26.7	30.5	32.5	55.1	54.3	54.7	52.4
CrPAP2	---------		90.2	22.8	25.9	27.1	47.2	48.8	48.1	45.1
CrPAP3	---------	---------		22.5	25.9	26.9	46.9	48.9	47.9	45.0
CrPAP4	---------	---------	---------		15.4	19.5	29.1	28.1	29.2	26.8
CrPAP5	---------	---------	---------	---------		34.8	31.8	30.5	31.0	30.3
CrPAP6	---------	---------	---------	---------	---------		36.3	35.8	35.5	35.1
Atphy	---------	---------	---------	---------	---------	---------		81.7	82.2	77.2
Ntphy	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------		84.4	75.3
Mtphy	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	-------		76.0
Gmphy	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	-------	---------	

Cuadro 2.4 Motivos consenso encontrados en las PAPs de *C. reinhardtii*. En negritas se destaca el residuo que debe de permanecer conservado para conferir actividad de metalofosfoesterasa. Los motivos consenso son los descritos por Schenk *et al.*, (2000).

Código	Consenso				
	I	II	III	IV	V
	DXG	GDXX**Y**	G**N**HE/D	VXX**H**	G**H**X**H**
CrPAP1	**D**VS	GDFA**Y**	G**N**HE	AMW**H**	G**H**V**H**
CrPAP2	**D**VG	GDNS**Y**	A**N**HE	VQF**H**	G**H**V**H**
CrPAP3	**D**IG	GDNT**Y**	A**N**HE	VQF**H**	G**H**V**H**
CrPAP4	**D**MG	GDIS**Y**	G**N**HE	VGG**H**	G**H**H**H**
CrPAP5	**D**MG	GDLA**Y**	G**N**HE	VGI**H**	G**H**V**H**
CrPAP6	**D**WG	GDNF**Y**	G**N**HD	VGH**H**	G**H**E**H**

Además se observó que en las secuencias CrPAP1, CrPAP2 y CrPAP3 se encuentra conservado un residuo de Cys (Figura 2.1), el cuál ha sido reportado previamente y se cree que pudiera estar involucrado en la formación de un puente disulfuro que es el responsable de formar un homodímero en las PAPs de *A. thaliana* (Li *et al.*, 2002).

```
Atphy      1 ---------------------MTFL-L------LLFCF--SPA-SSAHS-----------
Gmphy      1 ------------------MASITFS-LQFHRAPILL-LL--LAGFGHCH------------
Ntphy      1 ---------------------MKYSGFVVSILVWFL-F-SLVE-NK-GQ-----------
Mtphy      1 ---------------------MGSV-VHTHVVTLCM-V-SLSS-LVHGG-----------
CrPAP1     1 ------------------------------MSRS-VSIAAALALFG-----------
CrPAP2     1 ------------------MAYSRLV-ALSALALAGV-VNADVQ-HADDDDAWLRKDFRRN
CrPAP3     1 ------------------MAQSRLA-ALSALVLAAA-VNAEVQ-HTADDDAWLLPNFRRN
CrPAP4     1 MAPKAGVWPPVLLPLLLVGAAFTAP-LGAGRGHASSAT-RAAD-QQQASIAAGASQLAPH
CrPAP5     1 ------------------------------------------------------------
CrPAP6     1 -------------------------AALGNGSQHTA-RADYD-EDEDR----------F

Atphy     22 -PSTLDGPFVPV-VLL-TSLR-QI-IDLP-TDPR-RR--RVIGFE--------QISLS
Gmphy     30 -PSTLEGPFDPV-VLF-PALR-V-VDLPETDPR-RR--RVRGFE--------QISLS
Ntphy     28 -PTTVDGPF-PV-VLL-QSFR-H-VDLP-TDPR-QR--TVKGFE--------QISLS
Mtphy     29 -VPTTLDGPF-PV-VLL-KSFR-N-VDLP-TDPL-QR--NVEAFQ--------QISLS
CrPAP1    17 AAHAGITVRHPEIAALYGSSQPEA-TGFAELGGFALPKNSSYLQP-------AGKAEQ
CrPAP2    43 MIAEAGNTAYIHEV-HCIPKAV-SVAGCF-QNIPAVGNIDYKFGAIQVSYPTDGSPWG-H
CrPAP3    43 MIAEAGGAAYIHEV-HCIPAAV-SVAGCY-QGIPAVGNVDFKFGSIQVAYPTDGTPWG-H
CrPAP4    61 DVDAQIHAYLELERSRVGSFHQPLERLRVAAVTEQPDPKIQIHVDRQELADGSG-WFT-T
CrPAP5     1 -YAHKGFREGLMCDS-AKKKRFSVIMHTALMTDLIPDTAYWYQLGD--------SGRITD
CrPAP6    26 F-SGVEKIGAIRNIYEIQLKRKKLIVGIGISIGV-GLVALILGLAYG----LSRRKIDYV

Atphy     71 SSDH---SLVVTT-EFQ-----------------------------------------
Gmphy     79 STSH---SVVISVVT-EFQ-----------------------------------------
Ntphy     77 SSTH---SVVISVIT-EYQ-----------------------------------------
Mtphy     78 STSH---SVVISVIT-EFQ-----------------------------------------
CrPAP1    70 VVVT-QSAGEVVISVV-HSAVC----NDLTCAAVP-------------------------
CrPAP2   103 TGP-PDGRTYLV-YV-APT-------------------------------------
CrPAP3   103 TGP-PDGRTYLV-YF-GPT-------------------------------------
CrPAP4   121 WTGVDSPAYDD-LAVV-PADADLSATMPAKFRLISYRQPVAISFMRHGFDRAVEAARSAP
CrPAP5    52 FSSPKSRGSDSRF-FI-------------------------------------------
CrPAP6    82 CPRTYDASKTDLVFFVVS-----------------------------------------

Atphy     91 ----------KKVKP-------------LLTSINSV-QF-TLRH--SLSDE-KKHS---
Gmphy     99 ----------LDIKP-------------LLKTVSSV-QY-TSRF--ELVEI-RQS---
Ntphy     97 ----------DNIKP-------------LLSKVGSV-QY-KDKS--SLFIK-IIES---
Mtphy     98 ----------ENIEP-------------LLETVGSI-QY-RFGR--SMNGQ-VVYS---
CrPAP1   102 ----------------------------MAAG-SDVRY-TSRSSLKARAYGAGY---
CrPAP2   126 ----------ASVMR-------------PVVCGDKTYAAVRKAGAKGWTKITGSVVN---
CrPAP3   126 ----------ATVTR-------------TILSGMKTYAAVRKAGAKGWVKISGSVIN---
CrPAP4   181 IQVLRPNEPLQVHLALTGTAGEMRVQWNTRDVGVAPQ-RV-PASVPYSPRRAIQ-CVGKK
CrPAP5    68 ------------------------------------------------------------
CrPAP6   100 ------------------------------------------------------------

Atphy    123 -------------LVISQLYF----------------DGTLIIISGIIHHVRIIIIHS
Gmphy    131 -------------LIINQLYF----------------EGTQIIISGIIHHQKKIEES
Ntphy    129 -------------LIINQLYF----------------EGTQIIISGIIHHQTGIIIN
Mtphy    130 -------------LVISQLYF----------------EGLQIIISGIIHHVRGIIIN
CrPAP1   130 -------------YTQDYYF-ASLNVTGVSD-------NTQFIIISGRIYSARIGIISA
CrPAP2   160 -------------YIRAYTD-A----------------LVNGTILIPQIHHVVPHIDIN
CrPAP3   160 -------------YIRAYSD-S----------------LVNGTILIPQIHHVVPRIDIN
CrPAP4   241 DKKKKKDDDDDDGPAIPHTA-VDRSFAYQREDMCGGAAISGGWVDA-THIVATIIGIIIA
CrPAP5    68 ------------------------------------------------------------
CrPAP6   100 ------------------------------------------------------------

                                                  I

Atphy    154 IIIIRCHHRRVSKIHHFTMPVSPSSHGHIAVVIILLIYTTDIISHIIHHS
Gmphy    162 LLIIICHHLQVSDIYFTMPISGSKSHGKVAVVIILLIYTTIIIGHITSHE
Ntphy    160 LLIIICHHIPVSTIYHFTMPISPKSHKHIAIVIILLIYTTISVSHIMGID
Mtphy    161 LLIIICHHLSVSDVHFTMPVSGPKSHSHIAVVIILLIYTTISVNHMISHH
CrPAP1   170 RRIISLKDAVRSFKTTPRGAFPGS----------MAVVSVSVVAIEIIRKIGLSN
CrPAP2   191 FIIIVVMNGQLIGEYRKTLPGPGKSVHILVGLIAVVQVVSSDIRDHMAKK
CrPAP3   191 FIIIVLMGKLVGEYRKTLPGPGKTVHILVGLIAIIQVVSSDIRDHMAKK
CrPAP4   301 RRIIRVSSQGDFGWSKEVSFVSAPPAGPAGTVALFAMMQAEVDGLEGSQILPSL
CrPAP5    68 ---------------------------------------AFHMME-SHVKKKAPIA----
CrPAP6   100 ------------------------------------------HWRAGIDNQRRTARIMAD-
```

```
                                                   II
Atphy      214 DV---------------------------ILLIGDVSYANLYLTNGTSSDCYSCSFPEIP
Gmphy      222 DV---------------------------ILLIGDVTYANLYLTNGTGSDCYSCSFPLIP
Ntphy      220 NI---------------------------VLLVGDVTYANLYLSNGTGSDCYSCSFNDIP
Mtphy      221 DV---------------------------ILLVGDASYANMYLTNGTGSDCYSCSFSNIP
CrPAP1     220 DI---------------------------LLIVGDFAYANIDDFRG---AFNYGPVVSNG
CrPAP2     251 QV---------------------------VILVGDNSYADNYGAL---------SPDDLD
CrPAP3     251 QV---------------------------VIMVGDNTYADNYGAL---------DTEVRN
CrPAP4     361 NTTMLMYRDTLASYREAEASGGAVPPYTLLVHNGDISYSRGESTQWDNFMQQIEPVAA--
CrPAP5      86 -----------SRTVDAIGQELFRRPADLIVHIGDLAYADGKYKVWDSFMAAIEPLAA--
CrPAP6     119 ----------------VAGCMPP----AFVVSTDNFYPSGIRSVDDVQFDESFRNIYDA
                                                   III
Atphy      247 IHETYQPRWDYWGEFYENDTSKVPLMVDEGNHEIELL----------------AEIKTEEA
Gmphy      255 IHETYQPRWDYWGEFYQNDVSNVPIMVVEGNHEIEKQ----------------AEIRTEVA
Ntphy      253 IHETYQPRWDYWGEYYQPDVDKIPIMVVEGNHEIEEQ----------------AEIQTEAA
Mtphy      254 IHETYQPRWDYWGEYYEPDIESVPVMVVEGNHEIEEQ----------------AVIKTEVA
CrPAP1     250 LTYSYQPRWDTLGEMIEGVTGRVPVLTTQGNHEMELL----------------LDGSMEKA
CrPAP2     275 GSGTNYQRWDTYQQLWQPEFSTVPIDNCAANHELETEGIPAVINNTTTSFSFPTNYPEQS
CrPAP3     275 SKGINYQRWDTYQQLWQPDYSTVPIDNCAANHELETSGIPAVINYTTTSFSFPTNFPEQS
CrPAP4     419 ---------------------AYPYMYTPGNHERDWPG------------TGDAFVVEDS
CrPAP5     133 ---------------------SRPYMYGIGNHEAGPCRDTNGVDPSGEEP----------
CrPAP6     159 K------------------ELQVPWYYVMGNHDYGDAVDVSLLNTGQCLASPSGP-----

Atphy      292 YSSRFAFEF----NESGSSSTLYYSFNAGGIHFVMLGAYIAYDYS----------------
Gmphy      300 YSSRFAFES----QESGSSSTFYYSFNAGGIHFIMLGAYINYDYT----------------
Ntphy      298 YRSRFAFES----KESGSSSPFYYSFNAGGIHFIMLGGYVAYNYS----------------
Mtphy      299 YSSRFAFES----EESGSSSTLYYSFNAGGIHFIMLGSYISYDYS----------------
CrPAP1     295 WLSRFGWNS---PYSKSQGTPFYYSANVGPVHMVSHSPYVDFVP----------------
CrPAP2     335 YSARFPVEGTTSNFGDITQNLYYSFIIGGKVKLITYNNYVPHHG----------------
CrPAP3     335 YSARFPVEGTTSNFGDITQNLYYSFVIGGKVKLITYNNYVPHHG----------------
CrPAP4     446 GGECGIPFEARFPMPYPGKDKMYYAFEYGPVFFLQYSTEHRLGPG----------------
CrPAP5     162 ------------------------FDPDWENYGPESGECGSMTAHRFIMPGLDLGQRAG
CrPAP6     196 ---------------------DQCAGKCCYSPLWQLQP-----GFQARDARWNASMGGVV

Atphy      333 ------------------------------------------------------------
Gmphy      341 ------------------------------------------------------------
Ntphy      339 ------------------------------------------------------------
Mtphy      340 ------------------------------------------------------------
CrPAP1     337 ------------------------------------------------------------
CrPAP2     380 ------------------------------------------------------------
CrPAP3     380 ------------------------------------------------------------
CrPAP4     491 ------------------------------------------------------------
CrPAP5     198 AFTGTLRTAAQARALRRELQQDDAVGAGTGVSRRRRVEHNPPFWYSFDYASVHFVMLSSE
CrPAP6     230 TRRIALPP----------DAATGAPRSLDLVMLDTTPIIYQYAGASWVDFLNGFNAQDAD
                                                   IV
Atphy      333 ------AEDYEWLKYDLAKVDPSVTPWLVASWHPPWYSSYTAHYR--EAECMREAMEELL
Gmphy      341 ------AEDYKWLEYDLENVDPSITPWLVVTWHPPWYSSYEAHYR--EAECMRVEMEDLL
Ntphy      339 ------DDDYKWLEYDLANVDPTVTPWLVATWHPPWYSTYTAHYR--EAECMRVAMEELL
Mtphy      340 ------GDDYKWLEYDLASLDPEVTPWLVATWHAPWYSTYKSHYR--EAECMRVNMEDLL
CrPAP1     337 ------TPDYDWLVYDLSSVDPSVTPWVVAMWHAPWYHTYVSHYK--ELECHRIAYEPLL
CrPAP2     380 ------TPDYQWAMYDFASVDPKMTPWLFVQPHAPPYHTYFTHYK--EMDCFMSIWEDYF
CrPAP3     380 ------TPDYEWAMYDFASVDPKMTPWLFVQPHAPPYHTYYTHYK--EMDCFLSVWEDYF
CrPAP4     491 --SEQYQFMVKTLASVDRRRTPWLVVGGHRPIYVASTNANWPDGDQPVAQSYRDAYEDLY
CrPAP5     258 HDLGSSSSSQAAWLEADLAAADPCATPWVVVGIHRPMYVVYPHKDNRIVGEHRPAAEDLL
CrPAP6     280 AIKSSLQQQLNASYANGSAAAGGSSWRLVVGHHPVRSYGRHCTQPDAYDCDDMIFYRPWL
```

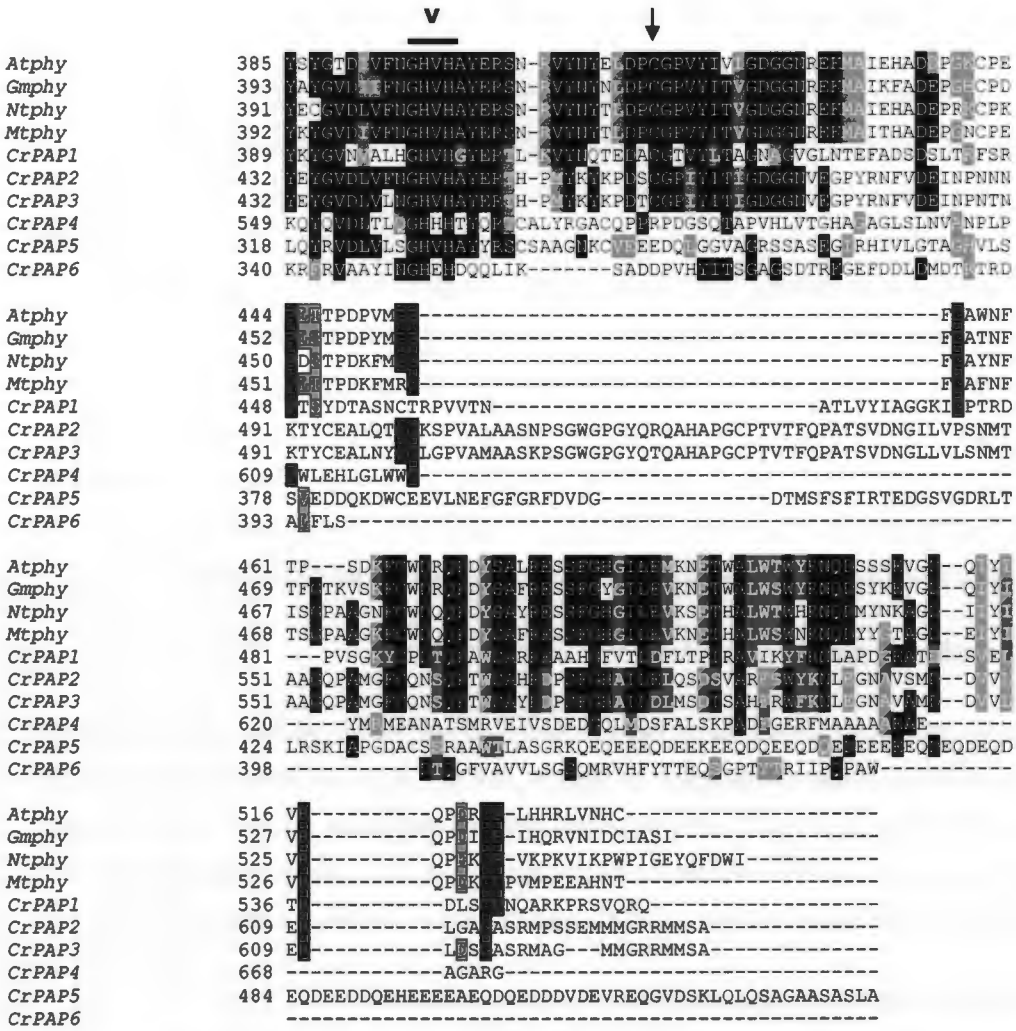

Figura 2.1 Alineamiento de las secuencias CrPAP. Se alinearon las secuencias aminoacidicas predichas de las seis CrPAP y las fitasas PAP de *Arabidopsis thaliana* (Atphy), *Glycine max* (Gmphy), *Nicotiana tabacum* (Ntphy) y *Medicago truncatula* (Mtphy) en ClustalX. Las barras con números romanos indican los motivos característicos de las PAPs (DXG, GDXXY, GNHE/D, VXXH, GHXH) (Schenk *et al.,* 2000). Aminoácidos idénticos fueron sombreados en negro, mientras aminoácidos similares fueron sombreados en gris. La flecha invertida señala el residuo de Cys involucrado en la formación de un puente disulfuro en Atphy (Li *et al.,* 2002).

2.3.2 Relación filogenética de las CrPAP de *C. reinhardtii.*

El análisis filogenético de las secuencias CrPAP reveló nueve grandes clados, los cuales se pueden ver en la Figura 2.2. En el clado I se agruparon las secuencias PAP homólogas de plantas, ya sea con péptidos señal hacia el retículo endoplásmico o hacia la mitocondria. En tanto que los clados II, IV, V, VI y VIII comprenden exclusivamente homólogos PAP de microalgas. Las fitasas PAP, así como las secuencias tipo PAP de plantas fueron agrupadas dentro del clado III junto con dos secuencias de la microalga *Coccomyxa subellipsoidea* C-169. El clado VII comprende la mayoría de los secuencias PAP homólogas de microalgas con excepción de una secuencia de la planta *Lupinus luteus.* La secuencia CrPAP1 se agrupó en el clado IV, CrPAP2 y CrPAP3 se agruparon en el clado V, mientras que CrPAP4 y CrPAP5 se agruparon en el clado VI. CrPAP6 se agrupó dentro del clado IX en conjunto con las secuencias PAP de mamíferos.

2.3.3 Predicción de péptidos señal.

Dado que la fitasa Gmphy presenta un péptido señal de secreción, se realizó la predicción de péptidos señal en las secuencias proteicas CrPAP. Este análisis indicó que las secuencias CrPAP1 a la CrPAP5 presentaban péptidos señal, los cuales probablemente dirijan las proteínas hacia alguna ruta de secreción. En el caso de la secuencia CrPAP6 no se encontró ningún péptido señal. En el Cuadro 2.5 se muestran los péptidos señal.

2.3.4 Predicción de dominios característicos de las PAP

Las seis proteínas CrPAPs predichas presentaron un dominio de metalofosfoesterasa, similar a aquellos encontrados en PAPs de plantas (Hegeman y Grabau 2001; Schenk *et al.,* 2000), con una cantidad de 224 aminoácidos (aa) en el caso de CrPAP1 hasta 270 aa en la caso de CrPAP5. En el caso de la secuencia CrPAP4 se predijo la presencia de un dominio similar al que se presenta en la fibronectina de tipo 3. En la Figura 2.3 se puede observar la representación gráfica de estos dominios.

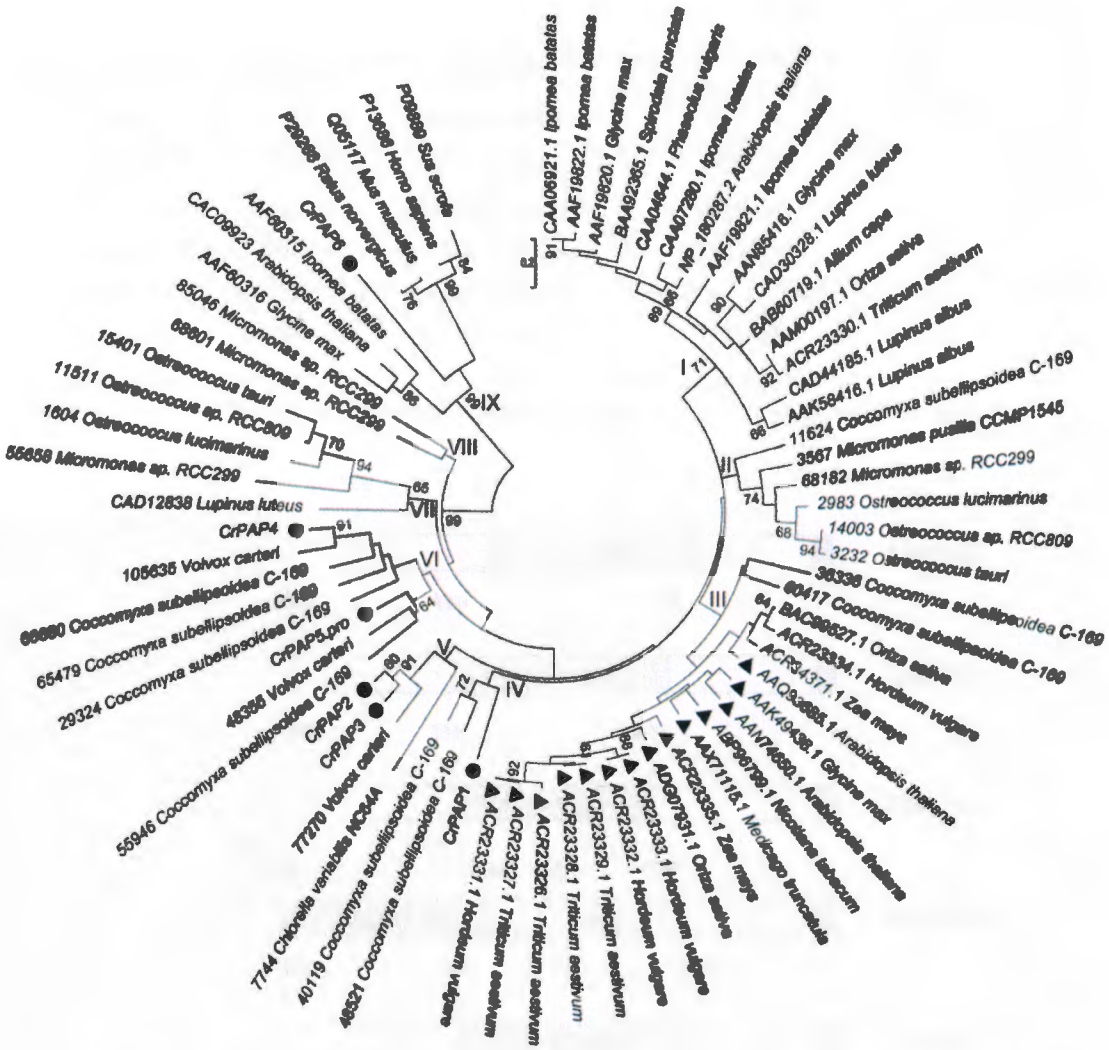

Figura 2.2 Árbol filogenético de las secuencias CrPAP. El árbol fue elaborado con el algoritmo Neighbor-joining y basado en el alineamiento de Clustal W de la secuencias PAP homologas de *C. reinhardtii* (círculos negros), genes de fitasas PAP de plantas (triángulos negros) y otros homólogos PAP de organismos eucariotas. Los números sobre las ramas indican el porcentaje de repeticiones de bootstrap que soporta a cada rama y únicamente aquellos con un porcentaje arriba de 60 son mostrados. Los números romanos indican los nueve clados mayores formados en el árbol filogenético.

Cuadro 2.5 Predicción del péptido señal de CrPAP1-CrPAP5 generadas con ayuda de los programas signalP 3.0 y TargetP.

ID	Longitud	Dominio COOH	Dominio Hidrofóbico	Dominio NH_4	Localización celular
CrPAP1	21	MSRS	VLSIAAALALF	GAAHAG	Extracelular
CrPAP2	23	MAYSR	LVLALSALALAG	VVVNAD	Extracelular
CrPAP3	23	MAQSR	LALALSALVLAA	AVVNAE	Extracelular
CrPAP4	29	MAPKAGVWPP	VLLPLLLVGAA	FTAPVLGA	Extracelular
CrPAP5	22	MAPRA	LLVLLALLQL	GACAFAA	Extracelular
Gmphy	29	MASITFSLLQFHRAP	ILLLILLA	GFGHCH	Extracelular

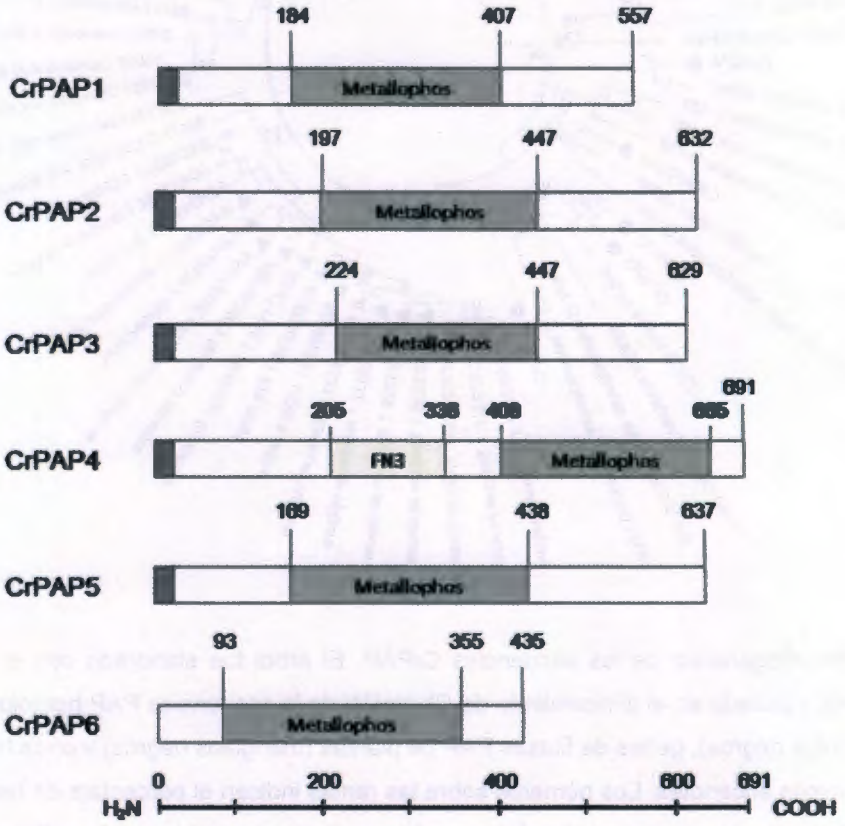

Figura 2.3 Representación gráfica de las proteínas CrPAP. Los dominios de metalofosfoesterasa (Metallophos) son indicados. Los péptidos señal se indican en gris obscuro y el dominio de fibronectina tipo 3 (FN3) es indicado en el caso de CrPAP4. Los números arriba de cada representación indican la posición del residuo aminoacídico.

2.3.5 Análisis de los promotores de los genes *CrPAP*

Se analizaron las secuencias correspondientes a los promotores de los genes CrPAP encontrados en el análisis bioinformático, con la finalidad de identificar elementos de respuesta que estén relacionados con la activación de la expresión de los genes mediante la adición de algún inductor químico. En el Cuadro 2.6 se describen los elementos de respuesta más interesantes encontrados tras este análisis.

Cuadro 2.6 Elementos de respuesta *cis* encontrados con el programa PLACE en la región correspondiente al promotor de los genes *CrPAP*.

Motivo \ Secuencia	*CrPAP1*	*CrPAP2*	*CrPAP3*	*CrPAP4*	*CrPAP5*	*CrPAP6*
ASF1MOTIFCAMV (AS) (Despres *et al.*, 2003)	1	———	———	1	2	1
CURECORECR (+Ni, -Cu) (Quinn y Merchant, 1995)	10	6	———	4	2	2
GT1CONSENSUS (AS) (Terzaghi y Cashmore, 1995)	5	1	2	4	2	1
GT1GSCAM4 (NaCl) (Park *et al.*, 2004)	1	———	———	1	———	———
P1BS (-P) (Rubio *et al.*, 2001)	2	———	———	———	———	2

Se encontraron dos elementos relacionados con la respuesta ante la presencia de ácido salicílico, el primero es el elemento ASF1MOTIFCAMV (TGACG) el cuál ha sido encontrado en genes de plantas como *Nicotiana tabacum* y *Arabidospsis thaliana* (Despres *et al.*, 2003), el segundo elemento es el GT1CONSENSUS (GRWAAW), encontrado en genes de plantas como *Pisum sativum, Avena sativa; Oryza sativa, Nicotiana tabacum, Arabidopsis thaliana* y *Spinacia oleracea* (Terzaghi y Cashmore, 1995).

El elemento de respuesta CURECORECR (GTAC), es nativo de *C. reinhardtii* y ha sido encontrado en genes como Cyc6 respondiendo ante la privación de Cu o la adición de Ni (Quinn y Merchant, 1995).

En el caso de GT1GSCAM4 (GAAAAA) es un elemento de respuesta que fue encontrado en genes de la planta de *Glycine max* y su función se encuentra relacionada con la inducción de los genes ante la presencia de NaCl (Park *et al.*, 2004).

De manera muy interesante el elemento de respuesta P1BS (GNATATNC) responde ante condiciones de privación de fósforo y ha sido encontrado en genes de plantas como *Arabidopsis thaliana, Lycopersicon esculentum, Medicago truncatula y Hordeum vulgare*.

2.4 DISCUSIÓN

En este estudio se encontraron seis genes (*CrPAP1-6*) en el genoma de *C. reinhardtii*, homólogos a secuencias de fosfatasas tipo PAP de plantas, indicando que esta microalga no ha pasado por un proceso extensivo de duplicación de genes. Por su parte, los genomas de las plantas contienen numerosos genes que codifican para PAPs. 29 en el caso de *A. thaliana* (Li *et al.*, 2002), 26 en *Oriza sativa* (Zhang *et al.*, 2011) y 35 en *G. max* (Li *et al.*, 2012). En contraste, secuencias tipo PAP en organismos procariotas como las cianobacterias aparentan ser menos numerosos, y se han identificado en un rango de uno a tres (Yeung *et al.*, 2009).

El peso molecular predicho para las CrPAPs 1 a 5 fue similar a aquellas fitasas PAP de plantas (Konietzny y Greiner 2002), en tanto que la secuencia CrPAP6 recuerda a las PAPs de mamíferos, que se caracterizan por su bajo peso molecular (Li *et al.*, 2012; Klabunde y Krebs 1997). El pI predicho para la mayoría de las CrPAPs tuvo valor ácido que fue de 4.46 a 6.32, y es similar al de las fitasas provenientes de bacterias y hongos (Konietzny y Greiner 2002), así como también a las fitasas provenientes de soya (Gibson y Ullah 1988), raíz de maíz (Hübel y Beck 1996) y la raíz de tomate (Li *et al.*, 1997). Por su parte, el valor de pI para la CrPAP1 fue de 8.5, el cual es similar al pI de la fitasa HAP de *Aspergillus fumigatus* (8.56), la cual es considerada una enzima con características adecuadas para su purificación directa a escala industrial (Wyss *et al.*, 1999).

Como se pudo observar anteriormente en el análisis *in silico*, las seis proteínas CrPAP predichas presentaron rasgos característicos de las enzimas PAP: un dominio de matalofosfoesterasa similar al dominio catalítico de las enzimas PAP conocidas y los siete residuos aminoacídicos que sirven de anclaje a los metales en los cinco motivos consenso reportados para plantas en las proteínas metalofosfoesterasas (Hegeman y Grabau 2001; Schenk *et al.*, 2000). Las metalofosfoesterasas tipo PAP han sido encontradas en bacterias, plantas superiores y en algunos tejidos animales. Este tipo de enzimas está conformado por diferentes clases de enzimas entre las que podemos encontrar las fosfoproteina-fosfatasas, exonucleasas, esfingomielinasas, entre otras (Tran *et al,*. 2010; Li *et al.*, 2002). La característica común entre ellas es que mantienen un dominio conservado con un sitio activo que consiste en dos iones metálicos (manganeso, hierro o zinc), coordinados en un jaula octaédrica de residuos de histidina (H), aspartato

(D) o asparagina (Q) (Hegeman y Grabau 2001; Schenk *et al.*, 2000). Hasta donde se ha revisado en la literatura, en las microalgas no se ha reportado la presencia de metalofosfoesterasas tipo PAP y mucho menos de fitasas tipo PAP, por lo que los resultados de la presente tesis son muy interesantes en ese sentido.

Adicionalmente, se predijo un dominio similar al de la fibronectina tipo 3 para CrPAP4, el cual es comúnmente observado en proteínas PAP de mamíferos. Dominios similares fueron observados en PAPs de *Phaseolus vulgaris* (frijol) (Tsyguelnaia y Doolittle 1998) y de *A. thaliana* (AtPAP10 y AtPAP12) (Li *et al.*, 2002).

El péptido señal predicho para las CrPAP1 a 5 podría indicar que estas proteínas son dirigidas a la vía de secreción y que su actividad podría estar ubicada en el exterior de la célula. Este es el caso de muchas fosfatasas de origen microbiano, así como de plantas, incluyendo a las fitasas. Una vez excretadas, las fitasas desfosforilan los diferentes sustratos que se encuentran en el medio ambiente para liberar Pi para su asimilación, que de otra forma no podrían ser usados por estos organismos (Tian *et al.*, 2012; Rao *et al.*, 2009). En el caso de CrPAP6, la ausencia de péptido señal podría ser indicador de que su función la realizae en el espacio citosólico de la célula.

Previamente, Dionisio y colaboradores (2011) reportaron un árbol filogenético compuesto por cinco clados agrupando a las fitasas PAP de plantas y otras proteínas PAP homólogas. Hasta donde se tiene conocimiento, aún no se han caracterizado proteínas PAP de microalgas, y en este estudio se reporta un total de nueve clados en un árbol filogenético en el cual se incluyen proteínas de microalgas y animales homólogas a las proteínas PAP. Todas las fitasas PAP de plantas y las secuencias tipo fitasa PAP se agruparon dentro del clado III, mientras que cinco clados (II, IV, V, VI y VIII) fueron conformados exclusivamente por proteínas de microalgas homólogas a las PAP de plantas. Ninguna de las CrPAPs fue agrupada con las fitasas PAP de plantas y esto probablemente se deba a que muchos de los genes y en consecuencia las proteínas que codifican, pueden ser rastreadas hacia el ancestro común entre las plantas verdes y los animales (Merchant *et al.*, 2008). De esta forma, se propicia la generación de clados intermedios entre el reino animal y el vegetal. Si bien las CrPAPs no se agruparon con las secuencias de plantas, dos PAP homólogos de la microalga *C. subellipsoidea* C-169 (JGI

protein id: 36336 and 60417) se agruparon dentro del clado III el cual contiene a las fitasas PAP de plantas.

Debido a que aún no se han caracterizado fitasas de microalgas, se utilizó como molde la secuencia Gmphy (AAK49438.1) para la búsqueda de secuencias de metalofosfoesterasa clase PAP en otras especies de microalgas cuyos genomas se encuentran disponibles en el JGI: *Ostreococcus tauri, Ostreococcus lucimarinus, Ostreococcus* sp. *RCC809, Micromonas pusilla CCMP 1545, Micromonas sp. RCC299, Coccomixa sp. C-169, Volvox carteri nagariensis, Emiliana huxleyii, Fragilaryopsis cylindrus, Phaedactylum tricornutum, Thalassiora pseudonana*. Los resultados de esta búsqueda arrojaron secuencias homólogas a la fitasa PAP de Gmphy, y en todos ellos se encontraron los cinco motivos que confieren actividad de metalofosfoesterasa clase PAP, estos motivos al igual que los de *C. reinhardtii*, presentaron algunas diferencias en los aminoácidos que los conformaban, pero siempre se encontraron conservados los siete residuos aminoacídicos involucrados en la coordinación del núcleo bimetálico en su sitio activo (Li *et al.* 2002).

Quisel y colaboradores (1996) mencionan la existencia de dos fosfatasas alcalinas en *C. reinhardtii*, que son excretadas al exterior de la célula cuando son privadas de la fuente de P. Estas enzimas fueron capaces de utilizar diferentes sustratos para la obtención de P, sin embargo, fueron incapaces de utilizar el IP_6 como sustrato. A pesar de lo anterior, estos autores mencionaron la observación (no publicada) de que *C. reinhardtii* fue capaz de crecer en un medio suplementado únicamente con IP_6 como fuente de P, por lo que sugieren la existencia de otras fosfatasas que permiten la asimilación del IP_6 presente en el medio de cultivo. Alguna de las seis CrPAP encontradas en este estudio podría ser la fitasa que no pudieron detectar Quisel y colaboradores (1996), y que le permite a *C. reinhardtii* aprovechar el IP_6 como fuente de P.

Por otra parte, la predicción de péptidos señal indicó que cinco de las secuencias analizadas (CrPAP1-CrPAP5) presentan péptidos señal relacionados con la secreción de la enzima hacia el espacio extracelular, lo que va de acuerdo a lo observado con la fitasa Gmphy (AAK49438.1). En cuanto a los elementos en *cis*, la secuencia CrPAP1 fue la más interesante, ya que se observó la presencia de cinco elementos responsivos diferentes entre los que se encuentran el P1BS que es un elemento responsivo relacionado con la

privación de P (Rubio *et al.*, 2001). CrPAP1 y CrPAP6 fueron las únicas secuencias que demostraron tener este tipo de elemento en la región de su promotor. Además de P1BS, se encontraron elementos relacionados con el incremento de la expresión ante la presencia de diversos inductores como el ácido salícilico (AS) (ASF1MOTIFCAMV y GT1CONSENSUS), adición de NaCl (GT1GSCAM4), privación de cobre o adición de Ni (CURECORECR).

2.5 CONCLUSIONES

1. El análisis *in silico* reveló que el genoma de *C. reinhardtii* contiene seis genes homólogos a fosfatasas PAP: CrPAP1 a CrPAP6.

2. Todas las CrPAP analizadas presentaron los motivos característicos de las metalofosfoesterasas de la clase PAP, aunque con algunas variaciones probablemente propias de las microalgas.

3. Todas las CrPAP analizadas presentaron los siete residuos aminoacídicos que sirven de anclaje a los metales en los cinco motivos consenso reportados para plantas en las proteínas metalofosfoesterasas.

4. Las secuencias de CrPAP, junto con las secuencias tipo PAP de microalgas encontradas en este estudio, se agruparon en clados alternos a los propuestos por Dionisio y colaboradores (2011), sugiriendo la existencia de una mayor diversidad de esta clase de fosfatasas.a las reportadas hasta el momento.

5. Todas las secuencias de aminoácidos de las CrPAP, con excepción de CrPAP6, presentaron un péptido señal de secreción predicho con los programas SignalP 3.0 y TargetP, lo que sugiere que su función se encuentra en el espacio extracelular.

6. Se encontrarón por predicción *in silico* elementos de respuesta en *cis* que se sabe responden en otros organismos ante diversos inductores como son déficit de P, la adición de ácido salicílico, NaCl o Ni o la ausencia de Cu.

2.6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller y D. J. Lipman (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research. 25(17), 3389-3402.

Center for biological sequence analysis CBS.SignalP 3.0 server [Online] (Actualizado 2004). Disponible en: http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/ [Acceso Septiembre 2011]

Center for biological sequence analysis CBS.TargetP server [Online] (Actualizado 2000). Disponible en: http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/ [Acceso Septiembre 2011]

Cheng, K.J., L.B. Selinger, L.J. Yanke, H.D. Bae, L. Zhou y L.W. Forsberg (1999). Phytases of ruminal microorganism. US5939303.

