



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**CARACTERIZACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN
CrGPDH3 DE LA MICROALGA VERDE
Chlamydomonas reinhardtii Y SU POTENCIAL
PARA CONDUCIR LA EXPRESIÓN DE UN GEN
REPORTERO DE MANERA INDUCIBLE**

Tesis que presenta
ANAYELI GUADALUPE BELTRAN AGUILAR

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

Mérida, Yucatán, México
Diciembre 2013





RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado: "Caracterización del promotor del gen *CrGPDH3* de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* y su potencial para conducir la expresión de un gen reportero de manera inducible" fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, dentro de la Opción 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.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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



Anayeli Guadalupe Beltran Aguilar

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca (No. 264772) otorgada para los estudios de maestría, así como al financiamiento del proyecto de Ciencia Básica 169217 otorgado para la realización de este proyecto.

Quisiera agradecer a mi asesora de tesis la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, que con sus consejos y guía me ayudo a realizar esta tesis.

Al Dr. Santy Peraza Echeverria, que aunque no fue mi asesor oficial, siempre fue un participante muy importante en ella.

A mi comité tutorial integrado por la Dra. Luisa Alhucema López Ochoa, el Dr. Santy Peraza Echeverria, el Dr. Octavio Martínez de la Vega, a por sus consejos, tiempo y dedicación.

A mis revisores de tesis, la Dra. Luisa Alhucema López Ochoa, el Dr. Santy Peraza Echeverria, el Dr. Octavio Martínez de la Vega, y al Dr. Jorge Santamaría Fernández por sus valiosos comentarios durante la revisión de la tesis.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, la Unidad de Biotecnología y el Posgrado en Ciencias Biológicas, Opción Biotecnología, de este Centro por las facilidades otorgadas para la realización de esta tesis.

A la Q.B.A. Ileana Cecilia Borges Argáez por el apoyo técnico prestado para la realización de este trabajo, además de sus valiosos consejos y amistad.

Al grupo del laboratorio BT04 de Biotecnología grupo de "microalgas y cultivos tropicales", Maru, Rodrigo, Paty, Melissa, Miguel Ángel, Merly, Ángeles, Luis, Alejandra, Daniela, Margarita, Shirley por su ayuda, consejos y amistad.

A mis Padres Juan y Aurora, a mi tío Mario y Familia por todo lo que han hecho por mí, por lo que me han enseñado, por su amor, cariño, comprensión, consejos y apoyo.

A mi Esposo, Carlos por su apoyo incondicional, comprensión y paciencia.

A Dios, por darme salud, sabiduría y entendimiento para resolver los problemas que se presentan y guiarme siempre hacia la felicidad.

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

A todos ¡¡¡MUCHAS GRACIAS!!!

DEDICATORIA

A mi esposo Carlos, mis Padres Juan y Aurora, mi Tío Mario, mi Suegra Lucelly, Mis Hermanos Juan, Marco y Erick, Familia y Amigos quienes me han brindado su apoyo incondicional, cariño, amor y consejos.

INDICE

LISTADO DE FIGURASVII

LISTADO DE TABLASX

INTRODUCCIÓN..... 5

CAPITULO I 7

ANTECEDENTES 7

1.1 Generalidades de *Chlamydomonas reinhardtii*. 7

1.1.1 Características morfológicas. 7

1.1.2 *Chlamydomonas reinhardtii* como organismo modelo..... 8

1.1.3 *C. reinhardtii* y la respuesta al estrés osmótico. 9

1.1.4 *C. reinhardtii* como biorreactor para la producción de proteínas recombinantes. 10

1.2 Uso de promotores para la producción de proteínas recombinantes en el núcleo de *Chlamydomonas reinhardtii*. 12

1.2.1 Promotores constitutivos para la producción de proteínas recombinantes en el núcleo *C. reinhardtii*. 12

1.2.2 Promotores inducibles para la producción de proteínas recombinantes en el núcleo *C. reinhardtii*. 14

1.2.3 El gen *GPDH* que codifica para la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa en *Chlamydomonas reinhardtii*. 16

1.3 Genes reporteros expresados en el núcleo de *C. reinhardtii*. 18

1.3.1 El gen reportero GUSPlus (*uidA*). 18

1.4 Justificación..... 20

1.5 Hipótesis..... 20

1.6 Objetivos. 20

1.6.1 Objetivo general. 20

1.6.2 Objetivos específicos. 21

1.7	Estrategia experimental.....	22
1.8	Bibliografía.....	23
CAPITULO II.....		27
ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>CRGPDH3</i> EN RESPUESTA A DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICIÓN Y CONCENTRACIONES DE NaCl.....		27
2.1	Introducción.....	27
2.2	Materiales y Métodos.....	28
2.2.1	Cepa y cultivo de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	28
2.2.2	Experimentos de estrés por NaCl.....	28
2.2.2.1	Extracción de ARN.....	29
2.2.2.2	Electroforesis en gel de agarosa.....	29
2.2.2.3	Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	29
2.2.2.4	Análisis de expresión del gen <i>CrGPDH3</i> mediante RT-PCR.....	30
2.2.2.5	Predicción de elementos de respuesta en <i>cis</i> en la región promotora putativa del <i>CrGPDH3</i> de <i>C. reinhardtii</i>	31
2.3	Resultados.....	31
2.3.1	Análisis de expresión de <i>CrGPDH3</i> en respuesta a exposición ante 200 mM de NaCl. 31	
2.3.2	Análisis de expresión de <i>CrGPDH3</i> en respuesta a exposición ante 100 mM de NaCl. 33	
2.3.3	Análisis de expresión de <i>CrGPDH3</i> en respuesta a exposición ante 50 mM de NaCl..	35
2.3.4	Análisis de expresión de <i>CrGPDH3</i> en respuesta a exposición ante 5 mM de NaCl...	37
2.3.5	Predicción de elementos de respuesta en <i>cis</i> en la región promotora putativa del gen <i>CrGPDH3</i> de <i>C. reinhardtii</i>	39
2.4	Discusión.....	42
2.5	Conclusiones.....	45
2.6	Bibliografía.....	46

CAPITULO III	49
EVALUACIÓN DE LA INDUCIBILIDAD DEL PROMOTOR DEL GEN <i>CRGPDH3</i> Y SU CAPACIDAD PARA CONDUCIR LA EXPRESIÓN DEL GEN REPORTERO <i>UIDA</i>	49
3.1 Introducción.....	49
3.2 Material y Métodos.....	50
3.2.1 Cepa y cultivo de <i>C. reinhardtii</i>	50
3.2.2 Extracción de ADN genómico (ADNg).....	50
3.2.3 Clonación de tres diferentes fragmentos del promotor más su 5'UTR del <i>CrGPDH3</i> y el gen reportero <i>uidA</i>	51
3.2.3.1 Diseño de oligonucleótidos específicos.....	51
3.2.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	54
3.2.3.3 Clonación de los amplicones en pGEM-T-Easy.	54
3.2.3.4 Secuenciación de los productos de PCR.	55
3.2.4 Elaboración de la construcciones génicas <i>CrGPDHGus A</i> , <i>CrGPDHGus B</i> , <i>CrGPDHGus C</i>	55
3.2.5 Transformación de <i>C. reinhardtii</i> por biobalística.	61
3.2.6 Extracción de ADN genómico (ADNg).....	62
3.2.7 Análisis de las colonias putativamente transformadas mediante PCR.	62
3.2.8 Evaluación de la expresión del gen reportero <i>uidA</i> bajo el control de <i>promA</i> en clonas individuales de <i>C. reinhardtii</i>	63
3.2.8.1 Tratamientos de NaCl.	63
3.2.8.2 RT-PCR.	63
3.2.8.3 Evaluación de la expresión del gen reportero <i>uidA</i> bajo el control de <i>promA</i> , <i>promB</i> ó <i>promC</i> mediante una estrategia de "pool" de clonas transgénicas.	64
3.3 RESULTADOS.....	67
3.3.1 Cultivo y Extracción de ADN genómico de <i>C. reinhardtii</i>	67
3.3.2 Clonación de tres diferentes fragmentos del promotor más la región 5'UTR del <i>CrGPDH3</i> (<i>promA</i> , <i>promB</i> y <i>prom C</i>).	68
3.3.3 Clonación del gen reportero <i>GUSPlus</i>	72

3.3.4	Elaboración del plásmido de transformación pCrGPDHGus A.....	75
3.3.4.1	Subclonación del gen reportero <i>uidA</i> para generar el pA1.	75
3.3.4.2	Subclonación del 3'UTR del <i>RBCS2</i> para generar el pA2.	76
3.3.4.3	Subclonación de <i>promA</i> para generar el pCrGPDHGus A.....	77
3.3.5	Elaboración de los plásmidos de transformación pCrGPDHGus B y pCrGPDHGus C.....	79
3.3.6	Expresión del gen reportero <i>uidA</i> bajo el control de <i>promA</i> en clonas individuales de <i>C. reinhardtii</i>	80
3.3.6.1	Clonas de <i>C. reinhardtii</i> transformadas con el pCrGPDHGus A.....	80
3.3.6.2	Expresión del <i>uidA</i> en respuesta a 50 mM de NaCl en clonas de <i>C. reinhardtii</i> transformadas con pCrGPDHGus A.....	83
3.3.7	Expresión del gen reportero <i>uidA</i> bajo el control de <i>promA</i> , <i>promB</i> , y <i>promC</i> en <i>C. reinhardtii</i>	85
3.4	DISCUSIÓN.....	88
3.5	CONCLUSIONES.....	96
3.6	BIBLIOGRAFÍA.....	96
CAPITULO IV.....		103
4.1	DISCUSIÓN GENERAL.....	103
4.2	CONCLUSIONES GENERALES.....	105
4.3	PERSPECTIVAS.....	106
4.4	BIBLIOGRAFÍA.....	109
ANEXOS.....		111

LISTADO DE ABREVIATURAS

5' UTR	Región 5' no traducible
3' UTR	Región 3' no traducible
ADNc	ADN complementario
ADNg	ADN genómico
GPDH	Glicerol-3- fosfato-Deshidrogenasa
Kb	Kilo bases
NaCl	Cloruro de sodio
Oligo-dT	Oligo deoxitimidina
ORF	Marco de lectura abierto (Del inglés: Open reading Frame)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PLACE	Plant <i>Cis</i> Regulatory Elements
TAG	Triacilglicérido
promA	Región de 1979 pb que incluye: 1694 pb correspondientes la región putativa del promotor <i>CrGPDH3</i> más 285 pb correspondientes a la región 5'UTR.
promB	Región de 1466 bp que incluye: 1181 de la región putativa del promotor <i>CrGPDH3</i> más 285 pb del 5'UTR.
promC	Región de 938 bp que corresponden a: 653 pb de la región putativa del promotor <i>CrGPDH3</i> + más 285 pb del 5'UTR. 285 pb.

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. 1 Representación de la estructura celular de la microalga verde <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (Merchant <i>et al.</i> 2007).	8
Figura 1. 2 Análisis de la expresión del <i>CrGPDH1</i> , <i>CrGPDH2</i> y <i>CrGPDH3</i> por RT-PCR en <i>C. reinhardtii</i> después de 2 horas a 0mM o 200 mM de NaCl. Como un control positivo con una banda esperada de aproximadamente 200 pb fue amplificado el gen de actina de <i>C. reinhardtii</i> a partir de ADNc. El marcador de peso molecular es de 1Kb.	17
Figura 1. 3 Detección histoquímica de la actividad del <i>uidA</i> en células transformadas de <i>C. reinhardtii</i> (kumar <i>et al.</i> 2004).	19
Figura 1. 4 Estrategia experimental para caracterizar al promotor del gen <i>CrGPDH3</i> en la microalga verde <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	22
Figura 2. 1 ARN total de los cultivos sujetos al tratamiento de 200 mM de NaCl a tiempos de exposición de 30 y 120 min.	32
Figura 2. 2 Análisis de la expresión del gen <i>CrGPDH3</i> bajo los tratamientos de 200 mM de NaCl por 30 y 120 min. Se utilizó el gen <i>CrActina</i> como control positivo (+RT <i>CrActina</i>) negativo (-RT <i>CrActina</i>). M= Marcador de peso molecular 1Kb.	33
Figura 2. 3 ARN total de los cultivos sujetos al tratamiento de 100 mM de NaCl a tiempos de exposición de 5, 30, 60 y 120 min.	34
Figura 2. 4 Análisis de la de expresión del gen <i>CrGPDH3</i> bajo los tratamientos de 100 mM de NaCl por 5, 30, 60 y 120 min. Se utilizó el gen <i>CrActina</i> como control positivo (+RT <i>CrActina</i>) y negativo (-RT <i>CrActina</i>). M= Marcador de peso molecular 1Kb.	35
Figura 2. 5 ARN total de los cultivos sujetos al tratamiento de 50 mM de NaCl a tiempos de exposición de 5, 30, 60 y 120 min.	36
Figura 2. 6 Análisis de la de expresión del gen <i>CrGPDH3</i> bajo los tratamientos de 50 mM de NaCl por 5, 30, 60 y 120 min. Se utilizó el gen <i>CrActina</i> como control positivo (+RT <i>CrActina</i>) y negativo (-RT <i>CrActina</i>). M= Marcador de peso molecular 1Kb.	37
Figura 2. 7 ARN total de los cultivos sujetos al tratamiento de 5 mM de NaCl a tiempos de exposición de 5, 30, 60 y 120 min.	38
Figura 2. 8 Análisis de la de expresión del gen <i>CrGPDH3</i> bajo los tratamientos de 5 mM de NaCl por 5, 30, 60 y 120 min. Se utilizó en gen de <i>CrActina</i> como control positivo (+RT <i>CrActina</i>) y negativo (-RT <i>CrActina</i>). M= Marcador de peso molecular 1Kb.	39
Figura 3. 1 Esquema del vector pSP124S con sus diferentes características así como la región policlonal del pBluescript SK.	56
Figura 3. 2 Esquema de la estrategia que se utilizó para subclonar al gen reportero <i>uidA</i> en el vector pSP124S.	58
Figura 3. 3 Esquema de la estrategia que se utilizó para clonar el 3'UTR del <i>RBCS2</i> en el pA1 y obtener como resultado el pA2.	59
Figura 3. 4 Esquema de la estrategia para subclonar el promotor del <i>CrGPDH3</i> en el plásmido pA2 y obtener como resultado el pCrGPDHGus A.	60
Figura 3. 5 Esquema de la obtención de los plásmidos denominados pCrGPDHGus B y pCrGPDHGUS C.	61

Figura 3. 6 Esquema de transformación por biobalística a <i>C. reinhardtii</i> con las construcciones génicas pCrGPDHGus A, B ó C. El pSP124S fue utilizado como control negativo (plásmido vacío).	65
Figura 3. 7 Estrategia experimental del “pool recombinante” para analizar la expresión del gen reportero <i>uidA</i> .	66
Figura 3. 8 Cultivo de <i>C. reinhardtii</i> . A) Cultivo en medio semisólido, B) Cultivo en medio líquido al final de su fase exponencial.	67
Figura 3. 9 Electroforesis de la extracción de ADN genómico de <i>C. reinhardtii</i> . ADNg1 y ADNg2 corresponden a dos muestras diferentes de esta extracción y M corresponde al marcador de peso molecular de 1Kb.	68
Figura 3. 10 Electroforesis de la amplificación del promotor y 5'UTR del <i>CrGPDH3</i> de <i>C. reinhardtii</i> . 1= amplicón esperado de 1979 pb, 2=control positivo, 3= control negativo. M= marcador de peso molecular de 1Kb.	69
Figura 3. 11 Electroforesis del producto de PCR purificado del promotor y 5'UTR del <i>CrGPDH3</i> de <i>C. reinhardtii</i> con un tamaño esperado de 1979 pb. M corresponde al marcador de peso molecular de 1 Kb.	69
Figura 3. 12 Electroforesis del análisis de restricción para el promA de <i>CrGPDH3</i> en pGEM-T Easy con la enzima <i>EcoRI</i> . Los carriles marcados con * fueron las que se mandaron secuenciar. M= Marcador de 1 Kb.	70
Figura 3. 13 Electroforesis de la amplificación de las longitudes más cortas del promotor del <i>CrGPDH3</i> y 5'UTR. A=región promA. B= región promC. CA- y CB- controles negativos.	71
Figura 3. 14 Electroforesis del análisis de restricción para los plásmidos recombinantes con la enzima de restricción <i>EcoRI</i> . Las clonas correspondientes al ppromB presentaron el inserto de 3Kb de pGEM-T-Easy y de 1466 pb de la región del promotor <i>CrGPDH3</i> . Las clonas pertenecientes al ppromC presentaron el inserto de 3Kb de pGEM-T-Easy y de 938 pb de la región promotora más corta del <i>CrGPDH3</i> . M= marcador de peso molecular de 2 Log (New England Biolabs).	72
Figura 3. 15 Electroforesis de la amplificación del gen reportero <i>uidA</i> . En el carril 1 se muestra el amplicón esperado del GUSPlus con 2053 pb. 2= control positivo del gen de actina de <i>C. reinhardtii</i> . 3= H2O ultrapura como control negativo. M= marcador de peso molecular 1Kb.	73
Figura 3. 16 Electroforesis del producto de PCR purificado del marco de lectura abierto del gen reportero <i>uidA</i> con un tamaño esperado de 2053 pb. M= corresponde al marcador de peso molecular de 1 Kb.	73
Figura 3. 17 Electroforesis del análisis de restricción con la enzima <i>EcoRI</i> para los plásmidos recombinantes con el gen reportero <i>uidA</i> con un tamaño de 2053 pb y el vector pGEM-T-Easy con 3Kb. M=marcador de peso molecular de 1Kb.	74
Figura 3. 18 Electroforesis de las muestras digeridas y purificadas. M=marcador de peso molecular de 1Kb. A) Inserto= gen reportero <i>uidA</i> con un tamaño de 2053 pb. B) Vector= pSP124S linearizado con un tamaño de 4132 pb.	75
Figura 3. 19 Electroforesis del análisis de restricción con las enzimas <i>BamHI</i> y <i>NotI</i> a los plásmidos recombinantes pA1. Las clonas 2, 4 y 5 corresponden al peso esperado de 2053 pb para el gen reportero <i>uidA</i> y 4132 pb perteneciente al vector pSP124S.	76
Figura 3. 20 Electroforesis del 3'UTR del RBCS2 y el pA1 linearizado. A) I= 3'UTR del RBCS2 (485 pb), M= marcador de peso molecular de 1 Kb. B) V= pA1 linearizado (6185 pb.) M=marcador de peso molecular 2 log.	76

- Figura 3. 21 Electroforesis del análisis de restricción con las enzimas *NofI* y *SacI* realizado al pA2. La clona 1 fue positiva con el peso esperado de 6185 pb correspondiente al pA1 y 485 pb perteneciente al 3'UTR del *RBCS2*..... 77
- Figura 3. 22 Electroforesis de promA y el pA2 linearizado. M=marcador de peso molecular de 1Kb. V= pA2 de 6670 pb. I= PromA de 1979 pb..... 78
- Figura 3. 23 Electroforesis del análisis de restricción con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* para los plásmidos recombinantes pCrGPDHGus A. La clonas 3 y 4 presentaron las bandas del peso esperado de 6670 pb correspondiente al pA2 y 1979 pb correspondiente al promA. 78
- Figura 3. 24 Electroforesis de promB, promC y pA2 linearizado. A) M=marcador de peso molecular 2 Log. B= promB con 1466 pb. C=promC con 938 pb. B) A2=pA2 con 6.5 Kb. M1= marcador de peso molecular de 1Kb. 79
- Figura 3. 25 Electroforesis del análisis de restricción con las enzimas *BamHI* y *EcoRI* para los plásmidos recombinantes pCrGPDHGus B y pCrGPDHGus C. 2 y 3: muestras que resultaron positivas con 6.5Kb correspondientes al pA2 y 1466 pb de promB (pCrGPDHGus B). 4 y 5: muestras positivas con 6.5Kb pertenecientes al pA2 y 938 pb de promC (pCrGPDHGus C). M= marcador de peso molecular de 2 Log..... 80
- Figura 3. 26 Muestras representativas de cajas de Petri con los cultivos de *C. reinhardtii* bombardeados por biobalística. 81
- Figura 3. 27 Electroforesis de la extracción de ADN genómico de cinco colonias potencialmente transformadas. A1 a A5 corresponden a las muestras potencialmente transformadas con CrGPDHGus A. WT es la cepa silvestre de *C. reinhardtii*, y el SP corresponde a una clona transformada con el pSP124S vacío. M es el marcador de 2 Log..... 81
- Figura 3. 28 Electroforesis de la PCR para detectar la presencia del gen *ble*. Las muestras de la A1 a A5 muestran el amplicón esperado de 456 pb al igual que la muestra SP. Como se esperaba la muestra WT no presentó amplificación. C+= control positivo de ADN plasmídico de las construcción CrGPDHGusA y C-= control negativo con agua ultrapura. 82
- Figura 3. 29 Electroforesis de la PCR para detectar la presencia del gen *uidA* en clonas recombinantes de *C. reinhardtii*. Las muestras de la A1, A2 y A3 muestran el amplicón esperado de 159 pb. Como se esperaba el WT no presento amplificación al igual que la muestra SP. C+= corresponde al control positivo de ADN plasmídico de las construcción CrGPDHGusA y C-= pertenece al control negativo de agua ultrapura..... 83
- Figura 3. 30 Electroforesis del ARN de las clonas recombinantes de *C. reinhardtii* con tratamiento de 50 mM de NaCl por 2 horas. Wt= cepa silvestre de *C. reinhardtii*, A1, A2, A3= clonas transformadas. SP= clonas transformadas con el plásmido vacío pSP124S.. 84
- Figura 3. 31 Expresión del *uidA* en respuesta a 50 mM de NaCl por 2 h en clonas de *C. reinhardtii* transformadas con pCrGPDHGus A. WT= cepa silvestre de *C. reinhardtii*, A1, A2, A3= clonas transformadas. SP= clonas transformadas con el plásmido vacío pSP124S..... 85
- Figura 3. 32 Cajas de Petri con colonias putativamente transformadas de *C. reinhardtii* después del bombardeo con los plásmidos pCrGPDHGus A, pCrGPDHGus B y pCrGPDHGus C, así como con pSP124S. Como controles de transformación se colocó cultivo de cepa silvestre de *C. reinhardtii* en medio de selección con zeocina y cultivo de cepa silvestre de *C. reinhardtii* en medio de cultivo TAP..... 86
- Figura 3. 33 ARN de muestras tratadas con 100 mM ó 0 mM de NaCl por 2 horas. WT= cepa silvestre de *C. reinhardtii*. Gus A, Gus B y Gus C corresponde a cada "pool" de 9

clonas de *C. reinhardtii* transformadas con los plásmidos pCrGPDHGus A, pCrGPDHGus B y pCrGPDHGus C respectivamente. SP= "pool" de 9 clonas de *C. reinhardtii* transformadas con el pSP124S vacío..... 87

Figura 3. 34 Evaluación de la inducibilidad del promotor *CrGPDH3* mediante la expresión del gen reportero *uidA* por RT-PCR en muestras tratadas con 100 mM de NaCl por 2 horas. WT= cepa silvestre de *C. reinhardtii*. Gus A, Gus B y Gus C corresponde a cada "pool" de 9 clonas de *C. reinhardtii* transformadas con los plásmidos CrGPDHGus A, CrGPDHGus B y CrGPDHGus C respectivamente. SP= "pool" de 9 clonas de *C. reinhardtii* transformadas con el pSP124S vacío. 88

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. 1 Comparación de las características de los sistemas de producción de proteínas recombinantes tradicionales con las de las microalgas. 11

Tabla 1. 2 promotores que se han utilizado para expresar proteínas recombinantes en el núcleo de *C. reinhardtii*..... 14

Tabla 1. 3 Genes reporteros utilizados en el núcleo de *C. reinhardtii*. 18

Tabla 3. 1 Oligonucleótidos específicos para la amplificación de tres diferentes longitudes de la región del promotor y 5'UTR del *CrGPDH3*, así como del gen reportero *uidA* que codifica para β -glucuronidasa. 51

RESUMEN

La microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* es considerada una plataforma atractiva para la producción de proteínas recombinantes, debido a su cultivo fácil, económico y su gran capacidad para acumular biomasa. Recientemente se ha despertado el interés en la utilidad de promotores inducibles para conducir la expresión de genes recombinantes en el núcleo de esta microalga. También se han identificado genes homólogos a glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) en *C. reinhardtii*, y se observó que la expresión de *CrGPDH3* fue inducida en respuesta a estrés osmótico por 200 mM de NaCl por dos horas. Por lo tanto, resulta atractivo determinar el potencial del promotor del gen *CrGPDH3* para conducir la expresión de un gen reportero de manera inducible.

La expresión del gen *CrGPDH3* se evaluó por RT-PCR bajo 5, 50, 100 y 200 mM de NaCl a diferentes tiempos (5, 30, 60 y 120 minutos) y se encontró que la expresión de este gen se induce bajo todas estas concentraciones a partir de los 5 minutos de exposición alcanzando el punto de expresión de la PCR a partir de una hora.

Por otra parte, se elaboraron tres construcciones de expresión que contenían tres fragmentos de diferente longitud correspondientes a la región del promotor más la región 5' no traducible (5' UTR) del gen *CrGPDH3* (promA, promB y promC) que incluyen al gen reportero *uidA*, y una secuencia terminadora del gen *RBCS2* de *C. reinhardtii*, y con ellas se transformó a *C. reinhardtii* mediante biobalística. Se evaluó la expresión del gen *uidA* en tres clonas individuales de *C. reinhardtii* transformadas con la construcción que contenía promA, y se encontró que esta secuencia fue capaz de conducir la expresión de este gen tanto en las muestras tratadas como no tratadas con 50 mM de NaCl. Posteriormente, se evaluó la expresión del gen *uidA* en un "pool" de nueve clonas transformadas con las construcciones que contenían ya sea promA, promB ó promC, y se observó que las tres secuencias de *CrGPDH3* fueron capaces para dirigir la expresión de este gen tanto en las muestras tratadas como no tratadas con 100 mM de NaCl. Por tanto, una secuencia de 938 pb que incluye el 5' UTR de *CrGPDH3* fue suficiente para conducir la expresión del gen reportero *uidA*. Sin embargo, será necesario continuar la investigación del promotor de *CrGPDH3*, para determinar si existe alguna secuencia río arriba que esté relacionada con la inducibilidad en presencia de NaCl, así como para incrementar los niveles de expresión obtenidos.

ABSTRACT

The green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* is considered an attractive platform for the production of recombinant proteins, due to its easy and economical culture and its high capacity to accumulate biomass. The use of inducible promoters to drive expression of recombinant genes in the nucleus of *C. reinhardtii* has been of interest. Recently, three glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) homologous genes were identified in *C. reinhardtii*, and it was observed that the expression of *CrGPDH3* gene was induced in response to osmotic stress at 200 mM NaCl for two hours. Therefore, it is interesting to determine the potential of *CrGPDH3* promoter to drive expression of a reporter gene in an inducible manner.

The expression of *CrGPDH3* was evaluated using RT-PCR in 5, 50, 100 and 200 mM NaCl at different times (5, 30, 60 and 120 minutes), and revealed that the expression of this gene was induced under all these concentrations, starting from since 5 minutes of exposure reaching the highest expression after one hour.

Moreover, three expression vectors were elaborated containing three fragments of different lengths corresponding to the promoter and the 5' untranslated region (5' UTR) of the *CrGPDH3* gene (promA, promB and promC) including the *uidA* reporter gene, a terminator sequence of the *C. reinhardtii* *RBCS2* gene. Then, these constructs were used to transform *C. reinhardtii* by biobalistics. The expression of the *uidA* gene was evaluated in the three individual *C. reinhardtii* transformed clones with the construct containing promA, and found that this sequence was able to drive the expression of this gene in both treated and untreated samples with 50 mM NaCl. Subsequently, the expression of *uidA* in a "pool" of nine clones transformed with constructs containing either promA, promB or promC. Was evaluated three sequences from *CrGPDH3* were capable of driving the expression of this gene both, in treated and untreated samples with 100 mM NaCl. Therefore, a 938 bp sequence which includes the 5' UTR *CrGPDH3* was sufficient to drive expression of the *uidA* reporter gene. However, it will be necessary to continue research of the *CrGPDH3* promoter, to determine whether any upstream sequence is related to inducibility in the presence of NaCl, as well as to increase the levels of expression obtained.

INTRODUCCIÓN

La microalga verde eucariota *Chlamydomonas reinhardtii* ha sido reconocida por su potencial tanto como plataforma para la expresión de proteínas recombinantes, como para la obtención de lípidos y otros metabolitos de interés comercial, debido a su cultivo fácil y económico, su tasa de crecimiento rápido y la factibilidad de su manipulación por ingeniería genética (Potvin y Zhang, 2010). Sin embargo, para esta aplicación es necesario contar con una alta expresión génica, y en este aspecto un factor muy importante es la regulación génica mediada por el promotor.

En *C. reinhardtii* solo se han caracterizado cinco promotores para la producción de proteínas recombinantes en el núcleo, entre los cuales el más estudiado para este fin es el promotor de tipo constitutivo HSP70A/RBCSS2 con un rendimiento de hasta 0.5% de proteína total soluble (Neupert *et al.* 2008; Quinn *et al.* 1999).

El uso de promotores inducibles para conducir la expresión de genes de interés biotecnológico en el núcleo de *C. reinhardtii* ha despertado la atención, ya que se podría tener un control temporal sobre el gen recombinante que se desee expresar mediante factores externos. Esta inducción podría ser realizada después de alcanzar una alta densidad de células sin interferir con el metabolismo celular (Lumbreras *et al.* 1998).

En un reciente estudio de nuestro grupo de investigación (Herrera-Valencia *et al.* 2012), se identificaron *in silico* tres genes homólogos a *GPDH* en el genoma nuclear de *C. reinhardtii*: *CrGPDH1*, *CrGPDH2* y *CrGPDH3*. Un análisis indicó que la expresión de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* es muy baja en condiciones normales de cultivo, mientras que *CrGPDH3* se expresa poco, pero que la expresión de ambos genes es inducida bajo estrés osmótico por dos horas a 200 mM de NaCl. Debido a lo anterior se hace atractivo el estudio de los promotores de estos genes, en particular del *CrGPDH3*, así como su potencial para conducir la expresión inducible de genes recombinantes de interés biotecnológico. En este sentido, es importante conocer la concentración mínima de NaCl a la cual se induce el gen nativo y el tiempo al cual ocurre esta inducción.

Por lo tanto, como primera parte de este trabajo se utilizó RT-PCR para evaluar la expresión del gen *CrGDPH3* y su sensibilidad para inducirse en respuesta a tratamientos de 5, 50, 100 y 200 mM de NaCl por tiempos de exposición de 5, 30, 60 y 120 min. Además, por medio de la base de datos PLACE se realizó una búsqueda en la región putativa del promotor *CrGDPH3* de secuencias que hayan sido caracterizadas previamente como elementos de respuesta en *cis* en plantas, con el fin de identificar elementos que pudieran estar regulando la inducibilidad de este gen con estrés osmótico por NaCl, estrés por sequía o estrés osmótico causado por otro tipo de sal.

Como segunda parte de este trabajo se realizó la clonación de tres fragmentos de la región que debe contener al promotor del gen *CrGDPH3* más su región 5' no traducible (5'UTR) para su caracterización, con el fin de determinar su capacidad de dirigir la expresión del gen reportero *uidA* de manera inducible en *C. reinhardtii*.

CAPITULO I

ANTECEDENTES

1.1 Generalidades de *Chlamydomonas reinhardtii*.

1.1.1 Características morfológicas.

Chlamydomonas reinhardtii es un organismo eucariota unicelular fotosintético considerado un sistema modelo para el estudio de procesos eucarióticos a nivel molecular (Harris, 2001). Así mismo, *C. reinhardtii* es fácilmente cultivable cuyas, ya que sus células crecen rápidamente. Tiene un ciclo biológico haplo-diploide, presenta una estructura polar y forma elipsoide, es de tamaño aproximado de 10 μm de diámetro dependiendo en el medio donde se encuentre. Su pared celular está compuesta de hidroxiprolina y es rica en glicoproteínas que se asemejan a la pared de las plantas. También, esta microalga contiene dos vacuolas contráctiles localizadas en la parte anterior de la célula, tiene múltiples mitocondrias dispersas en el citosol, y dos flagelos de 10 a 12 μm de longitud que le confieren movilidad (Harris, 2001).