Després, C., C. Chubak, A. Rochon, R. Clark, T. Bethune, D. Desveaux y P. R. Fobert (2003). The *Arabidopsis* NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. The Plant Cell Online. 15(9), 2181-2191.

Dionisio, G., C. K. Madsen, P. B. Holm, K. G. Welinder, M. Jørgensen, E. Stoger, E. Arcalis y H. Brinch-Pedersen (2011). Cloning and characterization of purple acid phosphatase phytases from wheat, barley, maize, and rice. Plant Physiology. 156(3), 1087-1100.

DOE Joint Genome Institute. Plant genomics program [Online] (Actualizado 2013). Disponible en: http://www.jgi.doe.gov/ [Acceso Septiembre 2011]

Ek-Rylander, B., M. Flores, M. Wendel, D. Heinegård y G. Andersson (1994). Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro. Journal of Biological Chemistry. 269(21), 14853-14856.

Gibson, D. M. y A. H. J. Ullah (1988). Purification and characterization of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds. Archives of Biochemistry and Biophysics. 260(2), 503-513.

Harris, E. H. (2001). *Chlamydomonas* as a model organism. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 52(1), 363-406.

Hegeman, C. E. y E. A. Grabau (2001). A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings. Plant Physiology. 126(4), 1598-1608.

Higo, K., Y. Ugawa, M. Iwamoto y T. Korenaga (1999). Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. Nucleic Acids Research. 27(1), 297-300

Hubel, F. y E. Beck (1996). Maize root phytase (purification, characterization, and localization of enzyme activity and its putative substrate). Plant Physiology. 112(4), 1429-1436.

Kaida, R., S. Serada, N. Norioka, S. Norioka, L. Neumetzler, M. Pauly, J. Sampedro, I. Zarra, T. Hayashi y T. S. Kaneko (2010). Potential role for purple acid phosphatase in the dephosphorylation of wall proteins in tobacco cells. Plant Physiology. 153(2), 603-610.

Klabunde, T., N. Sträter, B. Krebs y H. Witzel (1995). Structural relationship between the mammalian Fe(III)-Fe(II) and the Fe(III)-Zn(II) plant purple acid phosphatases. FEBS Letters. 367(1), 56-60.

Konietzny, U. y R. Greiner (2002). Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). International Journal of Food Science & Technology. 37(7), 791-812.

Kuang, R., K.-H. Chan, E. Yeung y B. L. Lim (2009). Molecular and biochemical characterization of AtPAP15, a purple acid phosphatase with phytase activity, in *Arabidopsis*. Plant Physiology. 151(1), 199-209.

Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, y D.G. Higgins (2007) "Clustal W and Clustal X Version 2.0." Bioinformatics 23, no. 21: 2947-2948.

Letunic, I., T. Doerks y P. Bork (2012). SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. Nucleic Acids Research. 40(D1), D302-D305.

Li, C., S. Gui, T. Yang, T. Walk, X. Wang y H. Liao (2012). Identification of soybean purple acid phosphatase genes and their expression responses to phosphorus availability and symbiosis. Annals of Botany. 109(1), 275-285.

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.

Li, M., M. Osaki, M. Honma y T. Tadano (1997). Purification and characterization of phytase induced in tomato roots under phosphorus-deficient conditions. Soil Science and Plant Nutrition. 43(1), 179-190.

Liao, H., F.-L. Wong, T.-H. Phang, M.-Y. Cheung, W.-Y. F. Li, G. Shao, X. Yan and H.-M. Lam (2003). GmPAP3, a novel purple acid phosphatase-like gene in soybean induced by NaCl stress but not phosphorus deficiency. Gene. 318(0), 103-111.

Lung, S.-C., A. Leung, R. Kuang, Y. Wang, P. Leung y B.-L. Lim (2008). Phytase activity in tobacco (*Nicotiana tabacum*) root exudates is exhibited by a purple acid phosphatase. Phytochemistry. 69(2), 365-373.

Matagne, R. F., R. Loppes y R. Deltour (1976). Phosphatase of *Chlamydomonas reinhardi*: biochemical and cytochemical approach with specific mutants. Journal of Bacteriology. 126(2), 937-950.

Merchant, S. S., S. E. Prochnik, O. Vallon, E. H. Harris, S. J. Karpowicz, G. B. Witman, A. Terry, A. Salamov, L. K. Fritz-Laylin, L. Maréchal-Drouard, W. F. Marshall, L.-H. Qu, D. R. Nelson, A. A. Sanderfoot, M. H. Spalding, V. V. Kapitonov, Q. Ren, P. Ferris, E. Lindquist, H. Shapiro, S. M. Lucas, J. Grimwood, J. Schmutz, P. Cardol, H. Cerutti, G. Chanfreau, C.-L. Chen, V. Cognat, M. T. Croft, R. Dent, S. Dutcher, E. Fernández, H. Fukuzawa, D. González-Ballester, D. González-Halphen, A. Hallmann, M. Hanikenne, M. Hippler, W. Inwood, K. Jabbari, M. Kalanon, R. Kuras, P. A. Lefebvre, S. D. Lemaire, A. V. Lobanov, M. Lohr, A. Manuell, I. Meier, L. Mets, M. Mittag, T. Mittelmeier, J. V. Moroney, J. Moseley, C. Napoli, A. M. Nedelcu, K. Niyogi, S. V. Novoselov, I. T. Paulsen, G. Pazour, S. Purton, J.-P. Ral, D. M. Riaño-Pachón, W. Riekhof, L. Rymarquis, M. Schroda, D. Stern, J. Umen, R. Willows, N. Wilson, S. L. Zimmer, J. Allmer, J. Balk, K. Bisova, C.-J. Chen, M. Elias, K. Gendler, C. Hauser, M. R. Lamb, H. Ledford, J. C. Long, J. Minagawa, M. D. Page, J. Pan, W. Pootakham, S. Roje, A. Rose, E. Stahlberg, A. M. Terauchi, P. Yang, S. Ball, C. Bowler, C. L. Dieckmann, V. N. Gladyshev, P. Green, R. Jorgensen, S. Mayfield, B. Mueller-Roeber, S. Rajamani, R. T. Sayre, P. Brokstein, I. Dubchak, D. Goodstein, L. Hornick, Y. W. Huang, J. Jhaveri, Y. Luo, D. Martínez,

W. C. A. Ngau, B. Otillar, A. Poliakov, A. Porter, L. Szajkowski, G. Werner, K. Zhou, I. V. Grigoriev, D. S. Rokhsar y A. R. Grossman (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. Science. 318(5848), 245-250.

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.

Nuttleman, P. R. y R. M. Roberts (1990). Transfer of iron from uteroferrin (purple acid phosphatase) to transferrin related to acid phosphatase activity. Journal of Biological Chemistry. 265(21), 12192-12199.

Park, H. C., M. L. Kim, Y. H. Kang, J. M. Jeon, J. H. Yoo, M. C. Kim, C. Y. Park, J. C. Jeong, B. C. Moon, J. H. Lee, H. W. Yoon, S.-H. Lee, W. S. Chung, C. O. Lim, S. Y. Lee, J. C. Hong y M. J. Cho (2004). Pathogen- and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor. Plant Physiology. 135(4), 2150-2161.

Patni, N. J., S. W. Dhawale y S. Aaronson (1977). Extracellular phosphatases of *Chlamydomonas reinhardi* and their regulation. Journal of Bacteriology. 130(1), 205-211.

Phytozome [Online] (Actualizado 2013). Disponible en: http://www.phytozome.net/ [Acceso Septiembre 2011]

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.

Quinn, J. M. y S. Merchant (1995). Two copper-responsive elements associated with the *Chlamydomonas* Cyc6 gene function as targets for transcriptional activators. The Plant Cell Online. 7(5), 623-638.

Quisel, J. D., D. D. Wykoff, y A. R. Grossman (1996). Biochemical characterization of the extracellular phosphatases produced by phosphorus-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiology 111, no. 3: 839-848.

Rao, D. E. C. S., K. V. Rao, T. P. Reddy y V. D. Reddy (2009). Molecular characterization, physicochemical properties, known and potential applications of phytases: An overview. Critical Reviews in Biotechnology. 29(2), 182-198.

Rubio, V., F. Linhares, R. Solano, A. C. Martín, J. Iglesias, A. Leyva y J. Paz-Ares (2001). A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. Genes & Development. 15(16), 2122-2133.

Saitou, N. y M. Nei (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution. 4(4), 406-425.

Schenk, G., L. W. Guddat, Y. Ge, L. E. Carrington, D. A. Hume, S. Hamilton y J. de Jersey (2000). Identification of mammalian-like purple acid phosphatases in a wide range of plants. Gene. 250(1–2), 117-125.

Schenk, G., Y. Ge, L. E. Carrington, C. J. Wynne, I. R. Searle, B. J. Carroll, S. Hamilton y J. de Jersey (1999). Binuclear metal centers in plant purple acid phosphatases: Fe–Mn in sweet potato and Fe–Zn in soybean. Archives of Biochemistry and Biophysics. 370(2), 183-189.

Shimogawara, K., D. D. Wykoff, H. Usuda y A. R. Grossman (1999). *Chlamydomonas reinhardtii* mutants abnormal in their responses to phosphorus deprivation. Plant Physiology. 120(3), 685-694.

Swiss Institute of Bioinformatics, Biozentrum: Univesitat Basel, The center for molecular life sciences. Swiss model [Online] (Actualizado 2011). Disponible en: http://swissmodel.expasy.org/ [Acceso Septiembre de 2011]

Swiss Institute of Bioinformatics, EMBnet. BOXSHADE 3.21 Pretty Printing and Shading of Multiple-Alignment files [Online] (Actualizado 31 agosto 2006). Disponible en: http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html [Acceso Septiembre de 2011]

Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei y S. Kumar (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution. 28(10), 2731-2739.

Tarafdar, J. C. y A. Jungk (1987). Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus. Biology and Fertility of Soils. 3(4), 199-204.

Terzaghi, W. B. y A. R. Cashmore (1995). Light-regulated transcription. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 46(1), 445-474.

Tian, J., C. Wang, Q. Zhang, X. He, J. Whelan y H. Shou (2012). Overexpression of OsPAP10a, a root-associated acid phosphatase, increased extracellular organic phosphorus utilization in rice. Journal of Integrative Plant Biology. 54(9), 631-639.

Tran, H. T., B. A. Hurley y W. C. Plaxton (2010). Feeding hungry plants: The role of purple acid phosphatases in phosphate nutrition. Plant Science. 179(1–2), 14-27.

Tsyguelnaia, I. y R. F. Doolittle (1998). Presence of a fibronectin type III domain in a plant protein. Journal of Molecular Evolution. 46(5), 612-614.

Turner, B. L., M. J. Papházy, P. M. Haygarth y I. D. Mckelvie (2002). Inositol phosphates in the environment. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences. 357(1420), 449-469.

Vincent, J. B., G. L. Olivier-Lilley y B. A. Averill (1990). Proteins containing oxo-bridged dinuclear iron centers: a bioinorganic perspective. Chemical Reviews. 90(8), 1447-1467.

Wyss, M., L. Pasamontes, A. Friedlein, R. Rémy, M. Tessier, A. Kronenberger, A. Middendorf, M. Lehmann, L. Schnoebelen, U. Röthlisberger, E. Kusznir, G. Wahl, F. Müller, H.-W. Lahm, K. Vogel y A. P. G. M. van Loon (1999). Biophysical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. Applied and Environmental Microbiology. 65(2), 359-366.

Xiao, K., M. J. Harrison y Z. Y. Wang (2005). Transgenic expression of a novel *M. truncatula* phytase gene results in improved acquisition of organic phosphorus by *Arabidopsis*. Planta. 222(1), 27-36.

Yadav, R. y J. Tarafdar (2001). Influence of organic and inorganic phosphorus supply on the maximum secretion of acid phosphatase by plants. Biology and Fertility of Soils. 34(3), 140-143.

Yao, M. Z., Y. H. Zhang, W. L. Lu, M. Q. Hu, W. Wang y A. H. Liang (2012). Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications. Journal of Applied Microbiology. 112(1), 1-14.

Yehudai-Resheff, S., S. L. Zimmer, Y. Komine y D. B. Stern (2007). integration of chloroplast nucleic acid metabolism into the phosphate deprivation response in *Chlamydomonas reinhardtii*. The Plant Cell Online. 19(3), 1023-1038.

Yeung, S.-L., C. Cheng, T. K. O. Lui, J. S. H. Tsang, W.-T. Chan y B. L. Lim (2009). Purple acid phosphatase-like sequences in prokaryotic genomes and the characterization of an atypical purple alkaline phosphatase from *Burkholderia cenocepacia* J2315. Gene. 440(1–2), 1-8.

Zhang, Q., C. Wang, J. Tian, K. Li y H. Shou (2011). Identification of rice purple acid phosphatases related to posphate starvation signalling. Plant Biology. 13(1), 7-15.

Zhu, H., W. Qian, X. Lu, D. Li, X. Liu, K. Liu y D. Wang (2005). Expression patterns of purple acid phosphatase genes in *Arabidopsis*; organs and functional analysis of *AtPAP23* predominantly transcribed in flower. Plant Molecular Biology. 59(4), 581-594.

Zuckerkandl, E. y L. Pauling (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins en: V. Bryson and H.J. Vogel (ed) Evolving Genes and Proteins, Academic Press, New York, pp 97-166

CAPÍTULO III

3. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL IP_6 COMO FUENTE DE P EN LOS PARÁMETROS DEL CULTIVO Y PERFIL DE PROTEÍNAS DE *C. reinhardtii*, ASÍ COMO EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *CrPAP*1-6 DE ESTA MICROALGA.

Los resultados de este capítulo fueron publicados en: Rivera-Solís, R., S. Peraza-Echeverria, I. Echevarría-Machado y V. Herrera-Valencia (2013). *Chlamydomonas reinhardtii* has a small family of purple acid phosphatase homologue genes that are differentially expressed in response to phytate. Annals of Microbiology.1-9 (Anexo 1).

3.1 INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es un macronutriente esencial para el sostén de la vida, ya que es un componente estructural de los ácidos nucleicos y de los fosfolípidos, y además tiene función en la modificación de carbohidratos y proteínas (Moseley *et al.*, 2009). Los organismos prefieren la asimilación del P en forma de ortofosfato (PO_4^{3-}) o también conocido como fósforo inorgánico (Pi). En el caso de *Chlamydomonas reinhardtii*, un conjunto de respuestas específicas le permiten adaptarse a las condiciones de limitación de P, mientras redistribuye las reservas de P internas. Entre estas respuestas se encuentra la movilización del polifosfato almacenado, así como el ADN plastídico y el reemplazo de los fosfolípidos por galactolípidos y sulfolípidos (Werner *et al.*, 2007. Yehudai-Resheff *et al.*, 2007; Riekhof *et al.*, 2003). Por otro lado, se sabe que bajo limitación de P *C. reinhardtii* es capaz de sintetizar diversas fosfatasas que pudieran permitir el aprovechamiento de P del ambiente (Quisel *et al.*, 1996, Patni *et al.*, 1977; Matagne *et al.*, 1976). Sin embargo, ninguna de ellas ha sido caracterizada a detalle por lo que es difícil su identificación.

Entre las fosfatasas se encuentran las metalofosfoesterasas de la clase PAP (fosfatasas ácidas púrpura) con actividad de fitasa, para las cuales existen reportes en los que se describe un incremento en su expresión ante tratamientos con inductores químicos como la adición de ácido salicílico (AS) en la planta de *Arabidopsis*, donde se induce la expresión de las fitasas en las raíces de la planta (Kuang *et al.*, 2009) o mediante la adición de NaCl en la planta de soya (Liao *et al.*, 2003). En *Arabidopsis* también se ha

visto que el gen *AtPAP10* está involucrado en la tolerancia de la planta durante la limitación de P, y su expresión es inducida ante esta condición. Además la proteína producida por esta enzima tiene la capacidad de degradar el fitato (IP_6) aunque en un muy bajo nivel (Wang *et al.*, 2011). Se sabe que la ausencia de P produce un incremento en la tasa de transcripción de algunos genes en *Chlamydomonas*; tal es el caso del gen *PHOX*, que codifica para la principal fosfatasa secretada en *C. reinhardtii*, cuyo nivel de transcrito incrementa hasta ~5000 veces bajo esta condición (Moseley *et al.*, 2009). Por otro lado, Quisel y colaboradores (1996), mencionaron que ante condiciones de déficit de P, se indujo la producción de fosfatasas alcalinas en *C. reinhardtii*, las cuales no resultaron catalíticamente eficientes cuando usaron al IP_6 como sustrato. Sin embargo, estos autores también comentaron una observación de que *C. reinhardtii* fue capaz de crecer en un medio de cultivo suplementado con IP_6 como la única fuente de P, por lo que sugirieron la probable existencia de alguna enzima tipo fitasa que aún no han sido identificada en esta microalga.

En este capítulo se evaluó la capacidad de multiplicación de *C. reinhardtii*, así como los cambios en su perfil de proteínas al ser cultivada en medio con IP_6, ya sea en presencia ó ausencia de sales de P. Una vez comprobado que *C. reinhardtii* fue capaz de utilizar IP_6 como única fuente de P para su crecimiento, se investigó la expresión de los genes *CrPAP1-6* en condiciones de cultivo con IP_6 y/o sales de P.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Diseño de oligonucleótidos

Para llevar a cabo los análisis de expresión de los genes *CrPAP1-6*, se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada una de las seis secuencias encontradas en el genoma de *C. reinhardtii* y se solicitó su síntesis a Sigma-Aldrich. Las secuencias de los oligonucleótidos fueron diseñadas en regiones cercanas a los motivos conservados que las identifican como metalofosfoesterasas clase PAP. Además dichos oligonucleótidos comprenden un intrón que permite diferenciar la amplificación a partir de ADNg y ADNc. Dichas secuencias se presentan en el Cuadro 3.1.

Cuadro 3.1 Oligonucleótidos para el análisis de la expresión de *CrPAP1-6* de *C. reinhardtii*. ADNc: ADN complementario; ADNg: ADN genómico, nt: nucleótido.

Nombre	Oligonucleótido ID	Secuencia del oligonucleótido (5'→3')	Localización en la secuencia (nt)	Amplicón predicho en ADNc (pb)	Amplicón predicho en ADNg (pb)
CrPAP1	FwCre1_672250	TCCTCCGTGGACCGCAGCGTC	1051-1279	229	1143
	RvCre1_672250	TCAAGTACACGGTGCCGCAGG			
CrPAP2	FwCre2_578350	TGAGCCCCGATGATCTTGACG	803-1016	214	804
	RvCre2.2_578350	AAGCGAGCCGAGTAGGACTGG			
CrPAP3	FwCre3_476700	ACTGAGGTCCGCAACAGCAAG	808-1016	209	637
	RvCre2.2_578350	AAGCGAGCCGAGTAGGACTGG			
CrPAP4	FwCrePAP4_V2	AGGGCCACCACCACACCTAC	1730-2000	271	969
	RvCrePAP4_V2	AGCGCGAAGCTGTCCATCAG			
CrPAP5	FwCre5_500200	ACTTTGTGATGCTGTCTTCCG	1064-1358	295	785
	RvCre5.1_500200	TCCTCCTCCACGCACTTGTTG			
CrPAP6	FwCrPAP6	TACATCAACGGACACGAGCAC	1039-1223	185	688
	RvCrPAP6	ACAGCACCACAGCCACAAAG			

Las condiciones de amplificación con dichos oligonucleótidos fueron evaluadas en ADNg

3.2.2 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADNg se realizó según el protocolo de Dellaporta (1983), con algunas modificaciones. La extracción se realizó de la siguiente manera: se recolectaron 50 mL de un cultivo de *C. reinhardtii* de siete días (al final de la fase logarítmica). Se centrifugó (centrífuga Eppendorf modelo 5810R) a 4,216 rpm durante cinco minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante para posteriormente agregar el volumen necesario de medio de cultivo para resuspender la pastilla y tener aproximadamente 40 x 10^6 células mL^{-1}. Cada mL de cultivo resuspendido fue transferido a un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL y se centrifugó (microcentrífuga marca Eppendorf modelo 5424) nuevamente a 3,000 rpm durante cinco minutos. El sobrenadante se desechó y los tubos con la pastilla celular se congelaron con nitrógeno líquido, ya sea para su almacenamiento a -80 °C o para la extracción inmediata. Se preparó la mezcla de extracción: 650 µL de amortiguador TEN(10 mM Tris -HCl; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl) adicionado con β-mercaptoetanol a una concentración final de 0.2 M por muestra y se homogeneizó con un vórtex en

velocidad 2. Posteriormente, la mezcla se incubó a 65 °C por 10 minutos. En la campana de extracción, se agregó la mezcla de amortiguador TEN+ β-mercaptoetanol a cada muestra y se agitó vigorosamente con ayuda de un vórtex durante 2 minutos. A cada muestra se le añadieron 43 µL de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20% (p/v), se agitaron en un vórtex y se incubaron a 65 °C durante 25 minutos con agitaciones periódicas cada tres minutos durante la incubación. Posteriormente, se adicionaron 700 µL de cloroformo: alcohol isoamílico ($CHCl_3$: AIA) en una proporción 24:1 a cada muestra y se agitó en el vórtex. Las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm durante cinco minutos, se recuperó el sobrenadante y fue transferido a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. A cada muestra se le añadió un volumen de $CHCl_3$:AIA igual al del sobrenadante y se mezcló por agitación en vórtex. Las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm durante cinco minutos, se recuperó el sobrenadante y fue transferido a un tubo nuevo de microcentrífuga de 1.5 mL. Esta extracción se repitió hasta tres veces, con el fin de conseguir el sobrenadante lo más claro posible. Para precipitar los ácidos nucleicos, a cada muestra se le adicionó un volumen de isopropanol puro igual al del sobrenadante.Se mezcló suavemente por inversión del tubo durante tres minutos, y se centrifugó a 13,500 rpm durante cinco minutos. La pastilla obtenida fue lavada dos veces con 800 µL de etanol frío al 70 % (v/v), y se centrifugó a 13,500 rpm durante cinco minutos. El sobrenadante fue desechado. La pastilla fue secada a temperatura ambiente durante 10 minutos, y se resuspendió en 40 µL de amortiguador Tris-HCl (10 mM; pH 7.5). Se incubó a 65 °C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL nuevo. Para la eliminación del ARN se adicionó 1µL de ARNasa (1 mg/mL) y se incubó a 37 °C durante 30 minutos.

3.2.3 Cepa y condiciones de cultivo

La cepa de *C. reinhardtii* que se utilizó para llevar a cabo estos experimentos fue la CC-125 (mt+), proveniente del Centro de Chlamydomonas (www.chlamy.org). El mantenimiento de los cultivos se realizó de manera axénica, en medio Tris-Acetato-Fosfato (TAP) pH 7.00 (Gorman y Levine, 1965) a 25 ± 2 °C bajo un fotoperiodo de 16 h:8 h (luz/oscuridad) con una intensidad lumínica de 90 µmol m^{-2} s^{-1} proveniente de lámparas MAGG F54T5/6500 K, en un orbitador a 140 rpm.

3.2.4 Tratamientos de cultivo para *C. reinhardtii* en presencia de IP_6

Para investigar el efecto del IP_6 (sal de fitato de sodio hidratado, Sigma P8810) como fuente de P en los parámetros del cultivo y perfil de proteínas de *C. reinhardtii*, así como en la expresión de los genes *CrPAP1-6* de esta microalga, se utilizaron cuatro medios de cultivo: 1) TAP (Gorman y Levine, 1965), 2) TAP+IP_6 (TAP más 171 µM de IP_6), 3) TA+IP_6 (sin sales de fósforo aportadas por el TAP, más 171 µM IP_6), y 4) TA (sin sales de fósforo). Todos los tratamientos fueron ajustados a pH 7.00.

Para lo anterior, se realizó un precultivo inoculando una colonia de *C. reinhardtii* en 50 mL de medio TAP, y se colectó al día siete de cultivo, al final de la fase exponencial de crecimiento. Posteriormente, se realizaron tres lavados con medio TA para eliminar las trazas de P que pudieran quedar. Para el lavado se recuperó el contenido celular del precultivo por medio de centrifugación a 4,216 rpm a 4°C durante cinco minutos, el sobrenadante fue desechado y la pastilla celular fue resuspendida con 50 mL de medio TA. Este proceso se repitió dos veces más y, de la última resuspensión se tomó una alícuota para inocular una concentración final de 10, 000 células mL^{-1} en 10 mL del medio correspondiente contenido en un tubo Falcon de 50 mL, nuevo y estéril el cual se dejó cultivando durante siete días. Al final del experimento se tomaron muestras para conteo celular. Las células fueron colectadas por medio de centrifugación y lavadas tres veces con el amortiguador de extracción de proteínas, cuya composición fue: Tris-HCl (100 mM, pH 6.8), EDTA (2mM), $CaCl_2$ (20 mM), sacarosa (250 mM) y glicerol al 10% (v/v) o con medio TA de la manera antes descrita para la extracción de ARN. La pastilla celular fue transferida a tubos de microcentrífuga de 1.5 mL, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis, ya sea para la extracción de proteínas o ARN.

La estrategia experimental que se siguió se presenta en la Figura 3.1.

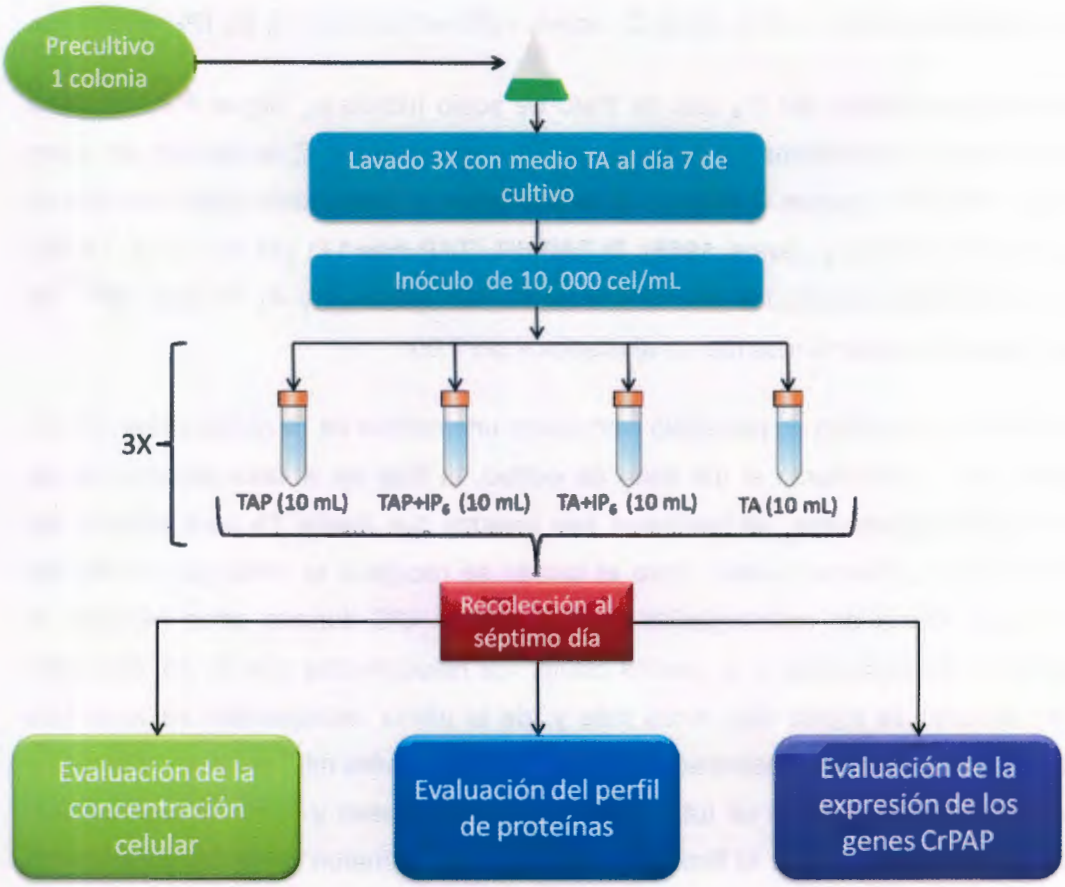

Figura 3.1 Estrategia experimental para la evaluación del efecto del IP_6 como fuente de P.

A continuación se describen los detalles de cada tratamiento:

1) Tratamiento TAP.

Este tratamiento consistió en cultivar las células de *C. reinhardtii* en medio TAP (Gorman y Levine, 1965). El P fue proporcionado por las sales de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) y fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) que forman parte de la solución denominada amortiguador de fosfatos II (BPII) y cuyo contenido total de P es de 3.19 g por cada 100 mL equivalentes a una concentración de 1 M de P. La concentración final del P en el medio TAP fue de 1 mM.

2) Tratamiento TAP+IP_6.

Este tratamiento consistió del medio de cultivo TAP al cual se le agregó IP_6. Este tratamiento contiene el P (1 mM) proporcionado por el BPII que originalmente se encuentra en el medio TAP reportado por Gorman y Levine (1965) y 171 µM de IP_6 el cual aporta una cantidad semejante de P.

3) Tratamiento TA+IP_6.

Este tratamiento consistió de IP_6 como única fuente de P y se realizó empleando un medio de cultivo donde todas las sales de P aportadas por el BPII del medio TAP fueron eliminadas y en su lugar se añadió la cantidad proporcional de P a partir de una solución de IP_6. Dicha solución se preparó pesando 11.33 g de IP_6 en un volumen final de 100 mL, quedando una concentración final de 171 mM de IP_6, la cual aporta la misma cantidad de P que el BPII descrito en el párrafo anterior. A partir de la solución de IP_6 se toman 10 µL los cuales se añaden a 10 mL del medio TA para tener una concentración final de 171 µM de IP_6.

4) Tratamiento TA.

En este tratamiento se eliminó el P aportado por el BPII. Para obtener el K que era proporcionado por las sales de fosfato de potasio del BPII, se preparó una solución de cloruro de potasio (1.5 M) la cual aporta la misma cantidad de K que aportaba por el BPII.

El IP_6 fue agregado a los tratamientos justo antes del inóculo. La solución de IP_6 fue esterilizada por filtración.

3.2.5 Determinación de la concentración celular

La concentración celular fue determinada por conteo de células en una cámara de Neubauer (hemocitómetro). Se colectaron 900 µL del cultivo de células en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL tipo Eppendorf y se le adicionaron 100 µL de una solución de yoduro de lugol (Mcmanus y Mowry, 1964) con el fin de fijar la muestra, posteriormente se colocaron por 5 minutos en el orbitador a 100 rpm. Se tomaron 20 µL de la muestra fijada y se colocaron en la cámara de Neubauer para llevar a cabo el conteo. Se contaron todas

las células contenidas en los cinco campos visuales situados en la cuadricula pequeña (Figura 3.2), siguiendo siempre las manecillas del reloj.

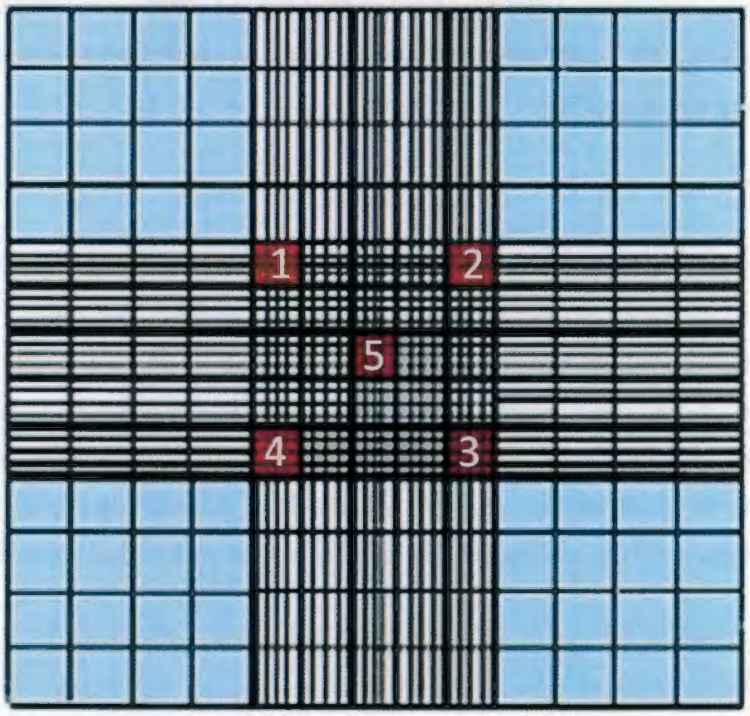

Figura 3.2 División de la celda de la cámara de Neubauer. En rojo se indican los cinco campos visuales utilizados para realizar el conteo de las células de *C. reinhardtii*. Los números indican el orden en el cual se realizó el conteo.

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

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

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

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante una prueba de ANOVA de una vía con una prueba de Fisher LSD para determinar diferencias significativas entre tratamientos, para ello se utilizó el paquete estadístico Statgraphics Plus 4.1. Todos los

experimentos contaron con tres réplicas y cada experimento se realizó dos veces. Todos los reactivos y solventes usados fueron de grado analítico.

3.2.6 Extracción y cuantificación de proteínas

Para llevar a cabo la extracción de proteínas, se colectó aproximadamente 50 mg de peso fresco de *C. reinhardtii* en un tubo de centrífuga tipo Eppendorf, se le adicionó 125 µL del amortiguador de extracción contenía: Tris-HCl (100mM), sacarosa (250mM) ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (2mM), cloruro de calcio (20mM), glicerol (10% v/v), β-mercaptoetanol (1 mM), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (1 mM), aprotinina (1 µg/µL) y leupectina (1 µg/µL). Se procedió a macerar durante cuatro minutos con la ayuda de un micropistilo estéril y manteniendo el tubo en hielo. Transcurrido ese tiempo, se procedió a centrifugar durante 30 minutos a 12,000 rpm a 4 °C. El sobrenadante se recuperó y se almacenó en hielo para trabajar con él de forma inmediata, o a -80 °C si las muestras serían utilizadas posteriormente. La cuantificación de proteínas se realizó de acuerdo al método de Bradford (1976), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (Bio-Rad, cat. 500-0006). Para la curva de calibración se utilizó albumina sérica bovina (BSA) en un rango de 0 a 10 mg mL^{-1}.

3.2.7 SDS-PAGE

Las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) Se cargaron aproximadamente 30 µg de proteína para cada muestra. El gel fue teñido con plata de acuerdo al protocolo de Henkeshoven y Dernick (1985).

3.2.8 Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó empleando el Kit Illustra RNAspin Mini RNA isolation de GE Healthcare, siguiendo las indicaciones del proveedor con algunas modificaciones como se describe a continuación.

Se utilizó todo el contenido celular de cada tratamiento para llevar a cabo la extracción de ARN, por lo que el número de células fue variable dependiendo del tratamiento. El rango de células extraídas fue de aproximadamente 5.9 x 10^7 para el tratamiento TA+IP_6 a 15.3

x 10^7 para TAP+IP_6. A cada muestra se le adicionaron 350 µL de solución de lisis RA1 y 3.5 µL de β-mercaptoetanol. Cada muestra se homogenizó por pipeteo, mientras se mantenía en hielo, con la finalidad de proteger el ARN. Las muestras se maceraron mediante la aplicación de agitación por vórtex a máxima velocidad durante dos minutos. El lisado celular fue transferido a columnas diseñadas para reducir la viscosidad de las muestras y se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto. El filtro de la columna fue descartado y el filtrado fue transferido a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL tipo Eppendorf, con la precaución de no absorber nada de la pastilla que se pudiera haber formado. Las condiciones de unión fueron ajustadas adicionando 350 µL de etanol (70%, v/v) al filtrado recuperado previamente y se mezcló por medio de agitación con vórtex dos veces durante cinco segundos. El lisado junto con el precipitado formado en el paso anterior se mezcló por pipeteo y posteriormente todo fue cargado en la columna de sílica. Para cada muestra se utilizó una columna de sílica previamente colocada en un tubo colector de 2 mL. Las muestras fueron centrifugadas por 30 segundos a 11,000 rpm y cada columna se colocó en un nuevo tubo colector. La capacidad máxima de la columna fue de 750 µL, por lo que cuando fue necesario, se repitió el procedimiento para procesar un volumen mayor de muestra. Se adicionaron a la columna 350 µL del buffer MDB y se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto hasta secar la membrana. Se desechó el sobrenadante y se regresó la columna al tubo colector. Cada columna se lavó con 200 µL de la solución de lavado RA2 y se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto. El sobrenadante fue descartado y la columna se regresó al mismo tubo colector. Se adicionaron 600 µL de la solución de lavado RA3 y se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto. El sobrenadante fue descartado y se regresó la columna al tubo colector. Se adicionaron 250 µL de la solución de lavado RA3 y se centrifugó a 13,000 rpm por dos minutos hasta secar la membrana completamente. Se descartó el sobrenadante y la columna se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL estéril. El ARN fue eluído con 40 µL de agua ultrapura (H_2O UP) y se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto. El sobrenadante se recuperó y se cargó de nueva cuenta en la columna, se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto (esta doble elución nos permitió obtener un buen rendimiento así como una buena concentración). La elución se mantuvo en hielo. La digestión del ADN se realizó adicionando 3 U de RQ DNAse; 40 U RNAse out y 5 µL de amortiguador 10X marca Promega, se completó con 1 µL de H_2O UP para tener un volumen final de 50 µL. La

mezcla fue homogenizada suavemente con el vórtex (velocidad seis). Tras la homogenización, las muestras fueron incubadas durante 20 min a 37 °C. Posteriomente, se adicionaron 350 µL de RA1 y 350 µL de etanol al 70%. Se homogenizó por vórtex dos veces durante cinco segundos. La mezcla se cargó en una columna de sílica nueva y se centrifugó a 11,000 rpm durante 30 segundos. La columna se colocó en un nuevo tubo colector y fue lavada con 600 µL de la solución de lavado RA3. Se centrifugó a 13,000 rpm durante un minuto y se desechó el sobrenadante. La columna se regresó al tubo colector y se adicionaron 250 µL de la solución de lavado RA3. Se centrifugó a 13,000 rpm durante dos minutos. La columna se insertó en un tubo libre de nucleasas y se procedió a eluir el ARN con 40 µL de H_2O UP. Se centrifugó a 13,000 rpm durante un minuto y la elución se cargó por segunda vez en la columna, centrifugando posteriormente a 13,000 rpm. La elución se colocó inmediatamente en hielo y se almacenó a -20 °C para su uso inmediato o a -80 °C para su posterior análisis.

3.2.10 Síntesis de ADNc

La síntesis del ADNc se realizó con una cantidad inicial de 5 µg de ARN total como molde. El ARN se mezcló con 2.5 µM de OligodT (Invitrogen) en un volumen final de 10 µL; se incubó a 75 °C durante cinco minutos e inmediatamente se enfrió en hielo. Posteriormente, se realizó la reacción de la transcriptasa reversa, 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, Roche), 40 U del inhibidor de ARNasa (40 U/µL, Invitrogen), 200 U de la enzima Superscript III (200 U/µL, Invitrogen), y finalmente H_2O 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 2 U de RNAsa H (2 U/µL, New England) y 4 µL de ARNasa A (100 mg/mL, Sigma). Se incubó a 37 °C durante 30 minutos y se diluyó a un volumen final de 100 µL. Como control para los experimentos de RT-PCR se empleó el gen nuclear de la actina, cuyos oligonucleótidos flanquean un intrón de forma que se obtiene un amplicón de 209 pb en ADNc y 429 pb en ADN genómico. La actina al ser un gen constitutivo se utilizó como control positivo para corroborar que la

carga en el gel haya sido homogénea y que los componentes de la reacción de RT-PCR funcionaran adecuadamente. Estos oligonucleótidos también se usaron como control negativo en la muestra sin retrotranscriptasa donde no se debe observar amplificación, ya que un amplicón de 429 pb sería un indicador de contaminación con ADNg.

3.2.11 Análisis de expresión

El análisis de expresión se realizó empleando como molde el ADNc generado según lo descrito en el apartado anterior. La reacción de PCR general consistió de lo siguiente: 5 µL del ADNc, oligonucleótido sentido 10 µM (1 µL), oligonucleótido antisentido 10 µM (1 µL), dNTP's 10 mM (1 µL), $MgCl_2$ 50 mM (1.5 µL), amortiguador de PCR 10X (1X), H_2OUP (40.3 µL), Taq polimerasa 5 U/µL (1 U). En el caso de la amplificación de CrPAP4 se adicionó 1X del reactivo CES 5X (Ralser *et al.*, 2006), El programa general de la reacción de PCR fue el siguiente: 1) desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 minutos, 2) desnaturalización a 95° C durante 30 segundos, 3) alineamiento a 50 °C para CrPAP1 y a 55° C para CrPAP2 a CrPAP6 durante 30 segundos, 4) extensión a 72 °C durante 1 minuto, 39 repeticiones del paso 2 al 4 y una extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Concentración celular de *C. reinhardtii* en respuesta a la presencia de IP_6 en el medio de cultivo

Se demostró que *C. reinhardtii* fue capaz de crecer en medio TA suplementado con IP_6 como única fuente de P (TA+IP_6) (Fig. 3.3a), alcanzando una concentración celular de 6.6 ±0.29 x 10^6 células mL^{-1}, mientras que se alcanzó una concentración de 11.37 ±1.05 x 10^6 células mL^{-1} en medio TAP, y de 17.09 ±1.5 x 10^6 células mL^{-1} en medio TAP+IP_6 (Fig. 3.3b).