Por otra parte *C. reinhardtii* cuenta con un único cloroplasto con forma de copa que ocupa aproximadamente el 40% del volumen celular (Rochaix, 1995) donde se localiza su aparato fotosintético (Figura 1.1).

Al igual la microalga cuenta con un núcleo, un nucléolo, membrana nuclear continúa hasta el retículo endoplásmico y cerca de éste se encuentran de 1 a 4 aparatos de Golgi. Otra estructura de importancia es la mancha ocular, rica en carotenos y que se cree que está encargada de percibir y dirigir la luz hacia el fotorreceptor verdadero de la microalga (Harris, 2001).

En condiciones de oscuridad y heterotrofia *C. reinhardtii* es capaz de ensamblar correctamente sus complejos fotosintéticos y crecer empleando acetato como fuente alternativa de carbono, el cual es asimilado por la ruta del glioxilato (Harris, 2001). Por tanto puede crearse fotoautotrófica, mixotrófica o heterotróficamente, lo que ha permitido el estudio de numerosos mutantes fotosintéticos (Nickelsen y Kuck, 2000).

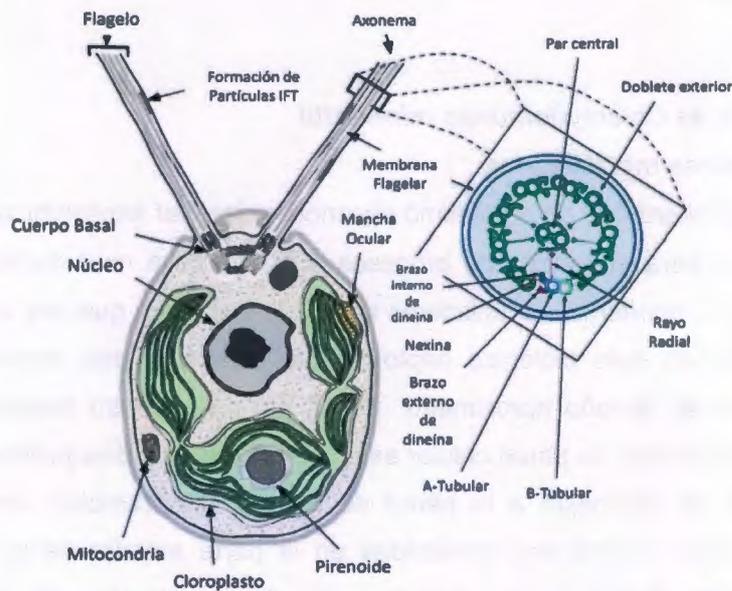


Figura 1. 1 Representación de la estructura celular de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Merchant *et al.* 2007).

1.1.2 *Chlamydomonas reinhardtii* como organismo modelo.

C. reinhardtii es una microalga que puede ser cultivada con facilidad a un costo económico, tiene un crecimiento rápido, se puede producir a gran escala y es fácil de transformar y manipular por medio de ingeniería genética. Esta microalga ha sido utilizada como organismo experimental para el estudio molecular y genético de procesos celulares, tales como la fotosíntesis, el desarrollo del cloroplasto, la formación flagelar y movilidad (Grossman, 2005). *C. reinhardtii* ha demostrado también ser un sistema apropiado para el estudio de sobreexpresión de genes (Kumar *et al.* 2005), así como en estudios de producción de proteínas de interés biotecnológico (Schroda *et al.* 2002).

Se han desarrollado técnicas de transformación genética para sus tres genomas de *C. reinhardtii* (del núcleo, cloroplasto y mitocondria). De hecho, *C. reinhardtii* fue el primer organismo en el que se logró la transformación del genoma del cloroplasto (Boynton *et al.*

1988) y también el primer eucariota fotosintético en el que se transformó el genoma mitocondrial (Randolph-Anderson *et al.* 1993). La transformación nuclear estable fue realizada con la técnica de bombardeo de microproyectiles de tungsteno (Mayfield y Kindle, 1990).

Por otro lado, el proyecto del genoma de *Chlamydomonas* presentó la secuencia completa del genoma del cloroplasto, el cual mide aproximadamente 204 Kb (Maul *et al.* 2002), y recientemente la totalidad de su genoma nuclear (Merchant *et al.* 2007). Los genomas se encuentran disponibles para cualquier búsqueda o requisitos de clonación, lo que nos brinda la posibilidad de analizar los genomas en busca de genes que sean de nuestro interés. El tamaño del genoma nuclear se estima en aproximadamente 121 MB (Merchant *et al.* 2007). Es rico en guaninas y citocininas (aproximadamente 62%) este contenido alto de GC puede producir dificultades en la clonación de genes (Harris, 2001). Las herramientas genéticas para la microalga *C. reinhardtii* aún se están desarrollando. Sin embargo, este organismo unicelular fotosintético ha demostrado una promesa significativa como plataforma para la expresión de proteínas recombinantes. En los últimos años, las técnicas moleculares han permitido desarrollar la expresión sólida de genes en el genoma nuclear y en plástidos. Con estos avances, muchos grupos de investigación han examinado la flexibilidad de esta microalga como reactores biológicos capaces de producir proteínas de alto valor comercial (Specht *et al.* 2010).

1.1.3 *C. reinhardtii* y la respuesta al estrés osmótico.

Una condición de estrés osmótico se define como una disminución en el potencial hídrico del ambiente en el cual se está desarrollando un organismo. La respuesta inmediata, que se da en segundos, es una salida del agua intracelular seguida de un proceso adaptativo más largo para tratar de llevar a cabo un ajuste osmótico. Debido al movimiento de agua, las concentraciones intracelulares de iones y biomoléculas se incrementan dando como resultado una disminución en la actividad celular; una vez que el organismo se adaptó, se retoma el crecimiento (Watanabe *et al.* 2008).

En esta fase de aclimatación de las células ante estrés osmótico se inducen mecanismos involucrados en la resistencia al estrés, como son el aumento en la concentración intracelular de glicerol y la exclusión de iones tóxicos (Folch-Mallol *et al.* 2004).

Microalgas como *C. reinhardtii* responden ante el estrés osmótico sintetizando glicerol como un metabolito osmorregulador, esta respuesta le permite ser capaz de soportar ciertas concentraciones salinas (hasta 200 mM de NaCl) (León y Galván 1994; Avron, 1986). Por otro lado, ha sido demostrado que el estrés osmótico por NaCl aumenta la acumulación de lípidos en *C. reinhardtii* después de la exposición a 100 mM de NaCl por 48 h, muy posiblemente porque el estrés osmótico causa un aumento en la producción de glicerol en esta microalga para mantener el balance osmótico intra y extra celular. Como los lípidos están compuestos de glicerol, probablemente parte de este glicerol que se produce se utiliza para la síntesis de lípidos, causando un aumento en la producción de éstos (Herrera-Valencia *et al.* 2011; Siaut *et al.* 2011).

1.1.4 *C. reinhardtii* como biorreactor para la producción de proteínas recombinantes.

Entre los organismos modificados que actúan como “reactores biológicos” capaces de sintetizar proteínas recombinantes se encuentran las bacterias, las levaduras, los insectos, las plantas y los mamíferos, así como líneas celulares derivadas de los tres últimos. Cada sistema de producción posee diferentes características en términos de rendimiento proteico, facilidad de manipulación y costos de producción, por lo que cada uno tiene diferentes ventajas y desventajas (Specht *et al.* 2010).

Recientemente, *C. reinhardtii* ha surgido como una alternativa nueva y atractiva para la producción de proteínas recombinantes, debido principalmente a su cultivo fácil y económico, su gran capacidad para acumular biomasa y ser inocua para el ser humano (Potvin y Zhang, 2010). En la siguiente tabla se hace una comparación de las características que presentan los organismos empleados comúnmente como biorreactores para la producción de proteínas recombinantes incluyendo las microalgas como una nueva alternativa para este fin.

Tabla 1. 1 Comparación de las características de los sistemas de producción de proteínas recombinantes tradicionales con las de las microalgas.

Características	Bacterias	Levaduras	Cultivo de células de mamífero	Animales transgénicos	Plantas transgénicas	Microalgas
Tiempo de producción	Corto	Mediano	Largo	Largo	Largo	Corto
Costo de producción	Mediano	Mediano	Alto	Alto	Bajo	Muy bajo
Costo de escalamiento	Alto	Alto	Alto	Alto	Bajo	Muy bajo
Costo de almacén	Económico -20°C	Económico -20°C	Costoso, NL	Costoso	Económico, TA	Económico, TA
Propagación	Fácil	Fácil	Difícil	Factible	Fácil	Muy fácil
Tamaño de genes	Desconocido	Desconocido	Limitado	Limitado	No limitado	No limitado
Glucosilación	Ausente	Incorrecto	"Correcto"	"Correcto"	"Correcto"	"Correcto"
Ensamble de proteína	No	No	No	Si	Si	Si

NL = Nitrógeno líquido; TA = Temperatura Ambiente (Rivera *et al.* 2011).

Por otro lado, los transgenes insertados en *C. reinhardtii* pueden ser expresados en cualquiera de los tres genomas ya secuenciados (núcleo, cloroplasto o mitocondria) (Rochaix, 2002), Siendo el cloroplasto el mas estudiado para producción de proteínas recombinantes debido a las propiedades que posee, como la inserción de genes por medio de recombinación homóloga (Franklin y Mayfield, 2005). Sin embargo, varias proteínas terapéuticas necesitan un correcto procesamiento post-traducciona para ser funcionalmente activas y este proceso no siempre ocurre en los plástidos (Eichler-Stahlberg *et al.* 2009). En este caso, la expresión del transgen dentro del genoma nuclear de *C. reinhardtii* ofrece la posibilidad de dirigir las proteínas recombinantes a los organelos que contienen todas las enzimas responsables para realizar todo este proceso. Además se ofrece la posibilidad de la secreción de la proteína recombinante hacia el medio de cultivo mediante una señal de secreción, lo cual permitiría que la purificación de la proteína sea del sobrenadante del cultivo y no de un extracto total de células, lo que simplificaría el proceso de obtención y bajaría el costo de producción (Lauersen *et al.* 2012).

Con respecto a lo anterior actualmente se ha elucidado información acerca de como regular la expresión de transgenes nucleares en *C. reinhardtii*, tales como la optimización del codón para que coincida con el 62% contenido de GC con el genoma nuclear de esta microalga, así como el mejoramiento de la expresión génica mediante la caracterización de promotores y la identificación de elementos regulatorios específicos, como la inserción de intrones de genes nativos (Eichler- Stahlberg *et al.* 2009; Lumbreras *et al.* 1998).

1.2 Uso de promotores para la producción de proteínas recombinantes en el núcleo de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Como se mencionó anteriormente se ha propuesto producir proteínas recombinantes el núcleo de *C. reinhardtii* debido a sus diversas ventajas, sin embargo para que este procedimiento sea llevado a cabo de manera exitosa se necesitan ciertos requisitos, siendo uno de los más importantes la utilización de un promotor adecuado, puesto que se ha observado que tanto la acumulación de transcrito, como la acumulación de proteína varían dependiendo de la secuencia regulatoria que se utilice, debido a que estos están involucrados con la eficiencia de transcripción, estabilidad del transcrito y eficiencia en la traducción. Es por ello que actualmente se han realizado varios estudios utilizando diferentes promotores con el fin de dirigir e incrementar la expresión de genes de interés en *C. reinhardtii* (Stahlberg *et al.* 2009; Neupert *et al.* 2009).

1.2.1 Promotores constitutivos para la producción de proteínas recombinantes en el núcleo *C. reinhardtii*.

Dentro de los promotores, los de tipo constitutivo son aquellos que permiten la expresión del gen en forma continua durante todo el desarrollo celular. Los promotores pueden ser modificados artificialmente (*in vitro*) con el fin de aumentar, disminuir o evitar la expresión del gen que regulan. Además, es posible adicionar un intrón o unir secuencias de distintos promotores.

Entre los promotores nucleares que se han caracterizado se pueden mencionar el promotor de tipo constitutivo de gen *RBCS2* (Rochaix y Purton, 1996) el cual fue fusionado a la región codificante del gen *ble* de *Streptoalloteichus hindustanus* que

confiere resistencia a fleomicina, zeocina y neomicina. Este trabajo fue una de las primeras evidencias de una transformación y expresión estable de un transgen en *C. reinhardtii*, obteniendo como resultado un marcador de selección para el genoma nuclear de esta microalga.

Posteriormente se comenzó a investigar cómo mejorar la expresión de transgenes por medio de la colocación de intrones nativos de *C. reinhardtii*. Este estudio fue realizado por Lumbreras *et al.* 1998, donde utilizó al promotor más el intrón del gen *RBCS2* fusionado al marcador de selección ble. Sus evidencias reportaron un mejoramiento en el aumento de ARNm y la acumulación de proteínas independientemente de la posición del intrón.

Aunado a esto, en un estudio más reciente realizado por Eichler-Stahlberg *et al.* 2009 y siguiendo las estrategias de los autores anteriores, este realizó una fusión de secuencias promotoras de los genes *RBCS2* y *Hps70A* creando así un promotor binario para conducir la expresión del gen reportero *CrLuc*. A esta construcción génica se le colocaron los intrones del *RBCS2* en ubicaciones diferentes creando varios constructos. En los resultados de este trabajo se pudo observar hasta un 449% de actividad del gen reportero *CrLuc*, comparado con el 100% de actividad de su constructo control.

En la siguiente tabla se muestra las proteína recombinantes producidas en el núcleo de *C. reinhardtii*.

Tabla 1. 2 promotores que se han utilizado para expresar proteínas recombinantes en el núcleo de *C. reinhardtii*.

Promotor utilizado	Gen expresado	Tipo de proteína	Función	Rendimiento Proteína total soluble	Referencia
HSP70A/RBCS2	Xin1	Xilanasa	Enzima técnica	0.25%	Rasala <i>et al.</i> 2012
HSP70A/RBCS2	GBSS	Anticuerpo contra la malaria	Anticuerpo monoclonal	0.1 %	Dauvillee <i>et al.</i> 2010
HSP70A/RBCS2	Sep15	Selenioproteína	Terapéutico	0.1%	Hou <i>et al.</i> 2013

1.2.2 Promotores inducibles para la producción de proteínas recombinantes en el núcleo *C. reinhardtii*.

La utilización de promotores de tipo inducible para la producción de proteínas recombinantes en el núcleo de *C. reinhardtii* ha despertado el interés puesto que permitiría la expresión de un gen recombinante después de alcanzar una alta densidad celular, y por tanto una mayor acumulación proteica recombinante interfiriendo muy poco con el metabolismo para la multiplicación celular. Otra ventaja que presenta este tipo de promotor es el de conducir una muy baja o casi nula expresión basal y solamente aumentar esta expresión ante la presencia de un inductor, a diferencia del constitutivo que se expresa durante todo el desarrollo celular. Además, cabe señalar que el contar con promotores inducibles se permitiría la expresión de proteínas de interés comercial tóxicas para la célula.

Uno de los primeros estudios realizados con un promotor inducible en *C. reinhardtii* fue el realizado por Ohresser *et al.* 1997 con el promotor del gen de la nitrato reductasa (*nit1*), la cual es una enzima involucrada en la asimilación del nitrógeno en el medio, por lo que este promotor se reprime en presencia de amoníaco y esta se induce cuando las células tienen la presencia de nitratos o nitritos en su medio. A este promotor se le fusionó el

gen reportero de la arilsulfatasa (Ars). Los resultados obtenidos indicaron un aumento en la actividad de la Ars en presencia de nitrato después de 24 horas de ser inducida, a comparación de su baja expresión basal en presencia de amoniaco.

En paralelo, Villand *et al.* 1997 realizó un estudio acerca del promotor inducible del gen de la anhidrasa carbónica (*Ca1*), la cual se expresa cuando se presentan bajas condiciones de CO₂ en el medio, puesto que se cree que cuando las células de *C. reinhardtii* se encuentran en estas condiciones, estas adquieren la habilidad para acumular carbono inorgánico con el fin de soportar la fijación fotosintética. A este promotor se le fusionó el gen reportero de la arisulfatasa (Ars). La evidencia de este trabajo reportó un aumento en la actividad del gen reportero mencionado después de 9 horas de ser inducido a bajas concentraciones de CO₂, mientras que en condiciones normales no se logró identificar expresión basal del gen reportero.

Otro de los estudios fue el realizado por Ferrante *et al.* 2008 con el promotor inducible del gen *CYC6* que codifica para el citocromo C6. En *Chlamydomonas reinhardtii* el citocromo C6 en condiciones limitantes de cobre, sustituye a la plastocianina (ya que esta es degradada para redistribuir cobre) actuando como disipador biológico de cobre. La deficiencia enciende al *CYC6*. La adición de níquel o cobalto también tienen efecto en este gen. En este trabajo, el promotor del *CYC6* se le fusionó el gen reportero CrLuc. Los resultados de este trabajo mostraron el incremento de la actividad del CrLuc después de 16 horas de inducción con NiCl₂, mientras que la muestra no tratada no pudo identificarse expresión basal.

Por otra parte el estudio realizado por Schroda *et al.* 2000 mostraron la capacidad del promotor inducible *Hsp70A* (enzima responsable para proteger a la célula de estrés térmico) para conducir la expresión del gen reportero ARS bajo un choque térmico. Los resultados de este trabajo mostraron un aumento en la actividad del gen reportero después de hora y media de inducción, datos que concuerdan con el número de copias ARNm que se acumularon en ese tiempo.

Como se puede observar en la literatura no se han reportado muchos promotores para la expresión de proteínas recombinantes, por lo que todavía sigue siendo un reto la búsqueda de estos para que favorezcan e incrementen la expresión de genes de interés

y se encuentren disponibles para estudios posteriores o bien para su futura comercialización en masa.

1.2.3 El gen *GPDH* que codifica para la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa en *Chlamydomonas reinhardtii*.

En un estudio reciente realizado en nuestro grupo del laboratorio (Herrera-Valencia *et al.* 2012), se identificaron y caracterizaron genes que codifican para la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) en *C. reinhardtii*. Esta enzima está involucrada en la síntesis de glicerol y el metabolismo de los lípidos. La enzima GPDH cataliza la conversión de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y NADH (Dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma reducida) a glicerol-3-fosfato (G-3-P), y NAD⁺ (Dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma oxidada). A su vez, el glicerol-3-fosfato es utilizado como sustrato para obtener glicerol, o ser usado como precursor para desencadenar la ruta de los triacilglicéridos (He *et al.* 2007). Herrera-Valencia *et al.* (2012) identificaron *in silico* tres genes nucleares homólogos a *GPDH*: *CrGPDH1*, *CrGPDH2* y *CrGPDH3*. Todas estas secuencias mostraron una significativa similitud con los genes *GPDH* de la microalga *Dunaliella salina* y *Dunaliella viridis*.

Por otro lado, en este estudio de acuerdo a un programa de predicción de péptidos señal, se encontró que únicamente *CrGPDH2* y *CrGPDH3* contienen en su extremo N-terminal un péptido señal de tránsito al cloroplasto, por lo que muy posiblemente correspondan a GPDHs con localización en este organelo.

El *CrGPDH1* no presentó péptido señal y se sugiere que esta GPDH tenga localización citosólica como se ha observado en la microalga *Dunaliella tertiolecta*.

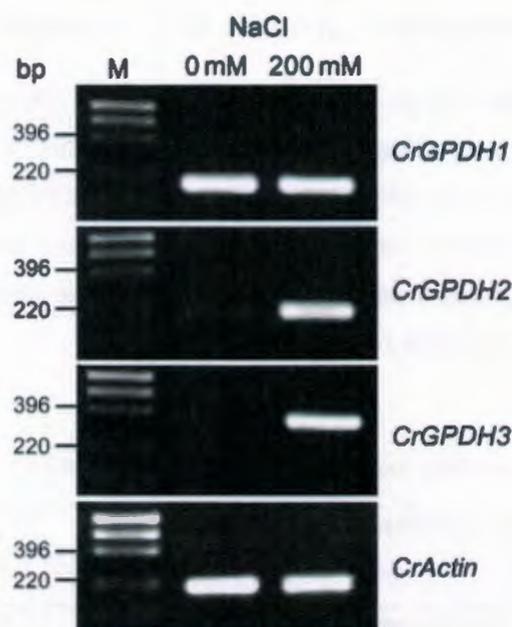


Figura 1. 2 Análisis de la expresión del *CrGPDH1*, *CrGPDH2* y *CrGPDH3* por RT-PCR en *C. reinhardtii* después de 2 horas a 0mM o 200 mM de NaCl. Como un control positivo con una banda esperada de aproximadamente 200 pb fue amplificado el gen de actina de *C. reinhardtii* a partir de ADNc. El marcador de peso molecular es de 1Kb (Herrera-Valencia *et al.* 2012).

El análisis de expresión indicó que la expresión de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* es muy baja, tanto que para el *CrGPDH3* es difícil de detectarse en un gel de agarosa, pero que la expresión de ambos genes es inducida bajo estrés salino por dos horas a 200 mM de NaCl. Debido a lo anterior se sugirió la posibilidad de que estos genes estén involucrados en osmorregulación y que jueguen un papel importante para la supervivencia de la célula bajo condiciones de estrés osmótico. Por otra parte, también sería interesante estudiar los promotores de estos genes, en particular del *CrGPDH3*, así como su potencial para conducir la expresión inducible de genes recombinantes de interés biotecnológico.

1.3 Genes reporteros expresados en el núcleo de *C. reinhardtii*.

Un gen reportero es aquel cuyo producto es fácilmente detectable. Se utiliza en construcciones genéticas para verificar la transferencia del transgén a una célula o tejido, o para estudiar la actividad de promotores y otras secuencias reguladoras. En el núcleo de *C. reinhardtii* se han utilizado varios genes reporteros para evaluar las secuencias reguladoras de diferentes genes y su capacidad para expresar proteínas recombinantes como se puede observar en la tabla 1.2.

Tabla 1. 3 Genes reporteros utilizados en el núcleo de *C. reinhardtii*.

Gen reportero	Gen producto	Método de prueba	Referencia
ARS	Arisulfatasa	Absorbancia	Davies <i>et al.</i> 1992
GFP	Proteína verde fluorescente	Luminiscencia	Fuhrmann <i>et al.</i> 1999
LUC	Luciferasa	Luminiscencia	Ferrante <i>et al.</i> 2008
GUS/uidA	β -glucuronidasa	Histoquímica o fluorométrica	Kumar <i>et al.</i> 2004

1.3.1 El gen reportero GUSPlus (*uidA*).

Para poder evaluar la capacidad que tiene un promotor para conducir la expresión de un gen de interés se necesita de un gen reportero, debido a que se puede detectar fácilmente su expresión con ayuda de ensayos bioquímicos.

Un claro ejemplo de genes reporteros es el de nombre comercial GUSPlus o bien *uidA* (aislado de *Staphylococcus sp.*) (Broothaerts *et al.* 2005) que se encuentra comercialmente disponible en la galería de los laboratorios de CAMBIA. Este gen codifica para la enzima β -glucuronidasa encargada de hidrolizar al 4-metil-umbelliferil- β -D-

glucuronido (MUG) y el producto fluorescente generado llamado 4-metil-umbelliferona (4-MU) puede ser fácilmente detectado por medio de fluorimetría.

La β -glucuronidasa ha servido en varios estudios para evaluar promotores endógenos en microalgas, debido a su sensibilidad y estabilidad tal es el caso del estudio realizado por *Li et al.* (2009) donde evaluaron la capacidad del promotor del gen de la anhidrasa carbonica de *Dunaliella salina* para inducirse ante concentraciones estresantes de NaCl.

En otro estudio realizado por *Uji et al.* (2012) se pudo observar como la expresión del gen la β -glucuronidasa ayudó a caracterizar al promotor del gen *pyKPA1*, gen que codifica para bombas de sodio en la macroalga roja *Porphyra yezoensis* con el objetivo de entender las preferencias de los mecanismos de regulación transcripcional en gametofitos y esporofitos.

En la microalga verde *C. reinhardtii* se ha observado la expresión del gen reportero de la β -glucuronidasa por medio de ensayos histoquímicos realizado por *Kumar et al.* (1999). En este estudio transformaron genéticamente mediante *Agrobacterium tumefaciens* a *C. reinhardtii* con el plasmido 1304 que contiene al *uidA* como reportero y por medio de un ensayo histoquímico estos autores pudieron observar la tinción azul de las células de *C. reinhardtii* (figura 1.3) producto de la hidrólisis del sustrato X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -glucuronide) por la β -glucuronidasa recombinante.

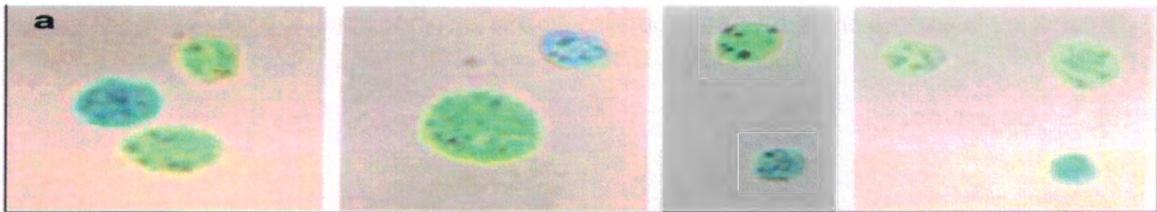


Figura 1. 3 Detección histoquímica de la actividad del *uidA* en células transformadas de *C. reinhardtii* (*kumar et al.* 2004).

1.4 Justificación

Estudios previos han demostrado la utilidad del uso de promotores inducibles para conducir la expresión de genes recombinantes de interés en el núcleo de la microalga verde *C. reinhardtii*. Los promotores inducibles permiten tener un control temporal sobre la expresión del gen recombinante mediante factores externos. Sin embargo, un obstáculo importante para *C. reinhardtii* es la pobre expresión de transgenes en su genoma nuclear, siendo una de las razones de los pocos estudios que existen acerca de la caracterización de promotores adecuados, los cuales hasta la fecha no han tenido resultados significativos para conducir la expresión de genes de interés, presentando niveles por debajo del 1% de acumulación de proteína total soluble (PTS), siendo al menos 1% de PTS lo necesario para que se considere comercialmente rentable. Por lo tanto, es necesario evaluar otros promotores inducibles que puedan conducir la expresión de genes de interés biotecnológico en el núcleo de *C. reinhardtii*, por lo que en este trabajo se propone la caracterización del promotor del gen *CrGPDH3* de la microalga verde *C. reinhardtii* y la evaluación de su potencial para conducir la expresión de un gen reportero de manera inducible.

1.5 Hipótesis.

El promotor del gen *CrGPDH3* de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* es capaz de conducir la expresión de un gen reportero de manera inducible.

1.6 Objetivos.

1.6.1 Objetivo general.

Caracterizar al promotor del gen *CrGPDH3* de la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* y evaluar su potencial para conducir la expresión de un gen reportero de manera inducible.

1.6.2 Objetivos específicos.

1. Analizar la expresión del gen *CrGPDH3* en respuesta a diferentes tiempos de exposición y concentraciones de NaCl.
2. Evaluar la capacidad del promotor del gen *CrGPDH3* para conducir la expresión del gen reportero *uidA* de manera inducible.

1.7 Estrategia experimental.

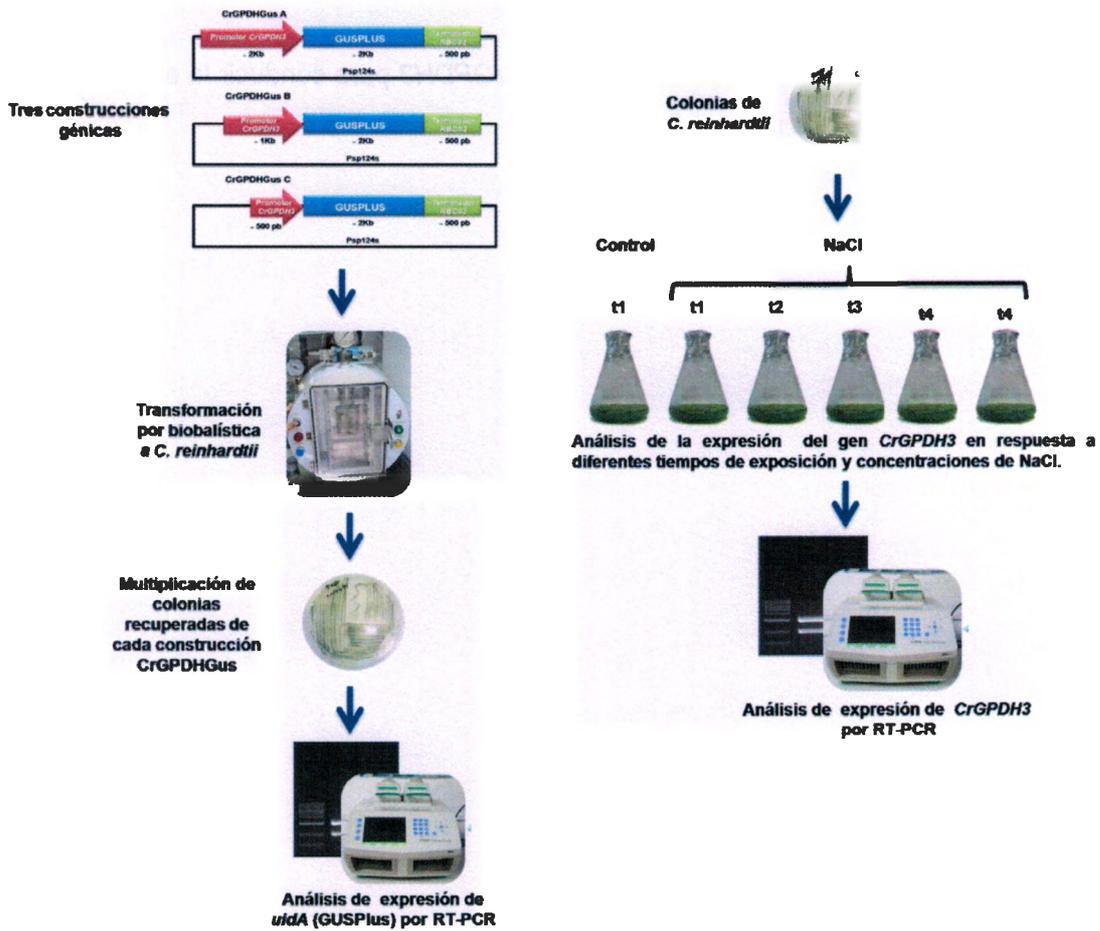


Figura 1. 4 Estrategia experimental para caracterizar al promotor del gen *CrGPDH3* en la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*.

1.8 Bibliografía.

- Boynton J. E., Gillham N. W., Harris E. H., Hosler J. P., Johnson A. M., Jones A. R. (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240, 1534-1538.
- Davies J. P., Weeks D., Grossman J. A. (1992) Expression of the arylsulfatase gene from the β_2 -tubulin promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nucleic Acids Res* 20, 2959-2965.
- Eichler-Stahlberg E., Weisheit W. A., Ruecker M. A., Heitzer M. J. (2009) Strategies to facilitate transgene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 229, 873-883.
- Ferrante P., Catalanotti C., Bonente G. (2008) An optimized, chemically regulated gene expression system for *Chlamydomonas*. *PLoS ONE* 3, e3200.
- Fuhrmann M., Wolfgang O., Hegemann P. (1999) A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* 19, 353-361
- Grossman A. R. (2005) Paths toward algal genomics. *Plant Physiol* 137, 410-427.
- Harris E. (2001) *Chlamydomonas* as a model organism. *Plant Physiol* 52, 363-406.
- He Q. H., Qiao D. R., Bai L. H., Zhang Q. L., Yang W. G., Li Q., Cao Y. (2007) Cloning and characterization of a plastidic glycerol 3-phosphate dehydrogenase cDNA from *Dunaliella salina*. *Plant Physiol* 164, 214-220.
- Herrera-Valencia V. A., Macario-González L. A., Casais-Molina M. L., Beltran-Aguilar A. G., Peraza-Echeverria S. (2012) *In Silico* Cloning and Characterization of the Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase (GPDH) Gene Family in the Green Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Microbiol* 64, 477-485.
- Kumar S. V., Misquitta R., Siva V., Jagadeeswar B., Rajam M. V. (2003) Genetic transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci* 166, 731-738.
-

- Kumar S.V., Basu B., Rajam M. V. (2005) Modulation of polyamine levels influence growth and cell division in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiol Mol Biol Plants* 11, 1-6.
- Mayfield S., Kindle K. (1990) Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by using a *C. reinhardtii* gene as the selectable marker. *Proc Natl Acad Sci* 87, 2087-2091.
- Mayfield S., Franklin S., (2005) Expression of human antibodies in eukaryotic micro-algae. *Vaccine* 23, 1828–1832.
- Maul J. E., Lilly J. W., Cui L., Pamphilis C. W., Harris E., Stern D. B. (2002) The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats. *Plant Cell* 14, 2659–2679.
- Merchant S., Prochnik S. E., Vallon O., Harris E., Karpowicz S. J., Witman G. B., Terry A., Salamov A., Fritz-Laylin L. K., Maréchal-Drouard L., Marshall W. F., Qu L. H., Nelson D. H., Sanderfoot A. A., Spalding M. H., Kapitonov V. V., Ren O., Ferris P., Lindquist E., Shapiro H., Lucas S. M., Grimwood J., Schmutz J., Chlamydomonas Annotation Team, JGI annotation Team, Grigoriev I. V., Rokhsar D. S., Grossman A. (2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318, 245-251.
- Nickelsen J., Kuck U. (2000) The unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* as an experimental system to study chloroplast RNA metabolism. *Naturwissenschaften* 87, 97-107.
- Neupert J., Karcher D., Bock R. (2008) Generation of *Chlamydomonas* strains that efficiently express nuclear transgenes. *Plant J* 57, 1140–1150.
- Lauersen K. J., Berger H., Mussgnug J., Kruse O. (2012) Efficient recombinant protein production and secretion from nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotechnol* 167, 101– 110.
- Li j., Lu Y., Xue L., Xie H. (2009) A structurally novel salt-regulated promoter of duplicated carbonic anhydrase gene 1 from *Dunaliella salina*. *Mol Biol Rep* 11, 43–1154.

- Lumbreras V., Stevens D. R., Purton S. (1998) Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron. *Plant J* 14, 441–447.
- Ohresser M., Matagne R. F., Loppes R. (1997) Expression of the arylsulphatase reporter gene under the control of the nit1 promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet* 31, 264–271.
- Potvin G., Zhang Z., (2010) Strategies for high-level recombinant protein expression in transgenic microalgae: A review. *Biotechnol Adv* 28, 910–918.
- Quinn J., Nakamoto J., Merchant S. (1999) Induction of Coproporphyrinogen Oxidase in *Chlamydomonas* Chloroplasts Occurs via Transcriptional Regulation of *Cpx1* Mediated by Copper Response Elements and Increased Translation from a Copper Deficiency-specific Form of the Transcript. *J Biol Chem* 274, 14444–14454.
- Randolph-Anderson B. L., Boynton J. E., Gillham N. W., Harris E., Johnson A. M., Dorthu M. P., Matagne R. F. (1993). Further characterization of the respiratory deficient dum-1 mutation of *Chlamydomonas reinhardtii* and its use as a recipient for mitochondrial transformation. *Mol Genet Genomics* 236, 235-244.
- Rivera R. A., Peraza-Echeverria S., Herrera-Valencia V. A. (2011) La microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*: nueva alternativa para la producción de proteínas recombinantes de interés médico. *Ciencia* 2-9.
- Rochaix J. D. (1995) *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Annu Rev Genet* 29, 209–230.
- Rochaix J. D. (2002) The three genomes of *Chlamydomonas*. *Photosynth Res* 73, 285–293.
- Rochaix J. D., Purton S. (1996) The bacterial phleomycin resistance gene ble as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*. *Mol Gen Genet* 251, 23–30.

Specht E., Miyake-Stoner S., Mayfield S. (2010) Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production. *Biotechnol Lett* 32, 1373–1383.

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

Uji T., Mizuta H., Saga N. (2012) Characterization of the Sporophyte-Preferential Gene Promoter from the Red Alga *Porphyra yezoensis* Using Transient Gene Expression. *Mar Biotechnol* 15,188-196.

CAPITULO II

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *CrGPDH3* EN RESPUESTA A DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICIÓN Y CONCENTRACIONES DE NaCl.

2.1 Introducción.

Algunas especies de microalgas verdes sobreviven en ambientes salinos acumulando metabolitos intracelularmente que le permiten obtener un balance osmótico. El glicerol es el soluto osmorregulador más importante en los géneros de microalgas verdes halotolerantes como *Dunaliella*, *Symbiodinium*, *Asteromonas* y en algunas especies no halotolerantes del género *Chlamydomonas* (Ben-Amotz y Avron, 1983). De acuerdo con He *et al.* (2007), los genes *GPDH* que codifican para la enzima glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa, son los responsables de la síntesis de glicerol durante la osmorregulación en microalgas similar a como sucede en las levaduras, en la cuales se ha observado la acumulación de este osmolito en respuesta a estrés osmótico por NaCl. *Chlamydomonas reinhardtii*, una microalga verde de agua dulce no halotolerante, ha sido reportada como capaz de soportar estrés salino de hasta 200 mM de NaCl, por encima de este valor no hay crecimiento, sino degradación del cultivo. La primera reacción de *C. reinhardtii* ante el estrés salino es la acumulación de glicerol como soluto osmorregulador para mantener el balance osmótico intra y extra celular y esta acumulación incrementa conforme mayor es la salinidad en el medio (León y Galván, 1994). Además, cabe señalar que reciente se ha reportado en *C. reinhardtii* que el estrés por 20 a 100 mM de NaCl puede inducir la acumulación de triacilglicéridos (Siaut *et al.* 2011).

En un reciente estudio de nuestro grupo de investigación (Herrera-Valencia *et al.* 2012), se identificaron *in silico* tres genes homólogos a *GPDH* en el genoma nuclear de *C. reinhardtii*: *CrGPDH1*, *CrGPDH2* y *CrGPDH3*. El análisis de expresión indicó que la expresión de los genes *CrGPDH2* y *CrGPDH3* es muy baja, tanto que para el *CrGPDH3* es difícil de detectarse en un gel de agarosa, pero que la expresión de ambos genes es inducida bajo estrés salino por dos horas a 200 mM de NaCl. Debido a lo anterior se sugirió la posibilidad de que estos genes estén involucrados en osmorregulación y que

jueguen un papel importante para la supervivencia de la célula bajo condiciones de estrés osmótico. Por otra parte, también sería interesante estudiar los promotores de estos genes, en particular del *CrGPDH3*, así como su potencial para conducir la expresión inducible de genes recombinantes de interés biotecnológico. En este sentido, es importante conocer la concentración mínima de NaCl a la cual se induce el gen nativo y el tiempo al cual ocurre esta inducción.

Por lo tanto, en este capítulo se utilizó RT-PCR para evaluar la expresión del gen *CrGDPH3* y su sensibilidad para inducirse en respuesta a tratamientos de 200, 100, 50 y 5 mM NaCl por tiempos de exposición de 5, 30, 60 y 120 min. Además por medio de la base de datos PLACE se realizó una búsqueda de secuencias hayan sido caracterizadas previamente como elementos responsivos en *cis* en la región putativa del promotor *CrGPDH3*, con el fin de identificar elementos que pudieran estar regulando la inducibilidad de este gen con estrés osmótico por NaC o estrés por sequia o estrés osmótico ocasionada por otro tipo de sal.

2.2 Materiales y Métodos.

2.2.1 Cepa y cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Se utilizó la cepa silvestre 137c (mt+) de *C. reinhardtii* proveniente del Centro de *Chlamydomonas* (www.chlamy.org) y actualmente depositada en el laboratorio de microalgas y cultivos tropicales de la Unidad de Biotecnología del CICY.

El cultivo líquido de *C. reinhardtii* para mantenimiento y experimentos se llevó a cabo en 50 mL de medio TAP (Tris-Acetato-Fosfato) (Anexo 1) (Harris, 1989), en matraces de 250 mL, en un cuarto con fotoperíodo (16 horas de luz/8 horas de oscuridad), a una temperatura de 25 ± 2 °C y con agitación constante a 140 rpm en un orbitador marca Thermo Scientific modelo MAXQ 4450. La intensidad lumínica fue de $22.6 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{seg}^{-1}$.

2.2.2 Experimentos de estrés por NaCl.

Se realizó un pre-cultivo que se inició inoculando una colonia de *C. reinhardtii* en 50 mL de volumen de medio TAP. Las células en fase exponencial fueron inoculadas en

matraces de Erlenmeyer con 50 mL de medio TAP a una concentración de 10,000 células/mL y fueron cultivadas por 7 días.

El tratamiento de estrés por NaCl correspondiente fue aplicado a los 7 días de cultivo. Para evaluar los efectos de estrés osmótico en la expresión del *CrGPDH3* se utilizaron los siguientes tratamientos: se adicionó a cada cultivo una solución de NaCl para una concentración final ya sea de 200, 100, 50 ó 5 mM a diferentes tiempos de exposición de 5, 30, 60 y 120 minutos. Como controles se colocaron cultivos de *C. reinhardtii* a los que se les adicionó únicamente agua destilada estéril. Posteriormente, se recuperó la biomasa resultante por centrifugación y se almacenó a -80°C.

2.2.2.1 Extracción de ARN.

La extracción del ARN total de las células de *C. reinhardtii* se realizó de acuerdo al protocolo del reactivo del TRIZOL (Invitrogen) incluyendo un tratamiento con DNAsa (PROMEGA) (Anexo 3). El ARN total se resuspendió en 40 µL de agua ultrapura y se almacenó a -80°C hasta su uso.

2.2.2.2 Electroforesis en gel de agarosa.

La integridad del ARN total se valoró cualitativamente en un gel de agarosa (1.2%) –TAE 1X (Tris-acetato-EDTA) teñido con 0.5 µL de bromuro de etidio (10 mg/mL). La electroforesis se realizó utilizando amortiguador TAE 1X a un voltaje constante de 85V durante 30 minutos. Posteriormente el gel de electroforesis se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta.

2.2.2.3 Síntesis de ADN complementario (ADNc).

El ADNc fue sintetizado con la enzima Superscript III siguiendo las especificaciones del fabricante (Invitrogen). Se utilizaron 8 µg de ARN total y 1 µL de oligo dT (50 µM). Esta mezcla se incubó a 75°C por 5 minutos e inmediatamente se enfrió en hielo por 3 minutos. Posteriormente, la muestra se dividió en dos tubos, que se etiquetaron como RT+ y al otro RT-, éste último es un control negativo que no llevó transcriptasa reversa y permitió determinar si había o no contaminación con ADN genómico. La reacción de síntesis de

ADNc en cada tubo (RT+ y RT-) consistió de 2 μ L de DTT 0.1M (0.01 M), 2 μ L de dNTP's 10mM (1mM), 1 μ L de Inhibidor de RNasa 40 U/ μ L (Invitrogen), 1 μ L de Superscript III 200U/ μ L (Invitrogen), 1 μ L de agua ultrapura, 4 μ L del amortiguador 5X first strand (1x) en un volumen final de 20 μ L. Se incubó a 55°C por 90 minutos, posteriormente se inactivó la reacción aumentando la temperatura a 75 °C por 15 minutos. Después se agregó 4 μ L de ARNasa A (1 mg/mL) (0.041 μ g) y se incubó a 37 °C por 30 minutos. Seguidamente se realizó una dilución 1:5 con agua ultrapura y los tubos se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Con el objetivo de evaluar la correcta síntesis de ADNc a partir del ARN total y descartar contaminación por ADNg en el ADNc, se realizó una RT-PCR amplificando un fragmento de un gen cuya expresión es de tipo constitutiva, en este caso se utilizó el gen de la Actina de *C. reinhardtii*, para el cual se utilizaron los oligonucleótidos: 5'- AACATCGTG CTGTCGGGAGG -3' (sentido, 20 pb, Tm= 69.7°C) y 5'- ACTCGTCGTA CTGACTCGGACTTG -3' (antisentido, 20 pb, Tm= 61.9 °C). Estos oligos flanquean un intrón y por tanto en ADNc el amplicón esperado será de 209 pb mientras que en ADNg sería de 409 pb. El programa que se utilizó para la reacción de PCR fue un ciclo de 95°C por 3 min, 40 ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 30 s y 72°C por 1 min y un ciclo de 72°C por 10 min. Como control negativo empleamos los mismos oligonucleótidos pero en la muestra RT-, que nos indicaría por medio de presencia o ausencia si nuestra muestra sufrió contaminación.

2.2.2.4 Análisis de expresión del gen *CrGPDH3* mediante RT-PCR.

Se realizó el análisis de expresión del gen *CrGPDH3* por medio de una RT-PCR para la cual se utilizaron los oligonucleótidos: 5' – ATCGGCTCTGGCGAGCAGCAC-3' (Sentido, 23 pb, Tm=80.6°C) y 5'-ACTGCTCCTGCTCATCGGTGAC-3' (Antisentido, 22 pb, Tm=70.1 °C) los cuales generan un amplicón en ADNc de 280 pb. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando 5 μ L del ADNc previamente sintetizado, el resto de la mezcla de reacción incluyó 1 μ L de cada oligonucleótido 10mM (sentido y antisentido) (0.2 μ M), 1 μ L de dNTP's 10mM (0.2mM), 0.2 μ L de Taq polimerasa (1U), 1.5 μ L de MgCl₂ 50mM (1.5 mM), 5 μ L de buffer de reacción 10X (1X) y agua ultrapura en un volumen final de 50 μ L. El programa que se utilizó para la reacción de PCR fue un ciclo de 95°C por 3

min, 40 ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 30 s y 72°C por 30 s y un ciclo de 72°C por 10 min. Los resultados pudieron observarse mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.2%.

2.2.2.5 Predicción de elementos de respuesta en *cis* en la región promotora putativa del *CrGPDH3* de *C. reinhardtii*.

Para realizar el análisis *in silico* de la región promotora putativa del gen *CrGPDH3*, se tomaron 3000 pares de bases río arriba con respecto a la región 5' UTR de la secuencia completa del genoma nuclear de la microalga *C. reinhardtii*. Esta región se sometió al programa PLACE (Plant cis-acting Regulatory DNA Elements) (Higo *et al.* 1999; Prestridge, 1991) y se seleccionaron aquellos elementos responsivos en *cis* relacionados con estrés salino.

2.3 Resultados.

2.3.1 Análisis de expresión de *CrGPDH3* en respuesta a exposición ante 200 mM de NaCl.

Se realizó un primer experimento donde se expuso el cultivo de *C. reinhardtii* a dos tratamientos con 200 mM de NaCl ya sea por 30 o 120 minutos. Después de los tratamientos, las muestras fueron colectadas y posteriormente se les realizó la extracción de ARN, obteniéndose las siguientes concentraciones: 1.5 µg/µL para la muestra sin tratamiento de NaCl (0 mM), 1.6 µg/µL para la muestra expuesta por 30 minutos y 2.1 µg/µL para la muestra tratada por 2 horas.

La electroforesis de este experimento se presenta en la Figura 2.1, donde se observa la integridad de cada muestra.

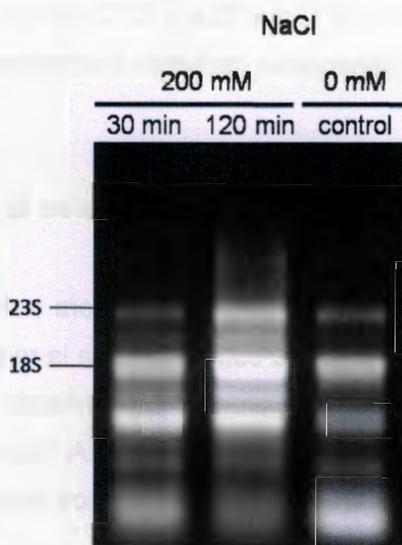


Figura 2. 1 ARN total de los cultivos sujetos al tratamiento de 200 mM de NaCl a tiempos de exposición de 30 y 120 min.

Como se observa en el resultado de la RT-PCR de la figura 2.2, la expresión del *CrGPDH3* puede observarse en ambos tratamientos, siendo visible el amplicón esperado de 298 pb a partir de los 30 minutos de exposición con 200 mM de NaCl. En el caso de la muestra sin tratamiento (0 mM) no se observó banda alguna, es decir la expresión del gen debió ser tan baja que no pudo detectarse en el gel de agarosa. En esta figura se observa el amplicón del gen de la Actina (*CrActina*) utilizado como control con un tamaño de 209 pb en todas la muestras tratadas y no tratadas con NaCl, lo cual indicó el uso de cantidades similares de ARN para la síntesis de ADNc comprobando la ausencia de contaminación por ADN genómico ya que el amplicón de *CrActina* más su intrón (409 pb en total) no fue detectado.

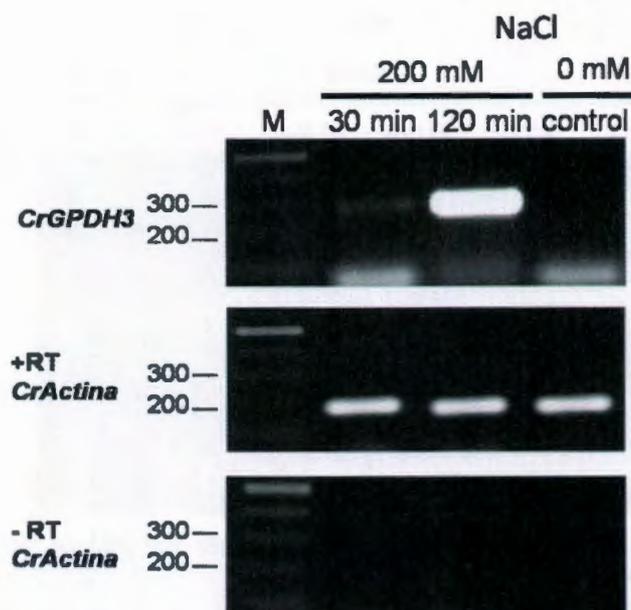


Figura 2. 2 Análisis de la expresión del gen *CrGPDH3* bajo los tratamientos de 200 mM de NaCl por 30 y 120 min. Se utilizó el gen *CrActina* como control positivo (+RT *CrActina*) y negativo (-RT *CrActina*). M= Marcador de peso molecular 1Kb.

2.3.2 Análisis de expresión de *CrGPDH3* en respuesta a exposición ante 100 mM de NaCl.

Se realizó un experimento donde se expuso el cultivo de *C. reinhardtii* a cuatro tratamientos con 100 mM de NaCl ya sea por 5, 30, 60 o 120 minutos. Después de los tratamientos, las muestras fueron colectadas y posteriormente se les realizó la extracción de ARN total y para comprobar su integridad se realizó una electroforesis (figura 2.3), con aproximadamente 1 µg de ARN total de cada muestra.

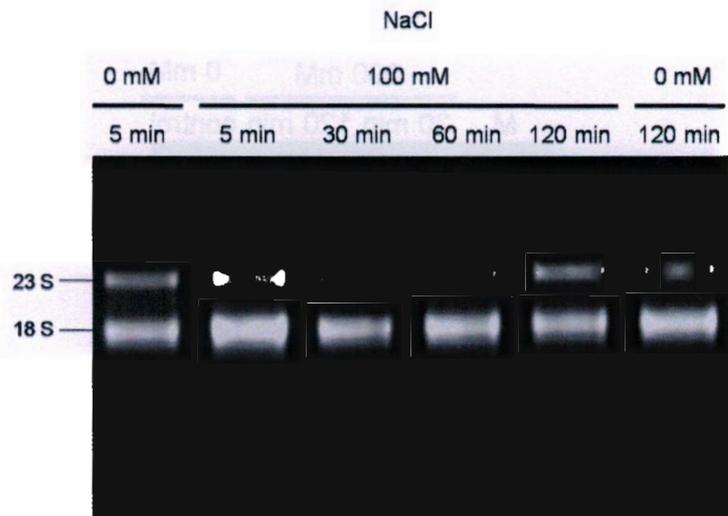


Figura 2. 3 ARN total de los cultivos sujetos al tratamiento de 100 mM de NaCl a tiempos de exposición de 5, 30, 60 y 120 min.

Como se observa en el resultado de la RT- PCR de la figura 2.4, la expresión de *CrGPDH3* puede observarse con un amplicón esperado de 298 pb a partir de los 5 minutos de exposición con 100 mM de NaCl llegando al punto máximo de expresión a los 60 minutos. En el caso de las muestras sin tratamiento (0 mM) no se observó banda alguna, es decir la expresión del gen debió ser tan baja que no pudo detectarse en el gel de agarosa. En la figura 2.4 se observa también el gen *CrActina* utilizado como control con un tamaño de 209 pb en todas las muestras tratadas y no tratadas con NaCl, indicando el uso de cantidades similares de ARN para la síntesis de ADNc comprobando la ausencia de contaminación por ADN genómico, ya que el amplicón de *CrActina* más su intrón (409 pb en total) no fue detectado.

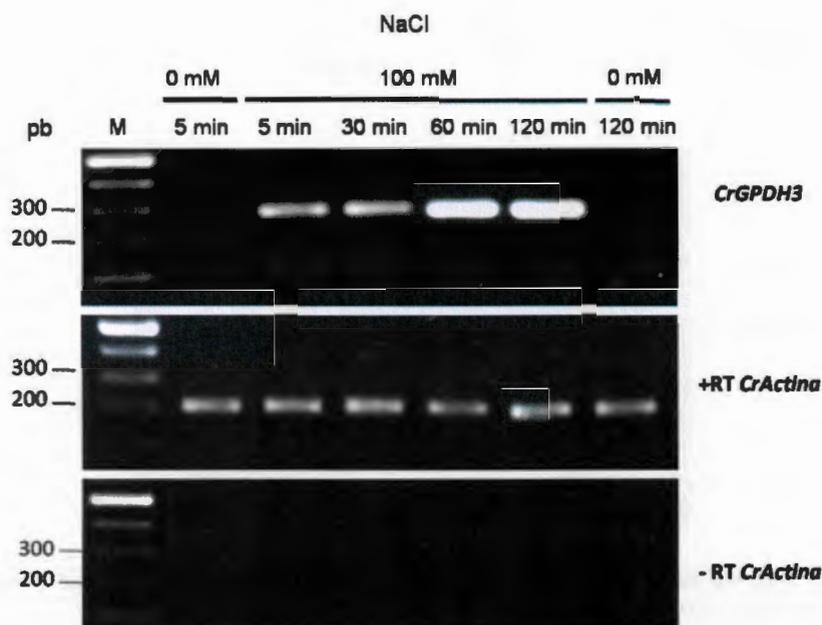


Figura 2. 4 Análisis de la de expresión del gen *CrGPDH3* bajo los tratamientos de 100 mM de NaCl por 5, 30, 60 y 120 min. Se utilizó el gen *CrActina* como control positivo (+RT *CrActina*) y negativo (-RT *CrActina*). M= Marcador de peso molecular 1Kb.

2.3.3 Análisis de expresión de *CrGPDH3* en respuesta a exposición ante 50 mM de NaCl.

Se realizó un experimento donde se expuso el cultivo de *C. reinhardtii* a cuatro tratamientos con 50 mM de NaCl ya sea por 5, 30, 60 o 120 minutos. Después de los tratamientos las muestras fueron colectadas y posteriormente se les realizó la extracción de ARN y para comprobar su integridad se realizó una electroforesis (figura 2.5) con aproximadamente 1 µg de cada muestra.

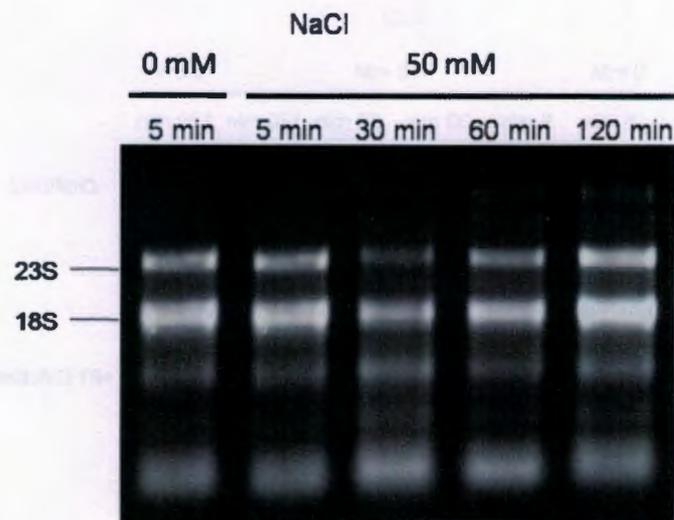


Figura 2. 5 ARN total de los cultivos sujetos al tratamiento de 50 mM de NaCl a tiempos de exposición de 5, 30, 60 y 120 min.

Como se observa en el resultado de la RT-PCR de la figura 2.6, la expresión del *CrGPDH3*, puede observarse con un amplicón esperado de 298 pb a partir de los 5 minutos de exposición con 50 mM de NaCl llegando al punto máximo de expresión a partir de los 60 minutos. En el caso de las muestras sin tratamiento (0 mM) no se observó banda alguna, es decir la expresión del gen debió ser tan baja que no pudo detectarse en el gel de agarosa. En esta figura se observa el gen *CrActina* utilizado como control con un tamaño de 209 pb en todas la muestras tratadas y no tratadas con NaCl e indican el uso de cantidades similares de ARN para la síntesis de ADNc comprobando la ausencia de contaminación ADN genómico ya que el amplicón de *CrActina* mas su intrón (409 pb en total) no fue detectado.

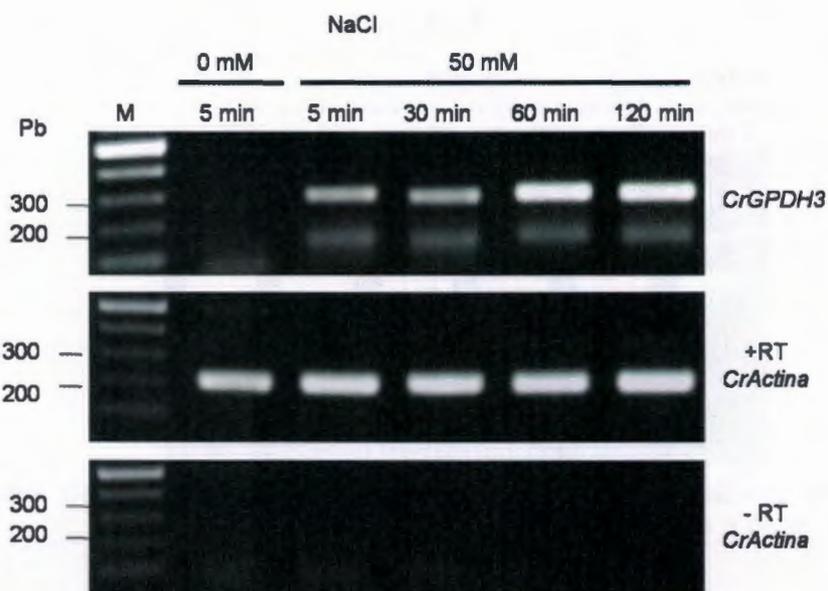


Figura 2. 6 Análisis de la de expresión del gen *CrGPDH3* bajo los tratamientos de 50 mM de NaCl por 5, 30, 60 y 120 min. Se utilizó el gen *CrActina* como control positivo (+RT *CrActina*) y negativo (-RT *CrActina*). M= Marcador de peso molecular 1Kb.

2.3.4 Análisis de expresión de *CrGPDH3* en respuesta a exposición ante 5 mM de NaCl.

Se llevó a cabo un experimento en el cual se expuso el cultivo de *C. reinhardtii* a cuatro tratamientos con 5 mM de NaCl ya sea por 5, 30, 60 y 120 minutos. Después de los tratamientos, las muestras fueron colectadas y posteriormente se les realizó la extracción de ARN y para comprobar su integridad y se realizó una electroforesis (figura 2.7), con aproximadamente 1 μ g de cada muestra.



Figura 2. 7 ARN total de los cultivos sujetos al tratamiento de 5 mM de NaCl a tiempos de exposición de 5, 30, 60 y 120 min.

Como se observa en el resultado de la RT-PCR de la figura 2.8, la expresión del *CrGPDH3*, puede observarse con un amplicón esperado de 298 pb a partir de los 5 minutos de exposición con 5 mM de NaCl llegando al punto máximo de expresión a partir de los 60 minutos. En el caso de las muestras sin tratamiento (0 mM) no se observó banda alguna, es decir la expresión del gen debió ser tan baja que no pudo detectarse en el gel de agarosa. En esta figura se observa el gen de *CrActina* utilizado como control con un tamaño de 209 pb en todas la muestras tratadas y no tratadas con NaCl indicando el uso de cantidades similares de ARN para la síntesis de ADNc comprobando la ausencia de contaminación ADN genómico, ya que el amplicón de *CrActina* mas su intrón (409 pb en total) no fue detectado.

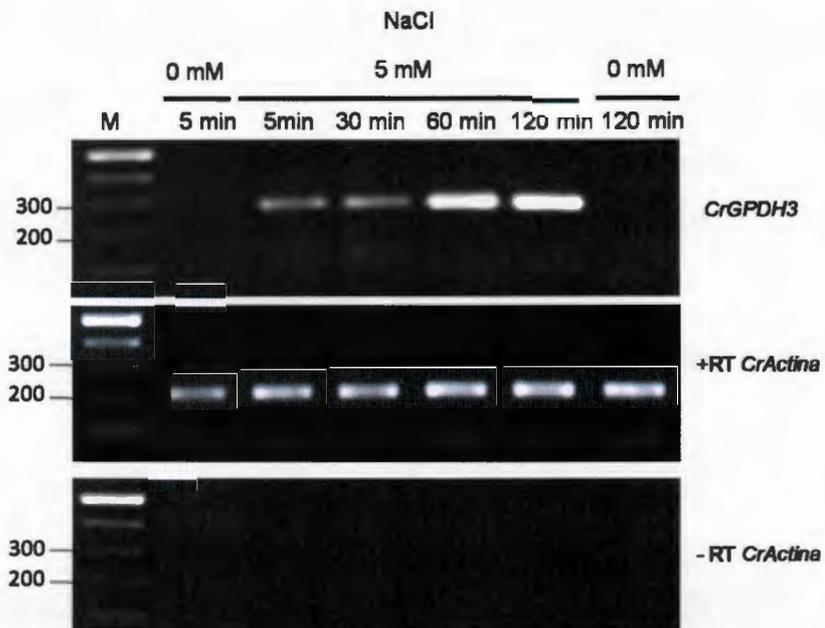


Figura 2. 8 Análisis de la de expresión del gen *CrGPDH3* bajo los tratamientos de 5 mM de NaCl por 5, 30, 60 y 120 min. Se utilizó en gen de *CrActina* como control positivo (+RT *CrActina*) y negativo (-RT *CrActina*). M= Marcador de peso molecular 1Kb.

2.3.5 Predicción de elementos de respuesta en *cis* en la región promotora putativa del gen *CrGPDH3* de *C. reinhardtii*.

Los resultados obtenidos de la búsqueda de elementos en *cis* en la región promotora putativa de 3000 pares de bases del *CrGPDH3* con el programa PLACE se presentan en el cuadro 3.9. No se encontraron elementos responsivos que hayan sido reportados previamente en la literatura como que estén implicados con la inducción con NaCl ó por sequia ó por estrés osmótico caudado por otra sal. Se encontraron elementos característicos de promotores eucariotes como son las cajas GC y la caja TATA en las primeras 2000 pares de bases con respecto al 5'UTR.

Tabla 2. 1 Resultado de la búsqueda de elementos de respuesta en *cis* predichos por el programa PLACE en la región promotora putativa de 2000 pares de bases con respecto al 5ÚTR del gen *CrGPDH3*.