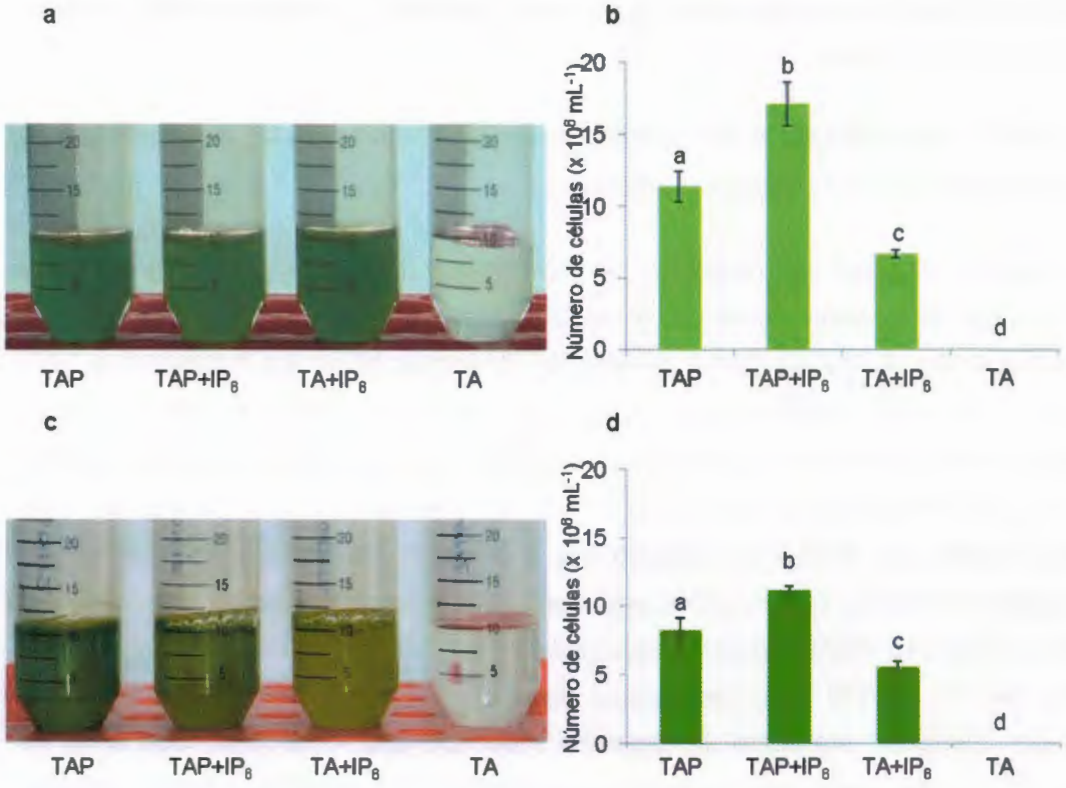

Figura 3.3 Efecto del IP_6 sobre el cultivo de *C. reinhardtii*. Cultivos de *C. reinhardtii* a los siete días en medio líquido bajo los tratamientos TAP, TAP+IP_6, TA+IP_6 y TA, dos réplicas (a y c). Concentración celular de los cultivos de *C. reinhardtii* después de siete días en medio líquido bajo los tratamientos TAP, TAP+IP_6, TA+IP_6 y TA, dos replicas, (b y d).

Este experimento se repitió con la finalidad de corroborar los resultados y se observó el mismo patrón de crecimiento que en el experimento anterior (Figura 3.3c). Por otro lado, aunque la concentración celular fue menor en este segundo experimento, la tendencia se mantuvo, como se puede observar en la Figura 3.3d. La concentración celular del medio TA+IP_6 fue de 5.59 ± 0.36 x 10^6 células mL^{-1}, mientras que en el medio TAP se alcanzó 8.31 ± 0.81 x 10^6 células mL^{-1} y de 11.21 ± 0.25 x 10^6 células mL^{-1} en medio TAP+IP_6 (Figura 3.3d). Como se esperaba, en el medio TA no hubo crecimiento alguno debido a que se suprimió la fuente de P. Como se puede observar, los datos anteriores indican que *C. reinhardtii* es capaz de crecer en presencia de IP_6, incluso si ésta es la única fuente de fósforo. Sin embargo, dada la importancia del fósforo en las funciones vitales de los

organismos vivos, como se esperaba no es capaz de crecer cuando se le retira la fuente de P del medio de cultivo.

3.3.2 Perfil electroforético de proteinas de *C. reinhardtii* en respuesta a la presencia de IP_6 en el medio de cultivo

Con respecto al perfil de proteínas, se encontraron diferencias tanto en el perfil electroforético intracelular como en el perfil electroforético extracelular (PEI y PEE respectivamente) de los diferentes cultivos de *C. reinhardtii* en los tratamientos TAP, TAP+IP_6 y TA+IP_6, (Figura 3.4a y 3.4b). Una banda de ~44 kDa fue observada exclusivamente en el PEI de los cultivos en presencia de IP_6, mientras que una banda de ~145 kDa fue encontrada únicamente en el PEE del cultivo correspondiente al tratamiento TA+IP_6. También, en el PEE se observó que a diferencia del tratamiento TAP, en los tratamientos TAP+IP_6 y TA+IP_6 aparecieron bandas de ~49 y ~92 kDa; sin embargo, esta última disminuyó su intensidad en el tratamiento TA+IP_6, así como también lo hicieron las bandas de ~71 y ~110 kDa. Los valores del peso molecular de cada banda fueron calculados mediante una curva de regresión lineal con una R^2 de 0.95. Con el fin de confirmar los datos observados, se replicó el experimento y los resultados fueron similares (Figura 3.4c y 3.4d).

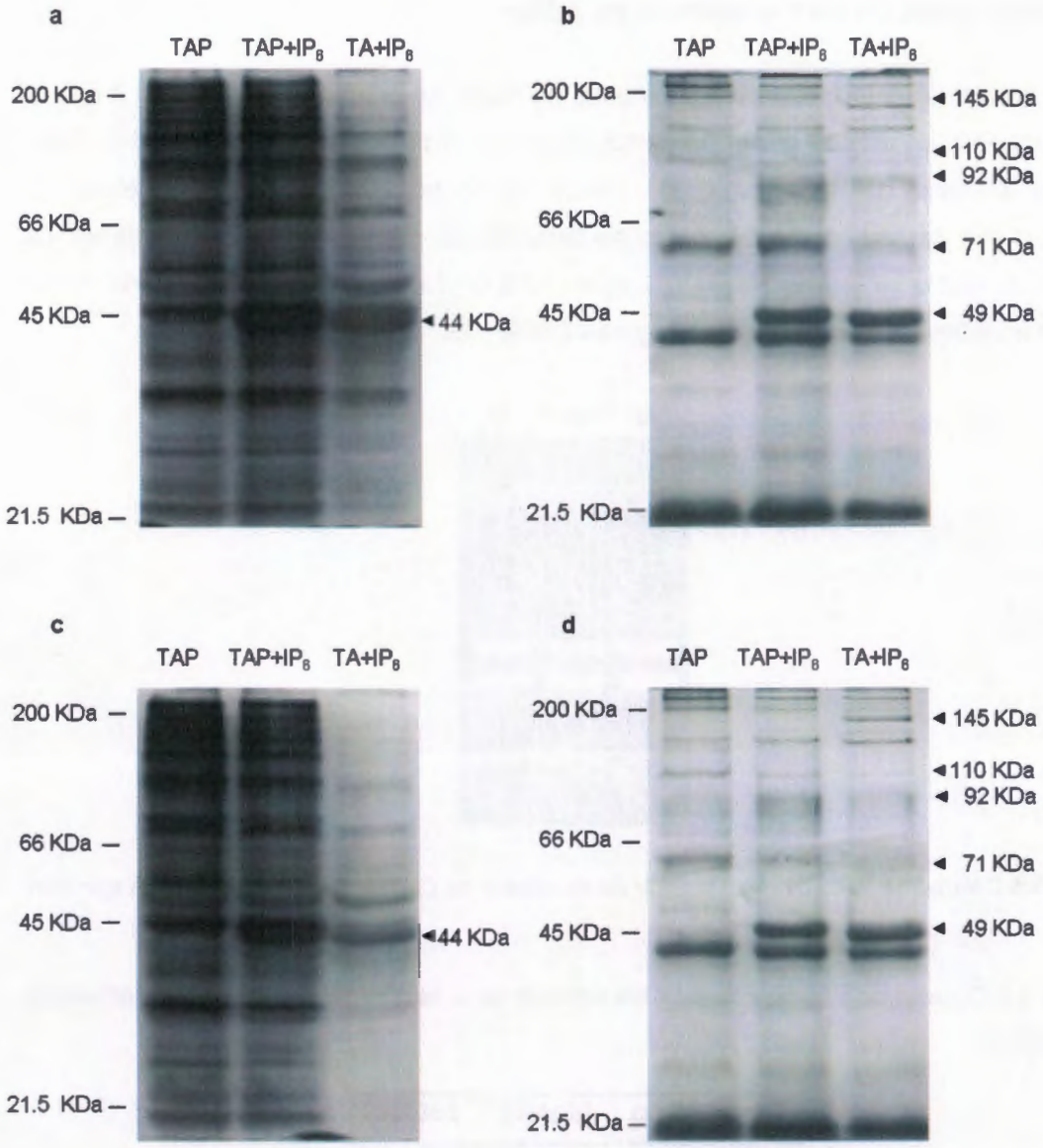

Figura 3.4 Perfil de proteínas de cultivos de *C. reinhardtii* después de siete días de cultivo en los tratamientos TAP, TAP+IP_6, TA+IP_6. Perfil electroforético intracelular dos réplicas (a y c). Perfil electroforético extracelular dos réplicas (b y d). Los pesos moleculares fueron calculados de acuerdo a una curva de calibración (R^2=0.95).

3.3.3 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

La calidad del ARN utilizado para la síntesis de ADNc se presenta en la Figura 3.5, y la concentración de ARN de cada una de las muestras se presenta en el Cuadro 3.2. Dado que en el caso del tratamiento sin fuente de P no hubo crecimiento celular, la cuantificación de ARN se señala como no determinado (ND) para dicho tratamiento. La síntesis de ADNc se realizó tomando 5 µg de ARN de cada muestra para posteriormente realizar el análisis de expresión de los genes *CrPAP1-6*.

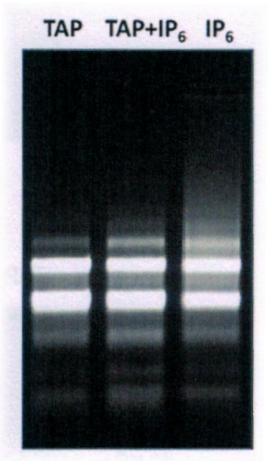

Figura 3.5 Calidad del ARN extraído a partir de de células de *C. reinhardtii* con el kit RNA spin Mini de GE

Cuadro 3.2 Concentración y pureza del ARN extraído de *C. reinhardtii* cultivado en los diferentes tratamientos.

Tratamiento	[µg/µL]	260/280
TAP	1.09	1.79
TAP+IP_6	0.75	1.84
TA-P	ND	ND
IP_6	0.36	1.81

3.3.4 Análisis de expresión de los genes *CrPAP1-6* de *C. reinhardtii* en respuesta a la presencia de IP_6 en el medio de cultivo

La expresión de los seis genes *CrPAP* fue evaluada por medio de RT-PCR. Este análisis se corroboró mediante una segunda réplica del experimento y los resultados fueron semejantes a los de la primera réplica. Los resultados de ambos experimentos se pueden ver en la Figura 3.6a y 3.6b.

La expresión de *CrPAP2*, *CrPAP4* y *CrPAP6* fue detectada en todos los tratamientos, donde los amplicones esperados de 214, 271 y 185 pb respectivamente, estuvieron presentes y se observaron bandas intensas en el gel de electroforesis. A diferencia de estos tres genes, *CrPAP3* presentó una muy baja expresión en todos los tratamientos, particularmente en el tratamiento TA+IP_6. Para este gen se observó un amplicón de ~400 pb en lugar de los ~200 pb que se esperaban de acuerdo a la secuencia predicha. Este resultado puede ser explicado por la predicción incorrecta de un exón, ya que se sabe que para un gen típico de *Arabidopsis* con cinco exones, al menos uno de ellos se espera que sus límites se encuentren mal predichos *ab initio* por el programa predictor (Rhee *et al.*, 2006). Por su parte, la expresión de *CrPAP1* no fue detectada o fue apenas detectable en el tratamiento TAP. En el tratamiento TAP+IP_6 se detectó una banda de muy baja intensidad, lo que sugiere una muy baja expresión de *CrPAP1* bajo este tratamiento. Sin embargo, e interesantemente, en el tratamiento TA+IP_6 se observó una banda intensa del amplicón de ~200 pb predicho para *CrPAP1*, lo que sugiere una expresión elevada de este gen bajo el tratamiento que contiene IP_6 como única fuente de fósforo.

En el caso de *CrPAP5*, su expresión fue detectada únicamente en el tratamiento TA+IP_6 observándose el amplicón de ~300 pb predicho, mientras que en los tratamientos TAP y TAP+IP_6 no fue posible detectar amplicón alguno de este gen en el gel de electroforesis. Lo anterior sugiere una muy baja o nula expresión de *CrPAP5* bajo tratamientos que contienen KH_2PO_4 y K_2HPO_4 aportados por el medio TAP, y que esta expresión es inducida en ausencia de estas fuentes de fósforo.

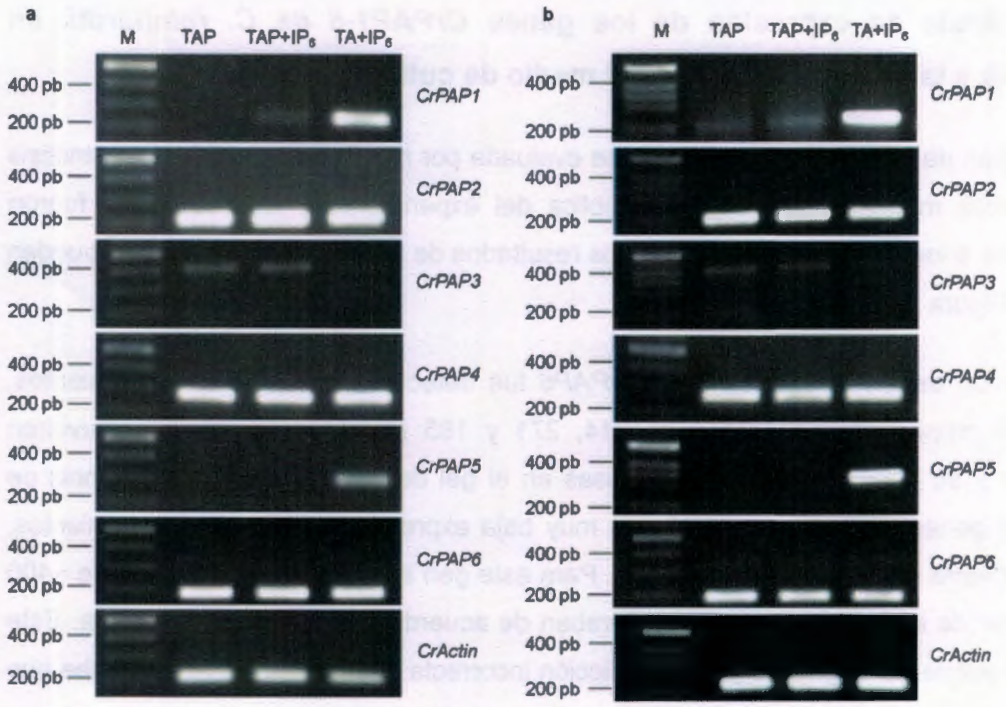

Figura 3.6 Análisis de la expresión de los genes *CrPAP1-6* de *C. reinhardtii* después de siete días de cultivo en los tratamientos TAP, TAP+IP_6, TA+IP_6. Dos réplicas (a y b). *CrActin*: actina de *C. reinhardtii*; M: marcador de peso molecular 2-log.

3.4 DISCUSION

Quisel y colaboradores (1996) mencionaron que *C. reinhardtii* había sido capaz de crecer en un medio suplementado únicamente con IP_6 como fuente de P, sin emabrgo no presentan evidencia de ello. En el presente estudio, se presentan evidencias de que *C. reinhardtii* fue capaz de crecer en un medio suplementado exclusivamente con IP_6 como fuente de P.

La alta concentración celular encontrada en el cultivo de *C. reinhardtii* correspondiente al tratamiento TAP+IP_6, podría ser atribuida al incremento en la cantidad de P disponible en el medio de cultivo, asumiendo que el IP_6 presente en el medio está siendo desfosforilado por alguna fitasa endógena de la microalga. Por el contrario, la baja concentración celular encontrada en el tratamiento TA+IP_6 podría deberse a que bajo este tratamiento *C. reinhardtii* depende única y exclusivamente del P obtenido a partir de la desfoforilación del IP_6 por alguna fitasa endógena de la microalga, y si la eficiencia de esta desfosforilación no resulta en la misma disponibilidad de P en el medio de cultivo que se tendría con el TAP, entonces ésta pudiera ser la causa de la menor concentración celular encontrada en el tratamiento TA+IP_6.

Maenz y colaboradores (1999) mencionan que a pH neutro, los cationes como el Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+} y Zn^{2+} inhiben en un 50% la actividad de la fitasa de *Aspergillus niger* sobre el IP_6, por lo que también cabe la posibilidad de que la baja concentración celular observada en el tratamiento TA+IP_6 se deba a una hidrólisis parcial del IP_6, provocada por la interferencia de los cationes presentes en el medio TA (pH = 7.00) con la actividad de las enzimas involucradas en dicha hidrólisis.

Por su parte, el IP_6 es un agente quelante de cationes minerales de significancia nutricional, como es el caso de K^{+2} y Mg^{+2}, así como de Ca^{+2}, Zn^{+2}, Fe^{+2} y Cu^{+2} (Lopez *et al.*, 2002). Este fenómeno podría ser la explicación del cambio de coloración observado entre el cultivo en medio TAP y los cultivos en medios con presencia de IP_6, ya que dicha coloración es similar a la que presentan los cultivos de *C. reinhardtii* deficientes en Zn^{+2} y Fe^{+2} (Kropat *et al.* 2011). Además, el efecto quelante del IP_6 podría estar afectando a las clorofilas al no permitirles unir el Mg^{+2}, el cual forma parte importante de estas moléculas (Urbano *et al.*, 2000). Por otro lado, Blevins (1999) menciona que para que se dé una

correcta asimilación del Mg^{+2}, es necesario un nivel adecuado de P, que permita generar la cantidad suficiente de ATP para activar los canales permeables a Mg^{+2} y otras moléculas. Estas dos teorías podrían explicar satisfactoriamente la diferencia de coloración en los tratamientos con presencia de IP_6; sin embargo, serían necesarios otros estudios para resolver esta interesante cuestión en un futuro.

Se observó también que la presencia de IP_6 en el medio de cultivo propició cambios en el perfil de electroforesis de proteínas de *C. reinhardtii.* La variación encontrada en los perfiles electroforéticos de proteínas, tanto intracelular como extracelular (Figura 3.4) podrían ser parte de las adaptaciones metabólicas como respuesta a la ausencia de P, conocida como PSR (por las siglas en inglés de "phosphate starvation response"), donde se sabe que ocurre una acumulación diferencial de proteínas bajo esa condición, lo que indica un cambio extenso en la expresión de genes, así como en el recambio de las proteínas (Duff *et al.,* 1991; Lan *et al.,* 2012; Raghothama, 1999).

El estudio de fosfatasas es muy limitado en microalgas y no existe un consenso acerca del número de fosfatasas presentes, ya que algunos autores como Matagne y colaboradores (1976) sugieren que existen dos fosfatasas ácidas constitutivas, una fosfatasa neutral y dos alcalinas inducibles, en tanto que Patni y colaboradores (1977) argumentan que únicamente existen dos fosfatasas, una ácida y una alcalina. Por otro lado, Quisel y colaboradores (1996) sugieren la existencia de dos fosfatasas alcalinas que son inducidas por la ausencia de P. Estos autores han caracterizado estas fosfatasas a nivel bioquímico utilizando diferentes substratos como el p-nitrofenil fosfato, el α-glicerol fosfato, naftil fosfato y el IP_6. Sin embargo, ninguna de las fosfatasas fue capaz de degradar a este último substrato. Ninguna de las fosfatasas estudiadas en *C. reinhardtii* ha sido caracterizada a nivel molecular, por lo que es difícil hacer una comparación entre ellas.

Los resultados del cultivo de *C. reinhardtii* con IP_6 como fuente de P sugieren que esta microalga posee una fitasa endógena que aún no ha sido caracterizada, y que le permite aprovechar esta fuente de P cuando las condiciones así lo propician.

Las fosfatasas de la clase PAP han sido mayormente estudiadas por su participación potencial en la nutrición por P, ya que son capaces de catalizar la hidrólisis de varios

ésteres y anhidros de fosfato (Oddie *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002). La función que ejercen en el reciclamiento de P es crucial para el metabolismo celular y en apariencia la inducción de las PAPs intracelulares, así como de aquellas que son secretadas, es una respuesta universal de las plantas ante condiciones de deficiencia de P (Tran *et al.*, 2010). Hasta la fecha, no se conocen ni se han caracterizado PAPs con o sin actividad de fitasa en *C. reinhardtii*, por lo que en este capítulo se evaluó la expresión de los seis genes *CrPAP* identificados en el capítulo anterior usando IP_6 como única fuente de P.

La expresión de los genes *CrPAP2*, *CrPAP4* y *CrPAP6* se mantuvo sin afectaciones ante la modificación en la forma de P proporcionada. Interesantemente, los genes Atphy y AtPAP23 de *Arabidopsis thaliana*, que codifican para fitasas de la clase PAP, son expresados de manera constitutiva y no se ven afectados por condiciones de privación de P (Wang *et al.*, 2009; Kuang *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2005). Por esta razón no se puede descartar que los genes *CrPAP* antes mencionados tengan alguna participación en la PSR ya que la regulación pudiese ser a nivel postranscripcional o postraduccional.

Por su parte, el gen *CrPAP3* tuvo una expresión muy baja en todos los tratamientos evaluados, y ésta disminuyó aun más en presencia de IP_6 como única fuente de P. En este sentido es conocido que el Pi puede actuar como un inhibidor competitivo moderado de algunas PAPs (Schenk *et al.*, 2005), por lo tanto, el Pi liberado por la hidrólisis del IP_6 podría actuar como un inhibidor de la expresión del gen *CrPAP3*. Se sabe que los fluoruros, el vanadato, y los oxoaniones tetraédricos como el fosfato pueden inhibir la actividad de algunas PAPs (Mitic *et al.*, 2006; Mcgeary *et al.*, 2009), y dado que el IP_6 es un compuesto polifosfatado, la liberación de fosfatos a partir de él pudieran de alguna manera afectar la expresión de este gen.

Interesantemente, se encontró que la expresión de *CrPAP1* fue inducida tanto en el medio TAP+IP_6 como en el TA+IP_6, sugiriendo que la expresión de este gen probablemente esté siendo inducida ante la presencia de IP_6 y esta respuesta se vería incrementada por la ausencia de sales de fosfato aportadas normalmente por el TAP en el medio. Por su parte, *CrPAP5* solo se expresó en el medio TA+IP_6, lo que sugiere que su expresión podría estar siendo negativamente afectada por la presencia de las sales de fosfato antes mencionadas, y tal vez su ausencia esté involucrada en la inducción de la expresión de

este gen. La inducción de la síntesis de fosfatasas ácidas en respuesta a la ausencia de Pi ha sido demostrada en plantas como *Brasica nigra* y *Lycopersicon esculentum* (Duff *et al.*, 1991; Goldstein *et al.*, 1988), mientras que en algunos microorganismos como en las bacterias *B. subtilis* y *Klebsiella terrigena*, la presencia de IP_6 puede inducir la síntesis de fitasas (Greiner *et al.*, 1997; Powar y Jagannathan 1982). Tanto *CrPAP1* como *CrPAP5* podrían codificar para fosfatasas involucradas en la PSR. Probablemente tengan actividad en el reciclaje de Pi a partir de fuentes orgánicas alternas, las cuales podrían incluir al IP_6 para cualquiera de ellas. Con base en los resultados obtenidos, podemos especular que *CrPAP1* está involucrado en la utilización del IP_6, ya que se observó que este gen fue inducido en los tratamientos con presencia de IP_6, a diferencia de *CrPAP5* que en apariencia fue inducido por la ausencia de Pi, ya que únicamente se observó su expresión en el medio TA+IP_6. CrPAP1 y CrPAP5 tuvieron pesos moleculares predichos de 60.84 y 70.22 KDa (Cuadro 2.2), por lo que se esperaría observar un incremento en la intensidad de las bandas de proteína visualizadas mediante SDS-PAGE, sin embargo, bajo el tratamiento TA+IP_6 no se observa dicho incremento, por el contrario, las bandas de proteína observadas disminuyen su intensidad en la zona correspondiente a estos pesos moleculares. El hecho de no observar una banda de elevada intensidad no implica que la proteína no se encuentre presente, ya que pudiera darse el caso de que la cantidad de proteína generada por los genes *CrPAP1* y *CrPAP5* no sea suficiente para ser detectada con la técnica de SDS-PAGE.

3.5 CONCLUSIONES

1. *C. reinhardtii* fue capaz de crecer en un medio de cultivo con IP_6 como la única fuente de fósforo presente, por lo que se sugiere que presenta al menos una fitasa endógena aún por ser caracterizada.
2. El tratamiento TAP+IP_6 propició un incremento en la concentración celular de *C. reinhardtii.*
3. La presencia de IP_6 en los tratamientos, modificó el perfil proteico de *C. reinhardtii*, tanto a nivel intracelular como a nivel extracelular.
4. El análisis de expresión indicó que los genes *CrPAP1* y *CrPAP5* se comportan como genes inducibles. *CrPAP1* ante la presencia de IP_6 y *CrPAP5* ante la ausencia de las sales de fósforo del medio TAP.

5. El análisis de expresión de los genes *CrPAP2*, *CrPAP3*, *CrPAP4* y *CrPAP6* indicó que estos genes no responden a tratamientos de déficit de fosfato.

3.6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Blevins, D.G. (1999). Why plants need phosphorus. Better Crops. 8 (2), 29-30

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72(1–2), 248-254.

Dellaporta, S., J. Wood y J. Hicks (1983). A plant DNA minipreparation: Version II. Plant Molecular Biology Reporter. 1(4), 19-21.

Duff, S. M., W. C. Plaxton y D. D. Lefebvre (1991). Phosphate-starvation response in plant cells: *de novo* synthesis and degradation of acid phosphatases. Proceedings of the National Academy of Sciences. 88(21), 9538-9542.

Goldstein, A. H., D. A. Baertlein y R. G. McDaniel (1988). Phosphate starvation inducible metabolism in *Lycopersicon esculentum*: I. excretion of acid phosphatase by tomato plants and suspension-cultured cells. Plant Physiology. 87(3), 711-715.

Gorman, D. S. y R. P. Levine (1965). Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardi*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 54(6), 1665-1669.

Greiner, R., E. Haller, U. Konietzny y K.-D. Jany (1997). Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 341(2), 201-206.

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.

Konietzny, U. y R. Greiner (2002). Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). International Journal of Food Science & Technology. 37(7), 791-812.

Kropat, J., A. Hong-Hermesdorf, D. Casero, P. Ent, M. Castruita, M. Pellegrini, S. S. Merchant y D. Malasarn (2011). A revised mineral nutrient supplement increases biomass and growth rate in *Chlamydomonas reinhardtii*. The Plant Journal. 66(5), 770-780.

Kuang, R., K.-H. Chan, E. Yeung y B. L. Lim (2009). Molecular and biochemical characterization of *AtPAP15*, a purple acid phosphatase with phytase activity, in *Arabidopsis*. Plant Physiology. 151(1), 199-209.

Lan, P., W. Li y W. Schmidt (2012). Complementary proteome and transcriptome profiling in phosphate-deficient *Arabidopsis* roots reveals multiple levels of gene regulation. Molecular & Cellular Proteomics. 11(11), 1156-1166.

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.

Liao, H., F.-L. Wong, T.-H. Phang, M.-Y. Cheung, W.-Y. F. Li, G. Shao, X. Yan y H.-M. Lam (2003). *GmPAP3*, a novel purple acid phosphatase-like gene in soybean induced by NaCl stress but not phosphorus deficiency. Gene. 318(0), 103-111.

Lopez, H. W., F. Leenhardt, C. Coudray y C. Remesy (2002). Minerals and phytic acid interactions: is it a real problem for human nutrition? International Journal of Food Science & Technology. 37(7), 727-739.

Maenz, D. D., C. M. Engele-Schaan, R. W. Newkirk y H. L. Classen (1999). The effect of minerals and mineral chelators on the formation of phytase-resistant and phytase-susceptible forms of phytic acid in solution and in a slurry of canola meal. Animal Feed Science and Technology. 81(3–4), 177-192.

Matagne, R. F., R. Loppes y R. Deltour (1976). Phosphatase of *Chlamydomonas reinhardi*: biochemical and cytochemical approach with specific mutants. Journal of Bacteriology. 126(2), 937-950.

McGeary, R. P., P. Vella, J. Y. W. Mak, L. W. Guddat y G. Schenk (2009). Inhibition of purple acid phosphatase with α-alkoxynaphthylmethylphosphonic acids. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 19(1), 163-166.

Mcmanus. J. F. A. y R. Mowry (1964). Special Methods for the constituents of cell and tissues en: Staining methods, Histologic and Histochemical, Harper y Row, Nueva York, Evanston y Londres; John Weatherhill, Inc., Tokyo pp 186

Mitić, N., S. J. Smith, A. Neves, L. W. Guddat, L. R. Gahan y G. Schenk (2006). The catalytic mechanisms of binuclear metallohydrolases. Chemical Reviews. 106(8), 3338-3363.

Moseley, J. L., D. Gonzalez-Ballester, W. Pootakham, S. Bailey y A. R. Grossman (2009). Genetic interactions between regulators of *Chlamydomonas* phosphorus and sulfur deprivation responses. Genetics. 181(3), 889-905.

Oddie, G. W., G. Schenk, N. Z. Angel, N. Walsh, L. W. Guddat, J. de Jersey, A. I. Cassady, S. E. Hamilton y D. A. Hume (2000). Structure, function, and regulation of tartrate-resistant acid phosphatase. Bone. 27(5), 575-584.

Patni, N. J., S. W. Dhawale y S. Aaronson (1977). Extracellular phosphatases of *Chlamydomonas reinhardi* and their regulation. Journal of Bacteriology. 130(1), 205-211.

Powar, V. K. y V. Jagannathan (1982). Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology. 151(3), 1102-1108.

Quisel, J. D., D. D. Wykoff y A. R. Grossman (1996). Biochemical characterization of the extracellular phosphatases produced by phosphorus-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiology. 111(3), 839-848.

Raghothama, K. G. (1999). Phosphate acquisition. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 50(1), 665-693.

Ralser, M., R. Querfurth, H.-J. Warnatz, H. Lehrach, M.-L. Yaspo y S. Krobitsch (2006). An efficient and economic enhancer mix for PCR. Biochemical and Biophysical Research Communications. 347(3), 747-751.

Rhee, S. Y., J. Dickerson y D. Xu (2006). Bioinformatics and its applications in plant biology. Annual Review of Plant Biology. 57(1), 335-360.

Riekhof, W. R., M. E. Ruckle, T. A. Lydic, B. B. Sears y C. Benning (2003). The sulfolipids 2′-O-acyl-sulfoquinovosyldiacylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol are absent from a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant deleted in SQD1. Plant Physiology. 133(2), 864-874.

Schenk, G., L. R. Gahan, L. E. Carrington, N. Mitić, M. Valizadeh, S. E. Hamilton, J. de Jersey y L. W. Guddat (2005). Phosphate forms an unusual tripodal complex with the Fe–Mn center of sweet potato purple acid phosphatase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 102(2), 273-278.

Tran, H. T., B. A. Hurley y W. C. Plaxton (2010). Feeding hungry plants: The role of purple acid phosphatases in phosphate nutrition. Plant Science. 179(1–2), 14-27

Urbano, G., M. López-Jurado, P. Aranda, C. Vidal-Valverde, E. Tenorio y J. Porres (2000). The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function? Journal of Physiology and Biochemistry. 56(3), 283-294.

Wang, L., Z. Li, W. Qian, W. Guo, X. Gao, L. Huang, H. Wang, H. Zhu, J.-W. Wu, D. Wang y D. Liu (2011). The *Arabidopsis* purple acid phosphatase AtPAP10 is predominantly associated with the root surface and plays an important role in plant tolerance to phosphate limitation. Plant Physiology. 157(3), 1283-1299.

Wang, X., Y. Wang, J. Tian, B. L. Lim, X. Yan y H. Liao (2009). Overexpressing *AtPAP15* enhances phosphorus efficiency in soybean. Plant Physiology. 151(1), 233-240.

Werner, T., N. Amrhein y F. Freimoser (2007). Inorganic polyphosphate occurs in the cell wall of Chlamydomonas reinhardtii and accumulates during cytokinesis. BMC Plant Biology. 7(1), 51.

Yehudai-Resheff, S., S. L. Zimmer, Y. Komine and D. B. Stern (2007). Integration of Chloroplast Nucleic Acid Metabolism into the Phosphate Deprivation Response in Chlamydomonas reinhardtii. The Plant Cell Online. 19(3), 1023-1038.

Zhu, H., W. Qian, X. Lu, D. Li, X. Liu, K. Liu y D. Wang (2005). Expression patterns of purple acid phosphatase genes in *Arabidopsis* organs and functional analysis of *AtPAP23* predominantly transcribed in flower. Plant Molecular Biology. 59(4), 581-594.

CAPÍTULO IV

4. CONSTRUCCIÓN DE UN PLÁSMIDO RECOMBINANTE CON EL GEN *PhyA* DE *Selenomonas ruminantium* PARA LA TRANSFORMACIÓN DEL CLOROPLASTO DE *C. reinhardtii*

4.1 INTRODUCCIÓN

Recientemente *C. reinhardtii* ha ganado relevancia como un sistema para la producción de PRs, ya que a diferencia de otros biorreactores presenta ventajas como: la ausencia de toxinas, su fácil manipulación a nivel laboratorio así como su rápida multiplicación. Además se considera que el período desde la transformación génica hasta la producción de PRs es relativamente corto, en comparación con otros organismos (Mayfield *et al.*, 2007; Franklin *et al.*, 2004; Rochaix *et al.*, 1995).

La mayoría de las PRs producidas en *C. reinhardtii* están destinadas para su uso en el área medica, tal es el caso de anticuerpos monoclonales (HSV8-lsc), proteínas terapeúticas (hGAD-65) y vacunas orales (CSFV), siendo el cloroplasto el sitio de producción preferido ya que permite una mayor acumulación de proteína en comparación con el núcleo u otro tipo de biorreactores, de una manera más eficiente y rentable, bajo condiciones de completa contención (Wang *et al.*, 2008; He *et al.*, 2007; Mayfield *et al.*, 2003).

Las fitasas son enzimas muy importantes en el área agropecuaria, ya que son utilizadas como aditivo alimenticio en la dieta de los animales monogástricos los cuales tienen una capacidad muy limitada de asimilación de fitato (IP_6) y por lo tanto, del P contenido en el IP_6 que es la principal forma de almacenamiento de P en los granos y semillas utilizados en la alimentación de estos animales. (Kim *et al.*, 2010; Leyten *et al.*, 2008; Kies *et al.*, 2006). No todas las fitasas cumplen con las características de pH, temperatura y eficiencia catalítica para que puedan ser utilizadas en la industria agropecuaria por lo que es necesario desarrollar nuevas herramientas que permitan la producción recombinante de este tipo de enzimas (Yao *et al.*, 2012).

Una fitasa que se ha reportado con las características adecuadas para ser utilizada en la alimentación animal, es la phyAsr aislada de la bacteria ruminal *S. ruminantium* (Puhl *et al.*, 2007; Chu *et al* 2004). Esta fitasa al provenir de una bacteria ruminal, se encuentra adaptada a las condiciones imperantes en el interior del aparato digestivo, además que ya ha sido caracterizada cinéticamente y ha demostrado tener una muy buena actividad en la degradación del IP_6 (Puhl *et al.*, 2007; Yanke *et al.*, 1998). Esta fitasa ha sido expresada con éxito en semillas de arroz alcanzando un rendimiento de 0.5% de proteína soluble total mediante transformación nuclear (Hong *et al.*, 2004).

Hasta la fecha, solo se conoce un reporte donde se indique el uso del cloroplasto de *C. reinhardtii* como biorreactor para la producción de una fitasa, sin embargo, los rendimientos obtenidos en este trabajo fueron muy bajos (10U/mg de microalga) (Yoon *et al.*, 2011). Una combinación de regiones reguladoras atractiva para llevar a cabo la producción de la phyAsr de *S. ruminantium* en el cloroplasto de *C. reinhardtii* es la región promotora y el 5'UTR del gen *atpA* y el 3'UTR del gen *psbA* del cloroplasto de esta microalga. De acuerdo al reporte de Barnes y colaboradores (2005) ésta es una de las mejores combinaciones para tener una elevada acumulación de ARNm y de proteína.

Comúnmente, el vector p322 es utilizado para la transformación del cloroplasto de *C. reinhadtii* (Newman *et al.*, 1991), sin embargo, la transformación con este plásmido requiere una estrategia de co-transformación utilizando un segundo plásmido, denominado p667, que confiere resistencia a espectinomicina. Una desventaja de esta estrategia es que la tasa de recuperación de falsos positivos es alta por lo que se necesita de un análisis exhaustivo para dar con la clona de interés.

Con base en lo anterior, el objetivo de este capítulo fue la obtención del vector pChPhy, un plásmido que pueda ser utilizado para la transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii* y expresar el gen que codifica para la fitasa phyAsr de la bacteria ruminal *S. ruminantium* utilizando la región promotora y el 5'UTR del gen *atpA* y el 3'UTR del gen *psbA* del cloroplasto de esta microalga, con la ventaja adicional de que pChPhy permite transformar el cloroplasto de *C. reinhardtii* sin tener que recurrir a la estrategia de co-transformación, ya que cuenta con el gen de selección *aadA* que le confiere resistencia a los antibióticos espectinomicina y estreptomicina.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Estrategia experimental

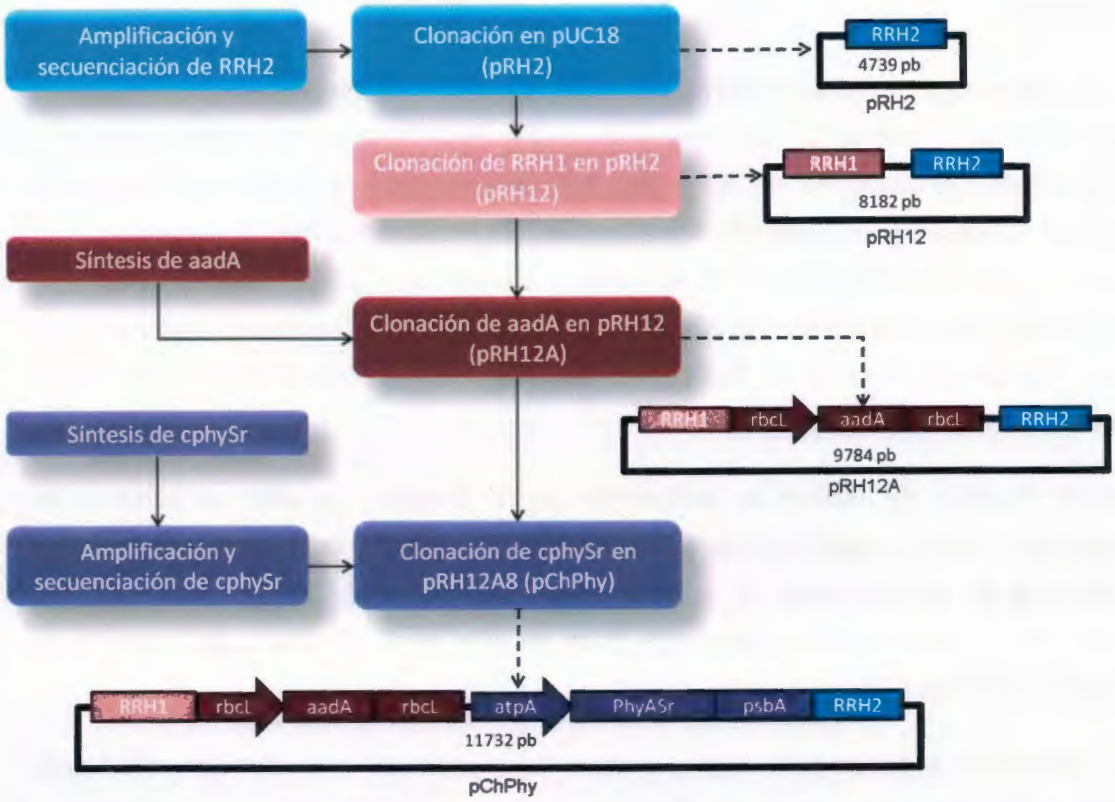

Figura 4.1 Estrategia experimental para la construcción del vector que contiene el gen *phyA* de *Selenomonas ruminantium* (pChPhy).