Nombre del elemento <i>cis</i>	Secuencia del elemento <i>cis</i>	Número de elementos	Inductor o Ubicación	Referencia
GATABOX	GATA	1	Secuencia común encontrada en promotores en plantas.	Rubio-Somoza <i>et al.</i> (2006)
CGCONSENSUS	GRWAAW	1	Secuencia encontrada en promotores de las plantas.	Zhou D <i>et al.</i> (1999)
TATABOX	TATA	1	Secuencia encontrada en promotores de plantas	Hartmann U <i>et al.</i> (2005)
CAATBOX	CAAT	1	Secuencia común encontrada en promotores de plantas	Kumar <i>et al.</i> (2012)

Donde: A= Adenina, G= Guanina, C= Citocinina, T= Timina, B= C, G o T, D= A, G o T, H= A, C o T, K= G o T, M= A o C, N= A, C, G o T, R= A o G, S= C o G, V= A, C o G, W= A o T y Y= C o T

En la figura 2.9 se presenta la ubicación de los elementos en *cis* en la secuencia promotora putativa de 2000 pares de bases con respecto al 5ÚTR del gen *CrGPDH3* predichos por el programa PLACE. Como puede observarse, se encontró una caja TATA a -26 pb, una caja GC a -428 pb, una caja caja CAAT a -507 pb y una caja GATA a -1373, todas estas con respecto al sitio de inicio de transcripción.

```

- 1625 GCAAGTCTTAAGCA TOCAGTGCAA ACTGOCGGGCA TACATT TTTT AACCACTTATATT TTTGGGCGT TG
- 1555 GTTTGGTGTTT GACATTGCGGCTT GAAAGGCAGCA CTGCGGTGTAGGC GGGTAGGTGT GCAOCCAACTGC
- 1485 CGGCCGGTGEAGCCACT GAAACA CTTGCGCGCCACGOGA CAGGCTGCAT TGTGAOGTTT TCTTGGTGC
- 1415 AGTGGATGGGAACAAGCAGTATTTGGTAAGCCTATTGATAGCAA TGGCGCGCAGGCTGAGGOGAGGAGCT
- 1345 GTCCGGTGCTGGGTAGCGCT OCGCATTGGGGGAGCAAGGOGTGTGTGCCAAGCGGCAGCAGOGGCATG
- 1275 ACACGTAGTGTGGCAGGAGCGCATGTGCTGAGTGTGCTGCGCTGGCTCTGCTGTGTGGTGGCTTGACCCTG
- 1205 CTGGGCACCTGCTGGGTT OGGCTAOGTGOCT GTTCAGA OCGATTCCGCTGT CAGGAOCTGCCAGCCACTG
- 1135 TAACATGCTGAGTAGCTT TCTGCC TCCGCC TGAAGCGTGA ACTCATGACTAGTT GTTAGCAGOCTGCGAC
- 1065 GGCAGCCACACGCCACCA GAGCTTTCAT CAGGCTGAGA GGCAGOGCAA OCTGCACGGCGTAGGTCGCGAC
- 995 CCCGGCTATGT CCGGGGATGAGGTAGT TCGGCTCAGACT TGGGAGAGGCTCAGGCCCTTTTCCCTCG
- 925 GGAACTCGATGCGA OCGCAAAGGCTCTT GCCOCTC OGCCTT OGGGGCAAGGGGCAAACCAA OCTGTGCTG
- 855 TCATCAAGAGATC CAGCTAT CAGGATGCA GGAAGT OCTAGCA CCAAGT GAGACCC AACCCAAAGCGC
- 785 CCCAGACCCAAACCCAC OCGATCCACC CACAAGGCCOCCCA CCGGAGCACAAA OCGAGCOCTTACGGA
- 715 CCCGAACCCTAACCTAC OCGAGC OGTGTGCCCCAC CAA GCGCGGAGTTATGGCTATGATGGACTCT
- 645 AGCCGTGCTTCAGCCAGGCGTAGAGTGT TGTGCCAGCGCT GCTGATGSCA OCGCGCTGAGGTCTTGC GG
- 575 GCGTCCATACTACTATTGCGT GCTCGCTGGCTGT GAGATC OGTGAGCGGA TTCCGCA TGTAGCCAACT
- 505 TCGTGTGTCCAGTCAAATTC GGAAGA AATCAAGACC CAGAACCTC OGTGTGTGT AAGGGGGGAGGG
- 435 GGGCGGTGTGCGTGGGGA CGTGGGAACCAA GGAAGCTGCCGAT CGGTTCTACCTGTGTAAGOCTCACGG
- 365 GTTAAACTOCTAT OGTCCAC OCGGCC OGTCCCGATT OCGGTT TAGGCCGTCCATGCTTGGTGTGGT
- 295 CGCTGCTCACAGCTTTGCAAGGCCGCCGCATGAAGCGCCGATTAGC OCGGGGT OGTGTGTTTATGGGT
- 225 TACGTCAAGGATTCTTGGAGCTAT GCGAACTGAGGTGGAC OCGCGATGT CAGACAGGCTGACTGAA TT
- 155 GGTGGAAGGCCGT CGCAGTCGCGCGAAAGT TCGGGAAGT TCGCCATCTTACTGGOGAATGACAAGCT
- 85 TCCGGCGCCAGGTATTAGTGTGCTCCCTGTGTGTGTCGTCAGGATTGGACCCACCCGCTTCCOGOGGATTT
- 15 AGCCCAGTCCCGCTTGCA TGGGGTGGTCTGACTGCATGGATCGCGGACTOCATAAATA GCGGATGTGCCA
- 1 GACTTGGCGGTCTGATCAAGCTTGAGAA TACA TAAACTCAATCGCCAGGCAACAAAGCTACAGCCCT
+ 57 ATATCGGCAGT TGCAACA TCC CAGCGCGGGGTTG GACTGCGTAA TTAGAGCGT OGTGAGCGGAGTTT
+ 127 GCAAACATGATGCTGT CAGGC OGCACCTGCAATGCGCCTT CAGT GCTCGT OGAAC TAGOCTOCAAAGCG
+ 197 GAGCGCTCGCTTTCCAT CCGCGCGGCTGCTACCTCAA CCGCGCGCGGCCACTTGGCGTGGCGCATCGTT
+ 267 TGTGCCAGGGCCATCTT CATG

```

Figura 2. 9 Ubicación de los elementos en *cis* encontrados en la secuencia promotora putativa de 2000 pares de bases con respecto al 5'UTR del gen *CrGPDH3*.

2.4 Discusión.

En el análisis de expresión de *CrGPDH3* por medio de RT-PCR para el tratamiento con 200 mM de NaCl se observó la presencia del transcrito de este gen únicamente en la muestra expuesta a NaCl tanto por 30 min como por dos horas de exposición, aunque a los 30 min la banda fue de mucho menor intensidad. Con este experimento se corroboró lo observado por Herrera-Valencia *et al.* (2012) donde se observó que la expresión de este gen fue inducida en respuesta a estrés osmótico con 200 mM de NaCl por dos horas. Además, este trabajo es el primer reporte de la detección de transcrito de *CrGPDH3* bajo esta concentración de NaCl para el tratamiento con 200 mM de NaCl por solo 30 min.

C. reinhardtii ha sido reportada como capaz de soportar estrés salino de hasta 200 mM de NaCl, por encima de este valor no hay crecimiento, sino degradación del cultivo. La primera reacción de *C. reinhardtii* ante el estrés salino es una disminución de la velocidad del crecimiento, siendo mayor conforme incrementa la salinidad del medio y cuando se llega a condiciones de hiper-estrés osmótico de NaCl (por ejemplo 300 mM de NaCl) la fotosíntesis es afectada por la deshidratación de la cavidad luminal, obstruyendo físicamente a la plastocianina y la movilidad del citocromo 6 evitando la transferencia de electrones al fotosistema I (León y Galván, 1994; Cruz *et al.* 2001). También se ha reportado que en esta microalga expuesta a una concentración de 300 mM de NaCl por 11 horas, la enzima Rubisco es oxidada y degradada (Navarro *et al.* 2006).

Reciente se ha reportado en *C. reinhardtii* que el estrés por NaCl de 20 a 100 mM (siendo 20 mM de NaCl la concentración más baja que se ha probado para esta microalga) con una exposición de 48 horas induce la acumulación de triacilglicéridos y el incremento de esta osmolaridad en el medio incrementa la producción de glicerol en esta microalga (Siaut *et al.* 2011). En este trabajo se realizó el análisis de expresión del gen *CrGPDH3* por medio de RT-PCR bajo estrés salino por 100 mM, 50 mM y 5 mM de NaCl a diferentes tiempos, y se detectó presencia de transcrito únicamente bajo las condiciones de estrés tan pronto como a partir de los 5 minutos de exposición, llegando todos al punto máximo de expresión a partir de los 60 minutos, siendo esta la primera evidencia de la tendencia de expresión del gen *CrGPDH3* ante concentraciones diferentes a 200 mM de NaCl por

tiempos inferiores a las 2 horas reportadas por Herrera-Valencia *et al.* (2012). Cabe señalar que durante los tratamientos de NaCl a los que fueron sometidas las células de *C. reinhardtii* fueron visualizadas en el microscopio y se observó que estas no presentaron daño y esta observación pudo ser corroborada mediante la obtención íntegra del ARN total a las células tratadas.

Los resultados encontrados en este trabajo difieren al de los genes *DvGPDH1* y *DvGPDH2* en *Dunaliella viridis* reportados por He *et al.* (2009) en el sentido de que estos genes presentaron expresión basal y al exponerse en concentraciones salinas de 0.5 a 2M de NaCl se observó un incremento progresivo en los niveles del transcrito en ambos genes, a comparación del *CrGPDH3* que mostró una expresión inducible desde una concentración tan baja como es 5 mM de NaCl. Por otro lado el *DsGPDH2* en *Dunaliella Salina* reportado por He *et al.* (2007) presentó un resultado similar al encontrado en *D. viridis* puesto que este gen presentaba también expresión basal y en cuanto se aumentaba la osmolaridad (de 1.5 a 3.5 M de NaCl) en el medio este gen incrementaba su expresión. Estas diferencias pueden ser debido a que las microalgas *D. salina* y *D. viridis* son capaces de tolerar altas concentraciones de NaCl puesto que normalmente son encontradas en aguas salinas particularmente en zonas costeras, por lo que es muy probable que sus genes *GPDH* se encuentren expresados de forma constitutiva para soportar esa salinidad y cuando la corriente marina las guía a lugares donde la salinidad es mayor (puesto que la salinidad del mar varía dependiendo de la zona) y están expuestas por un tiempo muy prolongado la expresión de estos genes se incrementa para poder obtener el balance osmótico necesario. Microalgas como *C. reinhardtii* que habitan en agua dulce donde la salinidad es mucho menor (con un promedio de salinidad de 0.003 M) a comparación del agua marina (con un promedio de 0.428 M), necesitan responder más rápido a este tipo de estrés y ante concentraciones mucho menores que las que enfrentan microalgas marinas como *Dunaliella* para obtener un balance osmótico, y así poder aclimatarse al medio en caso de ser necesario, ya que la salinidad del agua dulce a pesar de que es más estable puede variar ligeramente dependiendo de la zona. Debido a lo anterior, es posible que se observe una inducción del gen *CrGPDH3* a partir de los 5 minutos de exposición a un estrés osmótico tan bajo como 5 mM de NaCl.

La capacidad para soportar estrés salino en *C. reinhardtii* se debe a la acumulación de glicerol como soluto osmorregulador para mantener el balance osmótico intra y extra celular, como se ha sugerido por Vigeolas *et al.* (2007) y Takagi *et al.* (2007). Dado que la enzima GPDH está involucrada en la síntesis de glicerol como sucede en *D. salina*, *D. viridis* y en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (Folch-Mallol *et al.* 2004)), era de esperarse que al someter por estrés osmótico de NaCl a *C. reinhardtii* se indujera la expresión del gen *CrGPDH3*, como se demostró en el presente estudio.

La acumulación de glicerol como soluto compatible en respuesta ante estrés osmótico también se ha observado en levaduras, permitiendo una regulación adecuada de un gradiente osmótico a través de la membrana, siendo la producción de este compuesto regulada por la enzima GPDH. En los estudios de Tome *et al.* (1999) se reportó que los genes *DhGPD* de *Debaryomyces hansenii* se indujeron en presencia de 1.5 M de NaCl detectando presencia de transcrito mediante PCR en tiempo real a partir de los 15 minutos de exposición, llegando a una fase estacionaria a los 45 minutos. Por otra parte Eriksson *et al.* (1995) observó que en el gen *GPD1* en *S. cerevisiae* se indujo ante la presencia de 1.4 M de NaCl detectando presencia de transcrito a partir de los 30 minutos de exposición, llegando al punto máximo de expresión a los 120 minutos. Por otra parte Peng *et al.* (2010) observaron que el gen *PfGPD* en *Pichia farinosa* se indujo a 2 M de NaCl detectando la presencia de transcrito a partir de los 25 minutos de exposición, llegando al punto máximo de expresión a los 120 minutos. Comparado con nuestros resultados la inducción del *CrGPDH3* se detectó a partir de los 5 minutos de exposición indiferentemente de la concentración de NaCl que se probó en este estudio (100, 50 y 5 mM de NaCl) lo que sugiere que el promotor del gen *CrGPDH3* en *C. reinhardtii* es muy sensible a la inducción por estrés osmótico y es muy probable que para poder contrarrestar los efectos de este estrés se esté sintetizando glicerol de forma muy rápida dándole ventaja a esta especie para sobrevivir en fluctuaciones de ambientes osmóticos, similar a como sucede en levaduras (Tome *et al.* 1999; Folch-Mallol *et al.* 2004; Eriksson *et al.* 2000; Watanabe *et al.* 2009; Lee *et al.* 2008).

En los resultados del análisis realizado por PLACE en la región promotora putativa de *CrGPDH3*, no se pudieron detectar elementos de respuesta en *cis* asociados a la respuesta en estrés con salinidad. Es probable que los elementos responsivos en *cis* para *CrGPDH3* sean diferentes a los reportados para plantas superiores, por lo que se tendrán que identificar de manera experimental, por ejemplo mediante delección de nucleótidos como en el caso del promotor inducible por NiCl₂ del gen del CYC6 de *C. reinhardtii* (Quiin *et al.* 1999) o el caso del promotor inducible por NaCl del gen *DCA1* de la microalga *Dunaliella salina* (Li *et al.* 2010). Será interesante encontrar estos nuevos elementos involucrados con la inducibilidad por estrés osmótico de este gen. Por lo tanto con estos resultados se pudo evaluar parte de la sensibilidad del promotor *CrGPDH3* nativo para expresarse de manera inducible en respuesta a NaCl y con ello también se evalúa la sensibilidad del promotor *CrGPDH3* para conducir la expresión inducible de el gen reportero *uidA* objeto de este estudio y en un futuro evaluar su potencial para expresar genes recombinantes de interés biotecnológico de manera inducible.

2.5 Conclusiones.

1. Con 30 minutos de exposición la expresión del gen *CrGPDH3* fue inducida bajo condiciones de estrés salino de 200 mM de NaCl.
2. La expresión del *CrGPDH3* fue inducida a partir de los cinco minutos de exposición a una concentración tan baja como es 5 mM de NaCl, y el mismo patrón se observó a 50 y 100 mM de NaCl.
3. La acumulación de transcrito del *CrGPDH3* alcanzó su máximo a los 60 minutos de exposición a las concentraciones evaluadas de 5, 50 y 100 mM de NaCl.

2.6 Bibliografía.

- Albertyn J., Hohmann S., Thevelein J., Prior A. (1994) *GPD1*, Which Encodes Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase, Is Essential for Growth under Osmotic Stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and Its Expression Is Regulated by the High-Osmolarity Glycerol Response Pathway. *Mol cell Biol* 14, 4135-4144.
- Ben-Amotz A., Avron M. (1983) The role of glycerol in the osmotic regulation of the halophilic alga *D. parva*. *Plant. Physiol.* 51,875–878.
- Cruz J., Salbilla B., Kanazawa A., Kramer D. (2001) Inhibition of Plastocyanin to P700 Electron Transfer in *Chlamydomonas reinhardtii* by Hyperosmotic Stress. *Plant Physiol* 127, 1167–1179.
- Eriksson P., Alipour H., Adler L. (2000) Rap1p-binding Sites in the *Saccharomyces cerevisiae* *GPD1* Promoter Are Involved in Its Response to NaCl. *J Biol Chem* 275, 29368–29376.
- Eriksson P., Andre L., Ansell R., Blomberg A., Adler L. (1995) Cloning and characterization of *GPD2*, a second gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in *Saccharomyces cerevisiae*, and its comparison with *GPD1*. *Mol Microbiol* 17, 95–107.
- Folch-Mallol J., Garay-Arroyo A., Lledías F., Covarrubias A. (2004) The stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev Latinoam Microbiol* 46, 24-46.
- Harris E. (1989) The *Chlamydomonas* sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use. New York, NY: Academic Press, Inc.
- He Q. H., Qiao D., Bai L., Zhang Q., Yang W., Li Q., Cao Y. (2007) Cloning and characterization of a plastidic glycerol 3-phosphate dehydrogenase cDNA from *Dunaliella salina*. *J. Plant Physiol.* 164, 214-220.
- Herrera-Valencia V. A., Macario-González L. A., Casais-Molina M. L., Beltran-Aguilar A. G., Peraza-Echeverria S. (2012) In Silico Cloning and Characterization of the Glycerol-3-

- Phosphate Dehydrogenase (GPDH) Gene Family in the Green Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Microbiol* 64, 477–485.
- He Y., Meng X., Fan Q., Sun X., Xu Z., Song Y. (2009) Cloning and characterization of two novel chloroplastic glycerol-3-phosphate dehydrogenases from *Dunaliella viridis*. *Plant Mol Biol* 71, 193–205.
- Higo K., Ugawa Y., Iwamoto M., Korenaga T. (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucliec Acids Res* 27, 297-300.
- Lee D., Kim M., Ryu Y., Seo J. (2008) Cloning and characterization of CmGPD1, the *Candida magnoliae* homologue of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *FEMS Yeast Res* 8, 1324–1333.
- Li Y., Lu Y., Xue L., Xie H. (2010) A structurally novel salt-regulated promoter of duplicated carbonic anhydrase gene 1 from *Dunaliella salina*. *Mol Biol Rep* 3, 1143–1154.
- Leon R., Galván F. (1994) Halotolerance studies on *Chlamydomonas reinhardtii*: glycerol excretion by free and immobilized cells. *J Appl Phycol* 6, 13-20.
- Marín-Navarro J., Moreno J. (2006) Cysteines 449 and 459 modulate the reduction–oxidation conformational changes of ribulose 1·5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the translocation of the enzyme to membranes during stress. *Plant Cell and Environ* 29, 898–908.
- Peng F., Li G., Wang X., Jiang Y., Yang Y. (2010) Cloning and characterization of a glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*NAD*⁺) gene from the halotolerant yeast *Pichia farinose*. *Yeast* 27, 115–121.
- Quinn J., Nakamoto J., Merchant S. (1999) Induction of Coproporphyrinogen Oxidase in *Chlamydomonas* Chloroplasts Occurs via Transcriptional Regulation of *Cpx1* Mediated by Copper Response Elements and Increased Translation from a Copper Deficiency-specific Form of the Transcript. *J Biol. Chem.* 274, 14444–14454.

- Sambrook J., Russell D. (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Third edition Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York 1, 536-539.
- Subramanyam R., Jolley C., Thangaraj B., Nellaepalli S., Webber A., Fromme P. (2010). Structural and functional changes of PSI-LHCI supercomplexes of *Chlamydomonas reinhardtii* cells grown under high salt conditions. *Planta* 231, 913-922.
- Siaut M., Cuine C., Cagnon C. (2011) Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnol* 11, 1–15.
- Takagi M., Yoshida M. (2006) Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *J Biosci Bioeng* 101, 223-226.
- Thome P., Trench R. (1999) Osmoregulation and the Genetic Induction of Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase by NaCl in the Euryhaline Yeast *Debaryomyces hansenii*. *Mar Biotechnol* 1, 230–238.
- Vigeolas H., Waldeck P., Zank C., Geigenberger P. (2007) Increasing seed oil content in oil-seed rape (*Brassica napus* L.) by over-expression of a yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenase under the control of a seed-specific promoter. *Plant Biotechnol J* 5, 431–441.
- Watanabe Y., Tsuchimoto S., Tamai Y. (2004) Heterologous expression of *Zygosaccharomyces rouxii* glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene (*ZrGPD1*) and glycerol dehydrogenase gene (*ZrGCY1*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 4, 505–510.

CAPITULO III

EVALUACIÓN DE LA INDUCIBILIDAD DEL PROMOTOR DEL GEN *CrGPDH3* Y SU CAPACIDAD PARA CONDUCIR LA EXPRESIÓN DEL GEN REPORTERO *uidA*.

3.1 Introducción.

La microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* es un organismo modelo para el estudio de una amplia gama de áreas en biología, como la función flagelar y la fotosíntesis (Neupert *et al.* 2009). La reciente finalización del proyecto de secuenciación del genoma nuclear de *C. reinhardtii* ha proporcionado nuevos conocimientos sobre la evolución de los eucariotas fotosintéticos. El desarrollo de nuevas herramientas moleculares y recursos genéticos, que permiten el estudio de los procesos metabólicos y su regulación que tienen lugar en esta microalga, facilitando su aprovechamiento biotecnológico (Merchant *et al.* 2007).

Actualmente *C. reinhardtii* se presenta como una alternativa atractiva para la producción de proteínas recombinantes, debido principalmente a su cultivo fácil y económico, su gran capacidad para acumular biomasa y a que es generalmente considerada como inocua para el ser humano. Sin embargo, un obstáculo importante para *C. reinhardtii* es la pobre expresión de transgenes en su genoma nuclear, siendo una de las razones los pocos estudios que existen acerca de la caracterización de promotores adecuados, los cuales hasta la fecha no han tenido resultados significativos para conducir la expresión de genes de interés, presentando niveles por debajo del 1% de acumulación de proteína total soluble (PTS), siendo al menos 1% de PTS lo necesario para que se considere comercialmente rentable (Stahlberg *et al.* 2009; Schroda *et al.* 2000; Ferrante *et al.* 2008).

El contar con un promotor inducible para el núcleo de *C. reinhardtii* permitiría el control de la expresión de manera temporal de un transgén mediante la presencia de un inductor

después de alcanzar una alta densidad celular, permitiendo una mayor acumulación de proteína recombinante.

Recientemente, el *CrGPDH3* se ha reportado como un gen de tipo inducible ante un tratamiento de 200 mM de NaCl por dos horas donde en condiciones sin este inductor su expresión basal no puede ser detectada en un gel de agarosa (Herrera-Valencia *et al.* 2012). Por lo que este gen se presenta como candidato para caracterizar a su promotor y evaluar el potencial de éste para conducir la expresión de proteínas recombinantes en *C. reinhardtii*.

Partiendo de esto, en este capítulo de investigación se realizó la clonación de tres fragmentos de la región que supuestamente debe contener al promotor del gen *CrGPDH3* más su región 5' no traducible (5'UTR) para su caracterización, con el fin de determinar su capacidad de conducir la expresión del gen reportero *uidA* de manera inducible.

3.2 Material y Métodos.

3.2.1 Cepa y cultivo de *C. reinhardtii*.

Se utilizó la cepa silvestre 137c (mt+) de *C. reinhardtii*. Su cultivo para mantenimiento y experimentos se describe en el apartado 2.2.1 de materiales y métodos del capítulo 2 de esta tesis.

3.2.2 Extracción de ADN genómico (ADNg).

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

3.2.3 Clonación de tres diferentes fragmentos del promotor más su 5'UTR del *CrGPDH3* y el gen reportero *uidA*.

3.2.3.1 Diseño de oligonucleótidos específicos.

Se realizó el diseño de oligonucleótidos para la amplificación de tres diferentes fragmentos de la región del promotor y 5'UTR del *CrGPDH3*, así como del gen reportero *uidA* que codifica para la enzima β -glucuronidasa (tabla 3.1), estos oligos tenían una longitud entre 31 y 37 bases debido a que se le añadieron sitios de restricción compatibles con el vector de transformación pSP124S que se utilizaría posteriormente. La T_m osciló entre los 72°C a 91°C, con una composición de las bases de 50a 61% (G+C).

Así mismo se utilizó el programa PRIMER SELECT del paquete bioinformático LASERGENE V. 7.2 para seleccionar aquellos oligonucleótidos que no presentaran formación de estructuras secundarias. Los oligonucleótidos se mandaron a sintetizar a la compañía SIGMA-ALDRICH QUIMICA, S.A. de C.V.

Tabla 3. 1 Oligonucleótidos específicos para la amplificación de tres diferentes longitudes de la región del promotor y 5'UTR del *CrGPDH3*, así como del gen reportero *uidA* que codifica para β -glucuronidasa.

Nombre	Secuencia	T_m (°C)
GusplusAnyFw	5'- ACTGGATCCGCAACAATGGTAGATCTGAGGGTAAAT TTC-3'	74.7
GusplusAnyRv	5'- TGCGCGGCCGCTCACACGTGATGGTGATGGTGATG -3'	91.8
PromGPDH3Fw	5'-AATGAATTCGCAAGTCTTAAGCATCCAGTGC-3'	74.2
PromGPDH3Rv	5'-TGGGGATCCGAAGATGGCGCTGGGCACAAAC-3'	86.3

PromGPDH3(1200)Fw	5'-ATAGAATTCCTTCCGCCTGAGACGTGAACTC-3'	74.5
PromGPDH3(678)Fw	5'-AGCGAATTCGTCTTGCGGGCGTCCATACTAC-3'	79.4

La clonación de tres diferentes fragmentos de la región 5' que posiblemente correspondan al promotor del gen *CrGPDH3* incluyendo al 5'UTR se realizó de la siguiente forma:

- A) PromGPDH3Fw y PromGPDH3Rv amplifican una región de 1979 pb que incluye: 1694 pb correspondientes a la región putativa del promotor más 285 pb correspondientes a la región 5'UTR. Esta región fue llamada promA.
- B) PromGPDH3(1200)Fw y PromGPDH3Rv amplifican una región de 1466 bp que incluye: 1181 de la región putativa del promotor más 285 pb del 5'UTR. Esta región fue llamada promB.
- C) PromGPDH3(678)Fw y PromGPDH3Rv amplifican una región de 938 bp que corresponden a: 653 pb de la región putativa del promotor + 285 pb. Esta región fue llamada promC.

Cabe mencionar que la longitud de los fragmentos que fueron amplificados del promotor del *CrGPDH3* fueron diseñados de manera arbitraria, teniendo en cuenta de que la diferencia entre cada fragmento fuese equitativo (aproximadamente 500 pb). La región PromA que es el fragmento de mayor tamaño fue diseñado con la longitud ya antes mencionada debido a que se observó en la literatura que aproximadamente 2000 pb es suficiente para caracterizar a un promotor de interés y de esta manera se evita no clonar algún elemento en *cis* crucial para la dirigir la expresión de algún gen.

En la figura 3.1 se muestra la forma representativa de la clonación de los fragmentos promA, promB y promC.

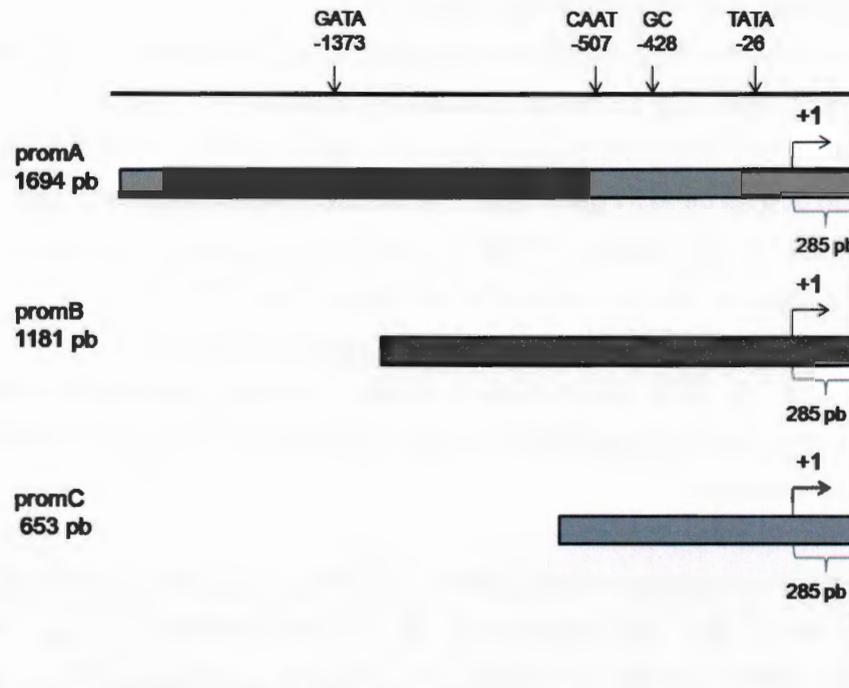


Figura 3. 1 Representación de los fragmentos que fueron clonados del promotor y 5'UTR de *CrGPDH3*.

Las regiones PromA, PromB y PromC fueron amplificadas a partir de ADN genómico de *C. reinhardtii*. La secuencia que se utilizó para realizar el diseño de los oligonucleótidos para amplificar las regiones antes mencionadas fue tomada de la secuencia completa del genoma nuclear de *C. reinhardtii*, disponible en la base de datos de Phytozome (www.phytozome.net/chlamy.php) del Instituto Conjunto del Genoma (JGI, por sus siglas en inglés) versión 7.0, con el número de accesoión para el *CrGPDH3* Cre01.g053150.t1.1. Por otro lado, se clonó el marco de lectura abierto del gen GUSPlus (*uidA*) usando la combinación de oligos GusplusAnyFw y GusplusAnyRv que amplifican 2053 pb, a partir del plásmido pCambia 1305.1 (disponible en el laboratorio) donde se encontraba clonado.

3.2.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción de PCR se realizó usando dos tipos de enzima polimerasa, la Taq-polimerasa (Invitrogen) y la Expand Long Template PCR System (Roche).

Las reacciones con la Taq-polimerasa estuvieron constituidas en un volumen final de 50 μL , conteniendo 500 ng de ADN genómico, 1 μL de cada oligonucleótido (10 μM), 1 μL de dNTPs (0.2 μM), 1.5 μL de MgCl_2 (1.5 μM), 1U de enzima Taq-polimerasa y se le adicionó a la mezcla de reacción 10 μL de 5X CES, el cual contiene: 6.7 mM de DTT, 6.7% de DMSO, 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BSA y 2.7 M de betaina (Bachmann *et al.* 2009).

Para el programa de PCR fue necesario realizar ensayos preliminares evaluando diferentes temperaturas de alineamiento, tiempos de desnaturalización y alineamiento, así como el número de ciclos.

Las reacciones con la Expand Long Template PCR System estuvieron constituidas en un volumen final de 50 μL , conteniendo 500 ng de ADN plasmídico, 1 μL de cada oligonucleótido (10 μM), 1 μL de dNTPs (0.2 μM), 1.5 μL de amortiguador 3 (1.5 μM), 1 U de enzima Expand Long Template PCR System.

El programa que se utilizó fue el siguiente: un ciclo de desnaturalización de 95° C por 3 min, 39 ciclos de 95° C por 30 seg, 55° C por 30 seg, 68° C por 1 min, y un ciclo final de 68° C por 10 min.

La integridad de los productos de PCR se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa como se describe en materiales y métodos del capítulo 2 de esta tesis.

3.2.3.3 Clonación de los amplicones en pGEM-T-Easy.

La purificación del producto de PCR se realizó por medio del protocolo de uno de los estuches comerciales siguientes: para purificar en gel de agarosa se utilizó "QIAquick Gel Extraction" (QIAGEN, C.A) y para purificar en líquido se utilizó "Purification Kit High Pure PCR Product" (ROCHE), siguiendo las indicaciones del proveedor.

Los productos purificados se ligaron al vector de clonación pGEM-T- Easy utilizando el estuche comercial pGEM-T- Easy Vector Systems (PROMEGA).

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo en un volumen final de 10 μ L, conteniendo 5 μ L del fragmento purificado, 1 μ L de plásmido, 1 μ L de amortiguador 10X de T4 ligasa y 10 U de T4 ADN Ligasa (New England Biolabs). Posteriormente la reacción de ligación se usó para transformar la cepa de *E. coli* DH10B mediante choque térmico como se indica en el anexo 4. La extracción y purificación del ADN plasmídico se llevó a cabo mediante el protocolo comercial "High Pure Plasmid Purification Kit" (ROCHE) de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

Posteriormente, para verificar la presencia de los insertos purificados se realizó una digestión con la enzima de restricción *EcoRI*, cuyos sitios de corte flanquean al inserto. La reacción de digestión se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ L con los siguientes componentes: 2 μ L del plásmido, 2.0 μ L de buffer *EcoRI* 10X, 5 U de la enzima *EcoRI* y 15.5 μ L de agua ultrapura. El resultado de la digestión se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa como se describe en materiales y métodos del capítulo 2 de esta tesis.

3.2.3.4 Secuenciación de los productos de PCR.

Una vez que se comprobó que los plásmidos obtenidos contenían el amplicón deseado, se tomó una alícuota de cada muestra con una concentración final de 50 ng en 2.5 μ L y 0.5 μ L del oligonucleótido para secuenciar (2 picomolar) y fueron enviados a la Universidad de Clemson, en Carolina del Sur E.U. para su secuenciación.

Los cromatogramas resultantes de cada secuencia de estudio fueron ensambladas con el programa bioinformático Seqman (DNASTAR lasergene v.7.2), y se compararon con las secuencias tomadas del Phytozome y GenBank mencionadas anteriormente para comprobar su integridad.

3.2.4 Elaboración de la construcciones génicas CrGPDHGus A, CrGPDHGus B, CrGPDHGus C.

La elaboración de las construcciones génicas CrGPDHGus A, B y C, consistieron en clonar la región del promotor y el 5'UTR del *CrGPDH3* correspondiente (promA, promB ó promC), el gen reportero *uidA* y el 3'UTR del *RBCS2* en el vector pSP124S mediante una

serie de pasos que consistieron en digestiones por medio de enzimas de restricción y ligaciones, como se describe a continuación.

3.2.4.1 Construcción génica CrGPDHGus A.

A) Subclonación del gen reportero *uidA* al plásmido pSP124S (pA1).
 El vector que se utilizó fue el pSP124S que se obtuvo del centro de *Chlamydomonas* (<http://www.chlamy.org/>). Este plásmido se basa en el vector pBluescript SK donde en su región policlonal (entre los sitios de restricción *XhoI* y *HindIII*) tiene integrado al gen *ble* que confiere resistencia al antibiótico de Zeocina y fleomicina con un tamaño de 1.2 Kb, teniendo un tamaño total del plásmido de 4132 pb.

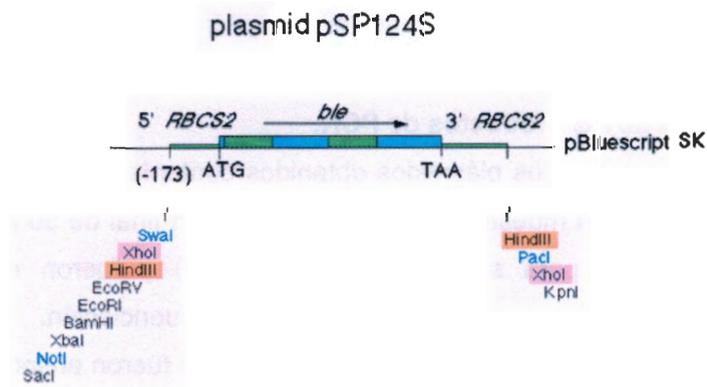


Figura 3. 2 Esquema del vector pSP124S con sus diferentes características así como la región policlonal del pBluescript SK.

El gen reportero *uidA* se encontraba clonado en pGEM-T-easy (pG), por lo que para su subclonación en pSP124S se realizó una doble digestión con las enzimas de restricción *BamHI* y *NotI*, en una reacción de digestión que se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ L con los siguientes componentes: 1.5 μ g del plásmido, 2 μ L de amortiguador 3 de *BamHI* a 10X, 10 U de la enzima *BamHI* (20 U/ μ L), 10 U de la enzima *NotI*, 0.2 μ L de

100X BSA y 14.8 μ L de agua ultrapura. En paralelo se realizó la misma reacción de digestión con las enzimas de restricción antes mencionadas al plásmido pSP124S para dejarlo en forma lineal y dejar libres los extremos para ligar al gen reportero *uidA*. Ambas reacciones se dejaron digiriendo por dos horas a 37°C. Posteriormente se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% con las dos reacciones de digestión con el fin de visualizar las bandas esperadas. Las bandas se escindieron del gel con ayuda de un escalpelo, inmediatamente se transfirió cada una a un tubo de microcentrifuga y se purificaron con el estuche comercial "QIAquick Gel Extraction Kit" (QIAGEN) siguiendo las especificaciones del proveedor.

Los productos purificados se visualizaron en un gel de agarosa con el fin de poder visualizar la intensidad de las dos bandas y así poder calcular la tasa de reacción de ligación entre el plásmido pS124S y el gen reportero *uidA*. Esta reacción se efectuó con 4 μ L del plásmido pS124S linearizado, 4 μ L del *uidA*, 10X de amortiguador de T4 DNA Ligasa y 3U de T4 DNA ligasa (NEB), en un volumen final de 10 μ L respectivamente. La mezcla de ligación se incubó por 16 horas a 4°C.

Posteriormente, con la reacción de la ligación se realizó una transformación de células competentes de *E. coli* para obtener al plásmido que resultaría de esta ligación el cual se denominó pA1, para luego extraerlo y purificarlo de acuerdo al protocolo de extracción de ADN plasmídico como se indica en el anexo 5.

Para verificar que el gen reportero *uidA* había sido integrado dentro del plásmido pSP124S se realizó una doble digestión al pA1 con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Not*I de acuerdo como se mencionó al principio de esta sección. Los fragmentos que se esperaban eran: 2053 pb pertenecientes al *uidA* y 4132 pb pertenecientes al plásmido pS124S. Las reacciones de digestión fueron visualizadas en un gel de agarosa al 1.2%. El esquema representativo de la estrategia de subclonación del gen reportero *uidA* al plásmido pSP124S se muestra en la figura 3.3.

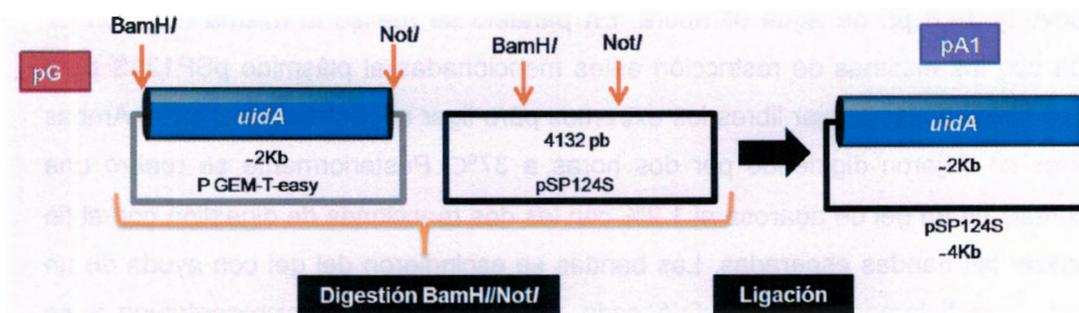


Figura 3. 3 Esquema de la estrategia que se utilizó para subclonar al gen reportero *uidA* en el vector pSP124S.

B) Subclonación del 3'UTR del *RBCS2* en el pA1.

La región 3' no traducible correspondiente al gen *RBCS2* (el cual codifica para la subunidad pequeña de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa en *C. reinhardtii*) se encontraba disponible en el laboratorio clonado en el vector pSP124S con un tamaño de 485 pb.

Se llevó a cabo una digestión con las enzimas de restricción *SacI* y *NotI*, tanto para el pA1 obtenido en el apartado anterior como para el plásmido que contenía al 3' UTR del *RBCS2*. La primera digestión se efectuó con 1.5 μg de cada plásmido correspondiente, 2 μL de amortiguador de *SacI* 10X, 10U de la enzima *SacI* (20 U/ μL), 0.1 μL de 100X BSA, en un volumen final de 10 μL . La reacción se incubó por dos horas a 37°C. Posteriormente se purificó la reacción de digestión con el estuche comercial "High Pure PCR Product Purification Kit" (ROCHE) siguiendo las especificaciones del proveedor y se obtuvieron 30 μL de elución. Se procedió con la segunda digestión para lo cual se usaron 10U de la enzima *NotI*, 3 μL de amortiguador 3 de *NotI* 10X, 0.3 μL de 100X BSA y 30 μL de elución en un volumen final de 35 μL . La reacción se incubó por dos horas a 37°C. Finalmente las reacciones de digestión fueron visualizadas en un gel de agarosa al 1.2%. La banda lineal del pA1, así como el 3'UTR del *RBCS2*, fueron aisladas y purificadas del gel como se mencionó anteriormente. Los productos purificados y visualizados en un gel de electroforesis al 1.2% para poder calcular la tasa de ligación. La ligación se efectuó usando 4 μL del pA1 linearizado, 4 μL del 3'UTR del *RBCS2*, 10X de buffer de T4 DNA

Ligasa y 3 U de T4 DNA ligasa (NEB), en un volumen final de 10 μ L respectivamente. La mezcla de ligación se incubó por 16 horas a 4°C. Como resultado se obtuvo el plásmido pA2 el cual fue transformado en *E. coli* y purificado como se mencionó anteriormente. Para comprobar la integración del 3'UTR del *RBCS2* dentro del plásmido pA1, se realizó una doble digestión con las enzimas *SacI/NotI* de igual manera como se describió al principio de esta sección. Los fragmentos esperados fueron: 485 pb pertenecientes al 3'UTR del *RBCS2* y 6132 pb pertenecientes al resto del plásmido. Las reacciones de digestión fueron visualizadas mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1.2%. El esquema representativo de cómo se llevó a cabo la subclonación del 3'UTR del *RBCS2* en el pA1 se muestra en la figura 3.4. A este plásmido se le denominó pA2.

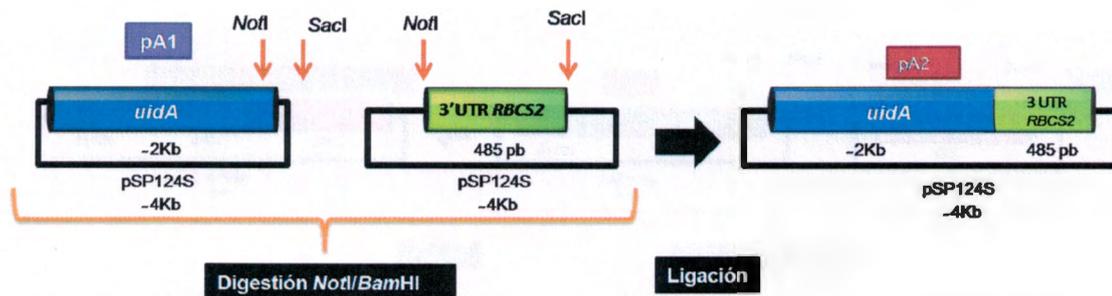


Figura 3. 4 Esquema de la estrategia que se utilizó para clonar el 3'UTR del *RBCS2* en el pA1 y obtener como resultado el pA2.

C) Subclonación de *promA* en el plásmido pA2 (pCrGPDHGus A).

La clonación del *promA* pA2 se realizó por medio de una doble digestión simultánea con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*. La reacción de digestión se llevó a cabo con 1.5 μ g de cada plásmido correspondiente, 3 μ L de amortiguador 3 de *BamHI* 10X, 10 U de la enzima *BamHI* (20 U/ μ L), 5 U de la enzima *EcoRI* (10 U/ μ L) 0.3 μ L de 100X BSA, en un volumen final de 30 μ L. Las reacciones se incubaron por dos horas a 37°C. Finalmente las reacciones de digestión fueron visualizadas en un gel de agarosa al 1.2%. La banda del plásmido lineal pA2 así como la de *promA* fueron aisladas y purificadas del gel como se mencionó anteriormente. Los productos purificados fueron visualizados en un gel de

electroforesis al 1.2% para poder calcular la tasa de ligación. La ligación se efectuó usando 4 μ L del pA2 linearizado, 4 μ L de promA, 10X de amortiguador de T4 DNA Ligasa y 3 U de T4 DNA ligasa (NEB), en un volumen final de 10 μ L. La mezcla de ligación se incubó por 16 horas a 4°C. Como resultado se esperaba al plásmido denominado pCrGPDHGus A el cual fue usado para transformar *E. coli* y purificado como se mencionó anteriormente. Para comprobar la integridad del pCrGPDHGus A, se realizó una doble digestión con las enzimas *EcoRI/BamHI* de igual manera como se describió al principio de esta sección. Los fragmentos esperados fueron: 1979 pb pertenecientes a promA y 6670 pb pertenecientes al resto del plásmido. Las reacciones de digestión fueron visualizadas en una electroforesis en un gel de agarosa al 1.2%. El esquema de esta subclonación se muestra en la figura 3.5.

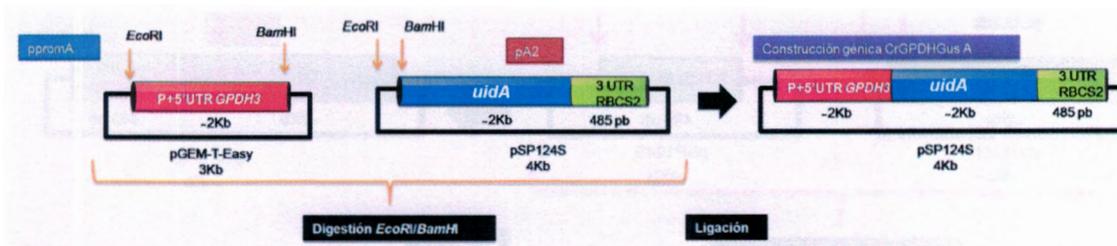


Figura 3. 5 Esquema de la estrategia para subclonar el promotor del *CrGPDH3* en el plásmido pA2 y obtener como resultado el pCrGPDHGus A.

3.2.4.2 Construcciones génicas CrGPDHGusB y CrGPDHGusC.

Para obtener las construcciones CrGPDHGus B CrGPDHGus C se subclonaron por separado promB y promC en el pA2 previamente obtenido en la sección 3.2.5.4. Las subclonaciones se realizaron por medio de una doble digestión simultánea que se realizó al pB (plásmido donde se encontraba clonado promB con 1466 pb en pGEM-T-Easy), pC (plásmido donde se encontraba clonado promA con 938 pb en p-GEM-T-Easy) y el pA2 con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*, siguiendo los mismos pasos de la sección 3.2.5.5. La estrategia que se siguió para las subclonaciones se muestra en la figura 3.6. A las construcciones génicas obtenidas se les denominó pCrGPDHGus B y pCrGPDHGus C respectivamente.

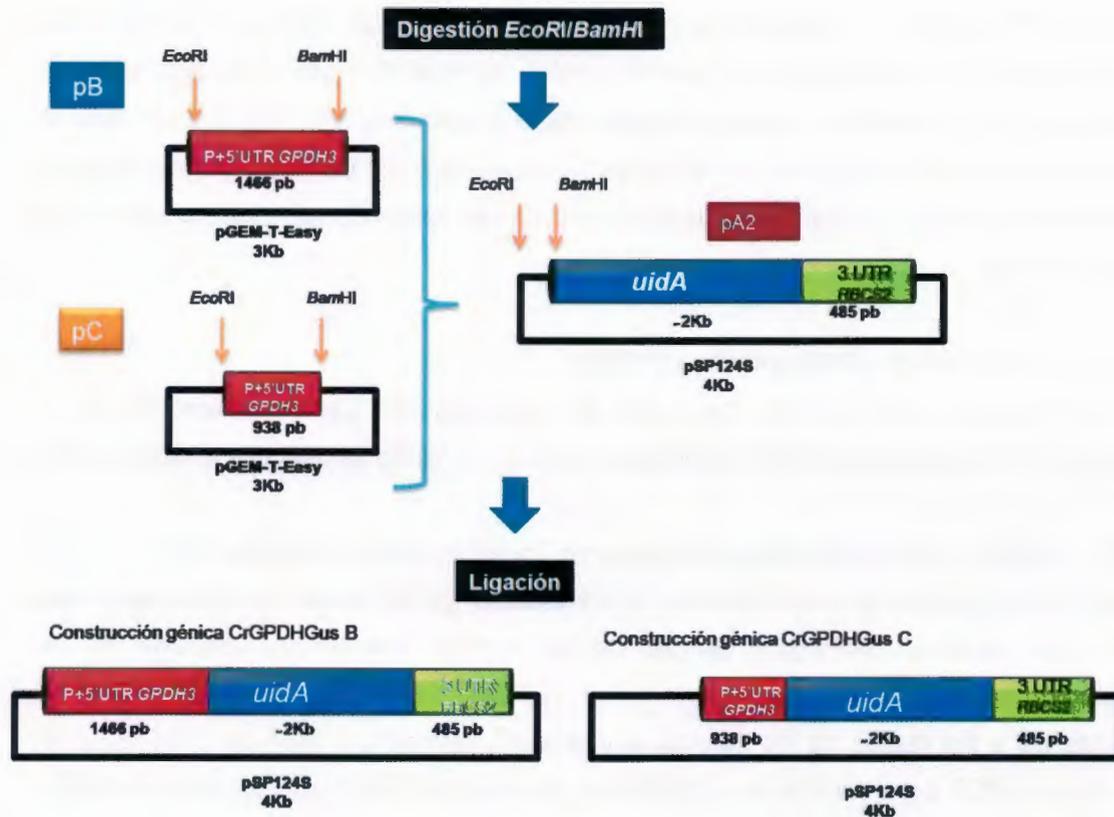


Figura 3. 6 Esquema de la obtención de los plásmidos denominados pCrGPDHGus B y pCrGPDHGUS C.

3.2.5 Transformación de *C. reinhardtii* por biobalística.

Para la transformación de *C. reinhardtii* por biobalística se partió de una colonia de esta microalga que fue inoculada en 50 mL de medio TAP en un matraz de 250 mL. Al final de la fase exponencial, 40 millones de células fueron plaquedas en cajas Petri con 30 mL de medio TAP semisólido. Se utilizó una solución con partículas de oro de 0.6 μm de diámetro, 2 μg del plásmido correspondiente (plásmido experimental ó pSP124S como

control) de acuerdo al protocolo del anexo 10. Las cajas transformadas y los controles se dejaron a luz indirecta por 24 horas aproximadamente.

Pasadas 24 h se recuperaron las células transformadas lavando cada caja con 750 μ l de medio TAP líquido, recuperando la mayor cantidad de células posibles para posteriormente ser plaqueadas con asa de siembra esparciendo todas la células, en cajas con medio TAP semisólido más el antibiótico de selección Zeocina (5mg/L). Las cajas se dejaron en el cuarto de cultivo a condiciones de fotoperiodo (16 horas luz/8 oscuridad) luz continua para esperar a que emergieran colonias de células de *C. reinhardtii* posiblemente transformadas.

3.2.6 Extracción de ADN genómico (ADNg).

El ADN genómico fue extraído por medio del protocolo de Illustra Nucleon Phytopure Genomic DNA Extraction Kit (GE Healthcare, Invitrogen), como se describe en el anexo 2.

3.2.7 Análisis de las colonias putativamente transformadas mediante PCR.

Como primer escrutinio a las colonias putativamente transformadas se les realizó una PCR para amplificar una región del gen *ble* que confiere resistencia a zeocina con un tamaño de 456 pb.

Las clonas a las cuales se les detectó la presencia del gen *ble* pasaron a un segundo análisis por PCR para detectar si contenían al gen reportero *uidA* amplificando una región de 159 pb.

Para ambos casos la reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo de la siguiente manera: 10X de amortiguador de PCR, 1.5 U de la enzima Taq polimerasa, 0.6 μ M de cada oligonucleótido, 50 mM de MgCl₂, 200 μ M de dNTP's (Roche) y 100 ng de ADN genómico (ADN molde), agua ultrapura (Invitrogen) en un volumen final de 50 μ L. Se utilizó el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización de 95°C por 3min, 35 ciclos de 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg, y un ciclo final de 72°C por 1min.

3.2.8 Evaluación de la expresión del gen reportero *uidA* bajo el control de *promA* en clones individuales de *C. reinhardtii*.

3.2.8.1 Tratamientos de NaCl.

Para evaluar la inducibilidad del promotor recombinante del *CrGPDH3*, las clonas transformadas con *pCrGPDHGus A* fueron sometidas a estrés osmótico por NaCl. Las clonas fueron cultivadas hasta el final de su fase exponencial de crecimiento tal y como se indica en apartado 3.2.5 de este capítulo. Se colocó un duplicado por cada colonia cultivada los cuales fueron utilizados como control. Para la muestra con tratamiento de NaCl se adicionaron 150 μ L de una solución 5 M de NaCl para obtener una concentración final de 50 mM de NaCl. Los cultivos permanecieron en esta condición de estrés por 2 h. A la muestra control se le adicionaron 150 μ L de agua filtrada estéril. Los cultivos fueron colectados por centrifugación y fueron almacenados a -80°C . A los cultivos colectados les fue extraído el ARN total con el protocolo con el reactivo Trizol previamente establecido en el capítulo 2 en la sección 2.2.2.1 de este trabajo de tesis. La integridad del ARN se observó en un gel de agarosa al 1.2%.

Con el ARN total extraído de las muestras el siguiente paso fue realizar la síntesis la extracción de ADNc de acuerdo a como se indicó en el apartado 2.2.2.3 del capítulo 2 de este trabajo.

3.2.8.2 RT-PCR.

Se realizó una RT-PCR para evaluar la expresión del gen reportero *uidA* bajo el control del *promA* de *CrGPDH3*. Para la reacción se utilizaron los oligonucleótidos: 5' – ACGTGGAGATTCCGAATGTC-3' (sentido, 20 pb, $T_m=63.9^{\circ}\text{C}$) y 5'-TGTTGATGAGGAACTTGCCG-3' (antisentido, 20 pb, $T_m=66.2^{\circ}\text{C}$) los cuales generan un amplicón tanto en ADN genómico como en ADNc de 159 pb.

Como control se realizó una RT-PCR para amplificar al gen nativo *CrGPDH3* para verificar que el experimento del tratamiento por NaCl realizado a las muestras recombinantes estuviera funcionando y descartar errores en los resultados a causa manipulación. Se utilizaron los oligonucleótidos: 5' – ATCGGCTCTGGCGAGCAGCAC-3' (sentido, 23 pb,

T_m=80.6°C) y 5'-ACTGCTCCTGCTCATCGGTGAC-3' (antisentido, 22 pb, T_m=70.1 °C) los cuales generan un amplicón de 280 pb tanto en ADN_g como en ADN_c

Las reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo utilizando 5 µL del ADN_c previamente sintetizado, el resto de la mezcla de reacción incluyó 1 µL de cada oligonucleótido 10mM (sentido y antisentido) (0.2µM), 1 µL de dNTP's 10mM (0.2mM), 1 U de Taq polimerasa, 1.5 µL de MgCl₂ 50mM (1.5 mM), 5 µL de amortiguador de reacción 10X (1X) y agua ultrapura en un volumen final de 50 µL. El programa que se utilizó fue de un ciclo a 95°C por 3 min, 40 ciclos a 95°C por 30 s, 55°C por 30 s y 72°C por 30 s y un ciclo de 72°C por 10 min. Como control negativo se emplearon los mismos oligonucleótidos con H₂O ultrapura. Los resultados fueron observados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.2%.

3.2.8.3 Evaluación de la expresión del gen reportero *uidA* bajo el control de *promA*, *promB* ó *promC* mediante una estrategia de “pool” de clonas transgénicas.

Se realizó la transformación por biobalística como se indicó en el apartado 3.2.5 de este capítulo con la diferencia realizada de que se utilizarón por separado cada uno de los tres plásmidos pCrGPDHGus A, B y C, por lo que al final del evento se obtuvieron cinco cajas de Petri por cada uno de éstos plásmidos, cinco cajas correspondientes al pSP124S, tres cajas como control positivo de cultivo de la línea de *C. reinhardtii* silvestre y tres más que fueron utilizadas como control del antibiótico (zeocina). La estrategia para llevar a cabo este experimento se representa en la figura 3.7.

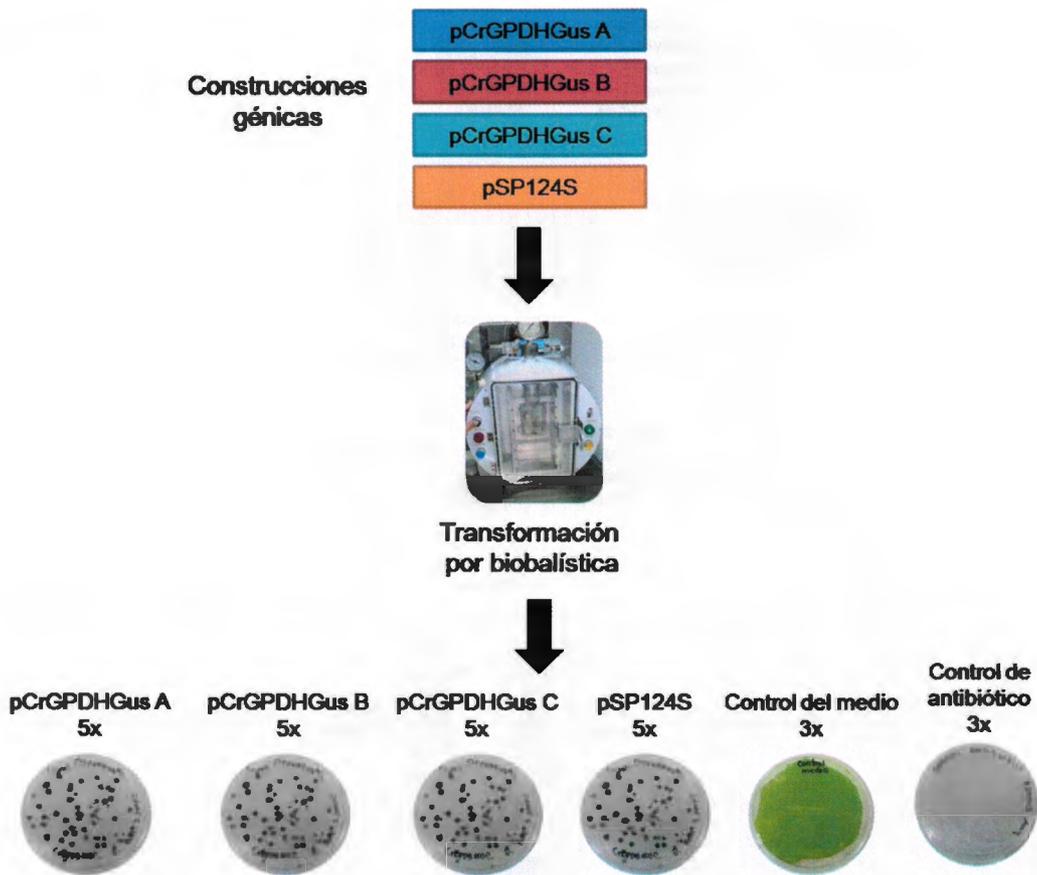


Figura 3. 7 Esquema de transformación por biobalística a *C. reinhardtii* con las construcciones génicas pCrGPDHGus A, B ó C. El pSP124S fue utilizado como control negativo (plásmido vacío).

La expresión del *uidA* en las colonias putativamente transformadas fue analizada mediante RT-PCR a un "pool" de 9 colonias de *C. reinhardtii* transformadas con uno de los tres plásmidos evaluados.

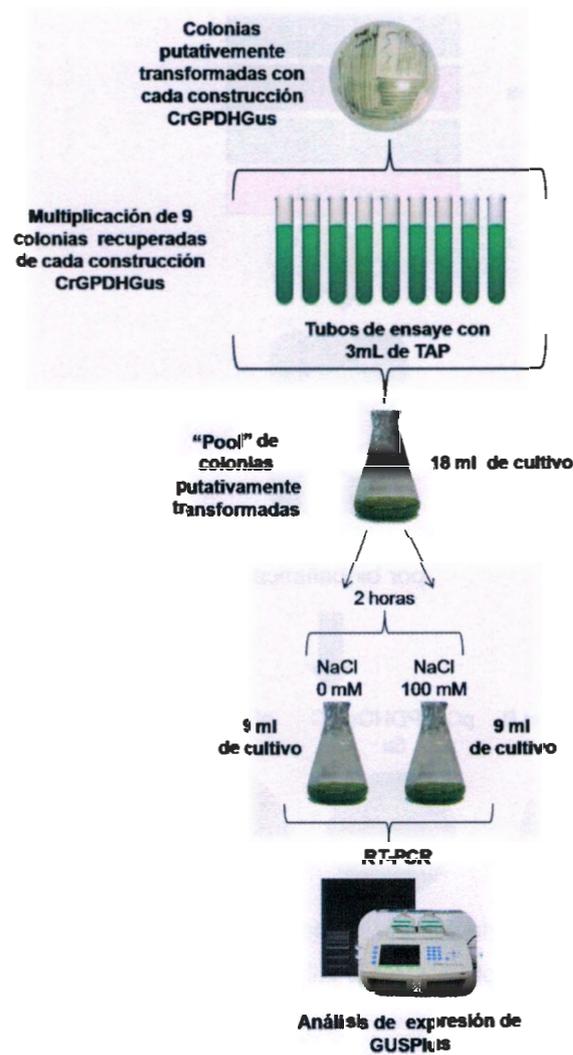


Figura 3. 8 Estrategia experimental del "pool recombinante" para analizar la expresión del gen reportero *uidA*.

Como se indica en la figura 3.8 se recuperaron 9 colonias putativamente transformadas por cada construcción génica, las cuales fueron cultivadas por separado en tubos de ensayo durante 7 días en 3 mL de medio TAP y posteriormente 2mL de cada tubo fue depositado en un matraz de 250 mL para obtener un volumen total de 18 mL los cuales fueron mezclados gentilmente. Posteriormente el cultivo del "pool" recombinante fue

divido en dos matraces de 50 mL obteniendo un volumen final de 9 ml para cada uno. Un matraz recibió un tratamiento de 100 mM de NaCl por dos horas mientras que al otro matraz se le añadió agua destilada filtrada y fue utilizado como control.

Los cultivos fueron colectados por centrifugación y fueron almacenados a -80°C . Se extrajo el ARN total de las muestras con el protocolo del reactivo Trizol previamente descrito en el capítulo 2 (sección 2.2.2.1) de este trabajo de tesis. La integridad del ARN se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.2%. Se realizó la síntesis de ADNc de acuerdo a como se indicó en el apartado 2.2.2.3 del capítulo 2 de este trabajo de tesis. Posteriormente se realizó una RT-PCR para amplificar al gen reportero *uidA* y al gen nativo *CrGPDH3* tal y como se indicó en el apartado 3.2.8.2 de este capítulo.

3.3 Resultados.

3.3.1 Cultivo y Extracción de ADN genómico de *C. reinhardtii*.

La figura 3.9 muestra ejemplos del cultivo en estado semisólido y líquido al final de la fase exponencial de *C. reinhardtii*. En la figura 3.10 se presenta la electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de las muestras de ADN genómico extraídas de esta microalga.

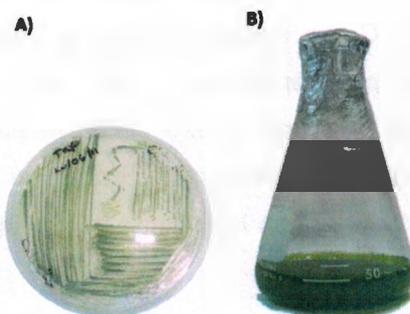


Figura 3. 9 Cultivo de *C. reinhardtii*. A) Cultivo en medio semisólido, B) Cultivo en medio líquido al final de su fase exponencial.



Figura 3. 10 Electroforesis de la extracción de ADN genómico de *C. reinhardtii*. ADNg1 y ADNg2 corresponden a dos muestras diferentes de esta extracción y M corresponde al marcador de peso molecular de 1Kb.