4.2.2 Aislamiento *in silico* de las secuencias del promotor más el 5'UTR del gen *atpA*, 3'UTR del gen *psbA* de *C. reinhardtii* y región codificante del gen *phyASr* de *S. ruminantium*

Las secuencias reguladoras seleccionadas para llevar a cabo la construcción de expresión fueron la región del promotor más el 5'UTR (P+5'UTR) del gen *atpA* y la región 3' UTR del gen *psbA*. Estas secuencias fueron seleccionadas con base en el trabajo reportado por Barnes y colaboradores (2005). La secuencia del P+5'UTR del gen *atpA* fue aislada *in sílico* a partir de la secuencia del genoma del cloroplasto, que se encuentra en la base de datos del GenBank con el número de accesión BK000554, en tanto que la

secuencia de la región 3' UTR del gen *psbA*, fue proporcionada por el Dr. Stephen Mayfield. Esta secuencia fue corroborada con la secuencia del genoma del cloroplasto que se encuentra en la base de datos del GenBank, con el número de accesión BK000554.

El gen recombinante seleccionado para llevar a cabo la producción de la fitasa en el cloroplasto de *C. reinhardtii* fue el gen *phyA* nativo de la bacteria anaérobica ruminal *S. ruminantium*. La secuencia de dicho gen fue seleccionada con base a la patente de Cheng y colaboradores (1999) y fue corroborada con la secuencia que se encuentra en la base de datos del GenBank con el número de accesión AF177214.1. Dicha fitasa pertenece a la clase de proteínas fosfatasas de tirosina (PTP) o también conocidas como fitasas de cisteína (Chu *et al.*, 2004) y presenta una alta actividad usando fitato como sustrato.

Con la finalidad de facilitar la purificación de la proteína, se aisló la bandera de purificación FLAG, la cuál ha sido usado previamente para la purificación de proteínas producidas en el cloroplasto de *C. reinhardtii* (Mayfield *et al.*, 2003). La bandera de purificación se obtuvo de la secuencia dada de alta en el GenBank con número de accesión AY191459.1.

Los programas utilizados para aislar y analizar las secuencias antes mencionadas fueron Editseq y MegAlign del paquete bioinformático Lasergene de DNAstar.

4.2.3 Ensamblaje *in silico* y síntesis de la construcción *atpA/phyASr/psbA* (cphySr)

La construcción de expresión comprende a la región promotora más el 5'UTR del gen *atpA* del cloroplasto de *C. reinhardtii*, el gen *phyASr* que codifica para la fitasa de *S. ruminantium* y la región 3'UTR del gen *psbA* del cloroplasto de *C. reinhardtii*. Además, en el extremo 3' de la ORF, se incluyó la secuencia de la bandera de purificación FLAG, justo antes del codón de paro. La construcción de expresión fue ensamblada *in silico*, empleando el programa SeqBuilder del paquete bioinformático Lasergene de DNAstar. De aquí en adelante a esta construcción la denominaremos como *cphySr*.

La secuencia de la construcción de expresión cphySr fue enviada para su síntesis a la compañía alemana GENEART AG (http://www.geneart.com/), a la cual se le solicitó la optimización de la secuencia con el uso del codón del cloroplasto de *C. reinhardtii*.

4.2.4 Clonación de la construcción cphySr con los sitios de restricción *Sal*I Y *Asc*I

La construcción cphySr fue sintetizada por la compañía GENEART, con el sitio de restricción *BamH*I tanto en los extremos 5' como 3' de la construcción. Sin embargo para clonarlo en el vector pRH12A fue necesario agregarle nuevos sitios de restricción. Para ello la construcción cphySr fue amplificada mediante PCR con oligonucleótidos específicos, que adicionalmente añadieron en los extremos 5' y 3' los sitios de restricción *Sal*I y *Asc*I, respectivamente. El programa utilizado fue: 95 °C durante 3 minutos, 95 °C durante 1 minuto, 60 °C durante 30 segundos, 68 °C durante 2 minutos, se repitió 15 veces del paso 2 al 4 y finalmente una extensión final a 68 °C durante 5 minutos. La enzima empleada para llevar a cabo la reacción fue la Expand Long Template PCR System (Roche). El producto de PCR fue clonado en el vector p-GEM-T-easy (Promega) y fue enviado para su secuenciación Clemson University Genomics Institute (CUGI).

4.2.5 Aislamiento *in silico* de las secuencias promotor más 5'UTR (P+5'UTR) y 3'UTR del gen *rbcL* de *C. reinhardtii* y región codificante del gen *aadA* de *E. coli*

Las secuencias reguladoras P+5'UTR y 3'UTR del gen *rbcL* de *C. reinhardtii,* fueron aisladas a partir de la secuencia del genoma del cloroplasto que se encuentra en la base de datos del GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) con el número de accesión BK000554.2. Estas secuencias fueron seleccionadas con base en el trabajo reportado por Goldschmidt-Clermont (1991), donde fueron empleadas para llevar a cabo la expresión del gen de resistencia *aadA*.

El gen de resistencia seleccionado fue el gen *aadA* (Hollingshead y Vapnek, 1985) nativo de la bacteria *E. coli* y su secuencia (No. accesión X02340.1) fue obtenida del GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Dicho gen codifica para la proteína estreptomicina adenil transferasa la cuál confiere resistencia a los antibióticos estreptomicina y

espectinomicina que son usados como medio de selección de las clonas transformadas.

Los programas utilizados para aislar y analizar las secuencias antes mencionadas fueron Editseq y MegAlign, del paquete bioinformático Lasergene de DNAstar.

4.2.6 Ensamblaje *in silico* y síntesis de la construcción *rbcL/aadA/rbcL* (aadA)

La 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 adenil transferasa y la región 3'UTR del gen *rbcL* del cloroplasto de *C. reinhardtii* fueron ensambladas *in silico* empleando el programa SeqBuilder del paquete bioinformático Lasergene de DNAstar. De aquí en adelante a esta construcción se le denominará aadA.

La secuencia de la construcción de expresión aadA fue enviada para su síntesis a la compañía alemana GENEART AG (http://www.geneart.com/). Se solicitó la optimización del uso de codones del cloroplasto de *C. reinhardtii*, así como la inserción del sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *BamHI* en el extremo 5' y *NotI*, *SmaI* y *SalI* en el extremo 3' de la secuencia.

4.2.7 Clonación de la región de recombinación homóloga 2 (RRH2) en el vector pGEM-T-easy

La región de recombinación homóloga de ~2.0 Kb (RRH2) se amplificó mediante PCR, usando como molde el plásmido p322 obtenido del Centro de Chlamydomonas (www.chlamy.org). Este plásmido contiene las regiones de recombinación homóloga que permiten la inserción del gen de interés en una región intergénica presentes en el genoma del cloroplasto entre los genes *psbA* y *23S*. Los oligonucleótidos empleados fueron diseñados para adicionar los sitios de restricción *PstI*, *AscI*, *EcoRV* y *XhoI* en el extremo 5', y *SphI* en el extremo 3' de la secuencia amplificada. El programa que se utilizó fue: 95 °C durante 3 minutos, 95 °C durante 1 minuto, 58 °C durante 30 segundos, 68 °C durante 2 minutos, se repitió 15 veces del paso 2 al 4 y finalmente una extensión final a 68 °C durante 5 minutos. La enzima que se utilizó para llevar a cabo la reacción fue la Expand

Long Template PCR System (Roche). El producto de PCR fue clonado en el vector pGEM-T-easy (Promega) y enviado para su secuenciación al CUGI. Se seleccionó una clona con la secuencia correcta para su posterior uso.

4.2.8 Obtención del plásmido de transformación pChPhy

4.2.8.1 Transformación de células competentes

Se realizó la transformación de células competentes de *E. coli* DH10B, siguiendo el protocolo de pGEM-T-easy (Promega). Las células transformadas fueron plaqueadas en cajas de Petri con medio de selección LB sólido adicionado con ampicilina (10 mg/mL), Xgal (80 µg/mL), e IPTG (0.5 mM) y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Las colonias blancas fueron seleccionadas y propagadas en medio de selección LB líquido, adicionado con ampicilina (10 mg/mL).

4.2.8.2 Purificación de fragmentos empleados en la clonación

La purificación de los fragmentos empleados para ensamblar la construcción pChphy se realizó ya sea en líquido con el Kit High Pure PCR (Roche) siguiendo las indicaciones del proveedor y eluyendo en un volumen de 40 µL o mediante la purificiación a partir de una electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Las bandas de, interés fueron escindidadas del gel con un bisturí y purificadas con el Kit QIAquick Gel Extraction (Quiagen) siguiendo las instrucciones del proveedor.

4.2.8.3 Ligación de fragmentos

La ligación de los fragmentos purificados se llevó a cabo con 20 U de la enzima T4 DNA ligasa 20 U/µL y amortiguador T4-DNA ligasa 10X (1X) en un volmen final de 10 µL. El volumen de vector e inserto a ligar vario según el fragmento con el que se estuviera trabajando al momento. La ligación se dejó incubando a 16 °C durante toda la noche y posteriormente se inactivó a 65 °C durante 20 minutos

4.2.8.4 Purificación de plásmido

Los plásmidos obtenidos en cada etapa de la elaboación de esta contrucción fueron purificados por medio del Kit comercial High Pure Plasmid Isolation (Roche) siguendo las instrucciones del proveedor.

4.2.8.5 Clonación de la región de recombinación homóloga 2 (RRH2) en el vector pUC18

El vector de clonación utilizado como base para elaborar el vector de transformación fue el pUC18 (Stratagene). Este plásmido sirvió como esqueleto para ensamblar el vector de transformación para el cloroplasto. El primer paso para ensamblar el vector de transformación, fue la inserción de la región de recombinación homóloga de ~2.0 Kb (RRH2) en el vector pUC18 entre los sitios de restricción *PstI* y *SpHI*. La reacción de digestión tanto para el vector pUC18 como para el plásmido donde se encontraba el inserto (RRH2), constó de los siguiente componentes: Plásmido 1 µL, amortiguador apropiado para la enzima 10X (1X), BSA 100X (1X), *SphI* 10 U/µL (5U), *PstI* 20 U/µL (20 U) en un volumen final de 50 µL. Se incubó a 37 °C durante 2 horas y posteriormente se inactivó a 80 °C durante 20 minutos. La digestión del vector pUC18 fue purificada en líquido, en tanto que la digestión correspondiente al inserto RRH2 fue separada en una electroforesis en un gel de agarosa al 1.8 % durante 50 minutos y purificada como se describió anteriormente. La ligación de los fragmentos purificados se llevó a cabo usando: 4 µL de vector y 4 µL de inserto. Pasado el tiempo de incubación de la ligación, se realizó la transformación de células competentes y posteriormente se aislo el plásmido como fue descrito previamente. Se verificó la integridad del plásmido mediante una digestión con las enzimas de restricción *PstI* y *SphI* como se describió anteriormente. El plásmido generado en esta etapa se le nombró como pRH2.

4.2.8.6 Clonación de la región de recombinación homóloga 1 (RRH1) en el vector pRH2

La región de recombinación homóloga de ~3.5 Kb (RRH1), contenida originalmente en el p322, fue subclonada en el vector pRH2 entre los sitios de restricción *Eco*RI y *Bam*HI. La reacción de digestión, tanto para el vector como para el plásmido que contenía el inserto,

constó de lo siguiente: Plásmido 1 µL, amortiguador apropiado para la enzima 10X (1X), BSA 100X (1X), *BamH*I 20 U/µL (20U), *EcoR*I 20 U/µL (20 U). Se incubó a 37 °C durante dos horas y posteriormente se inactivó a 65 °C durante 20 minutos. La digestión correspondiente al vector fue purificado a partir de un gel de agarosa 1.2 % como fue descrito previamente. La digestión del inserto fue purificada a paritr de un gel de agarosa al 1.5 %. Los fragmentos purificados fueron ligados empleando 4µL de vector y 4µL de inserto. Las células competentes fueron transformadas con el resultado de la ligación previa y el plásmido fue extraído como se describió anteriormente. La integridad del plásmido generado se verificó mediante una digestión con las enzimas de restricción *BamH*I y *EcoR*I de la misma manera a la descrita anteriormente. El plásmido generado en esta etapa se le nombró pRH12.

4.2.8.7 Clonación de la construcción de expresión *aadA* en el vector pRH12

La construcción de expresión *aadA*, sintetizada por la compañía GENEART, se encontraba en el vector pMA, el cual es utilizado como esqueleto estándar por esta compañía. La construcción de expresión fue escindida del vector pMA mediante una digestión con las enzimas *BamH*I y *Sal*I. De manera semejante, el vector pRH12 fue digerido con esta misma combinación de enzimas. La reacción de digestión constó de plásmido (1 µL), amortiguador apropiado para la enzima 10X (1X), BSA 100X (1X), *BamH*I 20 U/µL (20U) *Sal*I 20 U/µL (20U) en un volumen final de 50 µL. La digestión del vector fue purificada a partir de un un gel de agarosa al 1.2 % como ya fue previamente descrito en tanto que la digestión del inserto fue purificada a partir de una electroforesis con un gel de agarosa al 1.5 %. Los fragmentos purificados fueron ligados empleando 5 µL de vector y 8 µL de inserto en un volumen final de 20 µL. Con la ligación obtenida, se realizó la transformación de células competentes como ya fue descrito anteriormente y posteriormente el plásmido fue purificado como se descrbe en el apartado 4.2.8.4. Se verificó la integridad del plásmido extraído mediante una digestión con las enzimas de restricción *BamH*I y *Sal*I, de la misma manera a la descrita anteriormente. El plásmido generado en esta etapa se le nombró pRH12A.

4.2.8.8 Clonación de la construcción de expresión cphySr en el vector pRH12A

La construcción de expresión cphySr proveniente de pGEM-T Easy fue sub-clonada en el vector pRH12A entre los sitios de restricción *Sal*I y *Asc*I. El vector pRH12A fue digerido en primera instancia con la enzima *Asc*I; la reacción se conformó de los siguientes reactivos: plásmido 2.5 µL, amortiguador apropiado para la enzima 10X (1X), *Asc*I 10 U/µL (10U) en un volumen final de 50 µL. La reacción fue incubada a 37 °C durante 6 horas, posteriormente la reacción fue inactivada a 80 °C durante 20 minutos y fue purificada en líquido con el Kit High Pure PCR (Roche). La segunda digestión fue realizada con la enzima *Sal*I y la reacción constó de 40 µL de la elución obtenida de la purificación de la digestión previa, amortiguador apropiado para la enzima 10X (1X) *Sal*I 20 U/µL (20U) en un volumen final de 50 µL y incubó a 37 °C durante dos horas. La enzima fue inactivada a 65 °C durante 20 minutos y purificada en líquido con el Kit High Pure PCR (Roche).

En el caso de cphySr, la primera digestión fue realizada con la enzima *Asc*I y la reacción de digestión fue compuesta de lo siguiente: plásmido 2.5 µL, amortiguador apropiado para la enzima 10X (1X), *Asc*I 10 U/µL (10U) en un volumen final de 50 µL. Se incubó a 37 °C durante toda la noche y posteriormente fue inactivada a 80 °C durante 20 minutos. La digestión fue purificada en líquido con el Kit High Pure PCR (Roche). La segunda digestión fue realizada con la enzima *Sal*I y constó de 40 µL de la elución obtenida de la purificación de la digestión previa, amortiguador apropiado para la enzima 10X (1X) *Sal*I 20 U/µL (20 U) en un volumen final de 50 µL y fue incubada a 37 °C durante toda la noche, posteriormente la enzima fue inactivada a 65 °C durante 20 minutos. La digestión fue purificada a partir de una electroforesis en un gel de agarosa al 1.8 %. Los fragmentos purificados, tanto del vector como del inserto, fueron ligados con la enzima T4-DNA ligasa tomando 3 µL del vector y 5 µL del inserto. Se realizó la transformación de las células competentes con el vector generado y posteriormente el plásmido fue extraído como se describió en el apartado 4.2.8.4. La integridad del vector fue verificada mediante una digestión con las enzimas de restricción *EcoR*V y *Not*I. La reacción de digestión con las enzimas antes mencionadas fue conformada de la siguiente manera: plásmido 1 µL, amortiguador apropiado para la enzima 10X (1X), BSA 100X (1X), *EcoR*V 20 U/µL (20U), *Not*I 10 U/µL (10U), en un volumen final de 50 µL. El plásmido generado en esta etapa fue

nombrado pChPhy.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Ensamblaje *in silico* y síntesis de la construcción *atpA/phyASr/psbA* (cphySr)

4.3.1.1 Ensamblaje de la construcción de expresión *cphySr*

El ensamblaje de la construcción de expresión fue realizado *in silico* utilizando el programa SeqBuilder de DNAstar de Lasergene. El esquema general de la construcción de expresión se puede observar en la Figura 4.2.

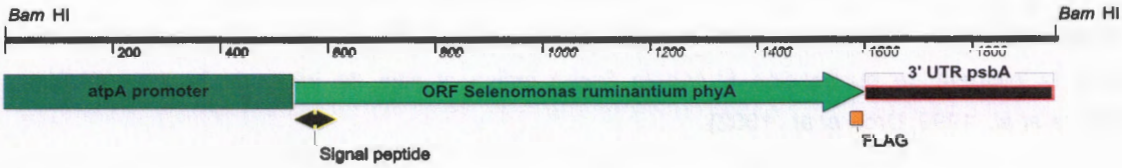

Figura 4.2 Esquema general de la construcción de expresión cphySr.

La secuencia de la construcción de expresión *cphySr* se puede ver en la Figura 4.3.

Una vez ensamblada la construcción de expresión, se verificó su integridad realizando los alineamientos correspondientes con cada uno de sus componentes utilizando el programa MegAlign de DNAstar (Anexos 2, 3 y 4).

```
   1 GGATCCCATT TTTATAACTG GTCTCAAAAT ACCTATAAAC CCATTGTTCT TCTCTTTTAG
  61 CTCTAAGAAC AATCAATTTA TAAATATATT TATTATTATG CTATAATATA AATACTATAT
 121 AAATACATTT ACCTTTTTAT AAATACATTT ACCTTTTTTT TAATTTGCAT GATTTTAATG
 181 CTTATGCTAT CTTTTTTATT TAGTCCATAA AACCTTTAAA GGACCTTTTC TTATGGGATA
 241 TTTATATTTT CCTAACAAAG CAATCGGCGT CATAAACTTT AGTTGCTTAC GACGCCTGTG
 301 GACGTCCCCC CCTTCCCCTT ACGGGCAAGT AAACTTAGGG ATTTTAATGC AATAAATAAA
 361 TTTGTCCTCT TCGGGCAAAT GAATTTTAGT ATTTAAATAT GACAAGGGTG AACCATTACT
 421 TTTGTTAACA AGTGATCTTA CCACTCACTA TTTTTGTTGA ATTTTAAACT TATTTAAAAT
 481 TCTCGAGAAA GATTTTAAAA ATAAACTTTT TTAATCTTTT ATTTATTTTT TCTTTTTT
 541 AAATACTGG CAGAAGCATG CCGTTCTTTG TAGTCTCTTG GTCGGCGCAT CCCTCTGGAT
 601 ACTGCCGCAG GCCGATGCGG CCAAGGCGCC GGAGCAGACG GTGACGGAGC CCGTTGGGAG
 661 CTACGCGCGC GCGGAGCGGC CGCAGGACTT CGAGGGCTTT GTCTGGCGCC TCGACAACGA
 721 CGGCAAGGAG GCGTTGCCGC GTAATTTCCG CACGTCGGCT GACGCGCTGC GCGCGCCGGA
 781 GAAGAAATTC CATCTCGACG CCGCGTATGT ACCGTCGCGC GAGGGCATGG ATGCACTCCA
 841 TATCTCGGGC AGTTCCGCAT TCACGCCGGC GCAGCTCAAG AACGTTGCCG CGAAGCTGCG
 901 GGAGAAGACG GCTGGCCCCA TCTACGATGT CGACCTACGG CAGGAGTCGC ACGGCTATCT
 961 CGACGGTATC CCCGTGAGCT GGTACGGCGA GCGCGACTGG GCAAATCTCG GCAAGAGCCA
1021 GCATGAGGCG CTCGCCGACG AGCGGCACCG CTTGCACGCA GCGCTCCATA AGACGGTCTA
```

```
1081 CATCGCGCCG CTCGGCAAGC ACAAGCTCCC CGAGGGCGGC GAAGTCCGCC GCGTACAGAA
1141 GGTGCAGACG GAACAGGAAG TCGCCGAGGC CGCGGGGATG CGCTATTTCC GCATCGCGGC
1201 GACGGATCAT GTCTGGCCAA CGCCGGAGAA CATCGACCGC TTCCTCGCGT TTTACCGCAC
1261 GCTGCCGCAG GATGCGTGGC TCCATTTCCA TTGTGAAGCC GGTGTCGGCC GCACGACGGC
1321 GTTCATGGTC ATGACGGATA TGCTGAAGAA CCCGTCCGTA TCGCTCAAGG ACATCCTCTA
1381 TCGCCAGCAC GAGATCGGCG GCTTTTACTA CGGGGAGTTC CCCATCAAGA CGAAGGATAA
1441 AGATAGCTGG AAGACGAAAT ATTATAGGGA AAAGATCGTG ATGATCGAGC AGTTCTACCG
1501 CTATGTGCAG GAGAACCGCG CGGATGGCTA CCAGACGCCG TGGTCGGTCT GGCTCAAGAG
1561 CCATCCGGCG AAGGCGGATT ATAAAGATGA TGATGATAAA TAATTTTTTT TTAAACTAAA
1621 ATAAATCTGG TTAACCATAC CTGGTTTATT TTAGTTTAGT TTATACACAC TTTTCATATA
1681 TATATACTTA ATAGCTACCA TAGGCAGTTG GCAGGACGTC CCCTTACGGG ACAAATGTAT
1741 TTATTGTTGC CTGCCAACTG CCTAATATAA ATATTAGTGG ACGTCCCCTT CCCCTTACGG
1801 GCAAGTAAAC TTAGGGATTT TAATGCTCCG TTAGGAGGCA AATAAATTTT AGTGGCAGTT
1861 GCCTCGCCTA TCGGCTAACA AGTTCCTTCG GAGTATATAA ATATCCTGCC AACTGCCGAT
1921 ATTTATATAC TAGGCAGTGG CGGTACCACT CGACGGATCC.
```

Figura 4.3 Secuencia de la construcción de expresión cphySr ensamblada *in silico*. Se indica con sombreado gris oscuro el codón de inicio de la ORF del gen *phyA* de la bacteria *Selenomonas ruminantium;* con sombreado gris claro el codón de paro de la ORF del mismo gen; subrayado se señala la etiqueta de purificación FLAG; la flecha indica el sitio de inicio de la transcripción (Ishikura *et al.*, 1999; Dron *et al.*, 1982).

Tras el alineamiento de cada uno de los fragmentos que forman parte de la construcción de expresión *cphySr* se pudo observar que todas las secuencias usadas para llevar a cabo el ensamblaje *in silico* coincidían con las secuencias originales de donde fueron tomadas. Las regiones donde no existe dicha coincidencia se debe a la presencia de sitios de restricción que fueron añadidos en el caso de la secuencia del plásmido p322 y a la presencia de la etiqueta de purificación que fue añadida en el extremo 5' de la ORF del gen *phyASr*, la cual corresponde al FLAG.

4.3.1.2 Síntesis de la construcción *cphySr*

Una vez corroborada la secuencia ensamblada *in silico*, fue enviada a la compañía alemana GENEART AG, quienes al recibir la secuencia inmediatamente nos enviaron la secuencia modificada con el uso de codón del cloroplasto de *C. reinhardtii*, la cual fue comparada con la secuencia que les fue enviada. En la Figura 4.4 se puede ver dicha comparación.

```
cphySr                  1 GGATCCCATTTTTATAACTGGTCTCAAAATACCTATAAACCCATTGTTCTTCTCTTTTAG
cphySr 1064468          1 GGATCCCATTTTTATAACTGGTCTCAAAATACCTATAAACCCATTGTTCTTCTCTTTTAG

cphySr                 61 CTCTAAGAACAATCAATTTATAAATATATTTATTATTATGCTATAATATAAATACTATAT
cphySr 1064468         61 CTCTAAGAACAATCAATTTATAAATATATTTATTATTATGCTATAATATAAATACTATAT

cphySr                121 AAATACATTTACCTTTTTATAAATACATTTACCTTTTTTTTAATTTGCATGATTTTAATG
cphySr 1064468        121 AAATACATTTACCTTTTTATAAATACATTTACCTTTTTTTTAATTTGCATGATTTTAATG

cphySr                181 CTTATGCTATCTTTTTTATTTAGTCCATAAAACCTTTAAAGGACCTTTTCTTATGGGATA
cphySr 1064468        181 CTTATGCTATCTTTTTTATTTAGTCCATAAAACCTTTAAAGGACCTTTTCTTATGGGATA

cphySr                241 TTTATATTTTCCTAACAAAGCAATCGGCGTCATAAACTTTAGTTGCTTACGACGCCTGTG
cphySr 1064468        241 TTTATATTTTCCTAACAAAGCAATCGGCGTCATAAACTTTAGTTGCTTACGACGCCTGTG

cphySr                301 GACGTCCCCCCCTTCCCCTTACGGGCAAGTAAACTTAGGGATTTTAATGCAATAAATAAA
cphySr 1064468        301 GACGTCCCCCCCTTCCCCTTACGGGCAAGTAAACTTAGGGATTTTAATGCAATAAATAAA

cphySr                361 TTTGTCCTCTTCGGGCAAATGAATTTTAGTATTTAAATATGACAAGGGTGAACCATTACT
cphySr 1064468        361 TTTGTCCTCTTCGGGCAAATGAATTTTAGTATTTAAATATGACAAGGGTGAACCATTACT

cphySr                421 TTTGTTAACAAGTGATCTTACCACTCACTATTTTTGTTGAATTTTAAACTTATTTAAAAT
cphySr 1064468        421 TTTGTTAACAAGTGATCTTACCACTCACTATTTTTGTTGAATTTTAAACTTATTTAAAAT

cphySr                481 TCTCGAGAAAGATTTTAAAAATAAACTTTTTTAATCTTTTATTTATTTTTTCTTTTTTAT
cphySr 1064468        481 TCTCGAGAAAGATTTTAAAAATAAACTTTTTTAATCTTTTATTTATTTTTTCTTTTTTAT

cphySr                541 GAAATACTGGCAGAAGCATGCCGTTCTTTGTAGTCTCTTGGTCGGCGGATCCCTCTGGAT
cphySr 1064468        541 GAAATATTGGCAAAAACACGCTGTTTTATGTTCATTATTAGTTGGTGCTTCATTATGGAT

cphySr                601 ACTGCCGCAGGCCGATGCGGCCAAGCGCCGGAGCAGACGTGACCGAGCCCGTTGGGAG
cphySr 1064468        601 TTTGCCACAAGCTGATGCTGCTAAAGCTCCAGAACAAACTGTTACCGAGCCAGTTGGTTC

cphySr                661 CTACGCGCGCGCGGAGCCGCCGCAGGACTTCGAGGGCTTTGTCTGGCCCTCGACAACGA
cphySr 1064468        661 ATATGCTCGTGCTGAACGTCCACAAGATTTTGAAGGTTTTGTTTGGCCTTTAGATAATGA

cphySr                721 CGGCAAGGAGGCGTTGCCGCGTAATTTCCGCACCTCGGCTGACGCGCTGCGCGCGCGGA
cphySr 1064468        721 TGGTAAAGAGGCTTTACGTCGTAATTTTCGTACATCAGCTGATGCTTTACGTGGTCCAGA

cphySr                781 GAAGAAATTCCATCTCGACGCCGCGTATGTACCGTCGCGGAGGCATGGATGGACTCCA
cphySr 1064468        781 AAAAAATTTCACTTAGATGCTGCTTATGTTCCATCACGTGAAGGTATGGATGCTTTACA

cphySr                841 TATCTCGGGCAGTTCCGGATTCACCCGGCGCACCTCAAGAACGTTGCCGCGAAGCTGCG
cphySr 1064468        841 CATTTCTGGTTCATCAGGTTTTACACCAGCTCAATTAAAAAATGTTGCTGCTAATTACG

cphySr                901 GGAGAAGACGGCTGGCCCCATCTACGATGTCGACCTACGGCAGGATTCGCACGGCTATCT
cphySr 1064468        901 TGAAAAAACAGCTGGTCCAATTTATGATGTTGATTTACGTCAAGAATCACACGGTTATTT

cphySr                961 CGACGGTATCCCCGTGAGCTGGTACGGCGAGCGCGACTGGGCAAATCTCGGCAAGAGCCA
cphySr 1064468        961 AGATGGTATTCCAGTTTCTTGGTATGGTGAACGTGATTGGGCTAATTTAGGTAAAAGTCA

cphySr               1021 GCATGAGGGGCTCGCCGACGAGCGGCACCGCTTCACGGAGCCCTCCATAAGACGGTCTA
cphySr 1064468       1021 ACACGAGGCTTTAGCTGATGAACGTCACCGTTTACACGCTGCATTACACAAAACAGTTTA

cphySr               1081 CATCGCGCCCCTCGGCAAGCACAACCTCCCCGAGGGCGGCGAAGTCCCCCGCGTACAGAA
cphySr 1064468       1081 TATTGCTCCTTAGGTAAACACAAATTACCTGAAGGTGGTGAAGTTCGTCGTGTTCAAAA

cphySr               1141 GGTGCAGACGGAACAGGAAGTCGCCGAGGCCGCGGGGATGCGCTATTTCCGCATCGCGGC
cphySr 1064468       1141 TGTTCAAACAGAACAAGAAGTTGCTGAAGCTGCTGGTATGCGTTATTTTCGTATTGCTGC

cphySr               1201 GACGGATCATGTCTGGCCAACGCCTGAGAACATCGACCGCTTCCTCGCGTTTTACCGCAC
cphySr 1064468       1201 TACAGATCACGTTTGGCCAACACCTGAAAATATTGATCGTTTTTTAGCTTTTTATCGTAC

cphySr               1261 GCTGCCGCAGGATGCGTGGCTCCATTTCCATTGTGAAGCCGGTGTCGGCCGCACGACGGC
cphySr 1064468       1261 TTTACCACAAGATGCTTGGTTACACTTTCACTGTGAAGCTGGTGTTGGTCGTACGACAGC

cphySr               1321 GTTCATGGTCATGACGGATATGCTGAAGAACCCGTCCGTATCGCTCAAGGACATCCTCTA
cphySr 1064468       1321 TTTTATGGTTATGACAGATATGTTAAAAATCCATCAGTTTCTTTAAAAGATATTTTATA
```

```
cphySr                1381 TCGCCAGCACGAGATCGGCGGCTTTTACTACGGGGAGTTCCCCATCAAGACGAAGGATAA
cphySr 1064468        1381 TCGTCAACACGAAATTGGTGGTTTTTATTATGGTGAATTTCCTATTAAAACAAAGATAA

cphySr                1441 AGATAGCTGGAAGACGAAATATTATAGGGAAAAGATCGTGATGATCGAGCAGTTCTACCG
cphySr 1064468        1441 AGATTCATGGAAAACAAATATTATCGTGAAAAAATTGTTATGATTGAACAATTTTATCG

cphySr                1501 CTATGTGCAGGAGAACCGCGCGGATGGCTACCAGACGCGTGGTCGGTCTGGCTCAAGAG
cphySr 1064468        1501 TTATGTTCAAGAAAATCGTGCTGATGGTTATCAAACACCTTGGAGTGTTTGGTTAAAAAG

cphySr                1561 CCATCCGGCGAAGGCGGATTATAAAGATGATGATGATAAATAATTTTTTTTTAAACTAAA
cphySr 1064468        1561 TCACCCAGCTAAAGCTGATTATAAAGATGATGATGATAAATAATTTTTTTTTAAACTAAA

cphySr                1621 ATAAATCTGGTTAACCATACCTGGTTTATTTTAGTTTAGTTTATACACACTTTTCATATA
cphySr 1064468        1621 ATAAATCTGGTTAACCATACCTGGTTTATTTTAGTTTAGTTTATACACACTTTTCATATA

cphySr                1681 TATATACTTAATAGCTACCATAGGCAGTTGGCAGGACGTCCCCTTACGGGACAAATGTAT
cphySr 1064468        1681 TATATACTTAATAGCTACCATAGGCAGTTGGCAGGACGTCCCCTTACGGGACAAATGTAT

cphySr                1741 TTATTGTTGCCTGCCAACTGCCTAATATAAATATTAGTGGACGTCCCCTTCCCCTTACGG
cphySr 1064468        1741 TTATTGTTGCCTGCCAACTGCCTAATATAAATATTAGTGGACGTCCCCTTCCCCTTACGG

cphySr                1801 GCAAGTAAACTTAGGGATTTTAATGCTCCGTTAGGAGGCAAATAAATTTTAGTGGCAGTT
cphySr 1064468        1801 GCAAGTAAACTTAGGGATTTTAATGCTCCGTTAGGAGGCAAATAAATTTTAGTGGCAGTT

cphySr                1861 GCCTCGCCTATCGGCTAACAAGTTCCTTCGGAGTATATAAATATCCTGCCAACTGCCGAT
cphySr 1064468        1861 GCCTCGCCTATCGGCTAACAAGTTCCTTCGGAGTATATAAATATCCTGCCAACTGCCGAT

cphySr                1921 ATTTATATACTAGGCAGTGGCGGTACCACTCGACGGATCC
cphySr 1064468        1921 ATTTATATACTAGGCAGTGGCGGTACCACTCGACGGATCC
```

Figura 4.4 Alineamiento de la secuencia sintetizada y optimizada con el uso de codón de *C. reinhardtii* por GENEART. cphySr: secuencia no optimizada con el uso de codón del cloroplasto de *C. reinhardtii*. cphySr 1064468: secuencia optimizada con el uso de codón del cloroplasto de *C. reinhardtii*. En el recuadro naranja se puede observar la secuencia correspondiente a la etiqueta de purificación FLAG.

Como se puede observar en la Figura previa, tanto el extremo 5' como el extremo 3' de ambas secuencias coinciden en su totalidad. Estos extremos corresponden a las regiones reguladoras P+5'UTR del gen *atpA* y 3'UTR del gen *psbA* y su coincidencia se debe a que estas regiones provienen del genoma de *C. reinhardtii*, por lo que no es necesario hacer modificación alguna del uso del codón. La región codificante del gen *phyASr* fue la única que sufrió modificaciones debido al cambio de uso de codón. Sin embargo, la etiqueta FLAG en el extremo 5' de la región codificante no sufrió modificación, ya que la secuencia de esta bandera fue tomada de una secuencia que había sido previamente optimizada con el uso de codón del cloroplasto de *C. reinhardtii*

Se llevó a cabo la traducción *in silico* de las regiones codificantes, tanto de la secuencia sin optimizar, como de la reportada por Cheng y colaboradores (1999) y la secuencia con el uso de codón del cloroplasto de *C. reinhardtii*. La traducción *in silico* de la secuencia optimizada con el uso del codón del cloroplasto fue correcta, ya que coincide con la traducción de la secuencia no optimizada y con la reportada por Cheng y colaboradores (1999). Dicho alineamiento se puede observar en el Anexo 5.

Con este resultado, la compañía GENEART procedió con la síntesis de la construcción de expresión cphySr.

4.3.1.3 Clonación de la construcción cphySr con los sitios de restricción *SalI* y *AscI*

La construcción cphySr fue obtenida por medio de PCR, usando 15 ciclos con la finalidad de minimizar posibles errores introducidos por la enzima Expand Long Template de Roche. La amplificación de cphySr se observa en la Figura 4.5.

Figura 4.5 Amplificación por PCR de cphySr (~2.0 Kb). La amplificación se realizó a 15 ciclos a una temperatura de alineamiento de 58 °C. M: Marcador de 1Kb ladder plus (NEB); 1: Producto de PCR. C-: Control negativo de la reacción.

El producto de la reacción de PCR mostrado anteriormente fue clonado en el vector pGEM-T-easy, lo cual fue comprobado mediante una digestión con la enzima de restricción *EcoR*I. El resultado de esta digestión fue la visualización de dos bandas, la

primera de ~3.0 Kb que corresponde al vector p-GEM-T-easy y la segunda de ~2.0 Kb que corresponde a la cphySr (Figura 4.6).

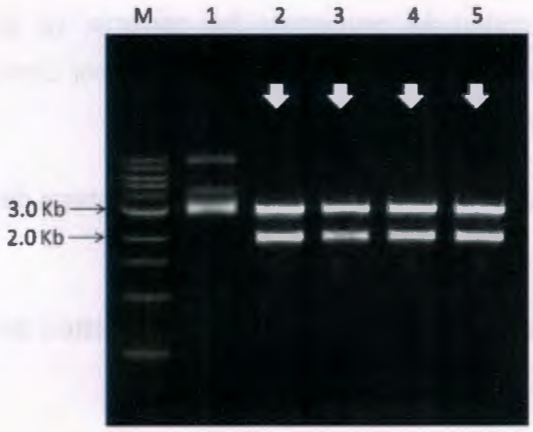

Figura 4.6 Verificación de la clonación de cphySr (~2.0 Kb) en pGEM-T-easy (~3.0 Kb). Patrón de electroforesis generado por *EcoR*I. M: Marcador de 1Kb ladder plus (NEB); 1 al 5: Clonas analizadas. La flecha blanca indica las clonas que contienen el inserto del tamaño esperado.