3.3.2 Clonación de tres diferentes fragmentos del promotor más la región 5'UTR del *CrGPDH3* (promA, promB y prom C).

Como se muestra en la figura 3.11, se realizó la amplificación de la región promA del *CrGPDH3*. Se recordará que esta es una región de 1979 pb que incluye 1694 pb correspondientes a la región putativa del promotor de *CrGPDH3* más 285 pb correspondientes a su región 5'UTR. Por medio de electroforesis se verificó el tamaño del amplicón de 1,979 pb (carril 1). Como control positivo se utilizó la misma muestra de ADNg y los oligos específicos para amplificar el gen de la actina con un tamaño correspondiente a 409 pb (carril 2). Como control negativo se preparó una mezcla de reacción con todos los elementos de la muestra experimental (oligos para amplificar al promotor y 5'UTR del *CrGPDH3*), pero con H₂O ultrapura en lugar del ADN molde (carril 3).

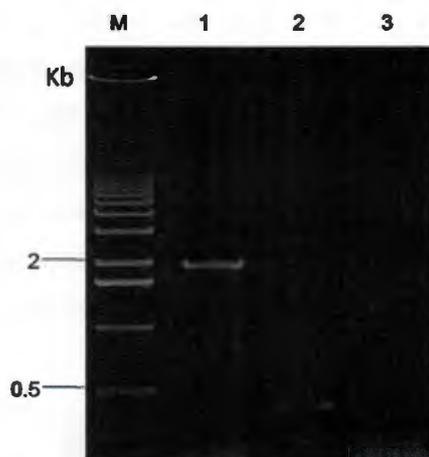


Figura 3. 11 Electroforesis de la amplificación del promotor y 5'UTR del *CrGPDH3* de *C. reinhardtii*. 1= amplicón esperado de 1979 pb, 2=control positivo, 3= control negativo. M= marcador de peso molecular de 1Kb.

El producto de PCR obtenido, se purificó del gel y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2% para observar su integridad (se usaron 5 μ L de producto purificado) y este resultado se puede observar en la figura 3.12.

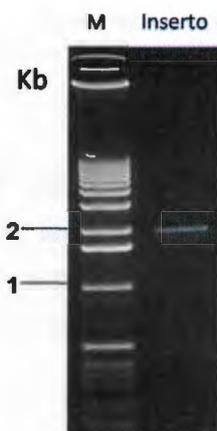


Figura 3. 12 Electroforesis del producto de PCR purificado del promotor y 5'UTR del *CrGPDH3* de *C. reinhardtii* con un tamaño esperado de 1979 pb. M corresponde al marcador de peso molecular de 1 Kb.

Se clonó el *promA* en el vector pGEM-T- Easy (Promega). De las colonias obtenidas se analizaron cuatro. En la Figura 3.12, se muestra el resultado de la digestión con la enzima *EcoRI* (NEB) de los plásmidos purificados, observándose las bandas esperadas de 3 Kb correspondiente al plásmido pGEM-T- Easy linealizado y una de 2 Kb que corresponde al *promA*. Como se puede apreciar en la figura, de las cuatro muestras digeridas dos presentaron el inserto de interés. Estas muestras fueron secuenciadas y en la figura 3.13 se señalan con un asterisco (*) las muestras que fueron seleccionadas para este proceso.

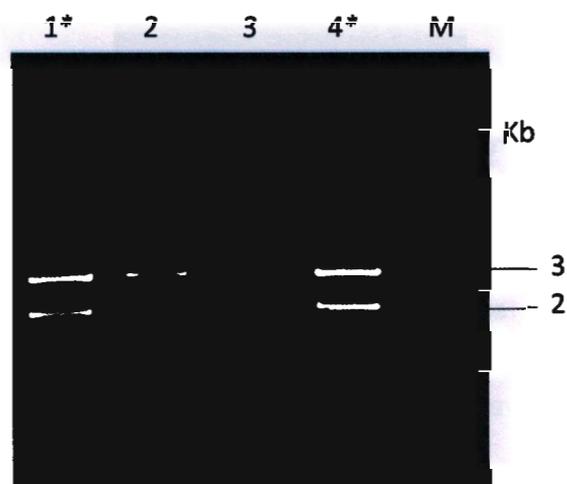


Figura 3. 13 Electroforesis del análisis de restricción para el *promA* de *CrGPDH3* en pGEM-T Easy con la enzima *EcoRI*. Los carriles marcados con * fueron las que se mandaron secuenciar. M= Marcador de 1 Kb.

Los crogratogramas resultantes fueron analizados con el programa SeqMan del paquete bioinformático Lasergene V 2.0, mediante el cual se obtuvo el alineamiento de la secuencia de nucleótidos y se comparó con la secuencia reportada de la base de datos del Phytozome. En el alineamiento obtenido se observó que esta secuencia fue igual a la predicha. El alineamiento se muestra en el anexo 6.

A partir del plásmido recombinante con la secuencia íntegra de 1979 pb del *promA*, se amplificaron por PCR dos fragmentos de menor longitud: una región de 1466 bp que incluye 1181 de la región putativa del promotor y 285 pb del 5'UTR (*promB*) y otra región

de 938 que corresponde a 653 pb de la región putativa del promotor y 285 pb del 5'UTR (promC). Los amplicones correspondientes a promB y promC se presentan en la figura 3.14.

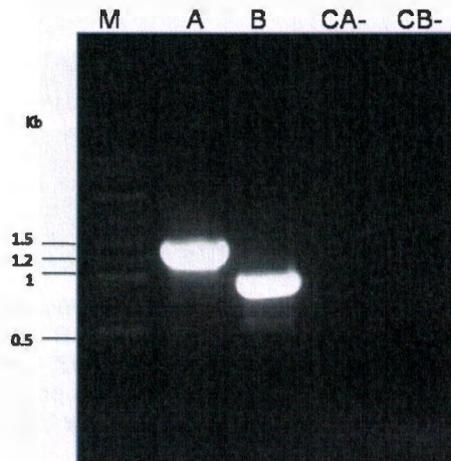


Figura 3. 14 Electroforesis de la amplificación de las longitudes más cortas del promotor del *CrGPDH3* y 5'UTR. A=región promA. B= región promC. CA- y CB- controles negativos.

Una vez que se amplificaron las regiones promB y promC se clonaron cada uno en el vector pGEM-T- Easy. En la Figura 3.15, se muestra el resultado de la digestión con la enzima *EcoRI* (NEB) de los plásmidos purificados:

- Para el caso del ppromB: un fragmento correspondiente al vector pGEM-T-Easy con un tamaño de 3 Kb y un fragmento de 1466 pb perteneciente a promB.
- Para el caso del ppromC: un fragmento correspondiente al vector pGEM-T-Easy con un tamaño de 3 Kb y un fragmento de 938 pb perteneciente a promC.

Los plásmidos fueron secuenciados. La figura 3.15 se señalan con un asterisco (*) las muestras que fueron seleccionadas para este proceso.

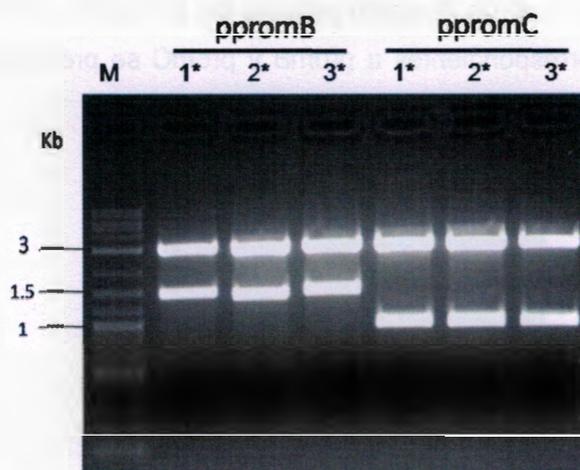


Figura 3. 15 Electroforesis del análisis de restricción para los plásmidos recombinantes con la enzima de restricción *EcoRI*. Las clonas correspondientes al ppromB presentaron el inserto de 3Kb de pGEM-T-Easy y de 1466 pb de la región del promotor *CrGPDH3*. Las clonas pertenecientes al ppromC presentaron el inserto de 3Kb de pGEM-T-Easy y de 938 pb de la región promotora más corta del *CrGPDH3*. M= marcador de peso molecular de 2 Log (New England Biolabs).

Los cromatogramas resultantes fueron analizados con el programa SeqMan del paquete bioinformático Lasergene V 7.2 mediante el cual se obtuvo el alineamiento de la secuencia de nucleótidos y se comparó con la secuencia reportada por el Phytozome. Las secuencias promB y promC íntegras pueden ser consultadas en los anexos 7 y 8 respectivamente.

3.3.3 Clonación del gen reportero GUSPlus.

El marco de lectura abierto del gen reportero *uidA* (GUSPlus) se amplificó mediante PCR y se visualizó el amplicón esperado de 2053 pb (figura 3.16). Como control positivo se utilizó ADNg de *C. reinhardtii* como molde y los oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento del gen de la actina (*CrActina*) obteniéndose el amplicón esperado de 409 pb. Como control negativo se preparó una mezcla de reacción con todos los elementos de la muestra experimental (oligonucleótidos) para amplificar al GUSPlus), pero con H₂O ultrapura en lugar del ADN molde.

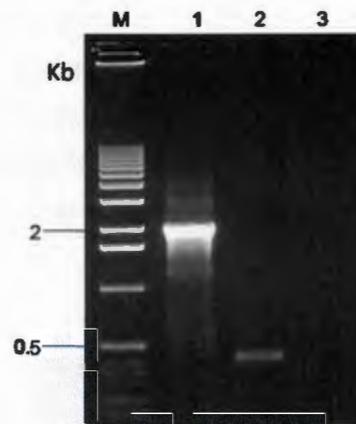


Figura 3. 16 Electroforesis de la amplificación del gen reportero *uidA*. En el carril 1 se muestra el amplicón esperado del GUSPlus con 2053 pb. 2= control positivo del gen de actina de *C. reinhardtii*. 3= H₂O ultrapura como control negativo. M= marcador de peso molecular 1Kb.

El amplicón de *uidA* obtenido se purificó del gel y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2% para observar su integridad (5 μ L de producto purificado) y este resultado se puede observar en la figura 3.17.

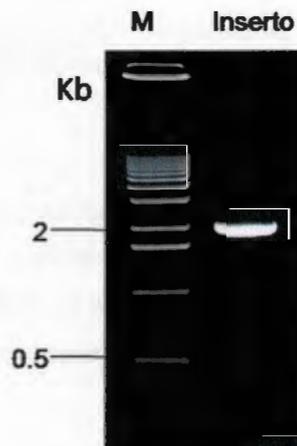


Figura 3. 17 Electroforesis del producto de PCR purificado del marco de lectura abierto del gen reportero *uidA* con un tamaño esperado de 2053 pb. M= corresponde al marcador de peso molecular de 1 Kb.

El amplicón de *uidA* purificado se clonó en el vector p-GEM-T-Easy. De las clonas obtenidas se analizaron seis. En la Figura 3.18, se muestra el resultado de la digestión con la enzima *EcoRI* (NEB) donde todas las clonas analizadas presentaron el tamaño de 2053 pb correspondientes al GUSplus y 3Kb correspondientes al vector p-GEM-T-Easy. También en esta figura se presenta con un asterisco (*) las muestras que fueron secuenciadas.

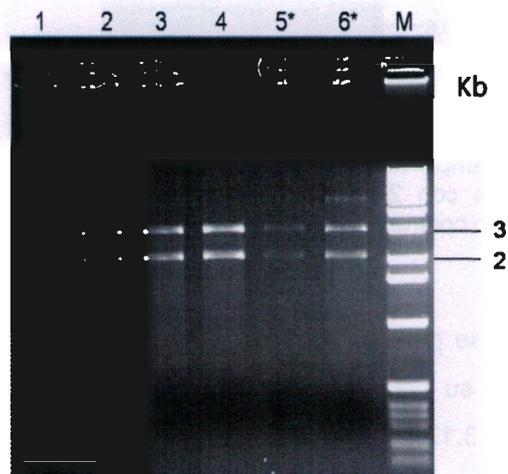


Figura 3. 18 Electroforesis del análisis de restricción con la enzima *EcoRI* para los plásmidos recombinantes con el gen reportero *uidA* con un tamaño de 2053 pb y el vector pGEM-T-Easy con 3Kb. M=marcador de peso molecular de 1Kb.

La secuencia de las dos clonas que fueron analizadas resultaron íntegras de acuerdo con la secuencia reportada en la base de datos del GenBank y se decidió tomar la clona 5 para continuar con la elaboración de las construcciones. El alineamiento de la secuencia íntegra del gen reportero puede ser consultada en el anexo 9.

3.3.4 Elaboración del plásmido de transformación pCrGPDHGus A.

3.3.4.1 Subclonación del gen reportero *uidA* para generar el pA1.

Para subclonar al gen reportero *uidA* en el vector de transformación pSP124S se realizó una doble digestión simultánea con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Not*I a pG y a pSP124S. Las reacciones de digestión de ambos plásmidos fueron purificadas de un gel de agarosa (figura 3.19).

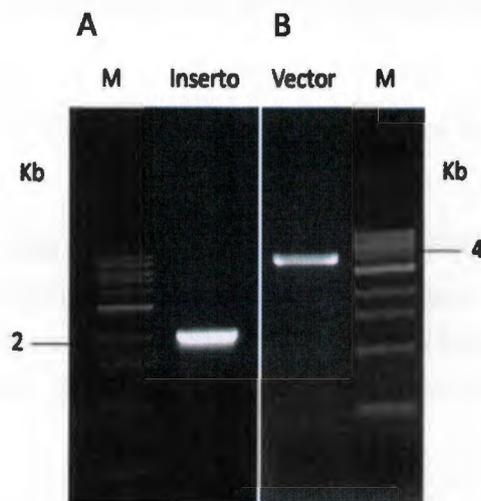


Figura 3. 19 Electroforesis de las muestras digeridas y purificadas. M=marcador de peso molecular de 1Kb. A) Inserto= gen reportero *uidA* con un tamaño de 2053 pb. B) Vector= pSP124S linealizado con un tamaño de 4132 pb.

A los productos purificados (figura 3.19) se realizó una reacción de ligación y se transformó a *E. coli*. De las colonias resultantes cinco fueron analizadas.

Mediante un análisis de restricción con las enzimas *Bam*HI/*Not*I (NEB) se identificó que las clonas 2, 4 y 5 resultaron positivas (figura 3.20) puesto que presentaron los insertos esperados de 2053 pb para el gen reportero *uidA* y 4132 pb pertenecientes al vector pSP124S. A este plásmido se le denominó pA1.

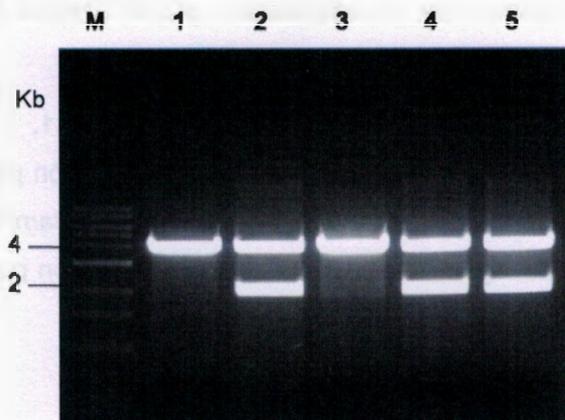


Figura 3. 20 Electroforesis del análisis de restricción con las enzimas *Bam*HI y *Not*I a los plásmidos recombinantes pA1. Las clonas 2, 4 y 5 corresponden al peso esperado de 2053 pb para el gen reportero *uidA* y 4132 pb perteneciente al vector pSP124S.

3.3.4.2 Subclonación del 3'UTR del *RBCS2* para generar el pA2.

El 3'UTR del *RBCS2* se encontraba clonado en el pS124S. Este fue escindido y purificado en gel de agarosa por medio de la digestión con las enzimas de restricción *Sac*I y *Not*I. Este mismo procedimiento se usó para linearizar el pA1 (figura 3.21).

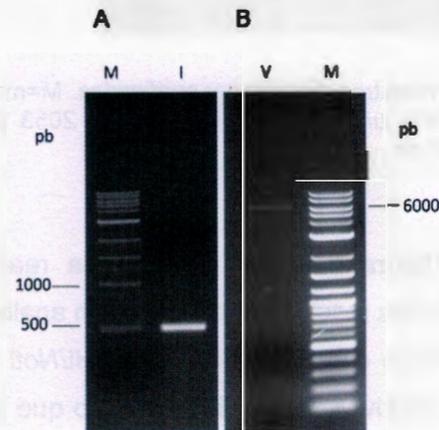


Figura 3. 21 Electroforesis del 3'UTR del *RBCS2* y el pA1 linearizado. A) I= 3'UTR del *RBCS2* (485 pb), M= marcador de peso molecular de 1 Kb. B) V= pA1 linearizado (6185 pb,) M=marcador de peso molecular 2 log.

El amplicón del 3'UTR se clonó en el pA1 y de las colonias obtenidas de bacterias de *E. coli* se analizó una clona, mediante la digestión con las enzimas *NotI* y *SacI* (NEB) (figura 3.22). La clona analizada, resultó positiva puesto que presentó los fragmentos esperados de 485 pb para el 3'UTR del *RBCS2* y 6185 pb pertenecientes al pA1. A este plásmido se le denominó pA2.

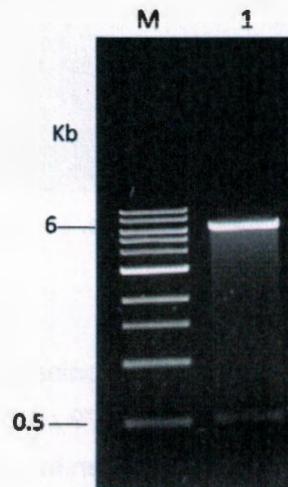


Figura 3. 22 Electroforesis del análisis de restricción con las enzimas *NotI* y *SacI* realizado al pA2. La clona 1 fue positiva con el peso esperado de 6185 pb correspondiente al pA1 y 485 pb perteneciente al 3'UTR del *RBCS2*.

3.3.4.3 Subclonación de *promA* para generar el pCrGPDHGus A.

Para la subclonación del *promA* en pA2 se realizó una doble digestión simultánea con las enzimas de restricción *EcoRI/BamHI* y las bandas de interés fueron purificadas como se observa en la figura 3.23.

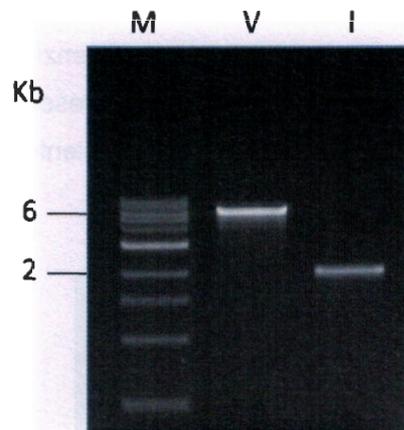


Figura 3. 23 Electroforesis de *promA* y el pA2 linealizado. M=marcador de peso molecular de 1Kb. V= pA2 de 6670 pb. I= *PromA* de 1979 pb.

Posteriormente *promA* fue clonada en pA2 y 5 colonias de *E. coli* fueron analizadas con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*. Los fragmentos de 1979 pb correspondiente a *promA* y 6670 pb perteneciente al pA2 pudieron ser identificados en las clonas 3 y 4. A este plásmido se le denominó pCrGPDHGus A.

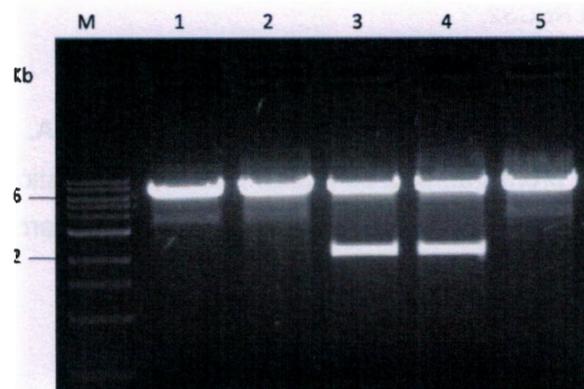


Figura 3. 24 Electroforesis del análisis de restricción con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* para los plásmidos recombinantes pCrGPDHGus A. La clonas 3 y 4 presentaron las bandas del peso esperado de 6670 pb correspondiente al pA2 y 1979 pb correspondiente al *promA*.

3.3.5 Elaboración de los plásmidos de transformación pCrGPDHGus B y pCrGPDHGus C.

Para obtener los plásmidos de transformación pCrGPDHGus B y pCrGPDHGus C, promB (1466 pb) y promC (938 pb) fueron clonados cada uno en el pA2. Lo anterior se realizó por medio de una digestión simultánea con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* para cada uno de los plásmidos (pB, pC y pA2), los cuales fueron purificados en gel de agarosa (Figura 3.25).

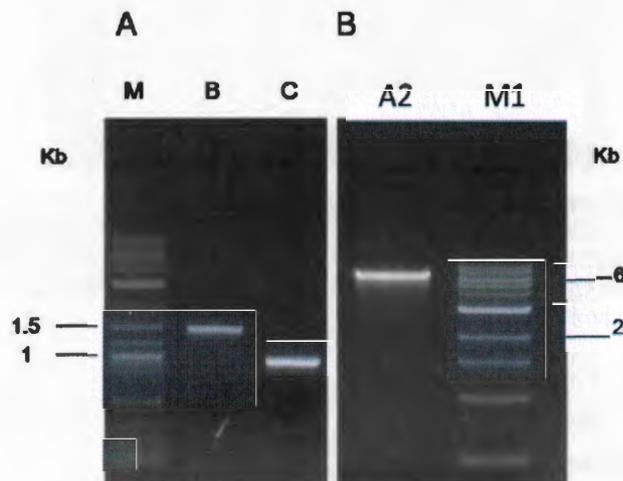


Figura 3. 25 Electroforesis de promB, promC y pA2 linealizado. A) M=marcador de peso molecular 2 Log. B= promB con 1466 pb. C=promC con 938 pb. B) A2=pA2 con 6.5 Kb. M1= marcador de peso moléculr de 1Kb.

Subsecuentemente promB y promC fueron clonados por separado en pA2. Se analizó tres colonias de bacterias por cada plásmido obtenido. En la figura 3.26 se muestra el resultado de la digestión con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*. Dos clonas resultaron positivas para pCrGPDHGus B (carril 2 y 3) presentado los fragmentos de 1466 pb correspondientes a promB y 6.5 Kb para el pA2. Por otro lado dos clonas resultaron positivas para pCrGHPDGus C (carril 4 y 5) presentado los fragmentos de 938 pb correspondientes a promC y 6.5 Kb para el pA2. Finalmente a los plásmidos positivos se les denominó pCrGPDHGus B y pCrGPDHGus C.



Figura 3. 26 Electroforesis del análisis de restricción con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI para los plásmidos recombinantes pCrGPDHGus B y pCrGPDHGus C. 2 y 3: muestras que resultaron positivas con 6.5Kb correspondientes al pA2 y 1466 pb de promB (pCrGPDHGus B). 4 y 5: muestras positivas con 6.5Kb pertenecientes al pA2 y 938 pb de promC (pCrGPDHGus C). M= marcador de peso molecular de 2 Log.

3.3.6 Expresión del gen reportero *uidA* bajo el control de *promA* en clonas individuales de *C. reinhardtii*.

3.3.6.1 Clonas de *C. reinhardtii* transformadas con el pCrGPDHGus A.

En un principio para identificar si el fragmento del promotor del *CrGPDH3* *promA* era capaz de dirigir la expresión del gen reportero *uidA*, las células de *C. reinhardtii* fueron transformadas mediante biobalística con el plásmido CrGPDHGus A.

De las células de *C. reinhardtii* transformadas se obtuvieron cinco cajas de Petri bombardeadas con el pCrGPDHGus A, cinco cajas de Petri bombardeadas con el pSP124s como controles del plásmido sin la construcción de interés, tres cajas sin bombardear como control del crecimiento del cultivo silvestre, y tres cajas sin bombardear pero conteniendo el antibiótico Zeocina como control del antibiótico. En la figura 3.27 se muestran las cajas bombardeadas y los controles mencionados.

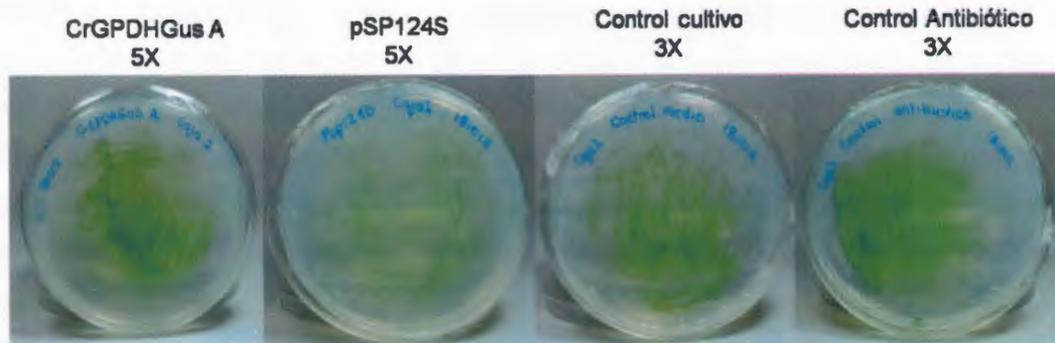


Figura 3. 27 Muestras representativas de cajas de Petri con los cultivos de *C. reinhardtii* transformados por biobalística.

Después del bombardeo, se extrajo el ADN genómico a las colonias recuperadas en el medio de selección con zeocina (putativamente transformadas). En la figura 3.28 se puede apreciar la integridad del ADN; A1, A2, A3, A4, A5 corresponden a cinco clonas recuperadas del bombardeo con pCrGPDHGusA, WT corresponde a la cepa silvestre y SP a una clona recuperada después del bombardeo con pSP124S sin la construcción de interés.

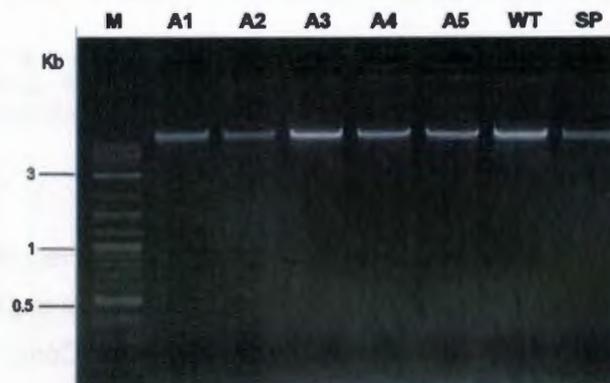


Figura 3. 28 Electroforesis de la extracción de ADN genómico de cinco colonias potencialmente transformadas. A1 a A5 corresponden a las muestras potencialmente transformadas con CrGPDHGus A. WT es la cepa silvestre de *C. reinhardtii*, y el SP corresponde a una clona transformada con el pSP124S vacío. M es el marcador de 2 Log.

En la figura 3.29 se puede observar la amplificación del gen *ble* con un tamaño de 456 pb realizado a las clonas putativamente transformadas de *C. reinhardtii*. Las cinco clonas que fueron analizadas (A1-A5) presentaron al gen *ble*. Como se esperaba, la clona SP presentó el amplicón esperado puesto que fue transformada con el pSP124S el cual contiene al gen *ble* que confiere resistencia a zeocina. La cepa silvestre no presentó amplificación como se esperaba. Como control positivo se colocó al ADN plasmídico de pCrGPDHGus A y como se observa en la figura presenta el amplicón esperado de 406 pb. Como control negativo de PCR se usó agua ultrapura.



Figura 3. 29 Electroforesis de la PCR para detectar la presencia del gen *ble*. Las muestras de la A1 a A5 muestran el amplicón esperado de 456 pb al igual que la muestra SP. Como se esperaba la muestra WT no presentó amplificación. C+= control positivo de ADN plasmídico de las construcción CrGPDHGusA y C-= control negativo con agua ultrapura.

Posteriormente se realizó el análisis por PCR para detectar al gen reportero *uidA*. Como se puede observar en la figura 3.30 las clonas A1, A2 y A3 contenían al gen *uidA* mientras que las clonas A4 y A5 que no lo contenían fueron descartadas. Como se esperaba, la muestra SP el no presentó amplificación puesto que fue transformada con el pSP124S vacío, es decir sin la construcción que contiene al *uidA*. Tampoco se observó amplicón en la cepa silvestre (WT) como era de esperarse. Como control positivo se colocó al ADN

plasmídico de pCrGPDHGusA y como se observa en la figura se presentó el amplicón de 159 pb. Como control negativo de la PCR se usó agua ultrapura.

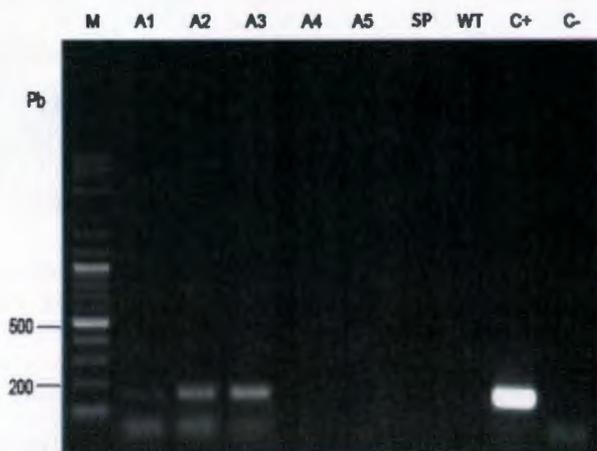


Figura 3. 30 Electroforesis de la PCR para detectar la presencia del gen *uidA* en clonas recombinantes de *C. reinhardtii*. Las muestras de la A1, A2 y A3 muestran el amplicón esperado de 159 pb. Como se esperaba el WT no presentó amplificación al igual que la muestra SP. C+= corresponde al control positivo de ADN plasmídico de las construcción CrGPDHGusA y C-= pertenece al control negativo de agua ultrapura.

3.3.6.2 Expresión del *uidA* en respuesta a 50 mM de NaCl en clonas de *C. reinhardtii* transformadas con pCrGPDHGus A.

Las tres clonas transformadas con pCrGPDHGus A (A1, A2 y A3) fueron sometidas a estrés osmótico por 50 mM de NaCl, incluyendo como controles a la cepa sin transformar de *C. reinhardtii* (WT) y la clona SP transformada con el plásmido pSP124S vacío. Para determinar si estos tratamientos con NaCl inducen cambios en la expresión dirigida por *promA* se extrajo el ARN total a la cepa silvestre de *C. reinhardtii*, las clonas A1, A2, A3, y la clona SP. En la figura 3.31 se muestra la calidad de la integridad del ARN total de las muestras analizadas.



Figura 3. 31 Electroforesis del ARN de las clonas recombinantes de *C. reinhardtii* con tratamiento de 50 mM de NaCl por 2 horas. Wt= cepa silvestre de *C. reinhardtii*, A1, A2, A3= clonas transformadas. SP= clonas transformadas con el plásmido vacío pSP124S.

Como se presenta en la figura 3.32, la expresión del gen reportero *uidA* se detectó tanto en las muestras tratadas como las no tratadas con 50 mM de NaCl (A1, A2, A3) con un tamaño de amplicón esperado de 159 pb, por lo que el promotor del *CrGPDH3* fue capaz de dirigir la expresión del gen reportero *uidA*. En el caso de la cepa silvestre (WT) y la SP no se observó expresión como era de esperarse. En la figura 3.32 se observa también la expresión del gen nativo *CrGPDH3* únicamente para las muestras tratadas con 50 mM de NaCl (WT, A1, A2, A3 y SP) como se esperaba, con un tamaño de amplicón de 280 pb. En la figura también se puede observar que se usaron cantidades similares de ARN para realizar la síntesis de ADN complementario puesto que identificado en todas las muestras el *CrActina* que se usó como control. Así mismo, se descarta la presencia de contaminación ADN genómico puesto que no fue detectado el amplicón de *CrActina* más su intrón (429 pb en total).

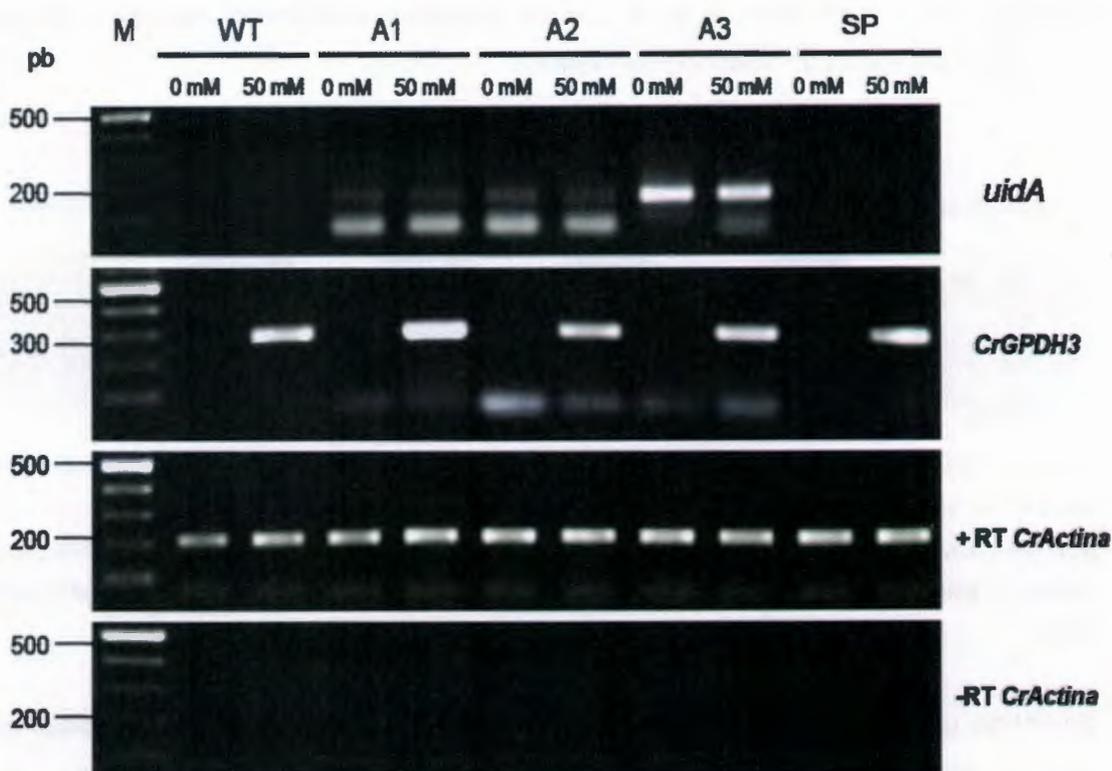


Figura 3. 32 Expresión del *uidA* en respuesta a 50 mM de NaCl por 2 h en clones de *C. reinhardtii* transformadas con pCrGPDHGus A. WT= cepa silvestre de *C. reinhardtii*, A1, A2, A3= clones transformadas. SP= clones transformadas con el plásmido vacío pSP124S.

3.3.7 Expresión del gen reportero *uidA* bajo el control de *promA*, *promB*, y *promC* en *C. reinhardtii*.

Cuando se observó que *promA* fue capaz de dirigir la expresión del gen reportero *uidA* se procedió a probar si los fragmentos *PromB* y *PromC* tenían la misma capacidad, por lo que se realizó la transformación de *C. reinhardtii* por biobalística con los plásmidos pCrGPDHGus B y pCrGPDHGus. Así mismo, se transformó con CrGPDHGusA para corroborar si la tendencia de expresión dirigida por *promA* era similar a la observada en la sección 3.3.6.2.

Como se puede observar en la figura 3.33 las colonias putativamente transformadas que emergieron del medio de selección con zeocina.

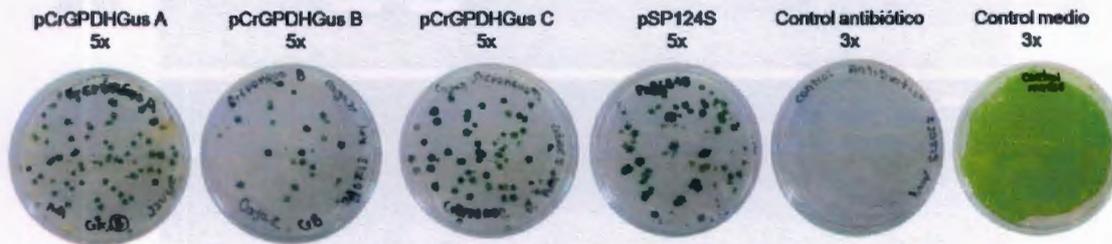


Figura 3. 33 Cajas de Petri con colonias putativamente transformadas de *C. reinhardtii* después del bombardeo con los plásmidos pCrGPDHGus A, pCrGPDHGus B y pCrGPDHGus C, así como con pSP124S. Como controles de transformación se colocó cultivo de cepa silvestre de *C. reinhardtii* en medio de selección con zeocina y cultivo de cepa silvestre de *C. reinhardtii* en medio de cultivo TAP.

Se obtuvo un "pool" del cultivo líquido de nueve clonas putativamente transformadas con cada plásmido, los cuales fueron tratados con 100 mM de NaCl, ó 0 mM de NaCl como control, como se describió en materiales y métodos. A cada "pool" se le denominó de acuerdo al plásmido con que había sido transformado: Gus A= pCrGPDHGus A, Gus B= pCrGPDHGus B, y Gus C= pCrGPDHGus C. En la figura 3.34 se presentan las muestras de ARN total extraído de cada "pool", donde se puede apreciar que el ARN es de buena calidad.

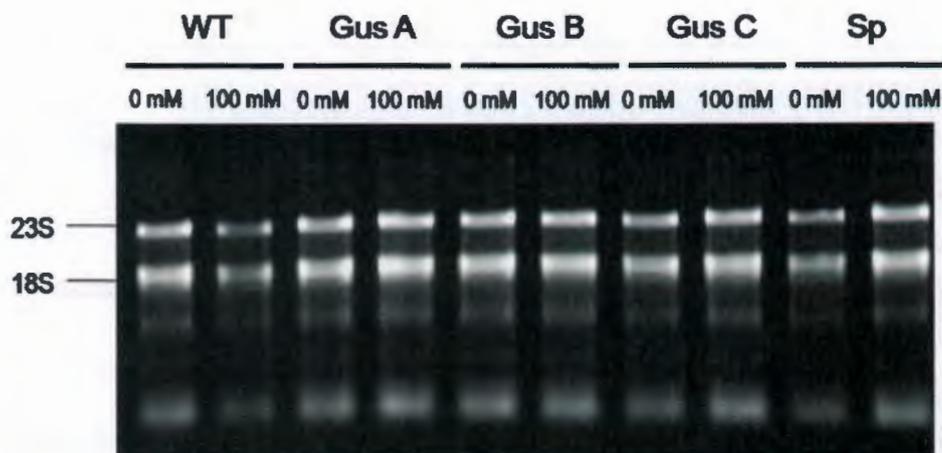


Figura 3. 34 ARN de muestras tratadas con 100 mM ó 0 mM de NaCl por 2 horas. WT= cepa silvestre de *C. reinhardtii*. Gus A, Gus B y Gus C corresponde a cada "pool" de 9 clonas de *C. reinhardtii* transformadas con los plásmidos pCrGPDHGus A, pCrGPDHGus B y pCrGPDHGus C respectivamente. SP= "pool" de 9 clonas de *C. reinhardtii* transformadas con el pSP124S vacío.

En la Figura 3.35 se presenta el resultado de la RT-PCR usando las muestras de ARN antes descritas, y se observó que los tres fragmentos clonados del promotor de *CrGPDH3* (promA, B y C) fueron capaces de conducir la expresión del gen reportero *uidA* y la expresión se observó tanto en las muestras tratadas como no tratadas con 100 mM de NaCl por 2 horas, con un tamaño esperado del amplicón de 159 pb. Cabe señalar que se notó un incremento en la expresión del reportero *uidA* en las muestras tratadas con NaCl. En el caso de la muestra de la cepa silvestre (WT) y la muestra transformada con el pSP124s vacío (SP) no se observó banda alguna como se esperaba. En la figura 3.35, como era de esperarse, se observó la expresión del gen nativo *CrGPDH3* solamente para las muestras tratadas con 100 mM de NaCl, con el tamaño de amplicón esperado de 280 pb. En la figura 3.35 también se pudo observar el gen de *CrActina* utilizado como control en todas las muestras con un tamaño de 209 pb en todas la muestras tratadas y no tratadas con NaCl, lo cual indica el uso de cantidades similares de ARN para la síntesis de ADNc y se comprueba la ausencia de contaminación con ADN genómico ya que el amplicón de *CrActina* mas su intrón (409 pb en total) no fue detectado.

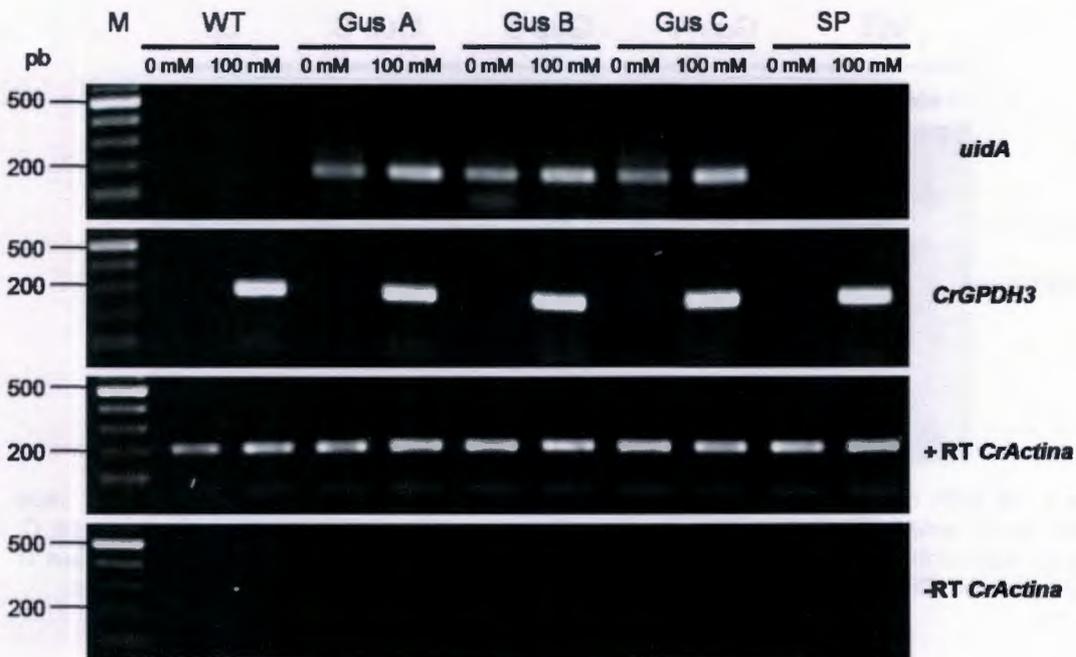


Figura 3. 35 Evaluación de la inducibilidad del promotor *CrGPDH3* mediante la expresión del gen reportero *uidA* por RT-PCR en muestras tratadas con 100 mM de NaCl por 2 horas. WT= cepa silvestre de *C. reinhardtii*. Gus A, Gus B y Gus C corresponde a cada "pool" de 9 clones de *C. reinhardtii* transformadas con los plásmidos *CrGPDHGus A*, *CrGPDHGus B* y *CrGPDHGus C* respectivamente. SP= "pool" de 9 clones de *C. reinhardtii* transformadas con el pSP124S vacío.

3.4 Discusión.

El gen *GPDH* codifica para la enzima glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (GPDH) que cataliza la reducción de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y NADH (Dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma reducida) a glicerol-3-fosfato (G3P) y NAD⁺ (Dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma oxidada) (Ansell *et al.* 1997). El producto de la reacción que cataliza la GPDH, el G3P, puede ser posteriormente defosforilado a glicerol por la acción de una enzima glicerol fosfatasa ó ser el precursor de la síntesis de todos los tipos de lípidos compuestos de glicerol, incluyendo lípidos de membrana y almacenaje (Goshal *et al.* 2002). En *C. reinhardtii* se han identificado tres genes homólogos a genes GPDH de microalgas: *CrGPDH1*, *CrGPDH2* y *CrGPDH3* (Herrera-Valencia *et al.* 2012). El análisis de expresión de estos genes mostró la

expresión de *CrGPDH1* tanto en condiciones normales de cultivo como ante un tratamiento de 200 mM de NaCl por 2 horas, y se sugirió que este gen podría estar implicado en la síntesis de lípidos de membrana y otros lípidos necesarios para el crecimiento celular y multiplicación en *C. reinhardtii*. Por otro lado, o se observó expresión de *CrGPDH2* y *CrGPDH3* en condiciones normales de cultivo, pero esta expresión fue inducida en respuesta a estrés osmótico con 200 mM de NaCl por dos horas, por lo que se sugirió que estos genes pudieran estar implicados en osmorregulación en esta microalga (Herrera-Valencia *et al.* 2012). Lo anterior también despertó el interés de estudiar el promotor de estos genes en busca de un promotor inducible que pudiera conducir la expresión de proteínas recombinantes de interés biotecnológico en *C. reinhardtii*.

Actualmente *C. reinhardtii* es considerada una plataforma atractiva para la producción de proteínas recombinantes, debido a su cultivo fácil y económico, su tasa de crecimiento rápido y la factibilidad de su manipulación genética (Manuel *et al.* 2008).

El contar con un promotor inducible en *C. reinhardtii* permitiría el control de la expresión de manera temporal de un transgen mediante la presencia de un inductor después de alcanzar una alta densidad celular, permitiendo una mayor acumulación de proteína recombinante, además de presentar ventajas industriales puesto que se podría expresar alguna proteína que pudiera ser tóxica para la célula (Ferrante *et al.* 2008).

Una primera estrategia para el estudio del promotor de *CrGPDH3* consistió en evaluar la expresión del gen reportero *uidA* bajo la regulación de una secuencia denominada *promA* de 1979 pb, que comprendía 285 pb del 5'UTR del *CrGPDH3* y 1694 pb río arriba a partir de esta secuencia dentro de la región que podría contener al promotor de este gen. Los resultados de este estudio demostraron que la secuencia *promA* de *CrGPDH3* fue capaz de conducir la expresión del gen reportero *uidA*, siendo éste el primer reporte del uso de una secuencia promotora de un gen *CrGPDH* en *C. reinhardtii* para conducir la expresión de un gen recombinante. Sin embargo, la expresión pudo detectarse tanto en las

muestras tratadas como en las no tratadas con 50 mM de NaCl, por lo que *promA* no se comportó como un promotor inducible en las clonas celulares analizadas. Además, se presentó una mayor acumulación de transcrito de *uidA* en una de las clonas (A3) a comparación de las otras dos líneas recombinantes obtenidas (A1 y A2). Aunado a esto, a las transformantes que se generaron, no se les analizó en número de copias de la construcción génica CrGPDHGus A transferidas genéticamente a *C. reinhardtii*, por lo que surge la posibilidad de que estos efectos pudieron deberse al método de transformación utilizado, puesto que existen reportes en donde se menciona que cuando se utiliza biobalística para la transformación genética se puede generar múltiples insertos con copias del transgen de interés a las células blanco, aumentando los efectos del silenciamiento génico (Angaji *et al.* 2010). Por otra parte, se ha reportado que los niveles de expresión de genes foráneos en microalgas como *C. reinhardtii*, además de ser generalmente bajos, son inconsistentes y difíciles de predecir, siendo una parte importante de esta variación debida al número de copias y los múltiples patrones de integración del transgen en el genoma, ya sea de forma invertida o con repeticiones en tándem (Potvin *et al.* 2010; Muskens *et al.* 2000; Baulcombe, 2004).

Cabe señalar que el gen reportero *uidA* fue escogido con base en el estudio realizado por Kumar *et al.* (2004), quienes determinaron que este gen podría ser utilizado como reportero en *C. reinhardtii*. Estos autores utilizaron al promotor constitutivo del gen CAMV 35S para conducir la expresión de este gen reportero. Además, cabe señalar que se utilizó este reportero puesto que se había observado que en otras microalgas ha sido utilizado para evaluar promotores endógenos, debido a su sensibilidad y estabilidad, como es el caso del estudio realizado por Li *et al.* (2009) quienes evaluaron la capacidad del promotor del gen que codifica para la anhidrasa carbónica de *Dunaliella salina* para ser inducido ante concentraciones de estrés osmótico por NaCl. En otro estudio realizado por Uji *et al.* (2012) la expresión del *uidA* ayudó a caracterizar al promotor del gen *pyKPA1*, gen que codifica para bombas de sodio en la macroalga roja *Porphyra yezoensis*. A su vez, es necesario señalar que en este trabajo no se le realizó ninguna modificación del uso del codón al reportero *uidA* para el núcleo de *C. reinhardtii* puesto que

en los estudios anteriormente mencionados no fue necesario realizar esta modificación para poder cumplir de manera exitosa con los objetivos de sus respectivos trabajos tanto para *C. reinhardtii* como para las otras microalgas. Por lo cual, no se considera que este factor haya influido en la acumulación de transcritos obtenidos en las clonas A1 y A2.

Para poder observar si *promA* podía dirigir la expresión del gen reportero *uidA* se analizaron 10 colonias potencialmente transformadas de *C. reinhardtii*, las cuales, conforme pasaron los diferentes escrutinios para verificar si estaban transformadas con la construcción genica *CrGPDHGus A* fueron disminuyendo a 5, hasta que solo a 3 clonas (A1, A2 y A3) se les pudo detectar acumulación de transcritos de *uidA*. Esta estrategia requirió bastante tiempo desde la transformación genética hasta observar una tendencia de expresión producida por *promA*. Además, se consideró que para evaluar la expresión del gen reportero *uidA* las tres clonas obtenidas no eran suficientes para concluir con un patrón de expresión fidedigno. Por lo que, se observó en la literatura que en ocasiones para evaluar la capacidad la expresión génica de algún promotor de interés en microalgas se hace uso de todo un cultivo de células potencialmente transformado y en el caso de plantas se realizó el análisis con cultivos de suspensiones celulares y de esta manera se puede llegar a un resultado en menor tiempo (Jarvis *et al.* 1990; Gan *et al.* 2003; Wang *et al.* 2007; Hirakawa *et al.* 2008).

A partir de estas estrategias mencionadas anteriormente y considerando sus ventajas se diseñó una segunda estrategia para el estudio del promotor de *CrGPDH3* que consistió en evaluar la expresión del gen reportero *uidA* usando “pools” de clonas bombardeadas por biobalística, de nuevo bajo la regulación de la secuencia *promA* antes descrita, así como de dos versiones más cortas de esta secuencia: *promB* y *promC*. *promB* de 1466, comprendía 285 pb del 5'UTR del *CrGPDH3* y 1181 pb río arriba a partir de esta secuencia dentro de la región que podría contener al promotor de este gen. *promC* de 938 pb, comprendía 285 pb del 5'UTR del *CrGPDH3* y 653 pb río arriba a partir de esta secuencia dentro de la región que podría contener al promotor de este gen. En esta estrategia se evaluó la expresión del *uidA* a partir de un “pool” de nueve colonias recuperadas del bombardeo de *C. reinhardtii* con cada uno de los plásmidos

pCrGPDHGus A, pCrGPDHGus B y pCrGPDHGus C que contenían al gen *uidA* bajo el control de las secuencias *promA*, *promB* y *promC* respectivamente. En esta ocasión el tratamiento consistió de 100 mM de NaCl por dos horas, debido a que se ha reportado que ante esta concentración de salinidad hubo un incremento en la acumulación de triacilglicéridos y que esta acumulación pudiera estar relacionada con una respuesta ante estrés osmótico Siaux *et al.* (2011). Dado que el GP3 que es un precursor tanto de glicerol como de triacilglicéridos (TAGs), es posible que el *CrGPDH3* esté involucrado tanto en la síntesis de glicerol como de TAGs en *C. reinhardtii*. Los resultados de este estudio demostraron que las tres secuencias *promA*, *promB* y *promC* fueron capaces de conducir la expresión del gen *uidA*. Para caracterizar promotores en *C. reinhardtii*, generalmente se toma una longitud aproximada de 2 Kb con el fin de abarcar todos los elementos en *cis* necesarios para que algún gen de interés pueda expresarse (Klein *et al.* 1992). En *C. reinhardtii* los promotores constitutivos del cloroplasto que se han caracterizado van en un rango de longitud aproximada de 100 a 300 pb (Klein *et al.* 1992; Klein *et al.* 1994; Sturm *et al.* 1994; Barnes *et al.* 2005). Por su parte, los promotores nucleares constitutivos que se han caracterizado en esta micoralga oscilan entre una longitud de 200 a 400 pb (Stevens *et al.* 1996; Schroda *et al.* 2000; Fisher *et al.* 2001). Por otra parte, los promotores de tipo inducible para el núcleo que se han caracterizado en *C. reinhardtii* tienen una longitud aproximada de 1000 pb (Ohresser *et al.* 1997; Villand *et al.* 1997; Ferrante *et al.* 2008). Cabe señalar que hasta la fecha no se ha reportado la identificación de algún promotor inducible para el cloroplasto.

En este estudio se encontró que 653 pb de la secuencia donde debe estar el promotor más las 285 pb del 5' UTR de *CrGPDH3* (*promC*) fueron suficientes para conducir la expresión de un gen recombinante (*uidA*). Queda por investigar si se podría usar una secuencia aún más corta como promotor, es decir, determinar el promotor mínimo, así como los sitios en *cis* involucrados en esta función.

Por otra parte, dado que se ha demostrado que la expresión del gen *CrGPDH* silvestre es inducible en respuesta a diferentes concentraciones de NaCl, se propuso que el promotor

de *CrGPDH* podría conducir la expresión de un gen recombinante también de manera inducible. En este estudio, la expresión del *uidA* conducida por alguna de las tres secuencias promA, promB y promC, se observó tanto en las muestras tratadas como en las no tratadas con 100 mM de NaCl, aunque fue notorio un incremento en la expresión de las muestras tratadas con NaCl. Una posible explicación puede ser que la región promotora del *CrGPDH3* abarca una longitud mayor a la clonada y que en ella existan elementos en *cis* que se encuentran regulando la expresión de este promotor de manera inducible. Por ejemplo, el promotor inducible por NaCl del gen de la anhidrasa carbónica (*DCAI*) en la microalga *D. salina* (Li *et al.* 2010) tiene una longitud ya caracterizada de 1432 pb incluyendo el 5'UTR, y a lo largo de su secuencia presenta elementos en *cis* (secuencias de GT en tándem) involucrados con la regulación inducible por esta sal. Cabe señalar que en las secuencias de *CrGPDH3* estudiadas no se encontraron secuencias parecidas a los elementos en *cis* del promotor del *DCAI*. Ohresser *et al.* (1997) caracterizaron al promotor del gen de la nitrato reductasa (*nit1*) de *C. reinhardtii*, que se induce con la presencia de nitrato, el cual presenta un tamaño de 1060 pb y por medio de experimentos de delección los autores observaron que toda la región contiene elementos esenciales para modular la eficiencia de la transcripción de forma inducible. En otro estudio realizado por Quinn *et al.* (1999) se caracterizó al promotor inducible del gen *CYC6*, el cual codifica para el citocromo 6 y por medio de la delección de nucleótidos identificaron su región promotora con 852 pb y encontraron elementos en *cis* involucrados con su inducibilidad por presencia de níquel y ausencia de cobre, los cuales son elementos que no se habían identificado para otro organismo eucarionte. A la región promA de *CrGPDH3* se le realizó un análisis bioinformático para identificar elementos en *cis* que pudieran estar relacionados con su inducibilidad mediante el programa PLACE, el cual funciona con una base de datos de elementos en *cis* caracterizados para plantas superiores. Con este análisis se pudieron identificar elementos característicos de promotores eucariontes como la caja TATA y la caja GC, sin embargo no se encontraron elementos en *cis* que estuvieran relacionados con estrés osmótico en plantas. Además, se analizaron 1000 pb más río arriba de la región promA, pero tampoco se encontró algún elemento en *cis* de este tipo. Por otra parte se realizó un análisis visual a la secuencia

PromA y 1000 pb río arriba de ésta secuencia en busca de la secuencia consenso AGGG involucrada con estrés osmótico en levaduras, sin embargo estos elementos tampoco fueron encontrados, por lo que al parecer los elementos involucrados con la inducibilidad por NaCl del *CrGPDH3* no han sido identificados previamente para otro organismo y tendrán que ser identificados de manera experimental, es decir por medio de delección de nucleótidos como los estudios realizados por Quinn *et al.* (1999).

Con todo lo presentado se sugiere que los promotores de tipo inducibles tanto en *C. reinhardtii* como en otras microalgas se presentan con un tamaño considerablemente mayor a los constitutivos, debido quizá a que su regulación es más compleja en comparación con estos últimos. Tal es el caso del promotor del gen *RBCS2* de *C. reinhardtii*, para el cual se determinó que 229 pb son necesarias para dirigir la expresión del gen reportero de la luciferasa (Lumbreras *et al.* 1998).

Con los resultados que se obtuvieron en este trabajo se pudo observar que el promotor del gen *CrGPDH3* fue capaz de conducir la expresión del *uidA*, sin embargo cualitativamente no se observó la misma intensidad de banda como la que presenta el gen nativo en condiciones de estrés osmótico por NaCl. Esto puede deberse a que, como se menciona en la literatura, diversos promotores de organismos eucariotas están regulados por elementos en *cis* llamados potenciadores o “enhancers” que se encuentran en sitios distales de los promotores, y se ha observado que pueden incrementar los niveles de transcripción de los genes, por lo que surge la posibilidad de que la causa de que no se estuvieran detectando los mismos niveles de transcrito que en nuestro fragmento clonado del promotor, a comparación del gen nativo, estén ausentes estos elementos en *cis* (Blackwood *et al.* 1998; Gaston *et al.* 2003; Wells *et al.* 1998, Komarnytsky *et al.* 2003; Rangarajan *et al.* 1989; Yang 1998).

Por otro lado, existe la posibilidad de que la inducibilidad del gen *CrGPDH3* esté regulada de forma negativa, es decir que exista la presencia de un represor que está unido a la secuencia de ADN a un sitio distal de la región promotora, tal como sucede en la levadura

Saccharomyces cerevisiae, donde se han realizado más estudios acerca de los mecanismos de adaptación durante el estrés por salinidad y se han detectado genes que se activan ante estas condiciones, así como se han revelado los mecanismos de regulación de éstos (Folch-Mallol *et al.* 2004). Un ejemplo claro es el gen *ENA1* que se ha presentado como un gen crucial para la adaptación celular ante la exposición de NaCl, el cual es altamente regulado a un nivel transcripcional y sus niveles de expresión incrementan en respuesta a estrés por NaCl y privación de glucosa tal como se muestra en el estudio realizado por Proft *et al.* (1998) donde identificaron la región promotora de 752 pb responsable de la inducción osmótica. Posteriormente, estos autores clonaron pequeñas secuencias río arriba de esta región y los fusionaron al promotor para evaluar la expresión del gen reportero que codifica para la β -galactosidasa e identificaron los elementos que estaban regulando a este gen. Estos autores descubrieron que en ausencia de las secuencias río arriba del promotor la expresión de la β -galactosidasa se comportaba de forma constitutiva tanto para las muestras tratadas como no tratadas con 0.3M de NaCl, y en la presencia de estas secuencias el estado basal de la β -galactosidasa se reprimía, siendo inducida ante la presencia de las condiciones de NaCl mencionadas. Estos autores concluyen que la inducción de este gen se debe a la presencia de un represor que está unido a la secuencia río arriba de la región promotora que habían caracterizado.

Debido a todo lo anterior, será necesario continuar con el estudio de la secuencia del promotor del gen *CrGPDH3*, para determinar si se necesita alguna secuencia río arriba que esté relacionada con su inducibilidad ante presencia de NaCl, así como para incrementar los niveles de expresión obtenidos cuando dirigen la expresión de un gen recombinante, para que sean al menos similares a como se observa en el gen nativo de *C. reinhardtii*. Además, cabe señalar que una vez que se identifiquen los elementos en *cis* necesarios para que el promotor del *CrGPDH3* se exprese de manera inducible, será interesante comparar los niveles de expresión y acumulación de proteína obtenidos con otros promotores que se han estudiado hasta este momento para esta microalga, como es

el caso del promotor inducible del CYC6 (Ferrante *et al.* 2008), y el caso del promotor binario de tipo constitutivo HP70A/RBCS2 (Eichler-Stahlberg *et al.* 2009).

Las evidencias presentadas en este estudio servirán de base para estudios posteriores que permitirán evaluar si el promotor del *CrGPDH3* pudiera ser utilizado para dirigir la expresión de genes de interés biotecnológico de manera inducible en la microalga verde *C. reinhardtii*.

3.5 Conclusiones.

1. Las secuencias promA, promB y promC de *CrGPDH3* estudiadas en este trabajo fueron capaces de dirigir la expresión del gen reportero *uidA*, siendo 938 pb que incluyen al 5'UTR (promC) suficientes para dirigir la expresión de este gen reportero.
2. Las secuencias promA, promB y promC dirigieron la expresión del *uidA* tanto en condiciones normales de cultivo como en respuesta al tratamiento de estrés osmótico por NaCl, pero su expresión aumentó en respuesta al tratamiento.
3. Será necesario continuar con el estudio del promotor de *CrGPDH3* para definir las secuencias necesarias para que dirigir una alta expresión de un gen recombinante de manera inducible.

3.6 Bibliografía.

Angaji S., Hedayati S., Poor R., Poor S., Shiravi S., Madani S., (2010) Application of RNA interference in plants. *Plant Omics* 3, 77–84.

Ansell R., Granath K., Hohmann S., Thevelein J., Adler J. (1997) The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J.* 6, 2179-218.

- Barnes D., Franklin E., Schultz J., Henry R., Brown E., Coragliotti A., Mayfield S. (2005) Contribution of 5'- and 3'-untranslated regions of plastid mRNAs to the expression of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast genes. *Mol Genet Genomics* 274, 625–636.
- Blackwood E., Kadonaga J. (1998) Going the Distance: A Current View of Enhancer Action. *Science* 281, 60-63.
- Baulcombe D. (2004) RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356-363.
- Gan S., Qin S., Yasmin R., Othman D., Phang S. (2003) Transient expression of *lacZ* in particle bombarded *Gracilaria changii* (Gracilariales, Rhodophyta). *J Appl Phycol* 15, 351–353.
- Eichler-Stahlberg E., Weisheit W., Ruecker W., Heitzer M. (2009) Strategies to facilitate transgene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 229, 873-883.
- Ferrante P., Catalanotti C., Bonente G. (2008) An optimized, chemically regulated gene expression system for *Chlamydomonas*. *PLoS ONE* 3, e3200.
- Fischer N., Rochaix D. (2001) The flanking regions of *PsaD* drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Genet Genomics* 265, 888–894.
- Frey H., Bachmann H., Peters J., Siffert W. (2009) PCR-amplification of GC-rich regions: 'slowdown PCR'. *Nature Protocols* 3, 8-10.
- Gaston K., Jayaraman P. (2003) Transcriptional repression in eukaryotes: repressors and repression mechanisms. *CMLS Cell Mol Life Sci* 60, 721–741.
- Harris E. (1989) The *Chlamydomonas* sourcebook. A comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. (ed.) Academic Press, Inc.
- Harris E. (2001) *Chlamydomonas* as a model organism. *Plant Physiol* 52, 363–406.