Se enviaron a secuenciar varias clonas al CUGI hasta que se obtuvo una clona (clona 10) con la secuencia íntegra, como se puede ver en la Figura 4.7.

```
cphySr              1 GGATCCCATTTTTATAACTGGTCTCAAAATACCTATAAACCCATTGTTCTTCTCTTTTAG
clona10 cphySr      1 GTCGACCATTTTTATAACTGGTCTCAAAATACCTATAAACCCATTGTTCTTCTCTTTTAG

cphySr             61 CTCTAAGAACAATCAATTTATAAATATATTTATTATTATGCTATAATATAAATACTATAT
clona10 cphySr     61 CTCTAAGAACAATCAATTTATAAATATATTTATTATTATGCTATAATATAAATACTATAT

cphySr            121 AAATACATTTACCTTTTTATAAATACATTTACCTTTTTTTTAATTTGCATGATTTTAATG
clona10 cphySr    121 AAATACATTTACCTTTTTATAAATACATTTACCTTTTTTTTAATTTGCATGATTTTAATG

cphySr            181 CTTATGCTATCTTTTTTATTTAGTCCATAAAACCTTTAAAGGACCTTTTCTTATGGGATA
clona10 cphySr    181 CTTATGCTATCTTTTTTATTTAGTCCATAAAACCTTTAAAGGACCTTTTCTTATGGGATA

cphySr            241 TTTATATTTTCCTAACAAAGCAATCGGCGTCATAAACTTTAGTTGCTTACGACGCCTGTG
clona10 cphySr    241 TTTATATTTTCCTAACAAAGCAATCGGCGTCATAAACTTTAGTTGCTTACGACGCCTGTG

cphySr            301 GACGTCCCCCCCTTCCCCTTACGGGCAAGTAAACTTAGGGATTTTAATGCAATAAATAAA
clona10 cphySr    301 GACGTCCCCCCCTTCCCCTTACGGGCAAGTAAACTTAGGGATTTTAATGCAATAAATAAA

cphySr            361 TTTGTCCTCTTCGGGCAAATGAATTTTAGTATTTAAATATGACAAGGGTGAACCATTACT
clona10 cphySr    361 TTTGTCCTCTTCGGGCAAATGAATTTTAGTATTTAAATATGACAAGGGTGAACCATTACT

cphySr            421 TTTGTTAACAAGTGATCTTACCACTCACTATTTTTGTTGAATTTTAAACTTATTTAAAAT
clona10 cphySr    421 TTTGTTAACAAGTGATCTTACCACTCACTATTTTTGTTGAATTTTAAACTTATTTAAAAT

cphySr            481 TCTCGAGAAAGATTTTAAAAATAAACTTTTTTAATCTTTTATTTATTTTTTCTTTTTTAT
clona10 cphySr    481 TCTCGAGAAAGATTTTAAAAATAAACTTTTTTAATCTTTTATTTATTTTTTCTTTTTTAT
```

```
cphySr              541 GAAATATTGGCAAAAACACGCTGTTTTATGTTCATTATTAGTTGGTGCTTCATTATGGAT
clona10 cphySr      541 GAAATATTGGCAAAAACACGCTGTTTTATGTTCATTATTAGTTGGTGCTTCATTATGGAT

cphySr              601 TTTACCACAAGCTGATGCTGCTAAAGCTCCAGAACAAACAGTTACAGAACCAGTTGGTTC
clona10 cphySr      601 TTTACCACAAGCTGATGCTGCTAAAGCTCCAGAACAAACAGTTACAGAACCAGTTGGTTC

cphySr              661 ATATGCTCGTGCTGAACGTCCACAAGATTTTGAAGGTTTTGTTTGGCGTTTAGATAATGA
clona10 cphySr      661 ATATGCTCGTGCTGAACGTCCACAAGATTTTGAAGGTTTTGTTTGGCGTTTAGATAATGA

cphySr              721 TGGTAAAGAGGCTTTACCTCGTAATTTTCGTACATCAGCTGATGCTTTACGTGCTCCAGA
clona10 cphySr      721 TGGTAAAGAGGCTTTACCTCGTAATTTTCGTACATCAGCTGATGCTTTACGTGCTCCAGA

cphySr              781 AAAAAAATTTCACTTAGATGCTGCTTATGTTCCATCACGTGAAGGTATGGATGCTTTACA
clona10 cphySr      781 AAAAAAATTTCACTTAGATGCTGCTTATGTTCCATCACGTGAAGGTATGGATGCTTTACA

cphySr              841 CATTTCTGGTTCATCAGCTTTTACACCAGCTCAATTAAAAAATGTTGCTGCTAAATTACG
clona10 cphySr      841 CATTTCTGGTTCATCAGCTTTTACACCAGCTCAATTAAAAAATGTTGCTGCTAAATTACG

cphySr              901 TGAAAAAACAGCTGGTCCAATTTATGATGTTGATTTACGTCAAGAATCACACGGTTATTT
clona10 cphySr      901 TGAAAAAACAGCTGGTCCAATTTATGATGTTGATTTACGTCAAGAATCACACGGTTATTT

cphySr              961 AGATGGTATTCCAGTTTCTTGGTATGGTGAACGTGATTGGGCTAATTTAGGTAAAAGTCA
clona10 cphySr      961 AGATGGTATTCCAGTTTCTTGGTATGGTGAACGTGATTGGGCTAATTTAGGTAAAAGTCA

cphySr             1021 ACACGAGGCTTTAGCTGATGAACGTCACCGTTTACACGCTGCATTACACAAAACAGTTTA
clona10 cphySr     1021 ACACGAGGCTTTAGCTGATGAACGTCACCGTTTACACGCTGCATTACACAAAACAGTTTA

cphySr             1081 TATTGCTCCATTAGGTAAACACAAATTACCTGAAGGTGGTGAAGTTCGTCGTGTTCAAAA
clona10 cphySr     1081 TATTGCTCCATTAGGTAAACACAAATTACCTGAAGGTGGTGAAGTTCGTCGTGTTCAAAA

cphySr             1141 AGTTCAAACAGAACAAGAAGTTGCTGAAGCTGCTGGTATGCGTTATTTTCGTATTGCTGC
clona10 cphySr     1141 AGTTCAAACAGAACAAGAAGTTGCTGAAGCTGCTGGTATGCGTTATTTTCGTATTGCTGC

cphySr             1201 TACAGATCACGTTTGGCCAACACCAGAAAATATTGATCGTTTTTTAGCTTTTTATCGTAC
clona10 cphySr     1201 TACAGATCACGTTTGGCCAACACCAGAAAATATTGATCGTTTTTTAGCTTTTTATCGTAC

cphySr             1261 ATTACCACAAGATGCTTGGTTACACTTTCACTGTGAAGCTGGTGTTGGTCGTACAACAGC
clona10 cphySr     1261 ATTACCACAAGATGCTTGGTTACACTTTCACTGTGAAGCTGGTGTTGGTCGTACAACAGC

cphySr             1321 TTTTATGGTTATGACAGATATGTTAAAAAATCCATCAGTTTCTTTAAAAGATATTTTATA
clona10 cphySr     1321 TTTTATGGTTATGACAGATATGTTAAAAAATCCATCAGTTTCTTTAAAAGATATTTTATA

cphySr             1381 TCGTCAACACGAAATTGGTGGTTTTTATTATGGTGAATTTCCTATTAAAACAAAAGATAA
clona10 cphySr     1381 TCGTCAACACGAAATTGGTGGTTTTTATTATGGTGAATTTCCTATTAAAACAAAAGATAA

cphySr             1441 AGATTCATGGAAAACAAAATATTATCGTGAAAAAATTGTTATGATTGAACAATTTTATCG
clona10 cphySr     1441 AGATTCATGGAAAACAAAATATTATCGTGAAAAAATTGTTATGATTGAACAATTTTATCG

cphySr             1501 TTATGTTCAAGAAAATCGTGCTGATGGTTATCAAACACCTTGGAGTGTTTGGTTAAAAAG
clona10 cphySr     1501 TTATGTTCAAGAAAATCGTGCTGATGGTTATCAAACACCTTGGAGTGTTTGGTTAAAAAG

cphySr             1561 TCACCCAGCTAAAGCTGATTATAAAGATGATGATGATAAATAATTTTTTTTTAAACTAAA
clona10 cphySr     1561 TCACCCAGCTAAAGCTGATTATAAAGATGATGATGATAAATAATTTTTTTTTAAACTAAA

cphySr             1621 ATAAATCTGGTTAACCATACCTGGTTTATTTTAGTTTAGTTTATACACACTTTTCATATA
clona10 cphySr     1621 ATAAATCTGGTTAACCATACCTGGTTTATTTTAGTTTAGTTTATACACACTTTTCATATA

cphySr             1681 TATATACTTAATAGCTACCATAGGCAGTTGGCAGGACGTCCCCTTACGGGACAAATGTAT
clona10 cphySr     1681 TATATACTTAATAGCTACCATAGGCAGTTGGCAGGACGTCCCCTTACGGGACAAATGTAT

cphySr             1741 TTATTGTTGCCTGCCAACTGCCTAATATAAATATTAGTGGACGTCCCCTTCCCCTTACGG
clona10 cphySr     1741 TTATTGTTGCCTGCCAACTGCCTAATATAAATATTAGTGGACGTCCCCTTCCCCTTACGG

cphySr             1801 GCAAGTAAACTTAGGGATTTTAATGCTCCGTTAGGAGGCAAATAAATTTTAGTGGCAGTT
clona10 cphySr     1801 GCAAGTAAACTTAGGGATTTTAATGCTCCGTTAGGAGGCAAATAAATTTTAGTGGCAGTT

cphySr             1861 GCCTCGCCTATCGGCTAACAAGTTCCTTCGGAGTATATAAATATCCTGCCAACTGCCGAT
clona10 cphySr     1861 GCCTCGCCTATCGGCTAACAAGTTCCTTCGGAGTATATAAATATCCTGCCAACTGCCGAT
```

```
cphySr          1921 [redacted]AT C--
clona10 cphySr  1921 [redacted]CG G[redacted]
```

Figura 4.7 Alineamiento de la secuencia de la clona 10 de cphySr. cphySr: construcción de expresión cphySr sintetizada por GENEART; Clona 10 cphySr: Secuencia de la clona 10 del producto de PCR de cphySr. En los cuadros azules se observa la modificación del sitio de restricción *BamH*I por *Sal*I en el extremo 5' y *BamH*I por *Asc*I en el extremo 3'.

Como se observa en la Figura anterior, la secuencia del plásmido purificado de la clona 10 es idéntica a la secuencia cphySr sintetizada *in silico*, con excepción de los extremos 5' y 3' donde los sitios *BamH*I de ambos extremos fueron sustituidos por los sitios de restricción *Sal*I y *Asc*I, respectivamente.

4.3.2 Ensamblaje *in silico* y síntesis de la construcción *rbcL/aadA/rbcL* (aadA)

4.3.2.1 Ensamblaje *in silico* de la construcción *rbcL/aadA/rbcL* (aadA)

El esquema general de la construcción de expresión se puede observar en la Figura 4.8.

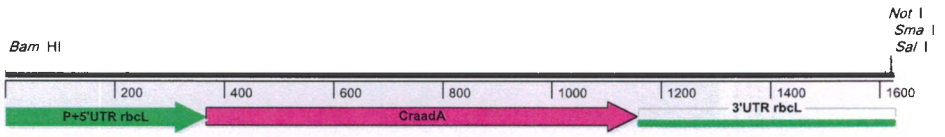

Figura 4.8 Esquema general de la construcción de expresión aadA.

La secuencia de dicha construcción de expresión se puede observar en la Figura 4.9.

```
  1 GGATCCATGG GTTTATAGGT ATTTTGAGAC CAGTTATAAA AATGACTTTT GACGTTTAGG
 61 TATATAAACA CTGCCTCTAA TAAAGTCTAC TATATTGGAG AGGAGTGAAC AGTGGCCTCG
121 CTTATCCCCG ACAGGAATAT ACATGGTTTT AGTAAGTAAA CTGCGTAAGA CGACCGACAT
181 ATACCTAAAG GCCCTTTCTA TGCTCGACTG ATAAGACAAG TACATAAATT TGCTAGTTTA
241 CATTATTTTT TATTTCTAAA TATATAATAT ATTTAAATGT ATTTAAAATT TTTCAACAAT
301 TTTTAAATTA TATTTCCGGA CAGATTATTT TAGGATCGTC AAAAGAAGTT ACATTTATTT
361 ATATAA[redacted]A GGGAAGCGGT GATCGCCGAA GTATCGACTC AACTATCAGA GGTAGTTGGC
421 GTCATCGAGC GCCATCTCGA ACCGACGTTG CTGGCCGTAC ATTTGTACGG CTCCGCAGTG
481 GATGAAACAA CGCGGCGAGC TTTGATCAAC GACCTTTTGG AAACTTCGGC TTCCCCTGGA
601 GAGAGCGAGA TTCTCCGCGC TGTAGAAGTC ACCATTGTTG TGCACGACGA CATCATTCCG
661 TGGCGTTATC CAGCTAAGCG CGAACTGCAA TTTGGAGAAT GGCAGCGCAA TGACATTCTT
721 GCAGGTATCT TCGAGCCAGC CACGATCGAC ATTGATCTGG CTATCTTGCT GACAAAAGCA
781 AGAGAACATA GCGTTGCCTT GGTAGGTCCA GCGGCGGAGG AACTCTTTGA TCCGGTTCCT
841 GAACAGGATC TATTTGAGGC GCTAAATGAA ACCTTAACGC TATGGAACTC GCCGCCCGAC
901 TGGGCTGGCG ATGAGCGAAA TGTAGTGCTT ACGTTGTCCC GCATTTGGTA CAGCGCAGTA
```

```
 961 ACCGGCAAAA TCGCGCCGAA GGATGTCGCT GCCGACTGGG CAATGGAGCG CCTGCCGGCC
1021 CAGTATCAGC CCGTCATACT TGAAGCTAGA CAGGCTTATC TTGGACAAGA AGAAGATCGC
1081 TTGGCCTCGC GCGCAGATCA GTTGGAAGAA TTTGTCCACT ACGTGAAAGG CGAGATCACC
1141 AAGGTAGTCG GCAAA[redacted]TT TTTATTTTTC ATGATGTTTA TGTGAATAGC ATAAACATCG
1201 TTTTTATTTT TTATGGTGTT TAGGTTAAAT ACCTAAACAT CATTTTACAT TTTTAAAATT
1261 AAGTTCTAAA GTTATCTTTT GTTTAAATTT GCCTGTGCTT TATAAATTAC GATGTGCCAG
1321 AAAAATAAAA TCTTAGCTTT TTATTATAGA ATTTATCTTT ATGTATTATA TTTTATAAGT
1381 AATAAAAGAA ATAGTAACAT ACTAAAGCGG ATGTAACTCA ATCGGTAGAG TGCGATCCTT
1441 CCAAGTTCGA GGTTGTGGGT TCGAGTCCCA TCATCCGCTA AACCAATCTA TAAAAGTTGT
1501 TGAATATGCT GAAATGTTTT CAAAGAAAAA GCCTAGTTTT TCTTTTACAA CAAGCAAAGA
1561 ACAATTGGCA TTCTTTGATT GTAAGAAAAT GCGCTTACGT GGAGTTATG
```

Figura 4.9 Secuencia de la construcción de expresión aadA ensamblada *in silico.* Se indica con sombreado gris oscuro el codón de inicio de la ORF del gen *aadA* de la bacteria *E. coli;* con sombreado gris claro el codón de paro de la ORF del mismo gen; la flecha indica el sitio de inicio de la transcripción (Ishikura *et al.*, 1999; Klein *et al.,* 1992; Dron *et al.*, 1982).

4.3.2.2 Síntesis de la construcción *rbcL/aadA/rbcL* (aadA)

Una vez que la secuencia de la construcción de expresión aadA fue ensamblada *in silico*, se envió a la compañía alemana GENEART AG, quienes al recibir la solicitud de síntesis inmediatamente enviaron la secuencia *in silico* modificada con el uso de codón del cloroplasto de *C. reinhardtii*, la cual fue comparada con la secuencia aadA sin optimizar. En la Figura 4.10 se puede ver dicha comparación.

```
aadA                1 GGATCCATGGGTTTATAGGTATTTTGAGACCAGTTATAAAAATGACTTTTGACGTTTAGG
aadA (pMA)          1 GGATCCATGGGTTTATAGGTATTTTGAGACCAGTTATAAAAATGACTTTTGACGTTTAGG

aadA               61 TATATAAACACTGCCTCTAATAAAGTCTACTATATTGGAGAGGAGTGAACAGTGGCCTCG
aadA (pMA)         61 TATATAAACACTGCCTCTAATAAAGTCTACTATATTGGAGAGGAGTGAACAGTGGCCTCG

aadA              121 CTTATCCCCGACAGGAATATACATGGTTTTAGTAAGTAAACTGCGTAAGACGACCGACAT
aadA (pMA)        121 CTTATCCCCGACAGGAATATACATGGTTTTAGTAAGTAAACTGCGTAAGACGACCGACAT

aadA              181 ATACCTAAAGGCCCTTTCTATGCTCGACTGATAAGACAAGTACATAAATTTGCTAGTTTA
aadA (pMA)        181 ATACCTAAAGGCCCTTTCTATGCTCGACTGATAAGACAAGTACATAAATTTGCTAGTTTA

aadA              241 CATTATTTTTTATTTCTAAATATATAATATATTTAAATGTATTTAAAATTTTTCAACAAT
aadA (pMA)        241 CATTATTTTTTATTTCTAAATATATAATATATTTAAATGTATTTAAAATTTTTCAACAAT

aadA              301 TTTTAAATTATATTTCCGGACAGATTATTTTAGGATCGTCAAAAGAAGTTACATTTATTT
aadA (pMA)        301 TTTTAAATTATATTTCCGGACAGATTATTTTAGGATCGTCAAAAGAAGTTACATTTATTT

aadA              361 ATATAAATGAGGGAAGCGGTGATCGCCGAAGTATCGACTCAACTATCAGAGGTAGTTGGC
aadA (pMA)        361 ATATAAATGAGGGAAGCTGTTATTGCTGAAGTTTCGACACAATTATCTGAAGTTGTTGGT

aadA              421 GTCATCGAGCGCCATCTCGAAGGAGCTTCCTGGCGTACATTTGTACGCTCCGGAGTG
aadA (pMA)        421 GTTATTGAACGTCACTTAGAACCAACATTATTAGCTGTTCACTTATATGCTTAGCTGTT

aadA              481 GATGGCGGCCTGAAGCCACACAGTGATATTGATTTGCTGGTTACGGTGACCGTAAGGCTT
aadA (pMA)        481 GATGGTGGTTTAAAGCCACACTCAGATATTGATTTATTAGTTACAGTTACAGTTCGTTTA
```

```
aadA                 541 GATGAAACAACGCGCGAGCTTTGATCAACGACCTTTTGGAAACTTCGGCTTCCCCTGGA
aadA (pMA)           541 GATGAAACAACACGTCGTGCTTTAATTAATGATTTATTAGAAACATCAGCTTCACCAGGT

aadA                 601 GAGAGCGAGATTCTCCGCGCTGTAGAAGTCACCATTGTTGTGCACGACGACATCATTCCG
aadA (pMA)           601 GAATCAGAAATTTTACGTGCTGTTGAAGTTACAATTGTTGTTCACGATGATATTATTCCG

aadA                 661 TGGCGTTATCCAGCTAAGCGCGAACTGCAATTTGGAGAATGGCAGCGCAATGACATTCGT
aadA (pMA)           661 TGGCGTTATCCAGCTAAACGTGAATTACAATTTGGTGAATGGCAACGTAATGATATTTGA

aadA                 721 GCAGGTATCTTCGAGCCAGCCACGATCGACATTGATCTGGCTATCTTGCTGACAAAAGGA
aadA (pMA)           721 GCTGGTATTTTTGAACCAGCTACAATTGATATTGATTTAGCTATTTTATTAACAAAAGCT

aadA                 781 AGAGAACATAGCGTTGCCTTGGTAGGTCCAGCGGCGGAGGAACTCTTTGATCCGGTTCCT
aadA (pMA)           781 CGTGAACACTCAGTTGCTTTAGTTGGTCCAGCTGCTGAAGAATTATTTGATCCAGTTCGA

aadA                 841 GAACAGGATCTATTTGAGGCGCTAAATGAAACCTTAACGCTATGGAACTCGCCGCCCGAC
aadA (pMA)           841 GAACAAGATTTATTTGAAGCTTTAAATGAAACATTAACATTATGGAATTCACCACCAGAT

aadA                 901 TGGGCTGGCGATGAGCGAAATGTAGTGCTTACGTTGTCCCGCATTTGGTACAGCGCAGTA
aadA (pMA)           901 TGGGCTGGTGATGAACGTAATGTTGTTTAACATTATCACGTATTTGGTATTCAGCTGTT

aadA                 961 ACCGGCAAAATCGCGCCGAAGGATGTCGCTGCCGACTGGGCAATGGAGCGCCTGCCGGCC
aadA (pMA)           961 ACAGGTAAAATTGCTCCAAAGGATGTTGCTGCTGATTGGGCTATGGAACGTTTACCAGCT

aadA                1021 CAGTATCAGCCCGTCATACTTGAAGCTAGACAGGCTTATCTTGGACAAGAAGAAGATCGC
aadA (pMA)          1021 CAATATCAACCCAGTTATTTTAGAAGCTCGTCAAGCTTATTTAGGTCAAGAAGAAGATCGT

aadA                1081 TTGGCCTCGCGCGCAGATCAGTTGGAAGAATTTGTCCACTACGTGAAAGGCGAGATCAGC
aadA (pMA)          1081 TTAGCTTCACGTGCTGATCATTTAGAAGAATTTGTTCACTATGTTAAAGGTGAAATTACA

aadA                1141 AAGGTAGTCGGCAAATAATTTTTATTTTTCATGATGTTTATGTGAATAGCATAAACATCG
aadA (pMA)          1141 AAAGTTGTTGGTAAATAATTTTTATTTTTCATGATGTTTATGTGAATAGCATAAACATCG

aadA                1201 TTTTTATTTTTTATGGTGTTTAGGTTAAATACCTAAACATCATTTTACATTTTTAAAATT
aadA (pMA)          1201 TTTTTATTTTTTATGGTGTTTAGGTTAAATACCTAAACATCATTTTACATTTTTAAAATT

aadA                1261 AAGTTCTAAAGTTATCTTTTGTTTAAATTTGCCTGTGCTTTATAAATTACGATGTGCCAG
aadA (pMA)          1261 AAGTTCTAAAGTTATCTTTTGTTTAAATTTGCCTGTGCTTTATAAATTACGATGTGCCAG

aadA                1321 AAAAATAAAATCTTAGCTTTTTATTATAGAATTTATCTTTATGTATTATATTTTATAAGT
aadA (pMA)          1321 AAAAATAAAATCTTAGCTTTTTATTATAGAATTTATCTTTATGTATTATATTTTATAAGT

aadA                1381 AATAAAAGAAATAGTAACATACTAAAGCGGATGTAACTCAATCGGTAGAGTGCGATCCTT
aadA (pMA)          1381 AATAAAAGAAATAGTAACATACTAAAGCGGATGTAACTCAATCGGTAGAGTGCGATCCTT

aadA                1441 CCAAGTTCGAGGTTGTGGGTTCGAGTCCCATCATCCGCTAAACCAATCTATAAAAGTTGT
aadA (pMA)          1441 CCAAGTTCGAGGTTGTGGGTTCGAGTCCCATCATCCGCTAAACCAATCTATAAAAGTTGT

aadA                1501 TGAATATGCTGAAATGTTTTCAAAGAAAAAGCCTAGTTTTTCTTTTACAACAAGCAAAGA
aadA (pMA)          1501 TGAATATGCTGAAATGTTTTCAAAGAAAAAGCCTAGTTTTTCTTTTACAACAAGCAAAGA

aadA                1561 ACAATTGGCATTCTTTGATTGTAAGAAAATGCGCTTACGTGGAGTTATG-----------
aadA (pMA)          1561 ACAATTGGCATTCTTTGATTGTAAGAAAATGCGCTTACGTGGAGTTATGCGGCCGCCCCG

aadA                     --------
aadA (pMA)          1621 GGGTCGAC
```

Figura 4.10 Alineamiento de la construcción de expresión aadA. aadA: secuencia ensamblada *in silico;* aadA (pMA) secuencia optimizada con el uso del codón del cloroplasto de *C. reinhardtii.*

Como se pudo observar, los extremos 5' y 3' de la construcción de expresión aadA no optimizada coinciden en su totalidad con los extremos 5' y 3' de secuencia optimizada.

Estas regiones corresponden a las regiones reguladoras P+5'UTR y 3'UTR del gen *rbcL* y al provenir del genoma de *C. reinhardtii* no fue necesario hacer modificación del uso del codón. La región codificante del gen *aadA* fue la única que sufrió modificaciones debido al cambio de uso de codón.

Como última prueba de que todo estuviera correcto en las secuencias analizadas, se llevó a cabo la traducción *in silico* de las regiones codificantes de la secuencia reportada en el GenBank, la secuencia sin optimizar y la secuencia optimizada. La traducción de la secuencia optimizada con el uso del codón del cloroplasto fue correcta, ya que coincidió con la traducción de la secuencia no optimizada y con la reportada en el GenBank. Con este resultado, se dio luz verde a la compañía GENEART para llevar a cabo la síntesis de la construcción de expresión aadA. Dicho alineamiento se puede observar en el Anexo 6.

4.3.3 Clonación de la región de recombinación homóloga 2 (RRH2) en el vector pGEM-T-easy

La RRH2 fue amplificada por medio de PCR, usando 15 ciclos con la finalidad de minimizar posibles errores introducidos por la enzima Expand Long Template de Roche, que aunque está diseñada para hacer copias fiel del molde utilizado, siempre cabe la posibilidad de que se introduzca algún error. La amplificación de la RRH2 se observa en la Figura 4.11.

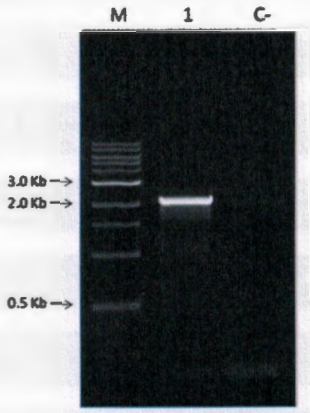

Figura 4.11 Amplificación por PCR de la RRH2 (~2.0 Kb). M: Marcador de 1Kb ladder plus (NEB); 1: Producto de PCR. C-: Control negativo de la reacción.

El producto de la reacción de PCR fue clonado en el vector pGEM-T-easy y se comprobó su inserción mediante una digestión con la enzima de restricción *EcoR*I (NEB). Se obtuvieron las dos bandas esperadas, la primera de ~3.0 Kb que corresponde al vector p-GEM-T-easy y la segunda de ~2.0 Kb que corresponde a la RRH2. En la Figura 4.12 se observa este resultado.

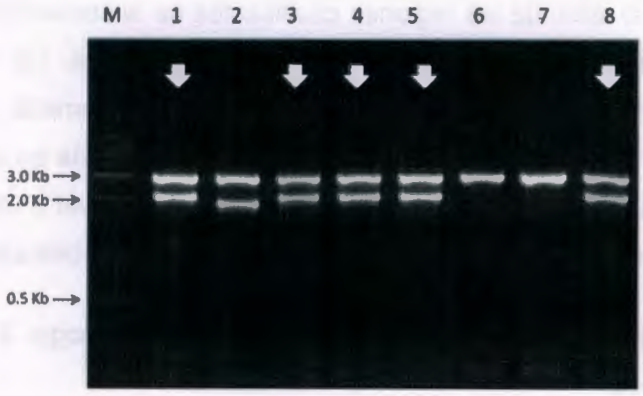

Figura 4.12 Digestión *EcoR*I para verificar la clonación de RRH2 (~2.0 Kb) en pGEM-T-easy (~3.0 Kb). M: Marcador de 1Kb ladder plus (NEB); 1 al 8: Clonas analizadas. La flecha blanca indica las clonas que contienen el inserto del tamaño esperado.

La clona 3 fue secuenciada y resultó con la secuencia íntegra (Figura 4.13).

```
RRH2 p322     1 --------------GGATCC-----GTATCCATGCTAGCAATATCTGATGGTACTTGCATT
Clona 3       1 CTGCAGGCGCGCCGATATCCTCAGGTATCCATGCTAGCAATATCTGATGGTACTTGCATT

RRH2 p322    43 TCATAAGTTTGGCCTGGAATAACCACCGTTTCGGAAGTACCTGTCGCTTTAAGTTTTATA
Clona 3      61 TCATAAGTTTGGCCTGGAATAACCACCGTTTCGGAAGTACCTGTCGCTTTAAGTTTTATA

RRH2 p322   103 GCTAAATCTAAAGTTTCTTTAAGTCTTTTAGCTGTATTAAATACTCCACGACTTTCCCTT
Clona 3     121 GCTAAATCTAAAGTTTCTTTAAGTCTTTTAGCTGTATTAAATACTCCACGACTTTCCCTT

RRH2 p322   163 ACGGGACAATAAATAAATTTGTCCCCTTCCCCTTACGTGACGTCAGTGGCAGTTGCCTGC
Clona 3     181 ACGGGACAATAAATAAATTTGTCCCCTTCCCCTTACGTGACGTCAGTGGCAGTTGCCTGC

RRH2 p322   223 CAACTGCCTCCTTCGGAGTATTAAAATCCTATATTTATATACTCCTAAGTTTACTTGCCC
Clona 3     241 CAACTGCCTCCTTCGGAGTATTAAAATCCTATATTTATATACTCCTAAGTTTACTTGCCC

RRH2 p322   283 AATATTTATATTAGGCAGTTGGCAGGCAACTGCCACTGACGTCCCGAAGGGGAAGGGGAA
Clona 3     301 AATATTTATATTAGGCAGTTGGCAGGCAACTGCCACTGACGTCCCGAAGGGGAAGGGGAA

RRH2 p322   343 GGACGTCCCCTTCGGGTAAATAAATTTTAGTGGCAGTGGTACCACCACTGCCTGCTTCCT
Clona 3     361 GGACGTCCCCTTCGGGTAAATAAATTTTAGTGGCAGTGGTACCACCACTGCCTGCTTCCT

RRH2 p322   403 CCTTCCCCTTCGGGCAAGTAAACTTAGAATAAAATTTATTTGCTGCGCTAGCAGGTTTAC
Clona 3     421 CCTTCCCCTTCGGGCAAGTAAACTTAGAATAAAATTTATTTGCTGCGCTAGCAGGTTTAC
```

```
RRH2 p322     463 ATACTCCTAAGTTTACTTGCCCGAAGGGGAAGGAGGACGTCCCCTTACGGGAATATAAAT
Clona 3       481 ATACTCCTAAGTTTACTTGCCCGAAGGGGAAGGAGGACGTCCCCTTACGGGAATATAAAT

RRH2 p322     523 ATTAGTGGCAGTGGTACAATAAATAAATTGTATGTAAACCCCTTCGGGCAACTAAAGTTT
Clona 3       541 ATTAGTGGCAGTGGTACAATAAATAAATTGTATGTAAACCCCTTCGGGCAACTAAAGTTT

RRH2 p322     583 ATCGCAGTATATAAATATAGAATGTTTACATACTCCGAAGGAGGACGCCAGTGGCAGTGG
Clona 3       601 ATCGCAGTATATAAATATAGAATGTTTACATACTCCGAAGGAGGACGCCAGTGGCAGTGG

RRH2 p322     643 TACCGCCACTGCCTGTCCGCAGTATTAACATCCTATTTTAATACTCCGAAGGAGGCAGTT
Clona 3       661 TACCGCCACTGCCTGTCCGCAGTATTAACATCCTATTTTAATACTCCGAAGGAGGCAGTT

RRH2 p322     703 GGCAGGCAACTGCCACTAATATTTATATTCCCGTAAGGGGACGTCCTAATTTAATACTCC
Clona 2       721 GGCAGGCAACTGCCACTAATATTTATATTCCCGTAAGGGGACGTCCTAATTTAATACTCC

RRH2 p322     763 GAAGGAGGCAGTTGGCAGGCAACTGCCACTAAAATTTATTTGCCTCCTAACGGAGCATTA
Clona 3       781 GAAGGAGGCAGTTGGCAGGCAACTGCCACTAAAATTTATTTGCCTCCTAACGGAGCATTA

RRH2 p322     823 AAATCCCGAAGGGGACGTCCCGAAGGGGAAGGGGAAGGAGGCAACTGCCTGCTTCCTCCT
Clona 3       841 AAATCCCGAAGGGGACGTCCCGAAGGGGAAGGGGAAGGAGGCAACTGCCTGCTTCCTCCT

RRH2 p322     883 TCCCCTTCGGGCAAGTAAACTTAGAATAAAATTTATTTGCTGCGCTAGCAGGTTTACATA
Clona 3       901 TCCCCTTCGGGCAAGTAAACTTAGAATAAAATTTATTTGCTGCGCTAGCAGGTTTACATA

RRH2 p322     943 CTCCTAAGTTTACTTGCCCGAAGGGGAAGGAGGACGTCCCCTTACGGGAATATAAATATT
Clona 3       961 CTCCTAAGTTTACTTGCCCGAAGGGGAAGGAGGACGTCCCCTTACGGGAATATAAATATT

RRH2 p322    1003 AGTGGCAGTGGTACAATAAATAAATTGTATGTAAACCCCTTCGGGCAACTAAAGTTTATC
Clona 3      1021 AGTGGCAGTGGTACAATAAATAAATTGTATGTAAACCCCTTCGGGCAACTAAAGTTTATC

RRH2 p322    1063 GCAGTATATAAATATCGGCAGTTGGCAGGCAACTGCCACTAAAATTCATTTGCCCGAAGG
Clona 3      1081 GCAGTATATAAATATCGGCAGTTGGCAGGCAACTGCCACTAAAATTCATTTGCCCGAAGG

RRH2 p322    1123 GGACGTCCACTAATATTTATATTCCCGTAAGGGGACGTCCCGAAGGGGAAGGGGACGTCC
Clona 3      1141 GGACGTCCACTAATATTTATATTCCCGTAAGGGGACGTCCCGAAGGGGAAGGGGACGTCC

RRH2 p322    1183 TAAACGGAGCATTAAAATCCCTAAGTTTACTTGCCTAGGCAGTTGGCAGGATATTTATAT
Clona 3      1201 TAAACGGAGCATTAAAATCCCTAAGTTTACTTGCCTAGGCAGTTGGCAGGATATTTATAT

RRH2 p322    1243 ACGATATTAATACTTTTGCTACTGGCACACTAAAATTTATTTGCCCGTAAGGGGACGTCC
Clona 3      1261 ACGATATTAATACTTTTGCTACTGGCACACTAAAATTTATTTGCCCGTAAGGGGACGTCC

RRH2 p322    1303 TTCGGTGGTTATATAAATAATCCCGTAGGGGGAGGGGGATGTCCCGTAGGGGGAGGGGAG
Clona 3      1321 TTCGGTGGTTATATAAATAATCCCGTAGGGGGAGGGGGATGTCCCGTAGGGGGAGGGGAG

RRH2 p322    1363 TGGAGGCTCCAACGGAGGTTGGAGCTTCTTTGGTTTCCTAGGCATTATTTAAATATTTTT
Clona 3      1381 TGGAGGCTCCAACGGAGGTTGGAGCTTCTTTGGTTTCCTAGGCATTATTTAAATATTTTT

RRH2 p322    1423 TAACCCTAGCACTAGAACTGAGATTCCAGACGGCGACCCGTAAAGTTCTTCAGTCCCCTC
Clona 3      1441 TAACCCTAGCACTAGAACTGAGATTCCAGACGGCGACCCGTAAAGTTCTTCAGTCCCCTC

RRH2 p322    1483 AGCTTTTTCACAACCAAGTTCGGGATGGATTGGTGTGGGTCCAACTGAGCAAAGAGCACC
Clona 3      1501 AGCTTTTTCACAACCAAGTTCGGGATGGATTGGTGTGGGTCCAACTGAGCAAAGAGCACC

RRH2 p322    1543 AAGGTTAACTGCATCTCTGTGAGATGCTAGTTAAACTAAGCTTAGCTTAGCTCATAAACG
Clona 3      1561 AAGGTTAACTGCATCTCTGTGAGATGCTAGTTAAACTAAGCTTAGCTTAGCTCATAAACG

RRH2 p322    1603 ATAGTTACCCGCAAGGGGTTATGTAATTATATTATAAGGTCAAAATCAAACGGCCTTTAG
Clona 3      1621 ATAGTTACCCGCAAGGGGTTATGTAATTATATTATAAGGTCAAAATCAAACGGCCTTTAG
```

```
RRH2 p322    1663 TATATCTCGGCTAAAGCCATTGCTGACTGTACACCTGATACCTATATAACGGCTTGTCTA
Clona 3      1681 TATATCTCGGCTAAAGCCATTGCTGACTGTACACCTGATACCTATATAACGGCTTGTCTA

RRH2 p322    1723 GCCGCGGCCTTAGAGAGCACTCATCTTGAGTTTAGCTTCCTACTTAGATGCTTTCAGCAG
Clona 3      1741 GCCGCGGCCTTAGAGAGCACTCATCTTGAGTTTAGCTTCCTACTTAGATGCTTTCAGCAG

RRH2 p322    1783 TTATCTATCCATGCGTAGCTACCCAGCGTTTCCCATTGGAATGAGAACTGGTACACAATT
Clona 3      1801 TTATCTATCCATGCGTAGCTACCCAGCGTTTCCCATTGGAATGAGAACTGGTACACAATT

RRH2 p322    1843 GGCATGTCCTTTCAGGTCCTCTCGTACTATGAAAGGCTACTCTCAATGCTCTAACGCCTA
Clona 3      1861 GGCATGTCCTTTCAGGTCCTCTCGTACTATGAAAGGCTACTCTCAATGCTCTAACGCCTA

RRH2 p322    1903 CACCGGATATGGACCAAACTGTCTCACGCATGAAATTTTAAAGCCGAATAAAACTTGCGG
Clona 3      1921 CACCGGATATGGACCAAACTGTCTCACGCATGAAATTTTAAAGCCGAATAAAACTTGCGG

RRH2 p322    1963 TCTTTAAAACTAACCCCTTTACTTTCGTAAAGGCATGGACTATGTCTTCATCCTGCTACT
Clona 3      1981 TCTTTAAAACTAACCCCTTTACTTTCGTAAAGGCATGGACTATGTCTTCATCCTGCTACT

RRH2 p322    2023 GTTAATGGCAGGAGTCGGCGTATTATACTTTCCCACTCTCGAG
Clona 3      2041 GTTAATGGCAGGAGTCGGCGTATTATACTTTCCCACTGCATGC.
```

Figura 4.13 Alineamiento de la secuencia RRH2. RRH2 p322: secuencia RRH2 contenida en el plásmido p322. Clona 3: secuencia correspondiente a la clona enviada a secuenciar al CUGI

4.3.4 Obtención del plásmido de transformación pchPhy

La RRH2 fue sub-clonada en el plásmido pUC18, para ello fueron digeridos, tanto el vector como el inserto, con las enzimas de restricción *Pst*I y *Sph*I y posteriormente purificados como se describió previamente. En la Figura 4.14 se observa la relación vector:inserto (1:1) con la cual se llevó a cabo la ligación de ambos fragmentos.

Figura 4.14 Relación Vector:Inserto (pUC18:RRH2). M: marcador 2-log, V: Plásmido pUC18 (~2.7 Kb); I: Región de recombinación homóloga 2 (RRH2 ~2.0 Kb).

Tras la transformación de las células competentes de *E. coli* con la ligación anterior, se obtuvieron alrededor de 20 colonias. Se picaron seis colonias para su análisis mediante la digestión con las enzimas de restricción *Pst*I y *Sph*I, como se puede observar en la Figura 4.15.

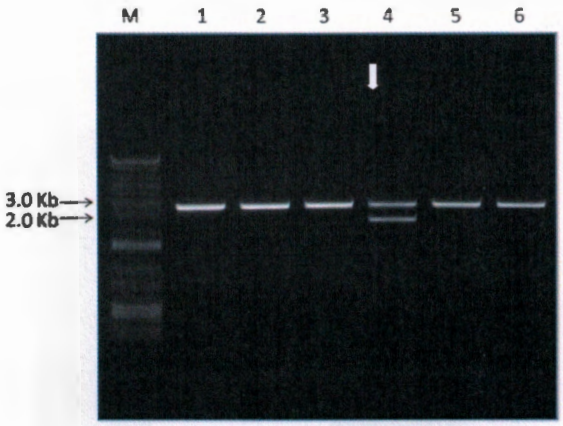

Figura 4.15 Verificación de la clonación de RRH2 (2.0 Kb) en pUC18 (2.7 Kb).Patrón de electroforesis generado por *Pst*I/*Sph*I. M: Marcador de 1Kb ladder plus (NEB); 1 al 6: Clonas analizadas. La flecha blanca indica las clonas que contienen el inserto del tamaño esperado.

Como se pudo observar en la Figura anterior, únicamente en el plásmido purificado de la clona 4 se encontraron los fragmentos esperados de ~2.7 Kb correspondiente al vector pUC18 y ~2.0 Kb correspondientes a la RRH2. Este plásmido fue seleccionado y se le dio el nombre de pRH2 (Figura 4.16).

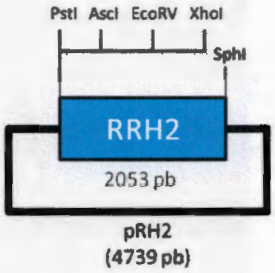

Figura 4.16 Diagrama del vector pRH2.

El siguiente paso en la elaboración de la construcción fue la clonación de la RRH1 en el pRH2. RRH1 fue obtenida a partir del vector p322 mediante el corte con las enzimas de restricción *EcoR*I y *BamH*I. En la Figura 4.17a, se observa la banda correspondiente al vector pRH2 (~4.7 Kb), linearizado por el corte con las enzimas antes mencionadas. En la Figura 4.17b se muestra la banda correspondiente a la RRH1 (~3.5 Kb) después de haber sido escindida y purificada.

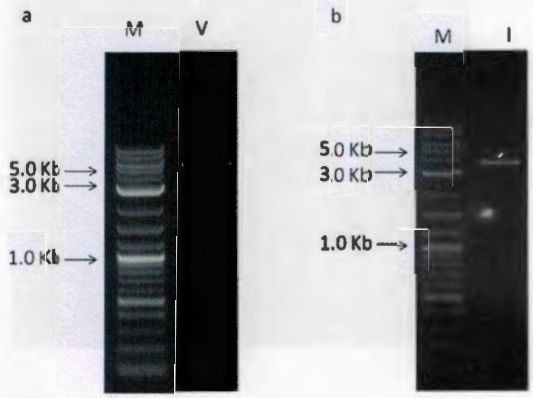

Figura 4.17 Bandas purificadas de vector e inserto. a) vector pRH2 (~4.7 Kb) y b) inserto RRH1 (~3.5 Kb). M: Marcador de peso molecular 2-log (NEB).

Después de la ligación, se obtuvieron tres colonias, las cuales fueron multiplicadas, se purificó el plásmido y se realizó su análisis mediante la digestión con las enzimas de restricción *BamH*I y *EcoR*I (Figura 4.18).

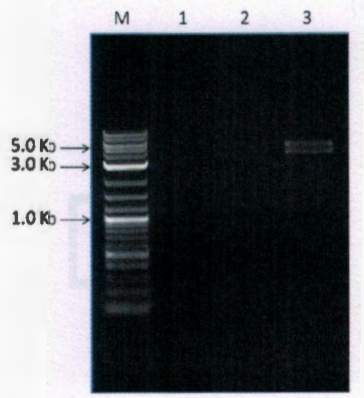

Figura 4.18 Verificación de la integridad de vector pRH12. Patrón de electroforesis generado por*BamH*I y *EcoR*I. M: Marcador 2-log (NEB); 1 a 3: clonas analizadas.

Como se puede observar en la Figura 4.18, el plásmido de la clona 3 fue el único que presentó el resultado esperado, y que contenía a RRH1 en pRH2. A este nuevo plásmido se le denominó pRH12 y con él se continuó el trabajo. En la Figura 4.19 se presenta el diagrama de este plásmido.

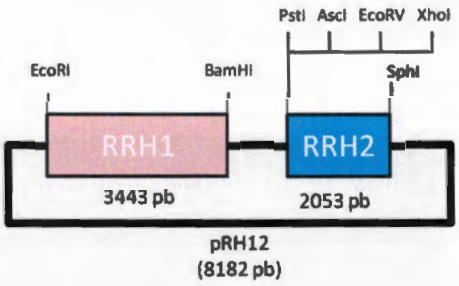

Figura 4.19 Diagrama del vector pRH12.

La clonación de la construcción que contiene al gen de resistencia *aadA* se realizó entre los sitios de restricción *BamH*I y *Sal*I del plásmido pRH12. Para ello se linearizaron tanto el vector como el inserto y se verificó su integridad mediante una electroforesis. En la Figura 4.20 se puede ver la relación V:I de los fragmentos linearizados y purificados, tanto del vector pRH12 (~8.0 Kb) como del inserto AadA (~1.6 Kb).

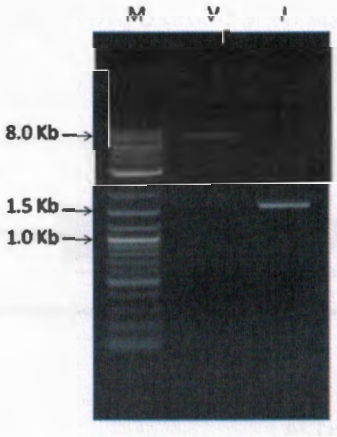

Figura 4.20 Relación vector inserto (pRH12:aadA). V: Vector pRH12 (~8.0 Kb); I: Inserto aadA (~1.6 Kb).

La reacción de ligación de ambos fragmentos se incubó toda la noche a 16 °C y posteriormente se transformaron las células competentes con ella. Se obtuvieron 14 colonias, de las cuales cuatro se multiplicaron y se les realizó la extracción del plásmido. Los plásmidos purificados fueron analizados por medio de digestión con las enzimas de restricción *BamH*I y *Sal*I. Todas la clonas analizadas fueron positivas a la presencia del inserto aadA como se puede verificar en la Figura 4.21.

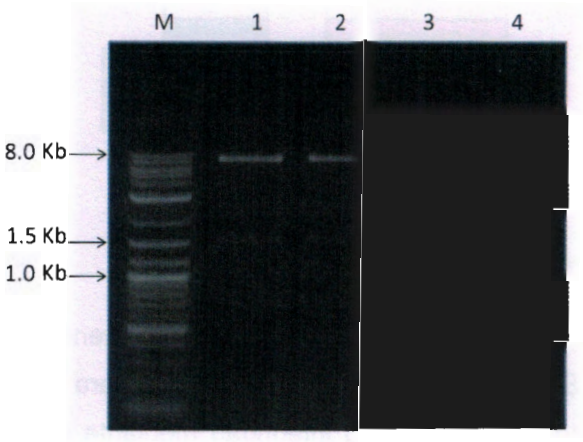

Figura 4.21 Verificación de la integridad del vector pRH12A. Patrón de electroforesis generado por *BamH*I y *Sal*I . M: Marcador 2-log (NEB); 1 a 4: clonas analizadas

Al plásmido generado en esta etapa se le nombró pRH12A (Figura 4.22).

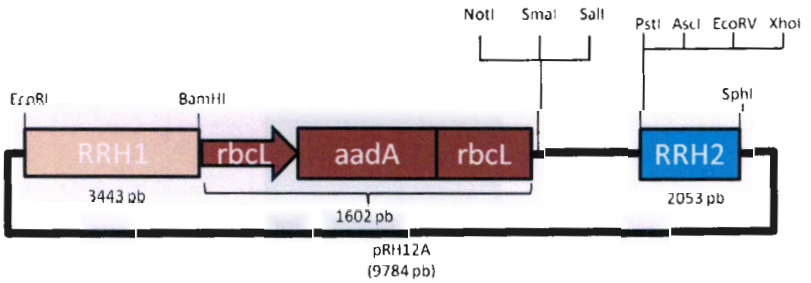

Figura 4.22 Diagrama del vector pRH12A.

Posteriormente, se continuó con la etapa final del ensamblaje del plásmido de transformación, la cual consistió en clonar la construcción de expresión cphySr en el vector pRH12A.

Para la clonación de cphySr en el plásmido pRH12A, el vector y el inserto se digirieron con las enzimas de restricción *Ascl* y *SalI*, y posteriormente purificados. En la Figura 4.23 se observó la relación vector:inserto con la cual se llevó a cabo la ligación de ambos fragmentos.

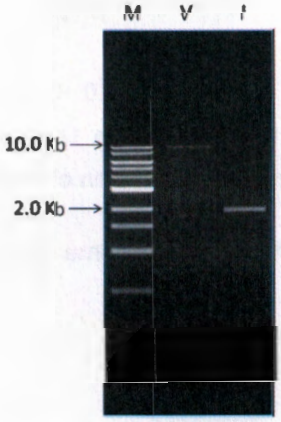

Figura 4.23 Relación Vector:Inserto (pRH12A:cphySr). M: marcador 1Kb DNA ladder plus (NEB) V: Plásmido pRH12A (~ 9.8 Kb); I: Construcción de expresión cphySr (~2.0 Kb).

Tras la transformación de las células competentes de *E. coli* con la ligación anterior, se obtuvieron 16 clonas de las cuales se analizaron 7 y se observó que cuando menos dos de ellas contenían los fragmentos esperados. Esto fue comprobado mediante una doble digestión con las enzimas *NotI* y *EcoRV*. Esta digestión permitió observar los fragmentos correspondientes al vector pUC18-RRH1-RRH2-aadA (~9.6Kb) y la construcción cphySr (~2.0 Kb). Estos fragmentos pueden observarse en la Figura 4.24.

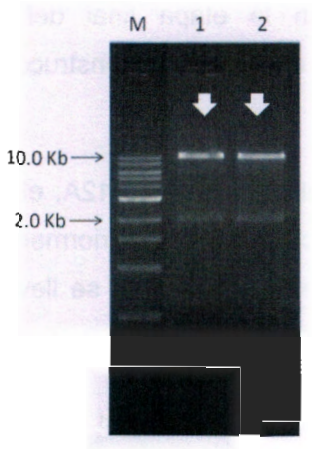

Figura 4.24 Verificación de la clonación de cphySr (~2.0 Kb) en pRH12A (~9.6Kb). Patrón de electroforesis generado por *EcoRV*/*NotI*. M: Marcador de 1Kb ladder plus (NEB); 1 y 2: Clonas analizadas. La flecha blanca indica las clonas que contienen el inserto del tamaño esperado.

El vector generado se le llamó pChPhy y el esquema general del mismo es el que se muestra en la Figura 4.25.

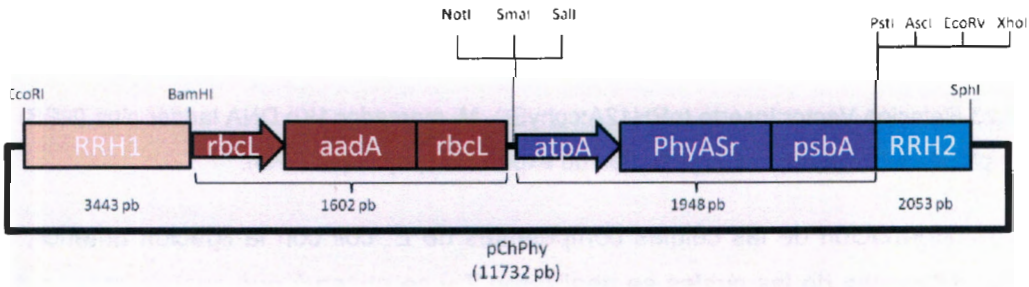

Figura 4.25 Diagrama del vector pChPhy.

Finalmente, para verificar la integridad del vector antes mencionado se realizó una digestión triple con las enzimas *BamHI*, *EcoRV* y *NotI*. Con esta digestión se esperaban fragmentos de ~8.0 Kb, ~2.0 Kb y ~1.6 Kb correspondientes al vector pUC18-RRH1-RRH2, a la construcción cphySr y a la construcción de expresión aadA, respectivamente. Lo anterior se puede observar en la Figura 4.26.

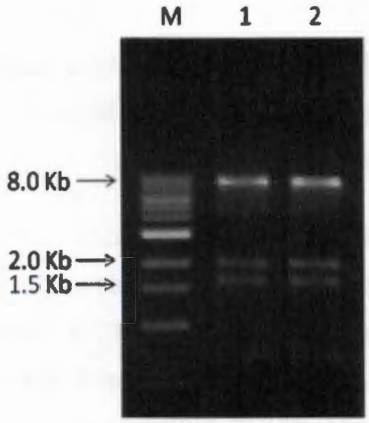

Figura 4.26 Verificación de la integridad del plásmido pChPhy. Patrón de electroforesis generado por *BamHI/EcoRV/NotI*. M: Marcador de 1Kb ladder plus (NEB); 1 y 2: Clonas analizadas

La imagen anterior confirma que pChPhy contiene tanto el gen de resistencia *aadA* como el gen que codifica para la fitasa phyA de la bacteria *Selenomonas ruminantium*

4.4 DISCUSIÓN

En este capítulo se obtuvo un plásmido para la transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii*, y la expresión del gen de la fitasa *phyA* de la bacteria *S. ruminantium* en este organelo. Este plásmido fue denominado como pChPhy.

Tradicionalmente, el vector utilizado para la transformación del cloroplasto ha sido el p322 (Newman *et al.*, 1991). Este plásmido se basa en el plásmido Bluescript KS+ y contiene las regiones de recombinación homólogas RRH1 y RRH2. Entre estas dos regiones, se encuentra un sitio de restricción *BamH*I entre las cuales las construcciones de interés pueden ser insertadas de manera no direccional. Para poder llevar a cabo la transformación con este plásmido, es necesario recurrir a una estrategia de co-transformación utilizando un segundo plásmido denominado p667, el cual contiene una mutación puntual en el gen de 16S de *C. reinhardtii* lo que provoca una elevada resistencia a la espectinomicina permitiendo de esta manera la identificación de transformantes. Una desventaja de esta estrategia es que existen tres posibles resultados:

1. Que el cloroplasto solo sea transformado con el gen de interés pero no con el gen de selección, impidiendo la recuperación exitosa de los transformantes.

2. Que se inserte el gen de selección y no el gen de interés dando como resultado falsos positivos al permitir la recuperación de clonas transformadas que no contienen el gen de interés.

3. Que tanto el gen de interés como el gen de selección sean insertados de manera correcta en el cloroplasto de *C. reinhardtii,* dando como resultado la recuperación de clonas transformadas exitosamente tanto con el gen de interés como con el gen de selección.

En vista de que solo la tercera posibilidad es exitosa, es necesario, realizar un análisis exhaustivo de las clonas hasta obtener una con el gen de interés y con el marcador de selección.

El vector pChPhy, presenta ventaja ante el panorama mencionado previamente ya que al

contener el gen de resistencia *aadA* asegura que al recuperar una colonia del medio de selección esta contendrá el gen de interés.

Anteriormente, se mencionó la existencia de un reporte en donde se indica el uso del cloroplasto de *C. reinhardtii* como biorreactor para la producción recombinante de una fitasa tipo HAP de *E. coli*. Este tipo de fitasas son de las más socorridas para su aplicación como aditivo alimenticio ya que tienen la capacidad de actuar a un pH entre 2 y 6 que es similar al del tracto digestivo de los animales monogástricos.

La secuencia madura (sin péptido señal) del gen *appA* de *E. coli* fue clonada en el vector pATPA, que es una versión del p322 y cuya diferencia es que ya contiene las regiones reguladoras P+5'UTR del gen *atpA* y las región 3' UTR del gen *rbcL,* las cuales han demostrado en trabajos previos que son capaces de dirigir altos rendimientos proteicos (Barnes *et al.,* 2005). Los rendimientos proteicos de la fitasa producida por el gen *appA* obtenidos por Yoon y colaboradores (2011) en el cloroplasto de *C. reinhardtii,* fueron de aproximadamente de 10 U/mg de lisado celular, que aun suponiendo que tengan el 100% de actividad catalítica, sería muy baja en comparación con la actividad de la misma enzima purificada a partir de *E. coli.* Los extractos purificados pueden llegar a tener una actividad entre los 811 a 1800 U/mg (Yoon *et al.*, 2011). Este bajo rendimiento fue atribuido a la ausencia del péptido señal y estos autores consideran que esto pudiera haber generado inestabilidad en el ARNm y por lo tanto se afectó la traducción de la proteína.

A diferencia del reporte de Yoon y colaboradores (2011), en este trabajo la construcción de expresión contiene el gen *phyA,* que codifica para la fitasa PTP de la bacteria *S. ruminantium.* Esta fitasa corresponde a un tipo único de fitasas propias de bacterias ruminales, por lo que se considera que están completamente adaptadas al medio ambiente imperante en el tracto digestivo de los animales de granja. La fitasa de *S. ruminantium* tiene uan alta afinidad por su sustrato y buena eficiencia catalítica, por lo que es una buena alternativa para ser usada como aditivo alimenticio.

Por otro lado, la secuencia de la fitasa de *S. ruminantium* fue clonada bajo la regulación del P+5'UTR de *atpA* y la región 3'UTR de *psbA*, la cual según Barnes y colaboradores (2005) es una de las mejores combinaciones para la acumulación de ARNm. Además, la

secuencia de la fitasa de *S. ruminatium* fue clonada incluyendo al péptido señal, con lo cual se espera que la estabilidad del ARNm no se verá comprometida y se pueda llevar a cabo de manera eficiente la traducción de la proteína.

pChPhy presenta la ventaja de tener siete sitios de restricción que pueden ser utilizados para la sustitución de la construcción de expresión cphySr por cualquier otra que contenga alguno de los sitios de restricción presentes en este plásmido.

Dado que este vector cuenta con las mismas regiones de recombinación homóloga que el tradicionalmente usado p322, la inserción de los genes de interés será dirigida hacia el mismo sitio de recombinación entre *EcoR*I y *Xho*I ubicados en regiones cercanas al intrón 4 del gen *psbA* y al extremo 3'del gen ribosomal *23S*.

4.5 CONCLUSIONES

1. Se obtuvo el vector pChPhy, diseñado para la transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii*.

2. pChPhy contiene un gen de resistencia (*aadA*) a antibiótico con el uso del codón del cloroplasto situado junto al sitio policlonal de la construcción de interés por lo que no será necesario recurrir a una estrategias de co-transformación.

3. pChPhy presenta un sitio policlonal que permitirá la sustitución de la construcción cphySr con alguna otra secuencia de interés con mayor facilidad que usando el plásmido disponible originalmente de un solo sitio de restricción.

4.6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Barnes, D., S. Franklin, J. Schultz, R. Henry, E. Brown, A. Coragliotti y S. Mayfield (2005). Contribution of 5′- and 3′-untranslated regions of plastid mRNAs to the expression of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast genes. Molecular Genetics and Genomics. 274(6), 625-636.

Cheng, K.-J., B. L. Selinger, L. J.Yanke., H. D. Bae, L. Zhou y C. W. Forsberg, (1999). Phytases of ruminal microorganisms. US Patent Number: 5, 939, 303.

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 *Selenomonas ruminantium* phytase in complex with persulfated phytate: DSP phytase fold and mechanism for sequential substrate hydrolysis. Structure. 12(11), 2015-2024.

Dron, M., M. Rahire y J. D. Rochaix (1982). Sequence of the chloroplast DNA region of *Chlamydomonas reinhardii* containing the gene of the large subunit of ribulose bisphosphate carboxylase and parts of its flanking genes. Journal of Molecular Biology. 162(4), 775-793.

Franklin, S. E. y S. P. Mayfield (2004). Prospects for molecular farming in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Current Opinion in Plant Biology. 7(2), 159-165.

Goldschmidt-Clermont, M. (1991). Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker for site-directed transformation of *Chlamydomonas*. Nucleic Acids Research. 19(15), 4083-4089.

He, D.-M., K.-X. Qian, G.-F. Shen, Z.-F. Zhang, Y.-N. Li, Z.-L. Su y H.-B. Shao (2007). Recombination and expression of classical swine fever virus (CSFV) structural protein E2 gene in *Chlamydomonas reinhardtii* chroloplasts. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 55(1), 26-30.

Hollingshead, S. y D. Vapnek (1985). Nucleotide sequence analysis of a gene encoding a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase. Plasmid. 13(1), 17-30.

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.

Ishikura, K., Y. Takaoka, K. Kato, M. Sekine, K. Yoshida y A. Shinmyo (1999). Expression of a foreign gene in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. Journal of Bioscience and Bioengineering. 87(3), 307-314.

Kim, O.-H., Y.-O. Kim, J.-H. Shim, Y.-S. Jung, W.-J. Jung, W.-C. Choi, H. Lee, S.-J. Lee, K.-K. Kim, J.-H. Auh, H. Kim, J.-W. Kim, T.-K. Oh y B.-C. Oh (2010). β-propeller phytase hydrolyzes insoluble Ca^{2+}-phytate salts and completely abrogates the ability of phytate to chelate metal ions. Biochemistry. 49(47), 10216-10227.

Kies, A. K., L. H. De Jonge, P. A. Kemme y A. W. Jongbloed (2006). Interaction between protein, phytate, and microbial phytase. *In vitro* studies. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54(5), 1753-1758.

Klein, U., J. D. De Camp y L. Bogorad (1992). Two types of chloroplast gene promoters in *Chlamydomonas reinhardtii*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 89(8), 3453-3457.

Leytem, A. B., G. P. Widyaratne y P. A. Thacker (2008). Phosphorus utilization and characterization of ileal digesta and excreta from broiler chickens fed diets varying in cereal grain, phosphorus level, and phytase addition. Poultry Science. 87(12), 2466-2476.

Mayfield, S. P., S. E. Franklin y R. A. Lerner (2003). Expression and assembly of a fully active antibody in algae. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 100(2), 438-442.

Mayfield, S. P. y J. Schultz (2004). Development of a luciferase reporter gene, *luxCt*, for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. The Plant Journal. 37(3), 449-458.

Mayfield, S. P., A. L. Manuell, S. Chen, J. Wu, M. Tran, D. Siefker, M. Muto y J. Marin-Navarro (2007). *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. Current Opinion in Biotechnology. 18(2), 126-133.

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.

Rochaix, J. (1995). *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. Annual Review of Genetics. 29(1), 209-230.

Wang, X., M. Brandsma, R. Tremblay, D. Maxwell, A. Jevnikar, N. Huner y S. Ma (2008). A novel expression platform for the production of diabetes-associated autoantigen human glutamic acid decarboxylase (hGAD65). BMC Biotechnology. 8(1), 87.

Yanke, L. J., H. D. Bae, L. B. Selinger y K. J. Cheng (1998). Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. Microbiology. 144(6), 1565-1573.

Yao, M. Z., Y. H. Zhang, W. L. Lu, M. Q. Hu, W. Wang y A. H. Liang (2012). Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications. Journal of Applied Microbiology. 112(1), 1-14.

Yoon, S.-M., S. Kim, K. Li, B. Yoon, S. Choe and 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.

CAPÍTULO V

5.1 DISCUSIÓN GENERAL

Desde hace aproximadamente 40 años se conoce la habilidad de las fitasas para hidrolizar el fitato (IP_6) y liberar el fósforo (P) contenido en éste, aunque es a finales de los años 90 que se comenzó a realizar estudios para encontrar enzimas capaces de ser utilizadas en la alimentación animal para sustituir el uso de fósforo inorgánico (Pi) proveniente de la roca. El Pi es un recurso no renovable, sin embargo, el alto costo de producción de esta clase de enzimas, la baja actividad enzimática y el bajo rendimiento que se ha obtenido de la mayoría de las fitasas estudiadas a la fecha han dificultado esta tarea (Yao *et al.*, 2012; Rao *et al.*, 2009).

La tendencia actual del mercado de las fitasas indica un incremento en la utilización de estas enzimas para satisfacer la demanda de P en el área pecuaria, en lugar del de Pi de origen mineral. El mercado de estas enzimas promete grandes ganancias para el año 2015 donde se esperan ventas por 4.4 mil millones de dólares, por lo que el mejoramiento de las fitasas conocidas mediante ingeniería genética y proteica, es una de las metas próximas a alcanzar. Ninguna de las fitasas conocidas en la actualidad cumple con la eficiencia catalítica, la resistencia a proteólisis, termoestabilidad y economía necesarias para ser consideradas como un aditivo alimenticio ideal (Yao *et al.*, 2012; Report Code: BIO030E, Published: January 2008, Report Code: BIO030F Published: January 2011), por lo que la búsqueda de nuevas fitasas con características novedosas, es uno de los retos a cumplir en los próximos años. Para ello, existen herramientas proteómicas (Wöhlbrand *et al.*, 2013) que permiten la identificación de proteínas a partir de una fuente biológica determinada y herramientas bioinformáticas, como el BLASTP (Altschul *et al.*, 1997), que permiten la identificación de proteínas de manera dirigida tomando como molde una secuencia proteica de interés.

Basándonos en esta última aproximación, en este trabajo de tesis se realizó el análisis *in silico* del genoma de *C. reinhardtii,* usando como base secuencias representativas de cada una de las cuatro clases de fitasas reportadas en la literatura [PAP: *G. max* (AK49438.1); BPP: *B. subtillis* (ACR78677.1); HAP: *A. niger phyA* (CAA78904.1); PTP: *S. ruminantium* (AAQ13669.1)]. Dicho análisis arrojó como resultado únicamente cinco

secuencias homólogas (CrPAP1 a CrPAP5) a fosfatasas ácidas púrpura (PAP). Una sexta PAP (CrPAP6) fue encontrada utilizando como molde las secuencias CrPAP encontradas previamente, lo cual indica que la familia de fosfatasas de la clase PAP en *C. reinhardtii* está conformada únicamente por seis proteínas. Ninguna de las otras clases de fitasa utilizadas en este análisis arrojó resultados positivos. Fosfatasas de la clase PAP han sido encontradas en plantas como *A. thaliana,* donde se conocen 29 miembros de esta familia y varios de ellos son inducidos por la privación de fósforo (Li *et al.*, 2002). En *O. japonica* se conocen 26 miembros de esta familia (Zhang *et al.*, 2011) y en *G. max* se han encontrado 35 miembros (Li *et al.*, 2012). Las PAP también han sido encontradas en organismos procariotas como las cianobacterias; sin embargo, el número de secuencias encontradas en estos organismos varía de uno a tres por individuo (Yeung *et al.*, 2009). En el caso de las microalgas, no se conoce reporte que indique el número de fosfatasas de la clase PAP presentes en ellas. En el presente trabajo se identificó que en el genoma de las especies de microalgas eucariotas analizadas en este trabajo existen entre 1 y 11 secuencias PAP, por lo que se considera normal el hecho de tan solo haber encontrado seis miembros de esta familia en *C. reinhardtii.*

La predicción de las características bioquímicas realizada a las seis secuencias CrPAP indicó que el peso peso molecular predicho para las CrPAP1 a la CrPAP5 es similar al de las fitasas de la clase PAP de plantas (Konietzny y Greiner, 2002), en tanto que CrPAP6 tiene mayor similitud a las PAP de bajo peso molecular típicas de los mamíferos, aunque algunas de ellas también han sido encontradas en plantas (Li *et al.*, 2012; Klabunde y Krebs, 1997). La mayoría de las CrPAPs presentaron su punto isoeléctrico en un rango que va de 4.46 a 6.32, los cuales son muy similares a las fitasas de origen bacteriano, fúngico (Konietzny y Greiner, 2002) y de plantas como la fitasa de soya (Gibson y Ullah 1988), de la raíz del maíz (Hübel y Beck, 1996) y la raíz del tomate (Li *et al.* 1997). En contraste, CrPAP1 presentó un punto isoeléctrico de 8.5 similar al de la fitasa de la clase HAP de *Aspergillus fumigatus,* cuyo punto isoeléctrico es de 8.56. Debido a esta característica se le considera como una enzima adecuada para su producción a nivel industrial, ya que permite una purificación fácil y eficiente (Wyss *et al.* 1999).

Los dominios identificados en las seis CrPAPs, corresponden a un dominio de metalofosfoesterasa similar al centro metálico que funciona como sitio catalítico de las enzimas de la clase PAP. Además, se identificaron los siete aminoácidos distribuidos en los cinco bloques conservados que forman parte de este dominio y que proporcionan un sitio de unión a los metales que forman parte de su sitio activo (Hegeman y Grabau, 2001; Schenk *et al.* 2000). Este dominio identifica a las secuencias CrPAP como miembros de las fosfatasas PAP. Si bien es conocido que existe baja homología entre la cadena polipeptídica de PAPs de diferentes reinos, los motivos que son la firma característica del dominio mantienen siempre el mismo orden y los siete residuos aminoacídicos que sirven de sitio de unión a metales, permanecen invariables (Schenk *et al.*, 2000) tal cual sucede con las CrPAP. Además, en el caso de CrPAP4 se identificó un dominio similar a la fibronectina 3, el cual es comúnmente observado en las PAP pertenecientes a mamíferos, observado también en la PAP de *Phaseolus vulgaris* (KBPAP) (Tsyguelnaia y Doolittle, 1998) y de *Arabidopsis thaliana* (AtPAP10 y AtPAP12) (Li *et al.,* 2002). La función de la fibronectina en mamíferos es proveer de conexiones esenciales a las células a través de integrinas y otros receptores, además de regular la adhesión celular, la migración e incluso la diferenciación (Schwarzbauer y DeSimone, 2011), pero se desconoce la razón por la cual este dominio se encuentra presente en las PAP de plantas.

Previamente se ha estudiado la relación filogenética de las PAP de diferentes plantas (Li *et al.,* 2012; Zhang *et al.,* 2011; Dionisio *et al.,* 2011; Li *et al.,* 2002) y la característica común en estos árboles filogenéticos es que las PAP de plantas con actividad de fitasa siempre se agrupan en un solo clado. En este trabajo se investigó la relación filogenética entre las CrPAPs y las PAP de plantas y animales con y sin actividad de fitasa. Al igual que en los reportes previos, las PAP de plantas con actividad de fitasa fueron agrupadas exclusivamente en el clado (III), en conjunto con dos secuencias tipo PAP de la microalga *C. subellipsoidea* C-169. Las CrPAPs no fueron agrupadas con las PAPs de plantas con actividad de fitasa, sino que fueron agrupadas junto con las secuencias tipo PAP de otras microalgas. Las CrPAP fueron distribuidas en los clados II, IV, V, VI y VIII, formados exclusivamente por microalgas. Lo anterior nos hace pensar que la mayoría de las PAPs de microalgas tienen características propias que las hace agruparse de manera independiente, al igual que como sucede entre PAPs de animales y plantas. A pesar de que las plantas y las microalgas pertenecen al mismo reino, estas últimas divergeron de

las plantas terrestres hace más de mil millones de años (Yoon *et al.*, 2004). Probablemente, por esta razón es que las fitasas de plantas fueron agrupadas exclusivamente en el clado III, en tanto que las secuencias de microalgas fueron agrupadas en clados independientes como es el caso de los clados IV (CrPAP1) y V (CrPAP2 y CrPAP3), los cuales dada su cercanía con el clado III pudieran contener a las secuencias con actividad de fitasa de las microalgas.

Dioniosio y colaboradores (2011) realizaron un estudio filogénetico con las PAPs y proteínas tipo PAP de plantas, encontrando que la mayoría de las secuencias PAP con actividad de fitasa se agrupaban en el mismo clado con excepción de la fitasa de *Arabidopsis thaliana* AtPAP23 (AQ93685). Estos autores identificaron cuatro motivos conservados [(1) R-G-(H/V/Q/N)-A-(V/I)-D-(L/I)-P-(D/E)-T-D-P-(R/L)-V-Q-R-(R/N/T); (2) S-(V/I)-V-(R/Q)-(Y/F)-G; (3) A-M-S-X-X-(H/Y)-(A/Y/H)-F-(R/K)-T-M-P; y (4) D-C-Y-S-C-(S/A)-F-X-X-X-T-P-I-H], exclusivos de las PAP de plantas con actividad de fitasa que se agruparon juntas y que no se han encontrado en ningún otro tipo de PAP, ya sea de plantas u otro organismo. La función de estos motivos se desconoce, por lo que queda como una incógnita a dar respuesta en el futuro.

Sería interesante analizar las secuencias de las PAPs de microalgas que se usaron en el presente estudio, con la finalidad de identificar motivos relacionados con la actividad de fitasa, propios de las PAPs de microalgas. Si bien en el presente trabajo se identificaron en *C. reinhardtii* secuencias homólogas a las fitasas de la clase PAP, no se conoce ninguna fitasa de esta clase en las microalgas, por lo que es aventurado decir qué secuencia de las CrPAP contiene los motivos que confieren actividad de fitasa. Además, el hecho de agruparse en clados diferentes dificulta aún más predecir su función.

Para lograr la identificación de estos motivos, el primer paso sería realizar la caracterización de una PAP de microalga que presente actividad de fitasa, con la cual posteriormente se podría realizar una búsqueda *in silico* de secuencias con características similares y partiendo de ello identificar los motivos relacionados con la actividad de fitasa.

En las secuencias proteicas CrPAP1 a CrPAP5 se predijo un péptido de secreción con los programas SignalP y TargetP, lo cual sugiere que estas proteínas podrían tener actividad

en el exterior de la célula, tal como lo hacen diversas fosfatasas bacterianas y de plantas cuya función es la desfosforilación de los diferentes sustratos encontrados en el ambiente y así permitir la asimilación del fósforo necesario para su sobrevivencia (Tian *et al.*, 2012; Rao *et al.*, 2009). En el caso de la CrPAP6 no se detectó péptido señal de ninguna clase, lo que sugiere que su localización es citosólica y su función la realiza en el interior de la célula. Sin embargo, se conocen proteínas que carecen de péptido señal, como la interleucina y, que utilizan vías alternas como la secreción apocrina, para llegar al lugar donde realizan su actividad, por lo que no se puede descartar la posibilidad de que esta proteína también sea secretada por una vía diferente a la del retículo endoplásmico (Manin *et al.*, 1995; Muesch *et al.*, 1990).

Los elementos de respuesta identificados con la base de datos PLACE (Higo *et al.*, 1999) en las regiones promotoras de los genes *CrPAP* indicaron una probable inducción de todos los genes *CrPAP* ante la presencia de ácido salicílico (ASF1MOTIFCAMV y GT1CONSENSUS). *CrPAP1* y *CrPAP4* probablemente se induzcan ante la presencia de cloruro de sodio (GT1GSCAM4). La presencia de níquel o a la ausencia de cobre (CURECORECR) podría inducir la expresión de todos los genes *CrPAP* con excepción de *CrPAP3*. *CrPAP1* y *CrPAP6,* probablemente respondan ante el déficit de fósforo (P1BS). Este último elemento resulta de particular interés, ya que se sabe que en el caso de diversos genes de *A. thaliana*, P1BS funciona como sitio de anclaje para el factor de transcripción PHR1, y aunque no se conoce la existencia de este elemento en las PAP de *A. thaliana* la condición de privación de fósforo produce un incremento en los niveles de transcripción de los genes AtPAP11, AtPAP12 y AtPAP23 (Sobkowiak *et al.*, 2012; Hurley *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2002). En el caso de *CrPAP1,* P1BS podría ser un elemento de cierta relevancia en la inducción de este gen. Si bien la mayoría de los elementos en *cis,* encontrados en este trabajo fueron identificados en plantas, también es cierto que pertenecen a organismos eucariotas como lo es *C. reinhardtii.* Es posible que los factores de transcripción encargados de unirse a estos elementos sean homólogos a los factores de transcripción que corresponden a los elementos *cis* de respuesta encontrados en las regiones promotoras de los genes *CrPAP.*

Dado que en el presente trabajo, se encontraron secuencias homólogas a fitasas de la clase PAP en el genoma de *C. reinhardtii*, y a que Quisel y colaboradores (1996) mencionaron resultados no publicados que indicaban que *C. reinhardtii* fue capaz de crecer en un medio de cultivo cuya única fuente de P era el IP_6, se evaluó el uso de este compuesto como fuente de P para el crecimiento de *C. reinhardtii.* Hasta la fecha lo anterior no había sido respaldado por ninguna publicación

En zonas de pastoreo intensivo, el IP_6 excretado por los animales, queda a disposición de los consorcios microbianos presentes en la zona, que a su vez generan fosfatos a partir del IP_6 los cuales llegan a los cuerpos de agua cercanos y provocan el fenómeno conocido como eutroficación (Yao *et al.,* 2012; Konietzny y Greiner, 2002). Aunque a la fecha no se conocen fitasas de origen microalgal, no se puede descartar la posibilidad de que una porción del IP_6 excretado por los animales de granja llegue íntegro a los cuerpos de agua, siendo las microalgas parte del consorcio encargado de degradar el IP_6. Por otro lado, Merchant y colaboradores (2008) consideran que muchos de los genes de *C. reinhardtii*, se remontan al antepasado común de las plantas y animales, por lo que es probable que alguno de los genes *CrPAP* encontrados en este trabajo codifiquen para una proteína con actividad de fitasa. En el presente trabajo, se presentaron evidencias de la capacidad que tiene *C. reinhardtii* para crecer en un medio suplementado con IP_6 como única fuente de P, lo que nos indica que esta microalga debe poseer al menos una fosfatasa con actividad de fitasa.

La concentración celular de *C. reinhardtii* cultivada en presencia de IP_6 como única fuente de P fue menor que el de aquellas cultivadas con la fuente de P habitual proporcionada por el medio TAP. Esto podría ser causado por la desfosforilación incompleta del IP_6 por una fitasa de la microalga y por lo tanto la disponibilidad de P en el medio de cultivo es menor. Probablemente la enzima de *C. reinhardtii* se encuentre regulada por algún mecanismo de retroalimentación que al percibir la presencia de P, necesario para su sobrevivencia, inhiba la producción de la enzima o a la enzima misma (Quan *et al.*, 2001). La concentración celular de *C. reinhardtii* cultivada en medio TAP+IP_6 fue mayor que la cultivada en medio TAP, lo que podría ser causado por el incremento en la cantidad de P presente en el medio, asumiendo que el IP_6 está siendo desfosforilado por una fitasa de la microalga.

Se observó también que dependiendo del tratamiento donde haya sido cultivada (medio TAP+IP_6 o medio TA+IP_6) *C. reinhardtii* presentó una variación en su perfil electroforético como lo indicó la presencia o ausencia de algunas bandas o la disminución e incremento en la intensidad de algunas otras. Este comportamiento podría ser parte de la respuesta a condiciones limitantes de P y que forman parte de la respuesta a la privación de fósforo. Se ha observado mediante análisis de expresión génica, metabolómica y proteómica, que los organismos eucariotas reprograman su metabolismo y circuitos genéticos para sobrellevar esta condición de estrés, y es en esta última, donde se puede observar una acumulación diferencial de proteína (Lan *et al.* 2012; Rouached *et al.*, 2010; Raghothama, 1999; Duff *et al.*, 1991).

En cuanto al análisis de expresión, se observó que *CrPAP2, CrPAP4 y CrPAP6* fueron capaces de mantener su expresión bajo los tratamientos de cultivo antes descritos, mientras que *CrPAP3* fue el gen con menor expresión y además ésta se vio afectada por la presencia de IP_6 como única fuente de P. Se sabe que el Pi puede actuar como inhibidor de las PAP (Schenk *et al.,* 2005), por lo que es probable que el P liberado a partir del IP_6 actúe como un inhibidor de este gen. En contraste, fue evidente que la expresión de *CrPAP1* fue inducida en los tratamientos con presencia de IP_6, lo que sugiere que este gen podría responder a la presencia de IP_6 y este efecto pudiera ser potenciado por la ausencia de las sales habituales de P del medio TAP. Por otro lado, *CrPAP5* aparenta responder a la privación de las sales de P, ya que este gen solo fue expresado en el medio con IP_6 como única fuente de P.

La inducción de la síntesis de las fosfatasas en respuesta a la privación de fósforo ha sido demostrada en plantas superiores (Duff *et al.,* 1991; Goldstein *et al.,* 1988), mientras que en algunos microorganismos como las bacterias (*Bacillus subtilis* y *Klebsiella terrigena*), la presencia de IP_6 puede inducir la síntesis de fitasas (Greiner *et al.,* 1997; Powar y Jagannathan, 1982). *CrPAP1* y *CrPAP5*, podrían codificar para fosfatasas involucradas en la PSR, reciclando P a partir de fuentes orgánicas, como el IP_6 en el caso de la proteína producida por *CrPAP1*. *CrPAP5* podría estar involucrado en reciclar compuestos fosfatados intracelulares, ya que su respuesta se observó únicamente en ausencia de las sales de fósforo proporcionadas por el medio TAP.

El estudio de fosfatasas en las microalgas es muy limitado y no se han identificado ni caracterizado PAP con o sin actividad de fitasa en *C. reinhardtii* o en alguna otra microalga. Este trabajo abre las puertas para seguir estudiando a esta familia de fosfatasas, tanto en *C. reinhardtii* como en las microalgas y de esta manera identificar alguna fitasa de la clase PAP que pudiera tener aplicación como aditivo alimenticio. Con esto se podría ampliar la variedad de fitasas disponibles en el mercado en la actualidad y por otro lado entender la función que desempeñan las fosfatasas de la clase PAP en las microalgas.

En vista de los datos presentados hasta el momento podemos sugerir que CrPAP1 es la que tiene mayor probabilidad de tener actividad de fitasa, ya que presentó mayor cercanía con el clado III conformado por las fitasas PAP de plantas. Además, se encontró en su promotor un elemento de respuesta P1BS, el cual se sabe participa en la inducción de diversos genes relacionados con la ausencia de P.

Por otro lado, en el análisis de expresión, se observó que el gen *CrPAP1* se indujo en presencia de IP_6 en el medio TAP, e incrementó su expresión al encontrarse en presencia de IP_6 como única fuente de P, lo que sugiere que la enzima codificada por este gen está relacionada con la utilización de fitato para la sobrevivencia de la microalga. En el caso del gen *CrPAP5*, si bien se observó que su expresión se incrementaba en presencia de IP_6 como única fuente de P, en el árbol filogenético la proteína producida por este gen no se encuentra ubicada en alguna región cercana al clado III el cual contiene a las fitasas de plantas la clase PAP. Es probable que se encuentre más relacionada con condiciones de deficiencia de P que con la presencia de IP_6. En el caso de las demás proteínas CrPAP, es un tanto más difícil determinar su posible función con los resultados presentados hasta el momento. Si bien los datos de expresión de *CrPAP1* y *CrPAP5* sugieren una probable función, es necesario realizar la caracterización experimental de las proteínas generadas por estos genes para poder comprobarla, tanto de estas dos enzimas como del resto de las CrPAPs encontradas en el presente trabajo.

Dada la importancia comercial que han alcanzado las fitasas, se han hecho diversos esfuerzos para incrementar la producción de estas enzimas mediante técnicas de ingeniería genética en biorreactores, como bacterias, hongos, levaduras, plantas y

animales. En este sentido, Yoon y colaboradores (2011) utilizaron el cloroplasto de *C. reinhardtii* como biorreactor para la producción de cinco diferentes fitasas de la clase HAP y una fitasa de la clase BPP. Sin embargo, los rendimientos obtenidos en este trabajo fueron muy bajos, siendo la fitasa codificada por el gen *appA* de *E. coli* la que mejor actividad presentó (10 U/mg). En el caso de las demás fitasas expresadas en este organelo no fue posible determinar su actividad. La fitasa de *E. coli* producida fue dosificada directamente a un grupo de pollos experimentales y se comprobó que fue capaz de realizar su actividad enzimática a niveles similares que el de la fitasa fúngica comercial utilizada como control.

Tanto en el trabajo de Yoon y colaboradores (2011) como en otros reportes donde se maneja el uso de *C. reinhardtii* como biorreactor para la producción de proteínas recombinantes, el plásmido comúnmente utilizado es el p322 (Newman *et al.*, 1991). Este plásmido permite la integración del transgén por medio de recombinación homóloga y no cuenta con un gen de selección por lo que es necesario recurrir a la estrategia de co-transformación con un segundo plásmido, el p667 (Boynton *et al.*, 1989). El p667 contiene al gen ribosomal *16S* modificado con una mutación puntual que le confiere resistencia al antibiótico espectinomicina.

En el presente trabajo se generó un plásmido (pChPhy) el cual contiene el gen *phyA* que codifica para la fitasa de la clase PTP de la bacteria ruminal *Selenomonas ruminantium.* Fue concebido como una herramienta que permita la transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii* para su uso como biorreactor en la producción recombinante de esta fitasa. phyASr presenta propiedades atractivas para ser usada como aditivo alimenticio, como su alta actividad específica (400U/mg cuando ha sido expresada en *E. coli*), el amplio rango de pH al cual se encuentra activa (3.0 a 6.0) y resistencia a la actividad de proteasas (Cheng *et al.*, 1999). Hong y colaboradores (2004) expresaron esta enzima en semillas de arroz con la finalidad de usar su germinado como aditivo alimenticio para animales de granja. Sin embargo, a pesar de haber obtenido un buen nivel de actividad enzimática, los rendimientos proteicos fueron bajos.

Por otro lado, es de considerarse la viabilidad de seguir destinando tanto el área de cultivo como el cultivo mismo del arroz o cualquier otra especie alimenticia a la alimentación

animal. Existen 870 millones de personas alrededor del mundo que sufren desnutrición (http://www.wfp.org/hunger/who-are) y no se cuenta con los insumos alimenticios necesarios que satisfacer sus necesidades. En vista de lo anterior, es necesario encontrar biorreactores adecuados que permitan la producción de las fitasas sin sacrificar un área de cultivo o el cultivo mismo para la alimentación animal.

En este sentido, las microalgas surgen como una alternativa de biorreactor, ya que presenta ventajas como la posibilidad de cultivarse en tierras marginales y bajo condiciones ambientales desfavorables o de estrés (Widjaja *et al.*, 2009). Las microalgas como *C. reinhardtii* permitirían la dosificación directa de aditivos como las fitasas ya que son reconocidas como organismos seguros al considerarse que no contienen toxinas. Esto permitiría omitir el proceso de purificación al que son sometidas las proteínas producidas en bacterias u hongos patógenos (Mayfield *et al.*, 2007).

El bajo rendimiento en la producción de la enzima en arroz fue atribuido a que se eliminó el péptido señal de la proteína en la construcción de expresión. Se ha visto que el péptido señal puede estar involucrado en la estabilidad proteica. En nuestro trabajo se contempló que el gen de interés contenido en pChPhy contara con la secuencia que codifica para el péptido señal. De esta manera se puede evitar la problemática de bajo rendimiento asociada con la estabilidad de la proteína.

En vista de lo expuesto anteriormente, se espera que el vector pChPhy sea una herramienta adecuada para la transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii.* Además, este biorreactor podría alcanzar altos rendimientos proteicos con una alta actividad enzimática, que permitan que esta fitasa pueda ser utilizada en la alimentación animal. Una ventaja adicional que presenta el plásmido pChPhy es que incluye al gen de resistencia *aadA* de *E. coli,* modificado con el uso del codón del cloroplasto de *C. reinhardtii.* Este gen confiere resistencia al antibiótico espectinomicina, por lo que se considera posible que usando un solo plásmido en el proceso de transformación, se puedan recuperar con facilidad clonas transformadas con el gen de interés, sin necesidad de recurrir a la estrategia de co-transformación.

El presente trabajo de tesis contribuyó con aportaciones de gran importancia en el estudio de las fosfatasas ácidas púrpura en *C. reinhardtii*, lo cual abre todo un campo inexplorado

en estos organismos microscópicos, ya que este es el primer estudio que explora a esta familia de fosfatasas en las microalgas. Además, se trazó el camino para la identificación de al menos una posible fitasa en esta microalga, lo cual es de gran importancia, ya que la tendencia actual en el mercado del área agropecuaria es el uso de esta clase de enzimas para satisfacer las necesidades de fósforo de los animales monogástricos. Por lo anterior, es necesario identificar enzimas con mejores propiedades que las que actualmente se encuentran disponibles en el mercado. Siguiendo esta última premisa, se contribuyó con la generación del plásmido pChPhy, con el cual se lograría la producción recombinante de la fitasa phyASr de *S. ruminantium,* con lo que se espera una mejora en los rendimientos obtenidos en la producción de fitasas en el cloroplasto de *C. reinhardtii.* Este hecho, abriría la oportunidad para la producción comercial de esta enzima sin necesidad de pasar por un proceso de purificación, permitiendo la dosificación directa de la enzima en los alimentos de los animales que así lo requieran.

5.2 CONCLUSIONES GENERALES

1. El genoma de *C. reinhardtii* cuenta con cinco secuencias (CrPAP1 a CrPAP5) homólogas a fosfatasas con actividad de fitasa de la clase PAP de *G. max, M. truncatula, A. thaliana y N. tabacum*. El genoma de *C. reinhardtii* también cuenta con una sexta secuencia (CrPAP6) perteneciente a la clase PAP. Por tanto, se concluyó que la familia de las PAP en *C. reinhardtii* está conformada por estos seis miembros. Los seis miembros de esta familia poseen la firma característica de las PAP (DXG, GDXXY, GNHE/D, VXXH, GHXH) que forma parte del dominio metalofosfoesterasa.

2. Las características bioquímicas predichas para las proteínas CrPAP1 a CrPAP5 fueron similares a las fitasas de plantas pertenecientes a esta misma clase, en tanto que CrPAP6 presentó mayor similitud con las PAP de bajo peso molecular típica de mamíferos.

3. La relación filogenética de CrPAP1 a CrPAP5 indicó que estas proteínas son evolutivamente diferentes de las PAP de plantas y animales, ya que fueron agrupadas de manera independiente de las PAP pertenecientes a estos organismos. Se agruparon en clados integrados exclusivamente por PAP de microalgas. CrPAP1, CrPAP2 y CrPAP3, fueron las proteínas de mayor relación con las fitasas de la clase PAP, en tanto que CrPAP6 fue la más alejada agrupándose con las PAP de mamíferos.

4. La actividad enzimática de CrPAP1 a CrPAP5 podría llevarse a cabo en el exterior de la célula, al igual que lo hacen algunas fitasas de origen fúngico y microbiano, ya que se predijo un péptido de secreción para estas secuencias.

5. *C. reinhardtii* fue capaz de ser cultivada usando IP_6 como única fuente de P, y se observó que este compuesto tiene un efecto positivo sobre la concentración celular, ya que permite el crecimiento celular en condiciones de privación de fósforo, así como el incremento en el número de células en un medio donde se encuentran presentes las sales de P del medio TAP. A su vez se observó que el perfil electroforético de proteínas sufría modificaciones, ya que algunas bandas disminuyeron su intensidad, en tanto que otras la aumentaron ante la presencia de IP_6.

6. El gen *CrPAP1* se expresó ante la presencia de IP_6, en tanto que el gen *CrPAP5*, lo hizo ante la privación de P, siendo este último potenciado por la presencia de IP_6, considerandolos genes de tipo inducible. Por otro lado, la expresión de los genes *CrPAP2*, *CrPAP4* y *CrPAP6* ocurrió en todos los tratamientos evaluados por lo que se puede decir que se expresan como genes constitutivos. De igual manera, *CrPAP3* también se considera un gen constitutivo aunque su expresión disminuyó ligeramente ante la presencia de IP_6.

7. El plásmido pChPhy que contiene el gen que codifica para la fitasa phyA de la clase PTP proveniente de la bacteria ruminal *Selenomonas ruminantium* es un vector novedoso, ya que además del gen de interés que presenta el uso del codón del cloroplasto, contiene entre su región de recombinación homóloga al gen de selección *aad*. Este plásmido permitirá la transformación simultanea de ambos genes sin la necesidad de recurrir a una estrategia de co-transformación con dos plásmidos.

5.3 PERSPECTIVAS

En este trabajo se identificaron seis secuencias de *C. reinhardtii* homólogas a fosfatasas de la clase PAP, cinco de ellas presentaron homología con las fitasas de esta misma clase. CrPAP1 se presenta como el candidato con mayor potencial de tener actividad de fitasa, ya que en el análisis de expresión de su gen se observó que es inducido por condiciones de presencia de IP_6. Por otro lado, el gen que codifica para CrPAP5, al ser inducido por la ausencia de P, es un candidato interesante para estudiar su función en este proceso. Por lo tanto, será interesante realizar el análisis funcional de las proteínas de los genes *CrPAP1* y *CrPAP5*. Para lo anterior, se podría llevar a cabo la clonación del ADNc de estos genes en un vector de expresión que permita la sobreexpresión y producción recombinante de las respectivas proteínas en *E. coli*, para su posterior purificación. Con la proteína aislada, se podrá realizar el ensayo enzimático en presencia de IP_6 para evaluar la actividad de fitasa, así como de otros sustratos orgánicos de fósforo para determinar la especificidad de las enzimas evaluadas.

Una vez identificada una enzima con actividad de 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. Basados en estos parámetros, se determinaría su posible uso como suplemento en las mezclas alimenticias de los animales monogástricos de granja, mediante la producción recombinante en *C. reinhardtii*. Al ser esta microalga un organismo inocuo, sería interesante evaluar la posibilidad de la dosificación directa de la biomasa seca que contiene a la fitasa. Ventaja adicional, sería que el producto generado sería considerado cisgénico, es decir, que los genes, promotores y regiones reguladoras forman parte del organismo por lo que se considera que no modifican el contenido génico del organismo transformado (Schouten *et al.*, 2006), facilitanado su aceptación en el mercado.

Por otro lado, sería interesante la caracterización de los promotores de los genes *CrPAP1* y *CrPAP5*, ya que a la fecha solo se conocen tres promotores inducibles en el genoma nuclear de *C. reinhardtii* : CYC6, NIT1 y CA1, (Ferrante *et al.*, 2008; Koblenz y Lechtreck, 2005; Villand *et al.*, 1997). Para realizar lo anterior, se podría partir de la caracterización *in silico* de la región 5' UTR de ambos genes mediante el programa BPROM, el cual dará una predicción de la longitud de la región 5' UTR, así como una aproximación del sitio de

inicio de la transcripción. Posteriormente, mediante un ensayo de RLM-RACE se podría determinar experimentalmente el sitio de inicio de la transcripción. Posteriormente, mediante ensayos de deleción, determinar la longitud mínima del promotor de cada gen. Además en el caso de *CrPAP1* mediante un ensayo de cambio de movilidad por electroforesis (EMSA), se podría determinar la funcionalidad del elemento de respuesta en *cis* P1BS.

Por otro lado, la relevancia de contar con el plásmido pChPhy consiste en que permitirá la transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii* para evaluar su capacidad de producir una fitasa de la clase PTP en este organelo. Si se obtiene buen rendimiento proteico esta enzima, podría ser utilizada para su comercialización, ya que el mercado de esta clase de enzimas se encuentra y seguirá en expansión con expectativas de ganancias de hasta 4.4 mil millones de dólares para el año 2015 (Report Code: BIO030F Published: January 2011). Aunado al beneficio que implica para el medio ambiente el uso de estas enzimas, ya que puede disminuir hasta en un 50% la excreción de fósforo por parte de los animales de granja (Yao et al., 2012). Además, este plásmido queda disponible en el laboratorio como una herramienta para la transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii* con algún otro gen de interés científico y biotecnológico.

5.4 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller y D. J. Lipman (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research. 25(17), 3389-3402.

BBC Research Market Forecasting (2008) Enzymes for insdustrial applications [Online] (Actualizado Enero 2008). Disponible en: http://www.bccresearch.com/report/enzymes-industrial-applications-bio030e.html [Acceso Octubre 2010].

BBC Research Market Forecasting (2011) Enzymes in Industrial Applications: Global Markets [Online] (Actualizado Enero 2011). Disponible en http://www.bccresearch.com/report/enzymes-industrial-applications-bio030f.html [Acceso Febrero 2011].

Boynton, J., N. Gillham, E. Harris, J. Hosler, A. Johnson, A. Jones, B. Randolph-Anderson, D. Robertson, T. Klein, K. Shark y J. Sanford (1988). Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. Science. 240(4858), 1534-1538.

Cheng, K.-J., B. L. Selinger, L. J.Yanke., H. D. Bae, L. Zhou y C. W. Forsberg, (1999). Phytases of ruminal microorganisms. US Patent Number: 5, 939, 303.

Dionisio, G., C. K. Madsen, P. B. Holm, K. G. Welinder, M. Jørgensen, E. Stoger, E. Arcalis y H. Brinch-Pedersen (2011). Cloning and characterization of purple acid phosphatase phytases from wheat, barley, maize, and rice. Plant Physiology. 156(3), 1087-1100.

Duff, S. M., W. C. Plaxton y D. D. Lefebvre (1991). Phosphate-starvation response in plant cells: *de novo* synthesis and degradation of acid phosphatases. Proceedings of the National Academy of Sciences. 88(21), 9538-9542.

Ferrante, P., C. Catalanotti, G. Bonente y G. Giuliano (2008). An optimized, chemically regulated gene expression system for *Chlamydomonas*. PLoS ONE. 3(9), e3200.

Gibson, D. M. y A. H. J. Ullah (1988). Purification and characterization of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds. Archives of Biochemistry and Biophysics. 260(2), 503-513.

Goldstein, A. H., D. A. Baertlein y R. G. McDaniel (1988). Phosphate starvation inducible metabolism in *Lycopersicon esculentum*: I. Excretion of acid phosphatase by tomato plants and suspension-cultured cells. Plant Physiology. 87(3), 711-715.

Greiner, R., E. Haller, U. Konietzny y K.-D. Jany (1997). Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 341(2), 201-206.

Hegeman, C. E. y E. A. Grabau (2001). A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings. Plant Physiology. 126(4), 1598-1608.

Higo, K., Y. Ugawa, M. Iwamoto y T. Korenaga (1999). Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. Nucleic Acids Research. 27(1), 297-300.

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.

Hübel, F. y E. Beck (1996). Maize root phytase (purification, characterization, and localization of enzyme activity and its putative substrate). Plant Physiology. 112(4), 1429-1436.

Hunger Statistics (2013) World food program [Online]. (Actualizado Enero 2013). Disponible en: http://www.wfp.org/hunger/stats [Acceso Julio 2013].

Hurley, B. A., H. T. Tran, N. J. Marty, J. Park, W. A. Snedden, R. T. Mullen y W. C. Plaxton (2010). The dual-targeted purple acid phosphatase isozyme AtPAP26 Is essential for efficient acclimation of *Arabidopsis* to nutritional phosphate deprivation. Plant Physiology. 153(3), 1112-1122.

Klabunde, T. y B. Krebse (1997). The dimetal center in purple acid phosphatases. Metal Sites in Proteins and Models. H. A. O. Hill, P. J. Sadler and A. J. Thomson, Springer Berlin Heidelberg. 89: 177-198.

Koblenz, B. y K.-F. Lechtreck (2005). The *NIT1* promoter allows inducible and reversible silencing of centrin in *Chlamydomonas reinhardtii*. Eukaryotic Cell. 4(11), 1959-1962.

Konietzny, U. y R. Greiner (2002). Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). International Journal of Food Science & Technology. 37(7), 791-812.

Lan, P., W. Li y W. Schmidt (2012). Complementary proteome and transcriptome profiling in phosphate-deficient *Arabidopsis* roots reveals multiple levels of gene regulation. Molecular & Cellular Proteomics. 11(11), 1156-1166.

Letunic, I., T. Doerks y P. Bork (2012). SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. Nucleic Acids Research. 40(D1), D302-D305.

Li, C., S. Gui, T. Yang, T. Walk, X. Wang y H. Liao (2012). Identification of soybean purple acid phosphatase genes and their expression responses to phosphorus availability and symbiosis. Annals of Botany. 109(1), 275-285.

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.

Li, M., M. Osaki, M. Honma y T. Tadano (1997). Purification and characterization of phytase induced in tomato roots under phosphorus-deficient conditions. Soil Science and Plant Nutrition. 43(1), 179-190.

Manin, M., P. Lecher, A. Martinez, S. Tournadre y C. Jean (1995). Exportation of mouse vas deferens protein, a protein without a signal peptide, from mouse vas deferens epithelium: a model of apocrine secretion. Biology of Reproduction. 52(1), 50-62.

Mayfield, S. P., A. L. Manuell, S. Chen, J. Wu, M. Tran, D. Siefker, M. Muto y J. Marin-Navarro (2007). *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. Current Opinion in Biotechnology. 18(2), 126-133.

Merchant, S. S., S. E. Prochnik, O. Vallon, E. H. Harris, S. J. Karpowicz, G. B. Witman, A. Terry, A. Salamov, L. K. Fritz-Laylin, L. Maréchal-Drouard, W. F. Marshall, L.-H. Qu, D. R. Nelson, A. A. Sanderfoot, M. H. Spalding, V. V. Kapitonov, Q. Ren, P. Ferris, E. Lindquist, H. Shapiro, S. M. Lucas, J. Grimwood, J. Schmutz, P. Cardol, H. Cerutti, G. Chanfreau, C.-L. Chen, V. Cognat, M. T. Croft, R. Dent, S. Dutcher, E. Fernández, H. Fukuzawa, D. González-Ballester, D. González-Halphen, A. Hallmann, M. Hanikenne, M. Hippler, W. Inwood, K. Jabbari, M. Kalanon, R. Kuras, P. A. Lefebvre, S. D. Lemaire, A. V. Lobanov, M. Lohr, A. Manuell, I. Meier, L. Mets, M. Mittag, T. Mittelmeier, J. V. Moroney, J. Moseley, C. Napoli, A. M. Nedelcu, K. Niyogi, S. V. Novoselov, I. T. Paulsen, G. Pazour, S. Purton, J.-P. Ral, D. M. Riaño-Pachón, W. Riekhof, L. Rymarquis, M. Schroda, D. Stern, J. Umen, R. Willows, N. Wilson, S. L. Zimmer, J. Allmer, J. Balk, K. Bisova, C.-J. Chen, M.

Elias, K. Gendler, C. Hauser, M. R. Lamb, H. Ledford, J. C. Long, J. Minagawa, M. D. Page, J. Pan, W. Pootakham, S. Roje, A. Rose, E. Stahlberg, A. M. Terauchi, P. Yang, S. Ball, C. Bowler, C. L. Dieckmann, V. N. Gladyshev, P. Green, R. Jorgensen, S. Mayfield, B. Mueller-Roeber, S. Rajamani, R. T. Sayre, P. Brokstein, I. Dubchak, D. Goodstein, L. Hornick, Y. W. Huang, J. Jhaveri, Y. Luo, D. Martínez, W. C. A. Ngau, B. Otillar, A. Poliakov, A. Porter, L. Szajkowski, G. Werner, K. Zhou, I. V. Grigoriev, D. S. Rokhsar y A. R. Grossman (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. Science. 318(5848), 245-250.

Muesch, A., E. Hartmann, K. Rohde, A. Rubartelli, R. Sitia y T. A. Rapoport (1990). A novel pathway for secretory proteins? Trends in Biochemical Sciences. 15(3), 86-88.

Newman, S. M., J. E. Boynton, N. W. Gillham, B. L. Randolph-Anderson, A. M. Johnson y E. H. Harris (1990). Transformation of chloroplast ribosomal RNA genes in *Chlamydomonas*: molecular and genetic characterization of integration events. Genetics. 126(4), 875-888.

Powar, V. K. y V. Jagannathan (1982). Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology. 151(3), 1102-1108.

Quan, C., L. Zhang, Y. Wang y Y. Ohta (2001). Production of phytase in a low phosphate medium by a novel yeast *Candida krusei*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 92(2), 154-160.

Quisel, J. D., D. D. Wykoff y A. R. Grossman (1996). Biochemical characterization of the extracellular phosphatases produced by phosphorus-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiology. 111(3), 839-848.

Raghothama, K. G. (1999). Phosphate acquisition. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 50(1), 665-693.

Rao, D. E. C. S., K. V. Rao, T. P. Reddy y V. D. Reddy (2009). Molecular characterization, physicochemical properties, known and potential applications of phytases: An overview. Critical Reviews in Biotechnology. 29(2), 182-198.

Rouached, H., A. B. Arpat y Y. Poirier (2010). regulation of phosphate starvation responses in plants: signaling players and cross-talks. Molecular Plant. 3(2), 288-299.

Schenk, G., L. R. Gahan, L. E. Carrington, N. Mitić, M. Valizadeh, S. E. Hamilton, J. de Jersey y L. W. Guddat (2005). Phosphate forms an unusual tripodal complex with the Fe–Mn center of sweet potato purple acid phosphatase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 102(2), 273-278.

Schenk, G., L. W. Guddat, Y. Ge, L. E. Carrington, D. A. Hume, S. Hamilton y J. de Jersey (2000). Identification of mammalian-like purple acid phosphatases in a wide range of plants. Gene. 250(1–2), 117-125.

Schouten, H. J., F. A. Krens. y E. Jacobsen (2006). Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants. EMBO Rep. 7(8), 750-753.

Schwarzbauer, J. E. y D. W. DeSimone (2011). Fibronectins, their fibrillogenesis, and *in vivo* functions. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 3(7).

Sobkowiak, L., D. Bielewicz, E. Malecka, I. Jakobsen, M. Albrechtsen, Z. Szweykowska-Kulinska y A. M. Pacak (2012). The role of the P1BS element containing promoter-driven genes in Pi transport and homeostasis in plants. Frontiers in Plant Science. 3.

Tian, J., C. Wang, Q. Zhang, X. He, J. Whelan y H. Shou (2012). Overexpression of OsPAP10a, a root-associated acid phosphatase, increased extracellular organic phosphorus utilization in rice. Journal of Integrative Plant Biology. 54(9), 631-639.

Tsyguelnaia, I. y R. F. Doolittle (1998). Presence of a Fibronectin Type III domain in a plant protein. Journal of Molecular Evolution. 46(5), 612-614.

Villand, P., M. Eriksson y G. Samuelsson (1997). Carbon dioxide and light regulation of promoters controlling the expression of mitochondrial carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochemical Journal. 327(1), 51-57.

Widjaja, A., C.-C. Chien y Y.-H. Ju (2009). Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. 40(1), 13-20.

Wöhlbrand, L., K. Trautwein and R. Rabus (2013). Proteomic tools for environmental microbiology—A roadmap from sample preparation to protein identification and quantification. PROTEOMICS. 13(18-19), 2700-2730.

World food program (2013) Hunger, Who are the hungry? [Online] (Actualizado Enero 2013). Disponible en: http://www.wfp.org/hunger/who-are [Acceso Julio 2013].

Wyss, M., L. Pasamontes, A. Friedlein, R. Rémy, M. Tessier, A. Kronenberger, A. Middendorf, M. Lehmann, L. Schnoebelen, U. Röthlisberger, E. Kusznir, G. Wahl, F. Müller, H.-W. Lahm, K. Vogel y A. P. G. M. van Loon (1999). Biophysical characterization of fungal phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. Applied and Environmental Microbiology. 65(2), 359-366.

Yao, M. Z., Y. H. Zhang, W. L. Lu, M. Q. Hu, W. Wang y A. H. Liang (2012). Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications. Journal of Applied Microbiology. 112(1), 1-14.

Yeung, S.-L., C. Cheng, T. K. O. Lui, J. S. H. Tsang, W.-T. Chan y B. L. Lim (2009). Purple acid phosphatase-like sequences in prokaryotic genomes and the characterization of an atypical purple alkaline phosphatase from *Burkholderia cenocepacia* J2315. Gene. 440(1–2), 1-8.

Yoon, H. S., J. D. Hackett, C. Ciniglia, G. Pinto y D. Bhattacharya (2004). A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. Molecular Biology and Evolution. 21(5), 809-818.

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.

Zhang, Q., C. Wang, J. Tian, K. Li y H. Shou (2011). Identification of rice purple acid phosphatases related to posphate starvation signalling. Plant Biology. 13(1), 7-15.

ANEXO 1

Ann Microbiol
DOI 10.1007/s13213-013-0688-8

ORIGINAL ARTICLE

Chlamydomonas reinhardtii has a small family of purple acid phosphatase homologue genes that are differentially expressed in response to phytate

Rodrigo Arturo Rivera-Solís · Santy Peraza-Echeverría · Ileana Echevarría-Machado · Virginia Aurora Herrera-Valencia

Received: 23 January 2013 / Accepted: 29 June 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg and the University of Milan 2013

Abstract Purple acid phosphatases (PAPs) are metallophosphoesterase enzymes involved in the acquisition and recycling of phosphorus. PAP phytases from microorganisms and plants are responsible for the dephosphorylation of phytate. Phytate is the main storage form of phosphorus in plant seeds and constitutes the major form of organic phosphorus present in soil. Although some phosphatases have been studied in *Chlamydomonas reinhardtii*, no gene coding for PAPs have so far been characterized. In this study, six PAP homologue genes were identified and characterized in silico in *C. reinhardtii* (*CrPAP1* to *CrPAP6*). A metallophosphoesterase domain including the seven conserved residues characteristic of PAP enzymes was found in all six CrPAPs. The phylogenetic tree comprising PAP homologue sequences from microalgae, plants, and animals showed nine major clades and CrPAPs resolved in four of them. A constitutive expression was found for *CrPAP2*, *CrPAP3*, *CrPAP4*, and *CrPAP6* in all media tested, while *CrPAP1* and *CrPAP5* were induced by the addition of phytate in a medium without phosphate salts. Our results provide a starting point for further functional analysis of the *CrPAP* gene family, and the evaluation of their potential as phytases in *C. reinhardtii*.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s13213-013-0688-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

R. A. Rivera-Solís · S. Peraza-Echeverría · V. A. Herrera-Valencia (✉)
Unidad de Biotecnología,
Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY),
Mérida, Yucatán, Mexico
e-mail: vicky@cicy.mx

I. Echevarría-Machado
Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas,
Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY),
Mérida, Yucatán, Mexico

Published online: 26 July 2013

Keywords Microalgae · Chlamydomonas · PAP · Genes · Phytate

Introduction

Phosphorus (P) is an essential nutrient for metabolic processes and a structural component of vital biomolecules in both terrestrial and aquatic organisms. However, most P is found in organic compounds and can only be assimilated by these organisms after being hydrolyzed into inorganic phosphate (orthophosphate, Pi) by phosphatases (Tarafdar and Jungk 1987; Yadav and Tarafdar 2001). Phytate (*myo*-inositol hexakisphosphate; IP_6) is the main storage form of P in cereal grains and legume seeds and represents between 60 and 90 % of total P contained in plants (Rao et al. 2009), and in most soils it is the major component of organic P (Turner et al. 2002). Phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase; EC 3.1.3.8, EC 3.1.3.72, and EC 3.1.3.26) are hydrolytic enzymes that catalyze the breakdown of phosphomonoesters bonds in phytate to release Pi (Mullaney and Ullah 2003), and have been found in microorganisms, plants, and animals (Konietzny and Greiner 2002). Phytases from microbes are currently being used as feed supplements for monogastric animals (e.g., swine and poultry), since they have little or no phytase activity to digest the phytate contained in dry grains used as feed. This practice not only makes more phosphorus available to these animals but also decreases the phytate excreted to the environment (Dionisio et al. 2011; Cheng et al. 1999). Some phytases are capable of using other substrates to release Pi, including glucose-6-phosphate, ATP, and phenylphosphate (Rao et al. 2009). According to their molecular structure, phytases can be classified in four classes: (1) histidine acid phosphatases (HAP), (2) β propeller phytases (BPP), (3) protein tyrosine phosphatase (PTP)-like phytases, and (4) purple acid phosphatases (PAP) (Mullaney and Ullah 2003; Puhl

et al. 2007). BPPs are considered as alkaline phytases while HAPs, PTPs, and PAPs are considered as acid phytases (Yao et al. 2011). Only phytases from the HAP and PAP groups have been reported in plants (Dionisio et al. 2011). PAP phytase genes isolated from plants include *Glycine max* (Hegeman and Grabau 2001), *Arabidopsis thaliana* (Kuang et al. 2009), *Nicotiana tabacum* (Lung et al. 2008), and *Medicago truncatula* (Xiao et al. 2005). PAP enzymes have been found in various fungi, plants, and animals (Schenk et al. 2000), and PAP-like sequences have also been identified in prokaryotic genomes (Yeung et al. 2009). PAPs are glycoproteins containing a binuclear Fe(III)-Fe(II), Fe(III)-Zn(II), or Fe(III)-Mn(II) metal center (Klabunde et al. 1995; Schenk et al. 1999), and are characterized by their intense pink or violet color, as well as by their low pH optima for enzymatic activity and their insensitivity to inhibition by tartrate (Vincent et al. 1990). PAPs contain seven metal-ligating amino acid residues found into five conserved blocks (DXG, GDXXY, GNHE/D, VXXH, GHXH) which comprise the characteristic signature of PAPs (Schenk et al. 2000).

Chlamydomonas reinhardtii is a unicellular green alga which is used as a model organism for both genetic and physiological studies (Harris 2001), including the study of P metabolism (Shimogawara et al. 1999). It has been suggested that the chloroplast polyploid genome might be used as a repository of P in *C. reinhardtii*, and that the chloroplast could contribute to P mobilization during P limitation (Yehudai-Resheff et al. 2007). Recently, a HAP phytase from *E. coli* was produced in the chloroplast of *C. reinhardtii* (Yoon et al. 2011); however, to our knowledge, no phytase genes have been characterized in this microalga. The existence of some phosphatases has been previously reported in *C. reinhardtii*, including the presence of extracellular phosphate starvation-inducible phosphatases (Matagne et al. 1976; Patni et al. 1977; Quisel et al. 1996). However, none of these phosphatases have been characterized with respect to polypeptide composition. The aim of this study was to identify, in silico, novel PAP homologues in *C. reinhardtii* and to evaluate their expression profiles in the presence of IP_6 in the medium as a sole source of phosphate. Our results provide a foundation to better understand the structure, evolution, and expression of these genes in *C. reinhardtii* and to pave the way for their functional analysis and identification of novel phytases in this microalga.

Materials and methods

Microalgal strain, culture conditions and growth evaluation

Chlamydomonas reinhardtii CC-125 (mt+) was obtained from the Chlamydomonas Center (www.chlamy.org). Axenic cultures were maintained on Tris-Acetate-Phosphate (TAP) (Harris 1989) at 25 °C ± 2 under a 16:8 h (light/dark) cycle at a light intensity of 90 μmol m^{-2} s^{-1} on a rotary shaker (140 rpm). To evaluate the ability of *C. reinhardtii* to use IP_6 (phytic acid sodium salt hydrate; Sigma) as the source of P, microalgal growth was evaluated in four different media: (1) TAP, (2) TAP+IP_6 (TAP plus 171 μM of IP_6), (3) TA+IP_6 (no phosphate salts, plus 171 μM IP_6), and (4) TA (no phosphate salts). Exponentially growing cells were inoculated into 50 ml sterile Falcon tubes containing 10 ml of the corresponding liquid medium to an initial cell concentration of 10,000 cell ml^{-1}, and were allowed to grow for 7 days. At the end of the experiments, cellular concentration was determined using a Neubauer hemacytometer. One-way ANOVA, Fisher's LSD test, was used to determine significant differences among treatments (Statgraphics Plus 4.1). Cells were washed three times with TA medium before being harvested by centrifugation, then frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C for further analysis. All the experiments were carried out in triplicate, and each experiment was carried out twice. All reagents and solvents were analytical grade.

Protein extraction and electrophoresis

Cells from 10 ml cultures (TAP, TAP+IP_6, and TA+IP_6 media) were collected by centrifugation and frozen in liquid nitrogen, then samples (~50 mg fresh weight) were used for protein extraction (Echevarría-Machado et al. 2007). Samples were homogenized for 2 min in 125 μl of protein extraction buffer (Tris-HCl 100 mM, sucrose 250 mM, EDTA 2 mM, $CaCl_2$ 20 mM, glycerol 10 % *w/v*) freshly supplemented with β-mercaptoethanol (1 mM), aprotinin (1 μg ml^{-1}), leupeptin (1 μg ml^{-1}), and phenylmethylsulfonyl fluoride (1 mM). Homogenate was centrifuged at 12,000*g* for 30 min and the supernatant collected and stored at −20 °C for further analysis. The culture medium for each sample was also collected, lyophilized, and the protein extracted by adding 100 μl of protein extraction buffer. Protein concentration was determined by Bradford assay (Bradford 1976). Proteins (30 μg) were separated in 10 % SDS-PAGE and visualized by silver staining.

In silico cloning and annotation

PAP phytase sequences from *G. max* (GenBank accession number AAK49438.1), *A. thaliana* (GenBank accession number AAN74650.1), *N. tabacum* (GenBank accession number ABP96799.1), and *M. truncatula* (GenBank accession number AAX71115.1) were used as queries in BLASTP (Altschul et al. 1997) searches to retrieve PAP homologue sequences from the *C. reinhardtii* genome sequence v.4.3 at Phytozome v8.0 (http://www.phytozome.net/search.php). The PAP homologue sequences retrieved from *C. reinhardtii* were then used as queries to search the *C. reinhardtii* genome sequence v.4.3 at Phytozome v.8.0. In addition, other PAP protein sequences with unknown phytase activity from *G. max* (GenBank

accession numbers: AAF19820.1, AAN85416.1, and AAF60316.1) were also used to search for PAP homologue sequences in the *C. reinhardtii* genome. Percent aminoacid identity between predicted proteins was performed with MegAlign software from the Lasergene package v.7.2 (DNASTAR, Madison, WI, USA). The conserved domains were predicted with the SMART database (http://smart.embl-heidelberg.de/) (Letunic et al. 2012), and the NCBI Conserved Domain Database (CDD) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd). Signal peptides were predicted with signalP 3.0 server (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) and the cellular location was predicted with TargetP (http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/).

Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis

Predicted proteins were aligned with the ClustalX software v.2.0 with the default settings (Larkin et al. 2007). Identical amino acid residues in the alignment were shaded with black and conservative substitutions with gray using the Boxshade program (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). In order to identify the characteristic signature of PAP metallophosphoesterase present in CrPAPs, we included the protein sequences of PAP phytases from *G. max* (Gmphy) (GenBank accession number AAK49438.1), *A. thaliana* (Atphy) (GenBank accession number AAN74650.1), *N. tabacum* (Ntphy) (GenBank accession number ABP96799.1), and *M. truncatula* (Mtphy) (GenBank accession number AAX71115.1). The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining (NJ) method (Saitou and Nei 1987) with the Poisson correction (Zuckerkandl and Pauling 1965) using the NJ algorithm implemented in the Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) software v.5 (Tamura et al. 2011). Bootstrapping (1,000 replicates) was used to evaluate the degree of support for particular grouping patterns in the phylogenetic tree. For the phylogenetic analysis, we included PAP phytases and PAP-like sequences of higher plants previously used by Dionisio et al. (2011). Additionally, GmPhy was used as query to perform a BLASTP to obtain PAP phytase-like sequences from the genomes of the microalgal species: *Ostreococcus tauri*, *Ostreococcus lucimarinus*, *Ostreococcus* sp. RCC809, *Micromonas pusilla* CCMP 1545, *Micromonas* sp. RCC299, *Coccomyxa* sp. C-169, *Chlorella variabilis* NC64A and *Volvox carteri* f. *nagariensis*, available at the Genome Portal of the Joint Genome Institute (JGI, http://genome.jgi.doe.gov/). Furthermore, PAP protein sequences from *Sus scrofa* (GenBank accession number P09889), *Homo sapiens* (GenBank accession number P13686), *Mus musculus* (GenBank accession number Q05117), and *Rattus norvegicus* (GenBank accession number P29288) were included. Only the region between the first conserved motif (DXG) of PAPs (Schenk et al. 2000) and the conserved block containing the eighth Cys residue reported by Kuang et al. (2009) for Atphy was considered for the phylogenetic tree construction.

Transcript expression analysis by RT-PCR

Total RNA was extracted from *C. reinhardtii* cultures grown for a period of 7 days in TAP, TAP+IP_6, and TA+IP_6 media using the commercial kit RNA spin mini (GE Healthcare) following the manufacturer's instructions. Synthesis of cDNA was performed using 5 µg of total RNA and 200 U of Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. PCR mixtures (50 µl) consisted of 200 µM each dNTP, 0.2 µM of each forward and reverse primer (Online Resource 1), 5 µl of diluted cDNA (1:5), 1× PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, and 1 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen). PCR mixtures also contained 1× CES (Raiser et al. 2006) for analysis of *CrPAP4* and *CrPAP6*. Cycling conditions were 95 °C for 3 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min, followed by a final incubation at 72 °C for 5 min, in a C1000 Thermal cycler (BioRad). In RT-PCR experiments, specific primers for the *C. reinhardtii Actin* gene, and spanning an intron (220 bp), were included as a control to detect any genomic DNA contamination.

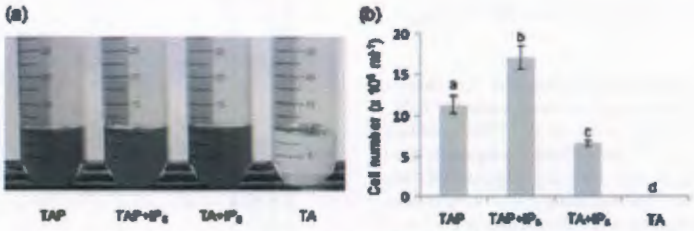

Fig. 1 *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated for 7 days in TAP, TAP+IP_6, TA+IP_6, and TA liquid media (a). Cell concentration of *C. reinhardtii* cultures after 7 days in TAP, TAP+IP_6, TA+IP_6, and TA liquid media (b). Each value is the mean of three samples ± SD. Different *lower case letters* indicate significant difference between means (one-way ANOVA, Fisher's LSD test, $P<0.05$)

Table 1 PAP homologues from *Chlamydomonas reinhardtii*. Prediction of the size of open reading frame (*ORF*), as well as length, molecular weight and isoelectric point of the corresponding proteins

Sequence	ORF (pb)	Protein (aa)	Molecular weight (kDa)	Isoelectric point (Ip)
CrPAP1	1,674	557	60.84	8.50
CrPAP2	1,899	632	69.73	6.32
CrPAP3	1,890	629	69.22	6.54
CrPAP4	2,076	691	75.29	5.85
CrPAP5	1,914	637	70.22	4.46
CrPAP6	1,308	435	47.92	6.07
Gmphy	1,644	547	62.25	5.21

Gmphy Glycine max phytase

Results

Chlamydomonas reinhardtii growth and protein electrophoretic profiles using IP_6 as a sole source of P

Chlamydomonas reinhardtii was able to grow in TA supplemented with phytate as a sole source of P (Fig. 1a), reaching a cell concentration of $11.37 \pm 1.05 \times 10^6$ cell ml^{-1} in TAP, while $17.09 \pm 1.5 \times 10^6$ cell ml^{-1} was reached in TAP+IP_6, and $6.6 \pm 0.29 \times 10^6$ cell ml^{-1} was reached in TA+IP_6 (Fig. 1b). As expected, the TA treatment did not show any growth. In addition, we found differences in protein profiles between *C. reinhardtii* cultures grown on TAP, TAP+IP_6, and TA+IP_6 media in both intracellular and extracellular electrophoretic profiles (IEP and EEP, respectively) (Online Resource 2). A band of ~44 kDa was found exclusively in the IEP from cultures growing in the presence of phytate, while a band of ~214 kDa was found only in TA+IP_6 in the EEP. Other bands of ~47 and ~93 kDa were also observed in the EEP of TAP+IP_6 and TA+IP_6 media; however, the band of ~93 kDa decreased in intensity in TA+IP_6 medium. The intensity of bands of ~70 and ~109 kDa also decreased in this medium (Online Resource 2).

The genome of *C. reinhardtii* contains six PAP homologue genes

A similarity search using the protein sequence from Gmphy retrieved five PAP homologue sequences, named CrPAP1, CrPAP2, CrPAP3, CrPAP4, and CrPAP5. CrPAP1 showed the lowest E value ($1.3e^{-77}$) and CrPAP5 the highest E value ($9.6e^{-17}$) (Online Resource 3). Only one additional PAP homologue sequence was retrieved using a PAP from *G. max* (GenBank accession number AAF60316.1) with an E value of $2.4e^{-34}$, named CrPAP6 (Online Resource 3). BLASTP searches using the six CrPAPs and other plant PAP sequences retrieved no more hits. All CrPAPs were further analyzed to

Table 2 Percentage identity of CrPAP sequences compared with PAP phytases from plants

	CrPAP1	CrPAP2	CrPAP3	CrPAP4	CrPAP5	CrPAP6	Atphy	Ntphy	Mtphy	Gmphy
CrPAP1		43.2	44.1	26.7	30.5	32.5	55.1	54.3	54.7	52.4
CrPAP2			90.2	22.8	25.9	27.1	47.2	48.8	48.1	45.1
CrPAP3				22.5	25.9	26.9	46.9	48.9	47.9	45.0
CrPAP4					15.4	19.5	29.1	28.1	29.2	26.8
CrPAP5						34.8	31.8	30.5	31.0	30.3
CrPAP6							36.3	35.8	35.5	35.1
Atphy								81.7	82.2	77.2
Ntphy									84.4	75.3
Mtphy										76.0
Gmphy										

Atphy Arabidopsis thaliana phytase, *Ntphy Nicotiana tabacum* phytase, *Mtphy Medicago truncatula* phytase, *Gmphy Glycine max* phytase

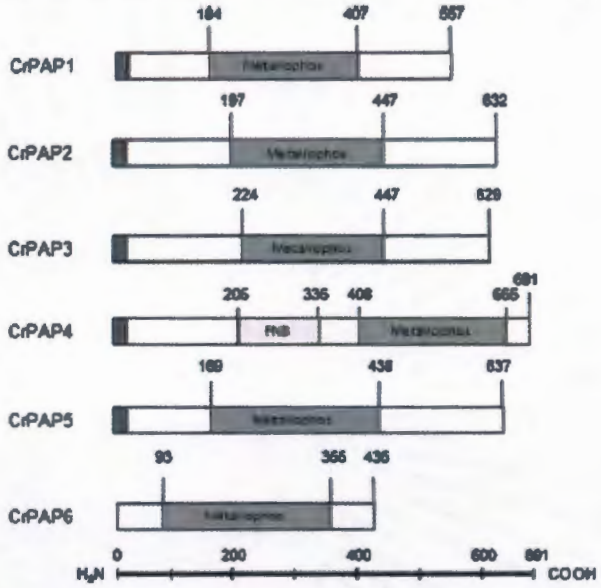

Fig. 2 The six CrPAPs from *C. reinhardtii*. The predicted metallophosphoesterase domains (*Metallophos*) are indicated. Predicted signal peptides are indicated in *dark gray*, and a Fibronectin type 3 domain (*FN3*) is indicated for CrPAP4. The amino acid numbers are also indicated

predict their respective molecular weight and isoelectric point (Table 1). The predicted molecular weight of the six CrPAPs varied from 47.92 kDa (CrPAP6) to 75.29 kDa (CrPAP4), while the isoelectric point was higher for most CrPAPs in comparison to Gmphy, except for CrPAP5 with a lower isoelectric point. Percent amino acid identity between the predicted amino acid sequences of *C. reinhardtii* homologues and the four plant PAP phytases, Atphy, Ntphy, Mtphy, and Gmphy, ranged from 26.8 % (CrPAP4 vs. Gmphy) to 55.1 % (CrPAP1 vs. Atphy), whereas amino acid identity among the *C. reinhardtii* PAP homologues ranged from 15.4 % (CrPAP4 vs. CrPAP5) to 90.2 % (CrPAP2 vs. CrPAP3) (Table 2). All six CrPAP predicted proteins showed a metallophosphoesterase domain similar to that found in plant PAPs (Hegeman and Grabau 2001; Schenk et al. 2000) (Fig. 2) with a length ranging from 224 aa in CrPAP1 to 270 aa in CrPAP5. A Fibronectin type 3 domain was predicted for CrPAP4 (Fig. 2). Also, a signal peptide for the secretory pathway was found in CrPAP1–5, but not in CrPAP6 (Fig. 2). Furthermore, CrPAP1–6 contained the conserved seven metal-ligating aminoacid residues in the five consensus motifs present in PAP metallophosphoesterase proteins (Hegeman and Grabau 2001; Schenk et al. 2000) (Table 3; Online Resource 4). In addition, CrPAP1, CrPAP2, and CrPAP3 contained a conserved Cys residue (Online Resource 4), which has been reported to be involved in the formation of a disulfide bridge to form a homodimer in *A. thaliana* PAPs (Li et al. 2002).

Table 3 PAP consensus motifs found in the sequences of *C. reinhardtii*

Code	Consensus				
	I DXG	II GDXXY	III GNHE/D	IV VXXH	V GHXH
CrPAP1	DVS	GDFAY	GNHE	AMWH	GHVH
CrPAP2	DVG	GDNSY	ANHE	VQFH	GHVH
CrPAP3	DIG	GDNTY	ANHE	VQFH	GHVH
CrPAP4	DMG	GDISY	GNHE	VGGH	GHHH
CrPAP5	DMG	GDLAY	GNHE	VGIH	GHVH
CrPAP6	DWG	GDNFY	GNHD	VGHH	GHEH

The residue that should remain preserved to confer metallophosphoesterase activity is shown in bold. Consensus motifs as described by Schenk et al. (2000)

Phylogenetic relationships of CrPAPs

The phylogenetic analysis revealed a tree with nine major clades (Fig. 3). Clade I grouped PAP homologue sequences from plants either with endoplasmic reticulum or mitochondrial signal peptides. Clades II, IV, V, VI, and VIII comprised only PAP homologue sequences from microalgae. PAP phytases and PAP phytase-like sequences from plants grouped in clade III, along with two sequences from the microalga *Coccomyxa subellipsoidea* C-169. Clade VII was comprised mostly of PAP

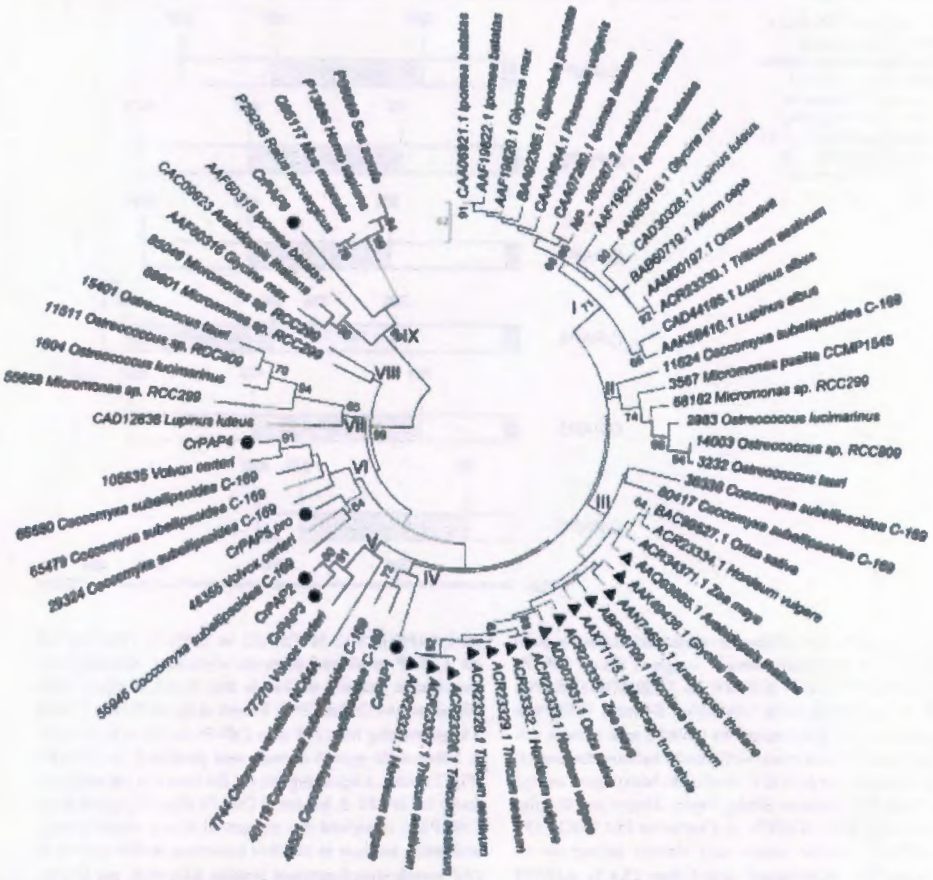

Fig. 3 Neighbor-joining phylogenetic tree based on the ClustalW alignment of PAP homologues from *C. reinhardtii* (*black circles*), PAP phytase genes from plants (*black triangles*) and other PAP homologues from eukaryotic organisms. *Numbers on the branches* indicate the percentage of 1,000 bootstrap replications supporting the particular nodes and only those with more than 60 % are shown. *Roman numbers* indicate the nine major clades of this phylogenetic tree

homologue sequences from microalgae, except for a sequence from the plant *Lupinus luteus*. CrPAP1 was grouped in clade IV, and CrPAP2 and CrPAP3 in clade V, whereas CrPAP4 and CrPAP5 were grouped in clade VI. CrPAP6 was grouped in clade IX along with mammalian PAPs.

Expression analysis of *CrPAP* genes

The expression of all six *CrPAP* genes was evaluated by RT-PCR (Fig. 4). The expression of *CrPAP2*, *CrPAP3*, *CrPAP4*, and *CrPAP6* was detected in all treatments, where the expected amplicons were present. *CrPAP3* showed a very low expression in all the treatments, particularly in TA+IP_6, where an amplicon of ~400 bp was visible, rather than the ~200 bp amplicon expected from the predicted sequence. This result could be explained by an incorrect prediction of an exon, since it is known that, for a typical *Arabidopsis* gene with five exons, at least one exon is expected to have at least one of its borders predicted incorrectly by the ab initio gene prediction program (Rhee et al. 2006). The expression of *CrPAP1* could not be detected in TAP, a very low expression was detected in TAP+IP_6, while a higher expression was visualized in TA+IP_6, where

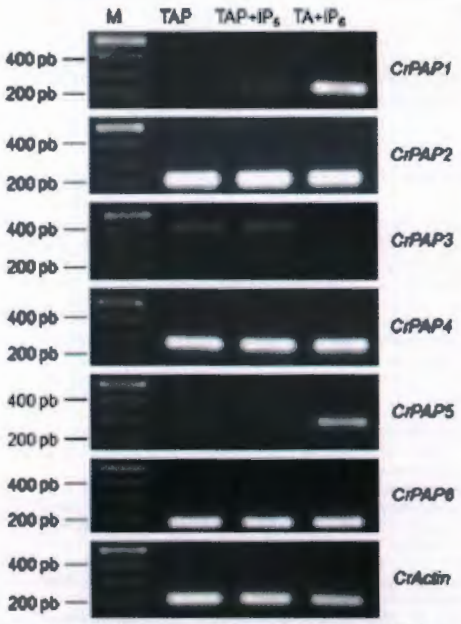

Fig. 4 Expression analysis of *CrPAP* genes by RT-PCR in *C. reinhardtii* after 7 days of culture in TAP, TAP+IP_6, and TA+IP_6. As a positive control, an expected band of ~200 bp was amplified from the *C. reinhardtii Actin* gene cDNA. Molecular weight marker (*M*) is 2-log DNA ladder (New England Biolabs)

the expected amplicon of ~200 bp was present. The expression of *CrPAP5* was detected in TA+IP_6, where an amplicon of ~300 bp from the cDNA was present, while no visible amplicon was detected either in TAP or TAP+IP_6.

Discussion

Quisel et al. (1996) mentioned unpublished results about *C. reinhardtii* being able to grow in a medium with phytate as the only source of phosphate. In this study, we further support this observation by showing that in fact this microalga was able to grow on phytate as the only source of P in the medium, and that this condition induced changes in the electrophoretic protein profile of *C. reinhardtii*. The higher *C. reinhardtii* cell numbers found in TAP+IP_6 could account for the increased amount of P available in the medium, assuming that phytate was dephosphorylated by a phytase from the microalga. In constrast, lower cell numbers in TA+IP_6 may be due to incomplete dephosphorylation of phytate by a microalgal phytase and therefore less P available in the medium. Since phytate is a chelator agent of mineral cations of nutritional significance, such as K and Mg, including metals such as Ca, Zn, Fe, and Cu (Lopez et al. 2002), this phenomenon could explain the pale green color found in the cultures grown in the presence of phytate, which is similar to *C. reinhardtii* cultures deficient in Zn and Fe (Kropat et al. 2011). Interestingly, we also found a variation in intracellular and extracellular electrophoretic protein profiles according to the media tested, as indicated by the presence or absence of some bands, while others decreased in intensity after the addition of phytate. These responses could be part of the metabolic adaptations known as phosphate starvation response (PSR), where a differential protein accumulation occurs under Pi starvation, indicating an extensive change in gene expression and/or protein turnover (Duff et al. 1991; Lan et al. 2012; Raghothama 1999). Further biochemical analysis, using two-dimensional electrophoresis, will facilitate the identification of novel phytases in *C. reinhardtii* grown on TAP, TAP+IP_6, and TA+IP_6 treatments.

Plant genomes contain numerous genes encoding PAPs: *A. thaliana* 29 PAP genes (Li et al. 2002), *Oriza sativa* 26 PAP genes (Zhang et al. 2011), and *G. max* 35 PAP genes (Li et al. 2012). In contrast, PAP-like sequences in prokaryotes appear to be less numerous; for example, one to three PAP-like sequences have been identified in various species of cyanobacteria (Yeung et al. 2009). In *C. reinhardtii*, we found six PAP homologue genes, indicating that the *C. reinhardtii* PAP gene family has not undergone an extensive gene duplication process. The predicted molecular mass for CrPAP1–5 was similar to those from plant PAP phytases (Konietzny and Greiner 2002), while CrPAP6 resembled the low molecular weight of plant and mammalian PAPs (Klabunde and Kreba 1997; Li et al. 2012). The predicted isoelectric point (pI) for most CrPAPs had acidic values from 4.46 to 6.32, similar to phytases from bacterial, fungal, and plant sources (Konietzny and Greiner 2002), as well as to plant phytases from soybean (Gibson and Ullah 1988), maize root (Hübel and Beck 1996), and tomato root (Li et al. 1997). In contrast, the pI value of 8.5 predicted for CrPAP1 was similar to the 8.56 of a HAP phytase enzyme from *Aspergillus fumigatus*, which is considered a well-suited enzyme for straightforward purification on an industrial scale (Wyss et al. 1999). As the in silico analysis revealed, all six CrPAP proteins contained features characteristic of PAP enzymes: a metallophosphoesterase domain similar to the one containing the metal center and acting as the catalytic domain in known PAP enzymes, as well as the seven metal-binding residues in the five consensus motifs reported for plants in PAP metallophosphoesterase proteins (Hegeman and Grabau 2001; Schenk et al. 2000). Additionally, a Fibronectin type 3 domain was predicted for CrPAP4, which is commonly observed in mammalian PAP proteins. Similar domains were observed in a PAP from *Phaseolus vulgaris* (kidney bean) (Tsyguelnaia and Doolittle 1998) and PAPs from *A. thaliana* (AtPAP10 and AtPAP12) (Li et al. 2002). The

signal peptide for the secretory pathway predicted for CrPAP1–5 indicate that these proteins could be acting in the extracellular environment, as do many microbial and plant phosphatases, including phytases, in order to dephosphorylate different substrates found in their environment and to release P for its uptake (Rao et al. 2009; Tian et al. 2012). Previously, Dionisio et al. (2011) reported a phylogenetic tree composed of five clades, grouping plant PAPs with phytase activity and other plant PAP homologue proteins. In this study, we report a total of nine major clades in a phylogenetic tree also including microalgae and animal PAP homologue proteins. All plant PAP phytases and plant PAP phytase-like sequences grouped in clade III, while five clades (II, IV, V, VI, and VIII) were exclusively formed by microalgae PAP homologue proteins. None of the CrPAPs grouped with plant PAP phytases; however, two PAP homologues from the microalga *C. subellipsoidea* C-169 (JGI protein id: 36336 and 60417) grouped into clade III containing the plant PAP phytases.

In this study, we found that gene expression of *CrPAP2*, *CrPAP4*, and *CrPAP6* remained unaffected by the changes in the P substrate, while *CrPAP3* was the gene with the lowest expression level, and its expression appeared even lower in the presence of phytate as only source of P. It is known that inorganic phosphate can act as a moderate competitive inhibitor of some PAPs (Schenk et al. 2005), therefore the Pi released by the hydrolysis of phytate could act as inhibitor of *CrPAP3*. Moreover, the levels of orthophosphate in the growth medium can inhibit the production of extracellular phytases in fungi (Konietzny and Greiner 2002). In contrast, we found that the expression of *CrPAP1* was induced both in TAP+IP_6 and TA+IP_6 media, indicating that this gene may be responsive to the presence of phytate, and the phosphate salts deprivation may be enhancing this response. *CrPAP5* appears to be responsive to phosphate salts deprivation, since this gene was expressed only in the TA+IP_6 medium. The induction of acid phosphatase synthesis in response to Pi starvation has been demonstrated in higher plants (Duff et al. 1991; Goldstein et al. 1988), while in some microorganisms like bacteria (*Bacillus subtilis* and *Klebsiella terrigena*), the presence of phytate can induce the synthesis of phytases (Greiner et al. 1997; Powar and Jagannathan 1982). Both *CrPAP1* and *CrPAP5* may encode for phosphatases involved in the PSR, probably acting in recycling Pi from alternate organic pools, which could include phytate for any of them. The study of phosphatases is very limited in microalgae, and no PAP with or without phytase activity has been identified and characterized in *C. reinhardtii*. In this study, we identified, in silico, six PAP homologue genes in *C. reinhardtii* (*CrPAP1–6*), and evaluated their expression using phytate as the only source of P. Taken together, the information generated in this study provides the first insights into the PAP family in *C. reinhardtii* and has paved the way for further genetic and biochemical studies aimed at elucidating the role of these proteins in the hydrolysis of phytate.

Acknowledgments This research was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) Project No. 60465. Rodrigo Arturo Rivera Solís is grateful to CONACYT, Mexico, for the Scholarship No. 213511. Authors are grateful to Ileana C. Borges Argáez and Mildred Carrillo Pech for technical support.

References

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA et al (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25:3389–3402

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248–254

Cheng JK, Selinger LB, Yanke LJ et al (1999) Phytases of ruminal microorganisms. USA Patent 5,939,303

Dionisio G, Madsen CK, Holm PB et al (2011) Cloning and characterization of purple acid phosphatase phytases from wheat, barley, maize, and rice. Plant Physiol 156:1087–1100

Duff SM, Plaxton WC, Lefebvre DD (1991) Phosphate-starvation response in plant cells: *De novo* synthesis and degradation of acid phosphatases. Proc Natl Acad Sci USA 88:9538–9542

Echevarría-Machado I, Martínez-Estévez M, Muñoz-Sánchez A et al (2007) Membrane-associated phosphoinositides-specific phospholipase C forms from *C. roseus* transformed roots. Mol Biotechnol 35:297–309

Gibson DM, Ullah AHJ (1988) Purification and characterization of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds. Arch Biochem Biophys 260:503–513

Goldstein AH, Baertlein DA, McDaniel RG (1988) Phosphate starvation inducible metabolism in *Lycopersicon esculentum*: I. Excretion of acid phosphatase by tomato plants and suspension-cultured cells. Plant Physiol 87:711–715

Greiner R, Haller E, Konietzny U, Jany K-D (1997) Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. Arch Biochem Biophys 341:201–206

Harris EH (1989) The *Chlamydomonas* sourcebook, a comprehensive guide to biology and laboratory use. Academic, San Diego

Harris EH (2001) *Chlamydomonas* as a model organism. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 52:363–406

Hegeman CE, Grabau EA (2001) A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings. Plant Physiol 126:1598–1608

Hübel F, Beck E (1996) Maize root phytase (purification, characterization, and localization of enzyme activity and its putative substrate). Plant Physiol 112:1429–1436

Klabunde T, Krebs B (1997) The dimetal center in purple acid phosphatases. In: Hill HAO, Sadler PJ, Thomson AJ (eds) Metal sites in proteins and models, structure and bonding, vol 89. Springer, Berlin, pp 177–198

Klabunde T, Strater N, Krebs B, Witzel H (1995) Structural relationship between the mammalian Fe(III)-Fe(II) and the Fe(III)-Zn(II) plant purple acid phosphatases. FEBS Lett 367:56–60

Konietzny U, Greiner R (2002) Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). Int J Food Sci Technol 37:791–812

Kropat J, Hong-Hermesdorf A, Casero D et al (2011) A revised mineral nutrient supplement increases biomass and growth rate in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant J 66:770–780

Kuang R, Chan K-H, Yeung E, Lim BL (2009) Molecular and biochemical characterization of AtPAP15, a purple acid phosphatase with phytase activity in *Arabidopsis*. Plant Physiol 151:199–209

Lan P, Li W, Schmidt W (2012) Complementary proteome and transcriptome profiling in phosphate-deficient arabidopsis roots reveals multiple levels of gene regulation. Mol Cell Proteomics doi:10.1074/mcp.M112.020461

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP et al (2007) Clustal W and clustal X version 2.0. Bioinformatics 23:2947–2948

Letunic I, Doerks T, Bork P (2012) SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. Nucleic Acids Res 40:D302–D305

Li M, Osaki M, Honma M, Tadano T (1997) Purification and characterization of phytase induced in tomato roots under phosphorus-deficient conditions. Soil Sci Plant Nutr 43:179–190

Li D, Zhu H, Liu K et al (2002) Purple acid phosphatases of *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem 277:27772–27781

Li C, Gai S, Yang T et al (2012) Identification of soybean purple acid phosphatase genes and their expression responses to phosphorus availability and symbiosis. Ann Bot 109:275–285

Lopez HW, Leenhardt F, Coudray C, Remesy C (2002) Minerals and phytic acid interactions: is it a real problem for human nutrition? Int J Food Sci Technol 37:727–739

Lung S-C, Leung A, Kuang R et al (2008) Phytase activity in tobacco (*Nicotiana tabacum*) root exudates is exhibited by a purple acid phosphatase. Phytochemistry 69:365–373

Matagne RF, Loppes R, Deltour R (1976) Phosphatase of *Chlamydomonas reinhardi*: biochemical and cytochemical approach with specific mutants. J Bacteriol 126:937–950

Mullaney EJ, Ullah AHJ (2003) The term phytase comprises several different classes of enzymes. Biochem Biophys Res Commun 312:179–184

Patni NJ, Dhawale SW, Aaronson S (1977) Extracellular phosphatases of *Chlamydomonas reinhardi* and their regulation. J Bacteriol 130:205–211

Power VK, Jagannathan V (1982) Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 151:1102–1108

Puhl AA, Gruninger RJ, Greiner R et al (2007) Kinetic and structural analysis of a bacterial protein tyrosine phosphatase-like myo-inositol polyphosphatase. Protein Sci 16:1368–1378

Quisel JD, Wykoff DD, Grossman AR (1996) Biochemical characterization of the extracellular phosphatases produced by phosphorus-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol 111:839–848

Raghothama KG (1999) Phosphate acquisition. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 50:665–693

Raher M, Quarfurth R, Warnatz H-J et al (2006) An efficient and economic enhancer mix for PCR. Biochem Biophys Res Commun 347:747–775

Rao DECS, Rao KV, Reddy TP, Reddy VD (2009) Molecular characterization, physicochemical properties, known and potential applications of phytases: an overview. Crit Rev Biotechnol 29:182–198

Rhee SY, Dickerson J, Xu D (2006) Bioinformatics and its applications in plant biology. Annu Rev Plant Biol 57:335–360

Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4:406–425

Schenk G, Ga Y, Carrington LE et al (1999) Binuclear metal centers in plant purple acid phosphatases: Fe–Mn in sweet potato and Fe–Zn in soybean. Arch Biochem Biophys 370:183–189

Schenk G, Guddat LW, Ge Y et al (2000) Identification of mammalian-like purple acid phosphatases in a wide range of plants. Gene 250:117–125

Schenk G, Guddat LR, Carrington LE et al (2005) Phosphate forms an unusual tripodal complex with the Fe-Mn center of sweet potato purple acid phosphatase. Proc Natl Acad Sci USA 102:273–278

Shimogawara K, Wykoff DD, Usuda H, Grossman AR (1999) *Chlamydomonas reinhardtii* mutants abnormal in their responses to phosphorus deprivation. Plant Physiol 120:685–694

Tamura K, Peterson D, Peterson N et al (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 28:2731–2739

Tarafdar JC, Jungk A (1987) Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus. Biol Fertil Soils 3:199–204

Tian J, Wang C, Zhang Q et al (2012) Overexpression of OsPAP10a, a root-associated acid phosphatase, increased extracellular organic phosphorus utilization in rice. J Integr Plant Biol 54:631–639

Thygesenin I, Doolittle RF (1998) Presence of a fibronectin type III domain in a plant protein. J Mol Evol 46:612–614

Turner BL, Paphazy MJ, Haygarth PM, McKelvie ID (2002) Inositol phosphates in the environment. Philos Trans R Soc Lond B 357:449–469

Vincent JB, Olivier-Lilley GL, Averill BA (1990) Proteins containing oxo-bridged dinuclear iron centers: a bioinorganic perspective. Chem Rev 90:1447–1467

Wyss M, Pasamontes L, Friedlein A et al (1999) Biophysical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. Appl Environ Microbiol 65:359–366

Xiao K, Harrison MJ, Wang Z-Y (2005) Transgenic expression of a novel *M. truncatula* phytase gene results in improved acquisition of organic phosphorus by *Arabidopsis*. Planta 222:27–36

Yadav RS, Tarafdar JC (2001) Influence of organic and inorganic phosphorus supply on the maximum secretion of acid phosphatase by plants. Biol Fertil Soils 34:140–143

Yao MZ, Zhang YH, Lu WL et al (2011) Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications. J Appl Microbiol 112:1–14

Yehudai-Resheff S, Zimmer SL, Komine Y, Stern DB (2007) Integration of chloroplast nucleic acid metabolism into the phosphate deprivation response in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Cell 19:1023–1038

Yeung S-L, Cheng C, Lui TKO et al (2009) Purple acid phosphatase-like sequences in prokaryotic genomes and the characterization of an atypical purple alkaline phosphatase from *Burkholderia cenocepacia* J2315. Gene 440:1–8

Yoon S-M, Kim S, Li K et al (2011) Transgenic microalgae expressing *Escherichia coli* AppA phytase as feed additive to reduce phytate excretion in the manure of young broiler chicks. Appl Microbiol Biotechnol 91:553–563

Zhang Q, Wang C, Tian J, Li K, Shou H (2011) Identification of rice purple acid phosphatases related to posphate starvation signalling. Plant Biol 13:7–15

Zuckerkandl E, Pauling L (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: Bryson V, Vogel HJ (eds) Evolving genes and proteins. Academic, New York, pp 97–166

ANEXO 2

Alineamiento de la región P+5'UTR del gen *atpA*. P+5'UTR *atpA*: secuencia obtenida del GenBank (Número de accesión BK000554); P+5' UTR *atpA* (p322): secuencia del P+5'UTR del gen *atpA* contenida en el plásmido p322; P+5' UTR *atpA (cphySr)*: secuencia del P+5'UTR del gen *atpA* contenida en la construcción de expresión cphySr.

```
P+5'UTR atpA              1 AAAAGTCATTTTTATAACTGGTCTCAAAATACCTATAAACCCATTGTTCTTCTCTTTTAG
P+5'UTR atpA(p322)        1 GGATCCCATTTTTATAACTGGTCTCAAAATACCTATAAACCCATTGTTCTTCTCTTTTAG
P+5'UTR atpA(cphySr)      1 GGATCCCATTTTTATAACTGGTCTCAAAATACCTATAAACCCATTGTTCTTCTCTTTTAG

P+5'UTR atpA             55 CTCTAAGAACAATCAATTTATAAATATATTTATTATTATGCTATAATATAAATACTATAT
P+5'UTR atpA(p322)       61 CTCTAAGAACAATCAATTTATAAATATATTTATTATTATGCTATAATATAAATACTATAT
P+5'UTR atpA(cphySr)     61 CTCTAAGAACAATCAATTTATAAATATATTTATTATTATGCTATAATATAAATACTATAT

P+5'UTR atpA            115 AAATACATTTACCTTTTTATAAATACATTTACCTTTTTTTTAATTTGCATGATTTTAATG
P+5'UTR atpA(p322)      121 AAATACATTTACCTTTTTATAAATACATTTACCTTTTTTTTAATTTGCATGATTTTAATG
P+5'UTR atpA(cphySr)    121 AAATACATTTACCTTTTTATAAATACATTTACCTTTTTTTTAATTTGCATGATTTTAATG

P+5'UTR atpA            175 CTTATGCTATCTTTTTTATTTAGTCCATAAAACCTTTAAAGGACCTTTTCTTATGGGATA
P+5'UTR atpA(p322)      181 CTTATGCTATCTTTTTTATTTAGTCCATAAAACCTTTAAAGGACCTTTTCTTATGGGATA
P+5'UTR atpA(cphySr)    181 CTTATGCTATCTTTTTTATTTAGTCCATAAAACCTTTAAAGGACCTTTTCTTATGGGATA

P+5'UTR atpA            235 TTTATATTTTCCTAACAAAGCAATCGGCGTCATAAACTTTACTTGCTTACGACGCCTGTG
P+5'UTR atpA(p322)      241 TTTATATTTTCCTAACAAAGCAATCGGCGTCATAAACTTTAGTTGCTTACGACGCCTGTG
P+5'UTR atpA(cphySr)    241 TTTATATTTTCCTAACAAAGCAATCGGCGTCATAAACTTTAGTTGCTTACGACGCCTGTG

P+5'UTR atpA            295 GACGTCCCCCCCTTCCCCTTACGGGCAAGTAAACTTAGGGATTTTAATGCAATAAATAAA
P+5'UTR atpA(p322)      301 GACGTCCCCCCCTTCCCCTTACGGGCAAGTAAACTTAGGGATTTTAATGCAATAAATAAA
P+5'UTR atpA(cphySr)    301 GACGTCCCCCCCTTCCCCTTACGGGCAAGTAAACTTAGGGATTTTAATGCAATAAATAAA

P+5'UTR atpA            355 TTTGTCCTCTTCGGGCAAATGAATTTTAGTATTTAAATATGACAAGGGTGAACCATTACT
P+5'UTR atpA(p322)      361 TTTGTCCTCTTCGGGCAAATGAATTTTAGTATTTAAATATGACAAGGGTGAACCATTACT
P+5'UTR atpA(cphySr)    361 TTTGTCCTCTTCGGGCAAATGAATTTTAGTATTTAAATATGACAAGGGTGAACCATTACT

P+5'UTR atpA            415 TTTGTTAACAAGTGATCTTACCACTCACTATTTTTGTTGAATTTTAAACTTATTTAAAAT
P+5'UTR atpA(p322)      421 TTTGTTAACAAGTGATCTTACCACTCACTATTTTTGTTGAATTTTAAACTTATTTAAAAT
P+5'UTR atpA(cphySr)    421 TTTGTTAACAAGTGATCTTACCACTCACTATTTTTGTTGAATTTTAAACTTATTTAAAAT

P+5'UTR atpA            475 TCTCGAGAAAGATTTTAAAAATAAACTTTTTTAATCTTTTATTTATTTTTTCTTTTTT--
P+5'UTR atpA(p322)      481 TCTCGAGAAAGATTTTAAAAATAAACTTTTTTAATCTTTTATTTATTTTTTCTTTTTTCA
P+5'UTR atpA(cphySr)    481 TCTCGAGAAAGATTTTAAAAATAAACTTTTTTAATCTTTTATTTATTTTTTCTTTTTT--

P+5'UTR atpA            535 -------------------------------------------------------------
P+5'UTR atpA(p322)      541 T------------------------------------------------------------
P+5'UTR atpA(cphySr)    541 -------------------------------------------------------------
```

ANEXO 3

Alineamiento de la región codificante de la fitasa de *S. ruminantium*. ORF (phyASr): secuencia obtenida del GenBank (Número de accesión AF177214.1); ORF (cphySr): secuencia del gen de la fitasa de *S. ruminantium* en la construcción de expresión cphySr.

```
ORF(phyASr      1 ATGAAATACTGGCAGAAGCATGCCGTTCTTTGTAGTCTCTTGGTCGGCGCATCCCTCTGG
ORF(cphySr)     1 ATGAAATACTGGCAGAAGCATGCCGTTCTTTGTAGTCTCTTGGTCGGCGCATCCCTCTGG

ORF(phyASr)    61 ATACTGCCGCAGGCCGATGCGGCCAAGGCGCCGGAGCAGACGGTGACGGAGCCCGTTGGG
ORF(cphySr)    61 ATACTGCCGCAGGCCGATGCGGCCAAGGCGCCGGAGCAGACGGTGACGGAGCCCGTTGGG

ORF(phyASr)   121 AGCTACGCGCGCGCGGAGCGGCCGCAGGACTTCGAGGGCTTTGTCTGGCGCCTCGACAAC
ORF(cphySr)   121 AGCTACGCGCGCGCGGAGCGGCCGCAGGACTTCGAGGGCTTTGTCTGGCGCCTCGACAAC

ORF(phyASr)   181 GACGGCAAGGAGGCGTTGCCACGTAATTTCCGCACGTCGGCTGACGCGCTGCGCGCGCCG
ORF(cphySr)   181 GACGGCAAGGAGGCGTTGCCACGTAATTTCCGCACGTCGGCTGACGCGCTGCGCGCGCCG

ORF(phyASr)   241 GAGAAGAAATTCCATCTCGACGCCGCGTATGTACCGTCGCGCGAGGGCATGGATGCACTC
ORF(cphySr)   241 GAGAAGAAATTCCATCTCGACGCCGCGTATGTACCGTCGCGCGAGGGCATGGATGCACTC

ORF(phyASr)   301 CATATCTCGGGCAGTTCCGCATTCACGCCGGCGCAGCTCAAGAACGTTGCCGCGAAGCTG
ORF(cphySr)   301 CATATCTCGGGCAGTTCCGCATTCACGCCGGCGCAGCTCAAGAACGTTGCCGCGAAGCTG

ORF(phyASr)   361 CGGGAGAAGACGGCTGGCCCCATCTACGATGTCGACCTACGGCAGGAGTCGCACGGCTAT
ORF(cphySr)   361 CGGGAGAAGACGGCTGGCCCCATCTACGATGTCGACCTACGGCAGGAGTCGCACGGCTAT

ORF(phyASr)   421 CTCGACGGTATCCCCGTGAGCTGGTACGGCGAGCGCGACTGGGCAAATCTCGGCAAGAGC
ORF(cphySr)   421 CTCGACGGTATCCCCGTGAGCTGGTACGGCGAGCGCGACTGGGCAAATCTCGGCAAGAGC

ORF(phyASr)   481 CAGCATGAGGCGCTCGCCGACGAGCGGCACCGCTTGCACGCAGCGCTCCATAAGACGGTC
ORF(cphySr)   481 CAGCATGAGGCGCTCGCCGACGAGCGGCACCGCTTGCACGCAGCGCTCCATAAGACGGTC

ORF(phyASr)   541 TACATCGCGCCGCTCGGCAAGCACAAGCTCCCCGAGGGCGGCGAAGTCCGCCGCGTACAG
ORF(cphySr)   541 TACATCGCGCCGCTCGGCAAGCACAAGCTCCCCGAGGGCGGCGAAGTCCGCCGCGTACAG

ORF(phyASr)   601 AAGGTGCAGACGGAACAGGAAGTCGCCGAGGCCGCGGGGATGCGCTATTTCCGCATCGCG
ORF(cphySr)   601 AAGGTGCAGACGGAACAGGAAGTCGCCGAGGCCGCGGGGATGCGCTATTTCCGCATCGCG

ORF(phyASr)   661 GCGACGGATCATGTCTGGCCAACGCCGGAGAACATCGACCGCTTCCTCGCGTTTTACCGC
ORF(cphySr)   661 GCGACGGATCATGTCTGGCCAACGCCGGAGAACATCGACCGCTTCCTCGCGTTTTACCGC

ORF(phyASr)   721 ACGCTGCCGCAGGATGCGTGGCTCCATTTCCATTGTGAAGCCGGTGTCGGCCGCACGACG
ORF(cphySr)   721 ACGCTGCCGCAGGATGCGTGGCTCCATTTCCATTGTGAAGCCGGTGTCGGCCGCACGACG

ORF(phyASr)   781 GCGTTCATGGTCATGACGGATATGCTGAAGAACCCGTCCGTATCGCTCAAGGACATCCTC
ORF(cphySr)   781 GCGTTCATGGTCATGACGGATATGCTGAAGAACCCGTCCGTATCGCTCAAGGACATCCTC

ORF(phyASr)   841 TATCGCCAGCACGAGATCGGCGGCTTTTACTACGGGGAGTTCCCCATCAAGACGAAGGAT
ORF(cphySr)   841 TATCGCCAGCACGAGATCGGCGGCTTTTACTACGGGGAGTTCCCCATCAAGACGAAGGAT

ORF(phyASr)   901 AAAGATAGCTGGAAGACGAAATATTATAGGGAAAAGATCGTGATGATCGAGCAGTTCTAC
ORF(cphySr)   901 AAAGATAGCTGGAAGACGAAATATTATAGGGAAAAGATCGTGATGATCGAGCAGTTCTAC

ORF(phyASr)   961 CGCTATGTGCAGGAGAACCGCGCGGATGGCTACCAGACGCCGTGGTCGGTCTGGCTCAAG
ORF(cphySr)   961 CGCTATGTGCAGGAGAACCGCGCGGATGGCTACCAGACGCCGTGGTCGGTCTGGCTCAAG

ORF(phyASr)  1021 AGCCATCCGGCGAAGGCGTAA----------
ORF(cphySr)  1021 AGCCATCCGGCGAAGGCGATTATAAAGATGATGATGATAAATAA
```

ANEXO 4

Alineamiento de la región 3'UTR del gen *psbA*. 3'UTR psbA (S.M.): secuencia de la región 3'UTR del gen *psbA* proporcionada por el Dr. Stephen Mayfield; 3' UTR psbA (cphySr): secuencia de la región 3'UTR del gen *psbA* contenida en la construcción de expresión cphySr. En el recuadro naranja se observa la etiqueta de purificación FLAG.

```
3'UTR psbA (S.M.)        1 TTAGTTTAGTTTATACACACTTTTCATATATATATACTTAATAGCTACCATAGGCAGTTG
3'UTR psbA (cphySr)      1 TTAGTTTAGTTTATACACACTTTTCATATATATATACTTAATAGCTACCATAGGCAGTTG

3'UTR psbA (S.M.)       61 GCAGGACGTCCCCTTACGGGACAAATGTATTTATTGTTGCCTGCCAACTGCCTAATATAA
3'UTR psbA (cphySr)     61 GCAGGACGTCCCCTTACGGGACAAATGTATTTATTGTTGCCTGCCAACTGCCTAATATAA

3'UTR psbA (S.M.)      121 ATATTAGTGGACGTCCCCTTCCCCTTACGGGCAAGTAAACTTAGGGATTTTAATGCTCCG
3'UTR psbA (cphySr)    121 ATATTAGTGGACGTCCCCTTCCCCTTACGGGCAAGTAAACTTAGGGATTTTAATGCTCCG

3'UTR psbA (S.M.)      181 TTAGGAGGCAAATAAATTTTAGTGGCAGTTGCCTCGCCTATCGGCTAACAAGTTCCTTCG
3'UTR psbA (cphySr)    181 TTAGGAGGCAAATAAATTTTAGTGGCAGTTGCCTCGCCTATCGGCTAACAAGTTCCTTCG

3'UTR psbA (S.M.)      241 GAGTATATAAATATCCTGCCAACTGCCGATATTTATATACTAGGCAGTGGCGGTACCACT
3'UTR psbA (cphySr)    241 GAGTATATAAATATCCTGCCAACTGCCGATATTTATATACTAGGCAGTGGCGGTACCACT

3'UTR psbA (S.M.)      301 CGAC------
3'UTR psbA (cphySr)    301 CGACGGATCC
```

ANEXO 5

Alineamiento de la secuencia de aminoácidos producida por la traducción *in silico* de la construcción cphySr optimizada con el uso del codón del cloroplasto de *C. reinhardtii*. phyASr: secuencia de la fitasa phyA de *S. ruminantium* dada de en el GenBank (No. de accesión AQ13669); cphySr: secuencia de la proteína producida por la construcción de expresión cphySr sin el uso de codón optimizado; cphySr 1064468: secuencia de la proteína producida por la construcción de expresión cphySr con el uso de codón optimizado. En el recuadro naranja se observa la bandera de purificación FLAG.

```
phyASr                    1 MKYWQKHAVLCSLLVGASLWILPQADAAKAPEQTVTEPVGSYARAERPQD
cphySr                    1 MKYWQKHAVLCSLLVGASLWILPQADAAKAPEQTVTEPVGSYARAERPQD
cphySr 1064468            1 MKYWQKHAVLCSLLVGASLWILPQADAAKAPEQTVTEPVGSYARAERPQD

phyASr                   51 FEGFVWRLDNDGKEALPRNFRTSADALRAPEKKFHLDAAYVPSREGMDAL
cphySr                   51 FEGFVWRLDNDGKEALPRNFRTSADALRAPEKKFHLDAAYVPSREGMDAL
cphySr 1064468           51 FEGFVWRLDNDGKEALPRNFRTSADALRAPEKKFHLDAAYVPSREGMDAL

phyASr                  101 HISGSSAFTPAQLKNVAAKLREKTAGPIYDVDLRQESHGYLDGIPVSWYG
cphySr                  101 HISGSSAFTPAQLKNVAAKLREKTAGPIYDVDLRQESHGYLDGIPVSWYG
cphySr 1064468          101 HISGSSAFTPAQLKNVAAKLREKTAGPIYDVDLRQESHGYLDGIPVSWYG

phyASr                  151 ERDWANLGKSQHEALADERHRLHAALHKTVYIAPLGKHKLPEGGEVRRVQ
cphySr                  151 ERDWANLGKSQHEALADERHRLHAALHKTVYIAPLGKHKLPEGGEVRRVQ
cphySr 1064468          151 ERDWANLGKSQHEALADERHRLHAALHKTVYIAPLGKHKLPEGGEVRRVQ

phyASr                  201 KVQTEQEVAEAAGMRYFRIAATDHVWPTPENIDRFLAFYRTLPQDAWLHF
cphySr                  201 KVQTEQEVAEAAGMRYFRIAATDHVWPTPENIDRFLAFYRTLPQDAWLHF
cphySr 1064468          201 KVQTEQEVAEAAGMRYFRIAATDHVWPTPENIDRFLAFYRTLPQDAWLHF

phyASr                  251 HCEAGVGRTTAFMVMTDMLKNPSVSLKDILYRQHEIGGFYYGEFPIKTKD
cphySr                  251 HCEAGVGRTTAFMVMTDMLKNPSVSLKDILYRQHEIGGFYYGEFPIKTKD
cphySr 1064468          251 HCEAGVGRTTAFMVMTDMLKNPSVSLKDILYRQHEIGGFYYGEFPIKTKD

phyASr                  301 KDSWKTKYYREKIVMIEQFYRYVQENRADGYQTPWSVWLKSHPAKA----
cphySr                  301 KDSWKTKYYREKIVMIEQFYRYVQENRADGYQTPWSVWLKSHPAKADYKD
cphySr 1064468          301 KDSWKTKYYREKIVMIEQFYRYVQENRADGYQTPWSVWLKSHPAKADYKD

phyASr                  351 ----
cphySr                  351 DDDK
cphySr 1064468          351 DDDK
```

ANEXO 6

Alineamiento de la proteína de resistencia aadA. aadA (Gb) corresponde a la secuencia proteica dada de alta en el GenBank (Número de accesión CAA26199.1). aadA corresponde a la proteína que proviene de la construcción de expresión sin optimizar y aadA (pMA) corresponde a la proteína que proviene de la secuencia optmizada con el uso del codón del cloroplasto de *C. reinhardtii.*

```
aadA (Gb)      1 MREAVIAEVSTQLSEVVGVIERHLEPTLLAVHLYGSAVDGGLKPHSDIDLLVTVTVRLDE
aadA           1 MREAVIAEVSTQLSEVVGVIERHLEPTLLAVHLYGSAVDGGLKPHSDIDLLVTVTVRLDE
aadA (pMA)     1 MREAVIAEVSTQLSEVVGVIERHLEPTLLAVHLYGSAVDGGLKPHSDIDLLVTVTVRLDE

aadA(Gb)      61 TTRRALINDLLETSASPGESEILRAVEVTIVVHDDIIPWRYPAKRELQFGEWQRNDILAG
aadA          61 TTRRALINDLLETSASPGESEILRAVEVTIVVHDDIIPWRYPAKRELQFGEWQRNDILAG
aadA (pMA)    61 TTRRALINDLLETSASPGESEILRAVEVTIVVHDDIIPWRYPAKRELQFGEWQRNDILAG

aadA (Gb)    121 IFEPATIDIDLAILLTKAREHSVALVGPAAEELFDPVPEQDLFEALNETLTLWNSPPDWA
aadA         121 IFEPATIDIDLAILLTKAREHSVALVGPAAEELFDPVPEQDLFEALNETLTLWNSPPDWA
aadA (pMA)   121 IFEPATIDIDLAILLTKAREHSVALVGPAAEELFDPVPEQDLFEALNETLTLWNSPPDWA

aadA (Gb)    181 GDERNVVLTLSRIWYSAVTGKIAPKDVAADWAMERLPAQYQPVILEARQAYLGQEEDRLA
aadA         181 GDERNVVLTLSRIWYSAVTGKIAPKDVAADWAMERLPAQYQPVILEARQAYLGQEEDRLA
aadA (pMA)   181 GDERNVVLTLSRIWYSAVTGKIAPKDVAADWAMERLPAQYQPVILEARQAYLGQEEDRLA

aadA (Gb)    241 SRADQLEEFVHYVKGEITKVVGK
aadA         241 SRADQLEEFVHYVKGEITKVVGK
aadA (pMA)   241 SRADQLEEFVHYVKGEITKVVGK
```