- Hirakawa Y., Kofuji R., Ishida K. (2008) transient transformation of a chlorarachniophyte alga, *lotharella Amoebiformis* (chlorarachniophyceae), with *uid*a and *egfp* reporter Genes. *J Phycol.* 44, 814-820.
- Herrera-Valencia V. A., Macario-González L. A., Casais-Molina M. L., Beltran-Aguilar A. G., Peraza-Echeverria S. (2012) In Silico Cloning and Characterization of the Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase (GPDH) Gene Family in the Green Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Microbiol* 64, 477–485.
- Innis M., Gelfand M. (1990) Optimization of PCRs. pp. 3-12 in: *PCR Protocols* (Innis, Gelfand, Sninsky and White, eds.); Acad. Press, New York. 6, 345-351.
- Jarvis E. E., Brown L. (1990) Transient expression of firefly luciferase in protoplast of the green alga *Chlorella ellipsoidea*. *Curr Genet* 19, 317-321.
- Klein U., James D., Camp D., Bogorad L. (1992) Two types of chloroplast gene promoters in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci* 89, 3453-3457.
- Klein U., James D., Camp D., Bogorad L. (1994) Activity of the *Chlamydomonas* chloroplast *rbcl* gene promoter is enhanced by a remote sequence element. *Proc Natl Acad Sci* 91, 10819-10823.
- Komarnytsky S., Borisjuk N. (2003) Functional analysis of promoters elements in plants. *Plant Phycol* 25:113-141.
- Jarvis E., Brown L. (1990) Transient expression of firefly luciferase in protoplast of the green alga *Chlorella ellipsoidea*. *Curr. Genet.*, 19:317-321.
- Kumar S., Misquitta R., Reddy V., Raob B., Rajama M. V. (2004) Genetic transformation of the green alga—*Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci* 166, 731–738.

- Li Y., Lu Y., Xue L., Xie H. (2010) A structurally novel salt-regulated promoter of duplicated carbonic anhydrase gene 1 from *Dunaliella salina*. *Mol Biol Rep* 37, 1143–1154.
- Lumbreras V., Stevens D., Purton S. (1998) Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron. *Plant J.* 14, 441–447.
- Marenkova T., Deineko E. (2010) Transcriptional gene silencing in plants. *J. Genet.* 46, 511–520.
- Manuell A., Mayfield S. (2006) A bright future for *Chlamydomonas*. *Genome Res* 7, 312-327.
- Muskens M., Vissers A., Mol J., Kooter J. (2000) Role of inverted DNA repeats in transcriptional and post-transcriptional gene silencing. *Plant Mol Biol* 43, 243-260.
- Ohresser M., Matagne R., Loppes R. (1997) Expression of the arylsulphatase reporter gene under the control of the nit1 promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet* 31, 264–271.
- Proft M., Serrano R. (1999) Repressors and Upstream Repressing Sequences of the Stress-Regulated *ENA1* Gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP Protein Sko1p Confers HOG-Dependent Osmotic Regulation. *Mol Cell Biol* 19, 537–546.
- Potvin G., Zhang Z. (2010) Strategies for high-level recombinant protein expression in transgenic microalgae: A review. *Biotechnol Adv* 28, 910–918.
- Quinn J., Nakamoto J., Merchant S. (1999) Induction of Coproporphyrinogen Oxidase in *Chlamydomonas* Chloroplasts Occurs via Transcriptional Regulation of *Cpx1* Mediated by Copper Response Elements and Increased Translation from a Copper Deficiency-specific Form of the Transcript. *J Biol Chem* 274, 14444–14454.
- Quiagen (2001) The Bench Guide. Protocols, hints, and tips for molecular biology labs. Disponible en: <http://www.qiagen.com/literature/benchguide/default.aspx>. Acceso: 300113.
- Raiser M. R., Querfurth H., Warnatz H., Lehrach M., Yaspo S. (2006) An efficient and economic enhancer mix for PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 347, 747–751.

- Rangarajan P., Padmanaban G. (1989) Factors regulating the transcription of eukaryotic protein coding genes and their mechanism of action: a review. *J Biosci* 14, 189–202.
- Rochaix S., Purton S. (1996) The bacterial phleomycin resistance gene *ble* as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*. *Mol Genet Genomics* 251, 23-30.
- Sahdev S., Saini S., Tiwari P., Saxena S., Saini K. (2007) Amplification of GC-rich genes by following a combination strategy of primer design, enhancers and modified PCR cycle conditions. *Mol Cell Probes* 21, 303–307.
- Sambrook J., Russell D. W. (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Third edition Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York, 1, 536-539.
- Schroda M., Blöcker D., Beck C. (2000) The *HSP70A* promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*. *Plant J.* 21, 121-131.
- Stevens R., Roehaix J., Purton S. (1996) The bacterial phleomycin resistance gene *ble* as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*. *Mol Genet Genomics* 251, 23-30.
- Siaut M., Cuine C., Cagnon C. (2011) Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnol* 11, 1–15.
- Sturm N., Kuras R., Buschlen S., Sakamoto., Kindle K., Stern D., Wollman K. (1994) The *petD* Gene Is Transcribed by Functionally Redundant Promoters in *Chlamydomonas reinhardtii* Chloroplasts. *Mol Cell Biol* 8, 6171-6179.
- Teixeira F., Colot V. (2010) Repeat elements and the Arabidopsis DNA methylation landscape. *Heredity* 105, 14–23.

- Uji T., Mizuta H., Saga N. (2012) Characterization of the Sporophyte-Preferential Gene Promoter from the Red Alga *Porphyra yezoensis* Using Transient Gene Expression. *Mar. Biotechnol* 15, 188-196.
- Villand P., Eriksson M., Samuelsson G. (1997) Carbon dioxide and light regulation of promoters controlling the expression of mitochondrial carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochem J* 327, 51-57.
- Wang C., Wang Y. (2007) Transient Expression of the GUS Gene in a Unicellular Marine Green Alga, *Chlorella* sp. MACC/C95, via Electroporation. *Biosci Biotechnol Biochem* 12,180-183.
- Wang C., Wang Y., Siau Q., Gao X. (2007) Transient Expression of the GUS Gene in a Unicellular Marine Green Alga, *Chlorella* sp. MACC/C95, via Electroporation. *Biotechnol Bioeng* 12, 180-183.
- Wells S., Hillner P., Vale R., Sachs A. (1998) Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell* 2, 135-190.
- Yang V. (1998) Eukaryotic Transcription Factors: Identification, Characterization and Functions. *Ann N Y Acad Sci* 1 28, 2045–2051.
- Zhang W., Hu G., Deisseroth A. (1991). Improvement of PCR sequencing by formamide. *Nat Rev Genet* 19, 23:6649.

CAPITULO IV

4.1 DISCUSIÓN GENERAL.

En este trabajo se caracterizó una región putativa del promotor del gen *CrGPDH3* (1694 pb) incluyendo su 5'UTR (285 pb) mediante varias estrategias tanto bioinformaticas como experimentales.

En una primera parte, con el programa bioinformatico PLACE se pudieron predecir elementos en *cis* que se encuentran con frecuencia en organismos eucariotes a lo largo de la región donde supuestamente se encuentra el promotor del *CrGPDH3* (2000 pb). Los elementos encontrados fueron la caja TATA, la caja GC, la caja CAAT y una caja GATA, por lo que, se hace evidente que esta secuencia cuenta con los elementos en *cis* para cumplir la función un promotor de tipo eucariote (Patikoglou *et al.* 1999).

Como el gen *CrGPDH3* es de expresión inducible por NaCl se esperaba que el PLACE identificara elementos de respuesta en *cis* involucrados en estrés por salinidad, sin embargo estos no pudieron ser identificados como los que ya se han caracterizado en plantas superiores. A pesar de que tambien se hizo un análisis de manera visual para identificar elementos de *cis* relacionados con salinidad en levaduras, no se tuvo éxito, por consiguiente se tendrá que llevar a cabo de mañera experimental esta búsqueda con deleciones mas finas de nucleótidos como se realizó comúnmente cuando se quiere caracterizar a un promotor de interés y las herramientas bioinformaticas actuales no pueden brindar una predicción como tal (Quinn *et al.* 1999; Uji *et al.* 2012).

Como segunda parte para la caracterización del promotor de *CrGPDH3* fue importante conocer la concentración minima de NaCl y el tiempo en el cual este promotor puede dirigir de manera inducible la expresión de un gen de interés. Por lo que, estas condiciones fueron analizadas en el gen nativo por medio de RT-PCR.

Los resultados del análisis mostraron la expresión inducible del *CrGPDH3* en concentraciones de 5, 50 y 100 mM de NaCl, en los cuales 5 minutos fueron suficientes

para detectar presencia de transcrito y 60 minutos para llegar al punto máximo de expresión. Con estos resultados surge la primera evidencia de la tendencia de expresión del gen *CrGPDH3* ante concentraciones diferentes a 200 mM de NaCl por tiempos inferiores a las 2 horas reportadas por Herrera-Valencia *et al.* (2012).

Se sabe que *C. reinhardtii* es capaz de soportar hasta ciertas concentraciones de estrés salino (200 mM) (Herrera-Valencia *et al.* 2012) y esto se debe a la acumulación de glicerol como soluto osmorregulador como método de supervivencia en condiciones de estrés osmótico. Por lo que, con los resultados que se obtuvieron se sugiere que el promotor del gen *CrGPDH3* en *C. reinhardtii* es muy sensible a la inducción por estrés osmótico y es muy probable que para poder contrarrestar los efectos de este estrés se esté sintetizando glicerol de forma muy rápida como sucede en otros microorganismos (Hohmann, 2002).

Como última parte de este trabajo y como parte de la caracterización del promotor del *CrGPDH3* se clonaron tres fragmentos de la región que supuestamente debe contener al promotor del *CrGPDH3* más su región 5'UTR y se evaluó si alguna de estas regiones era capaz de dirigir la expresión inducible de un gen reportero, en este caso el *uidA*.

Los resultados mostraron que los tres fragmentos promA, promB y promC fueron capaces de dirigir la expresión del gen reportero *uidA*, siendo promC el fragmento de menor longitud, suficiente para dirigir esta expresión.

La expresión del *CrGPDH3* se ha reportado como inducible (Herrera-Valencia *et al.* 2012) por lo que se esperaba que algún fragmento del promotor estudiado (promA, promB y promC) pudiera dirigir la expresión del *uidA* de forma inducible con NaCl. Sin embargo, el análisis mostró que la expresión del reportero pudo detectarse tanto en las muestras tratadas como en las no tratadas con NaCl indiferentemente de la concentración de sal a las que fueron tratadas las células recombinantes de *C. reinhardtii*. Esta evidencia sugiere que quizá la región promotora del *CrGPDH3* tenga una longitud mayor a la clonada y que en ella existan elementos en *cis* que este asociados a la inducibilidad de este promotor de

tal manera tal como sucede como sucede en otros microorganismos, por ejemplo en levaduras (Proft *et al.* 1998).

Por otro lado, aunque *promA*, *PromB* y *PromC* pudieron dirigir la expresión de *uidA*, cualitativamente esta expresión fue mucho mas baja que la presenta el gen silvestre *CrGPDH3* en condiciones de estrés osmótico por NaCl. Una posible explicación para este resultado es que quizá la secuencia promotora del *CrGPDH3* este siendo regulada por algún enhancer y como no esta presente el el fragmento que se clonó no se estan detectando los mismos niveles de transcrito a comparación del gen nativo.

Con todas las evidencias generadas en este trabajo se logró caracterizar parte del promotor *CrGPDH3*, por lo que será necesario continuar con el estudio de esta secuencia para determinar el promotor mínimo, la identificación de los elementos en *cis* relacionados con su inducibilidad, asi como para incrementar los niveles de expresión en genes recombinantes como se ha observado en el gen nativo de *C. reinhardtii*.

4.2 CONCLUSIONES GENERALES.

- 1 Con 30 minutos de exposición la expresión del gen *CrGPDH3* fue inducida bajo condiciones de estrés salino de 200 mM de NaCl.
- 2 La expresión del *CrGPDH3* fue inducida a partir de los cinco minutos de exposición a una concentración tan baja como es 5 mM de NaCl, y el mismo patrón se observó a 50 y 100 mM de NaCl.
- 3 La acumulación de transcrito del *CrGPDH3* alcanzó su máximo punto de expresión a los 60 minutos de exposición a las concentraciones evaluadas de 5, 50 y 100 mM de NaCl.

- 4 Las secuencias promA, promB y promC de *CrGDPH3* estudiadas en este trabajo pudieron conducir la expresión del gen reportero *uidA*, siendo 938 pb que incluyen al 5'UTR (promC) suficientes para dirigir la expresión de este gen reportero.
- 5 Las secuencias promA, promB y promC condujeron la expresión del *uidA* tanto en condiciones normales de cultivo como en respuesta al tratamiento de estrés osmótico por NaCl, pero su expresión aumentó en respuesta a tratamiento.
- 6 Será necesario continuar con el estudio del promotor de *CrGDPH3* para definir la o las secuencias necesarias para que conduzca una alta expresión de un gen recombinante de manera inducible.

4.3 PERSPECTIVAS.

En este estudio se evaluó la expresión del gen *CrGDPH3* mediante RT-PCR y se encontró que este gen se indujo en respuesta a tratamientos de 5, 50, 100 y 200 mM NaCl por tiempos de exposición de 5, 30, 60 y 120 minutos, alcanzando el punto de saturación de la PCR a partir de una hora. Será interesante investigar cual sería la concentración mínima de NaCl que necesita este gen para expresarse y si existe una correlación con el tiempo de exposición, es decir, si a una concentración mínima se requieren más de 120 min para llegar al punto de saturación. De igual forma, se podría realizar la cuantificación de la acumulación de transcritos mediante PCR en tiempo real por cada tratamiento evaluado.

Por otro lado, estos resultados podrán servir de base para caracterizar al promotor del gen *CrGDPH2*, cuya expresión también se ha reportado como inducible en respuesta a estrés osmótico con 200 mM de NaCl por dos horas.

Por otra parte, las tres secuencias de la región promotora de *CrGDPH3* evaluadas (promA, promB, promC) fueron capaces de conducir la expresión del gen *uidA* de manera constitutiva. Se observó que la región promC con 938 pb, fue suficiente para conducir la

expresión de un gen recombinante, en este caso el gen reportero *uidA*, por lo que sería interesante investigar si se podría usar una secuencia aún más corta como promotor, es decir, determinar el promotor mínimo, así como los sitios en *cis* involucrados en esta función.

También se podrá realizar la cuantificación de acumulación de transcritos de *uidA* que se generaron bajo los fragmentos promA, promB, promC, así como determinar la presencia de la enzima β -glucuronidasa por medio de ensayos histoquímicos y cuantificar la actividad de esta enzima por medio de fluorimetría.

Por otro lado será necesario clonar un fragmento río arriba de promA y fusionarlo a la región mínima necesaria para que el *uidA* se exprese, y de esta manera determinar los elementos en *cis* que estén relacionados con su inducibilidad y para incrementar sus niveles de expresión como se observa en el gen nativo de *C. reinhardtii*. El modelo propuesto para llevar a cabo este estudio se presenta en la figura 4.1.

Una vez que se consiga la secuencia del promotor de *CrGPDH3* que sea capaz de conducir la expresión de un gen recombinante de manera inducible, se podrá determinar cuál es la concentración y tiempo mínimo de NaCl para que este promotor pueda conducir la expresión de genes de interés biotecnológico.

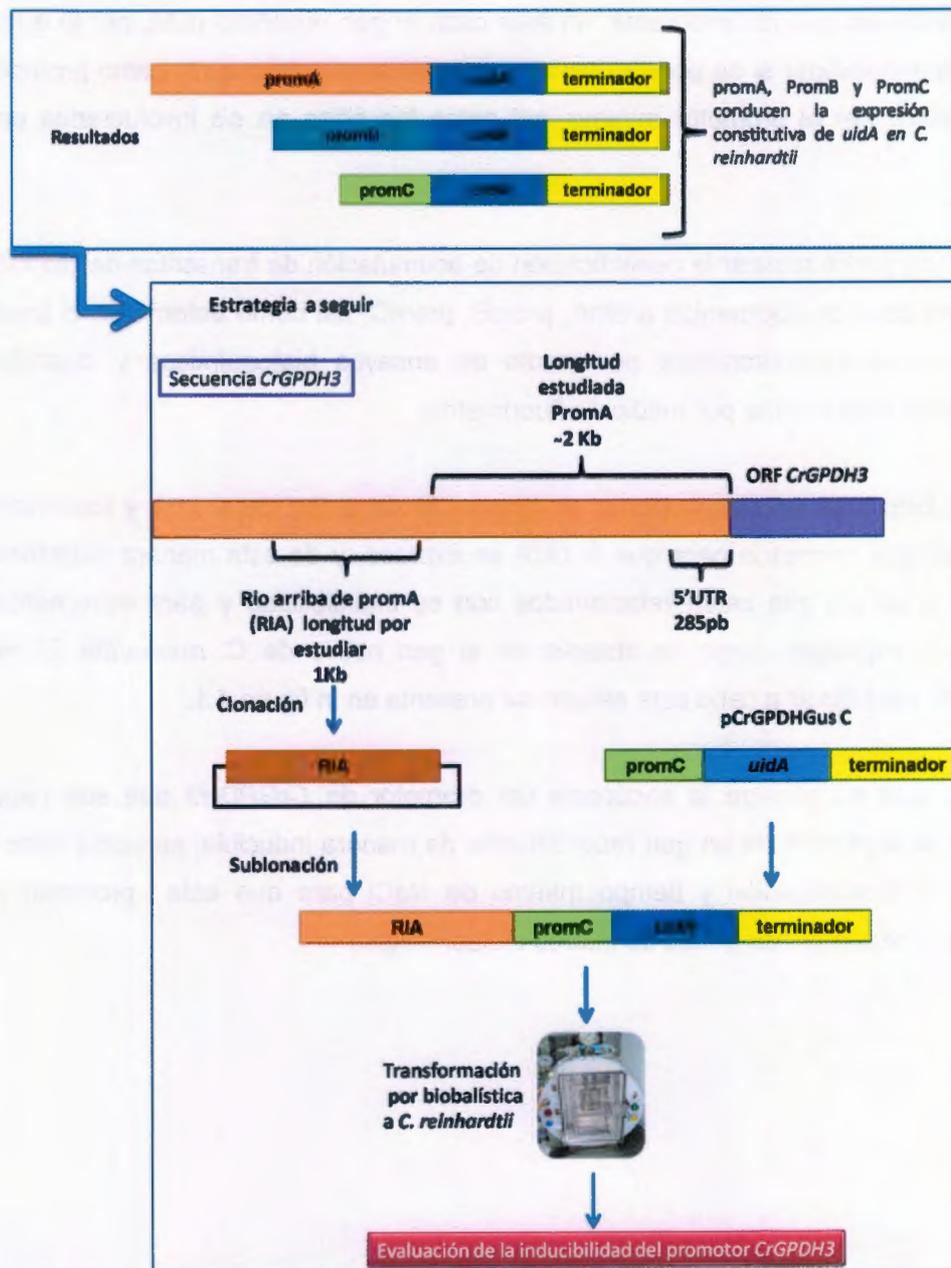


Figura 4. 1 Estrategia para evaluar la inducibilidad del promotor *CrGPDH3*.

4.4 Bibliografía.

- Herrera-Valencia V. A., Macario-González L. A., Casais-Molina M. L., Beltran-Aguilar A. G., Peraza-Echeverria S. (2012) In Silico Cloning and Characterization of the Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase (GPDH) Gene Family in the Green Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Microbiol* 64, 477–485.
- Hohmann S. (2002) Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 300–372.
- Li Y., Lu Y., Xue L., Xie H. (2010) A structurally novel salt-regulated promoter of duplicated carbonic anhydrase gene 1 from *Dunaliella salina*. *Mol Biol Rep* 37, 1143–1154.
- Lee D., Kim M., Ryu Y., Seo J. (2008) Cloning and characterization of CmGPD1, the *Candida magnoliae* homologue of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *FEMS Yeast Res* 8, 1324–1333
- Leon R., Galván F. (1994) Halotolerance studies on *Chlamydomonas reinhardtii*: glycerol excretion by free and immobilized cells. *J Appl Phycol* 6, 13-20.
- Patikoglou G., Kim J. L., Sun L., Yang S., Kodadek K. U (1999) TATA element recognition by the TATA box-binding protein has been conserved throughout evolution. *Genes dev*, 13, 3217–3230.
- Peng F., Li G., Wang X., Jiang Y., Yang Y. (2010) Cloning and characterization of a glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*NAD*⁺) gene from the halotolerant yeast *Pichia farinose*. *Yeast* 27, 115–121.
- Proft M., Serrano R. (1999) Repressors and Upstream Repressing Sequences of the Stress-Regulated *ENA1* Gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP Protein Sko1p Confers HOG-Dependent Osmotic Regulation. *Mol Cel Biol* 19, 537–546.

Uji T., Mizuta H., Saga N. (2012) Characterization of the Sporophyte-Preferential Gene Promoter from the Red Alga *Porphyra yezoensis* Using Transient Gene Expression. *Mar. Biotechnol* 15, 188-196.

Quinn J., Nakamoto J., Merchant S. (1999) Induction of Coproporphyrinogen Oxidase in *Chlamydomonas* Chloroplasts Occurs via Transcriptional Regulation of *Cpx1* Mediated by Copper Response Elements and Increased Translation from a Copper Deficiency-specific Form of the Transcript. *J Biol Chem* 274, 14444–14454.

ANEXOS.**Anexo 1****A) Preparación de medio TAP (Tris-Acetato-Fosfato) (Harris, 1989)**

Soluciones stock	Para 1 litro
1M Tris base	20 ml
Buffer de Fosfato II	1 ml
Metales traza de Hutner	1 ml
Solución A	10 ml
Acido acético glacial	1 ml
Ajustar el pH a 7.0	

Preparación de las soluciones stock

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

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

Solución de metales traza de Hutner	
Componentes	Para 500 ml
H ₃ BO ₃	5.7 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	11 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	2.53 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.495 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.805 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.785 g
Mo ₇ O ₂₄ (NH ₄) ₆ ·H ₂ O	0.5 g

Para medio TAP semisólido se agregan 15 g de agar bacteriológico (Merck KGaA Mikrobiologie) por cada 1000 mL de medio, después de ajustar el pH, y se esteriliza por autoclave a 121 °C y 15 lb/cm².

Preparación de las soluciones para la extracción de ADN.

A) Preparación de Yoduro de Lugol

KI (Yoduro de Potasio).....2.0 g
Cristales de Yodo.....1.0 g

Preparación:

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

En campana de extracción:

2. Los cristales de yodo se pesaron utilizando un vaso de precipitado de 250 mL previamente forrado con papel aluminio.
3. Los cristales de yodo se disolvieron en aproximadamente 40 ml de agua destilada utilizando una parrilla de agitación.
4. Cuando la mayor parte de los cristales se disolvieron, se agregó la solución de KI. Se agitó hasta disolver y se aforó posteriormente hasta un volumen de 100 mL con

agua destilada

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

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

B) Preparación Buffer TEN

REACTIVOS	Para 250 ml de Buffer
TRIS HCl 1 M pH8.0	12.5 ml
EDTA 0.5 mM	0.4653 g
NaCl	4.383 g

Modo de Preparación:

1.- Disolver los componentes indicados en la tabla en un volumen aproximado de agua de 200 ml

2.- Una vez disueltos, se aforó a 250 ml y esterilizó en autoclave

3.- La solución se almacenó a temperatura ambiente.

C) Preparación Buffer TE

Este buffer está conformado de TRIS HCl 100 mM pH8.0; EDTA 10 mM pH8.0

REACTIVOS	Para 250 ml de
TRIS HCl 100 mM pH8.0	12.5 ml
EDTA 0.5 M pH 8.0	0.4653 g

Modo de Preparación:

1.- Se disolvieron los componentes indicados en la tabla en un volumen aproximado de agua de 90 ml.

2.- Una vez disueltos, se aforó a 100 ml y esterilizó en autoclave

3.- La solución se almacena a temperatura ambiente.

D) Cloroformo: Alcohol Isoamílico 24:1

48 ml de cloroformo

2 ml alcohol isoamílico

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

E) Etanol al 70%

Para preparar 100 ml de una solución de etanol (grado biología molecular) al 70% se tomaron 70 ml etanol y se añadió 30 ml de H₂O ultra pura, se mezcló y se guardó a temperatura ambiente.

F) Preparación de Agarosa 1.2 %

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

G) Buffer de extracción de proteínas

50 mM Na₂HPO₄ PH 7

10 mM β-mercaptoetanol

10 mM EDTA

2 mM PMSF

H) Buffer de ensayo

50 mM Na₂HPO₄ PH 7

10 mM β-mercaptoetanol

10 mM EDTA

2mM PMSF

1 mM MUG

Anexo 2 extracción de ADN genómico

Se colectan 3 mL de un cultivo de *C. reinhardtii* de 7 días (saliendo de su fase logarítmica) en un tubo eppendorf centrifugando a 5000 rpm durante 5 minutos 1 mL a la vez, el sobrenadante se fue desechando hasta obtener una pastilla la cual se congela en nitrógeno líquido antes de empezar el proceso de extracción.

Posteriormente se prepara una mezcla de extracción con buffer TEN (TRIS HCl 1M pH8, EDTA 0.5 mM, NaCl) + β -mercaptoetanol (Sigma) precalentado a 65°C durante 10 minutos por cada muestra a extraer (0.014 de volumen de β -mercaptoetanol por volumen de buffer TEN). Después, se adiciona la mezcla de extracción a cada tubo eppendorf con el cultivo a extraer maceró con ayuda de un vortex (Digger Genio 2 con velocidad 9) durante 4 minutos, adicionando posteriormente 43 μ L de SDS al 20% y agitando cada muestra por vortex.

Se incubó cada muestra por 25 minutos a 65 °C agitando por vortex cada 2-3 minutos aproximadamente. Una vez terminada la incubación se le adiciona a cada muestra 700 μ L de Cloroformo-Alcohol Isoamílico (CHCl₃: AIA, 24:1), homogenizando por vortex y centrifugando posteriormente a 14000 rpm durante 5 minutos, recuperando la fase inorgánica y transfiriéndola a un tubo eppendorf estéril de 1.5mL. Se adicionó a la fase recuperada un volumen igual de CHCl₃: AIA al recuperado, homogenizando la muestra por agitación en vortex, centrifugando posteriormente a 14000 rpm durante 5 minutos y recuperando la fase inorgánica y transfiriéndola a un tubo eppendorf estéril. Este proceso se repitió hasta obtener una fase inorgánica transparente.

Una vez que se obtuvo la fase inorgánica, se le adicionó un volumen de Isopropanol igual al recuperado en cada muestra y se agitó por inmersión durante 3 minutos. El ADN se precipitó por centrifugación a 13500 rpm durante 5 minutos, retirando el sobrenadante y lavando 2 veces la pastilla obtenida con 800 μ L de etanol al 70% frío y centrifugando a 13500 rpm durante 5 minutos, desechando el sobrenadante. Una vez lavado el pellet, éste se dejó secar a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en 40 μ L de buffer TE (100mM Tris HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8). Después de resuspender el pellet, éste se incubó a 65°C durante 10 minutos y después se transfirió el sobrenadante a un tubo

ependorf estéril, se adicionó 1 μ L de RNasa A (10 μ g/mL, Sigma) y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Finalmente el ADN extraído se almacenó a -20°C.

La integridad del ADN se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% en buffer TAE y bromuro de etidio (10 μ g/ μ L), visualizándose en un transiluminador de UV.

Anexo 3 Extracción de ARN por el método de TRIZOL

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

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

Las muestras se tomaron directamente del nitrógeno líquido para la extracción, en dado caso que se encuentren almacenadas a -80°C, se transportan en N₂ líquido y se mantienen en él hasta el momento de empezar el proceso de extracción.

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

Se centrifugaron las muestras a 10,700 rpm por 15 minutos, de donde se recuperó el Sobrenadante, el cual fue transferido a un tubo nuevo. Posteriormente se le adicionó al sobrenadante recuperado un volumen igual de isopropanol, agitando gentilmente por inmersión unas 20 veces; las cuales fueron incubadas a 20°C por 10 minutos, una vez terminada la incubación, las muestras fueron centrifugadas a 10,700 rpm por 10 minutos. Se desechó el sobrenadante de las muestras procurando dejar el pellet lo más seco posible, después de les adicionó 1000 µL de etanol al 70%, las muestras fueron agitadas gentilmente por inmersión unas 3 veces y centrifugadas a 8,400 rpm por 5 minutos. Se desechó el sobrenadante de las muestras, procurando dejar la pastilla lo más seca posible, para secarla completamente a temperatura ambiente, en la campana de flujo laminar, por aproximadamente 10 minutos. Una vez seca la pastilla, fue re-suspendida en 39 µL de agua ultra pura. Almacenando la muestra a -20°C para su uso inmediato y a -80°C para almacenamiento prolongado.

Anexo 4 Transformación de células competentes de *E. coli* mediante choque térmico.

Para la transformación se utilizaron los 10 µL de la reacción de ligación y 100 µL de células competentes de *E. coli* cepa DH10B. La mezcla fue incubada en hielo durante 30 minutos y posteriormente sometida a un choque térmico de 42°C durante 45 segundos e inmediatamente enfriada en hielo por 2 minutos. Seguidamente se adicionaron 900 µL de medio SOC (Tryptona, Extracto de levadura, NaCl, Glucosa) y se incubaron a 37°C por 90 minutos a 225 rpm. Posteriormente, se plaqueó 100 µL de la mezcla en cajas de Petri con medio LB (Luria-Bertani) + 0.5mM de isopropil-tio-β-Dgalactósido (IPTG) + 80 mg/L de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D galactósido (X-Gal) + 100 mg/L de ampicilina, el resto se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos, se eliminaron 800 µL de sobrenadante, se resuspendió la pastilla en los 100 µL restantes y las células se plaquearon en cajas de Petri con medio LB (Luria-Bertani) + 0.5mM de isopropil-tio-β-Dgalactósido (IPTG) + 80 mg/L de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D galactósido (X-Gal) + 100 mg/L de ampicilina. Las cajas fueron incubadas a 37°C por 16 horas. Las colonias transformadas (colonias blancas) se picaron con palillos estériles, se colocaron en tubos de falcón con 4 mL de

medio LB (Luria-Bertani) líquido y ampicilina (100 µg/µL), y se incubaron a 37 °C en agitación a 220 rpm durante 16 horas.

Anexo 5 Extracción de ADN plasmídico.

La extracción y purificación del ADN plasmídico se llevó a cabo mediante el protocolo comercial de “High Pure Plasmid Purification Kit” (ROCHE) de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

Se concentró en un tubo eppendorf 4 mL del cultivo bacteriano, cultivado por 16 horas en medio LB líquido + ampicilina, centrifugando a 13,500 rpm por 1 minuto. Una vez concentrado el cultivo se resuspendió la pastilla con 250 µL de la solución fría del Buffer ARNsa, posteriormente se le adicionó 250 µL del buffer de lisis homogenizando por inmersión (6 veces) incubando a temperatura ambiente por 5 minutos, una vez terminada la incubación se le adicionó 360 µL de Binding buffer homogenizando por inmersión (6 veces) e incubando posteriormente en hielo por 5 minutos. Pasada la incubación se centrifugaron las muestras a 13500 rpm por 10 minutos mientras se adicionó a cada columna 200 µL de Binding buffer, una vez terminada la centrifugación se tomó el sobrenadante y se colocó en las columnas las cuales se centrifugaron a 13500 rpm por un minuto, se desechó el sobrenadante y se adicionó 500 µL del Washing buffer I a cada columna centrifugando posteriormente a 13500 rpm por 1 minuto, para lavar la columna se adicionó 700 µL del Washing Buffer II a la columna y se centrifugó por 1 minuto a 13500 rpm (2 veces), para secar completamente la columna se centrifugo en seco a 13500 rpm por 30 segundos. Una vez seca la columna se colocó esta en un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL y se le adicionó 40 µL de Tris HCl 10 mM pH 7.5 para eluir la muestra, incubándose a temperatura ambiente por 5 minutos, una vez terminada la incubación se centrifugaron las muestras a 13500 rpm por un minuto, para evitar la posible contaminación por fibras de la columna, se centrifugó nuevamente a 13500 rpm por un minuto y tomando el sobrenadante y colocándolo en un tubo eppendorf de 1.5 nuevo el cual es almacenando a -20°C.

Anexo 6 Alineamiento de la secuencia del promotor del *CrGPDH3* de tamaño de 1979 pb (promA).

CICY	1	GAATTCGCAAGTCTTAAGCATCCAGTGCAAACCTGCCGGGCATACATTTTTTAACCACTTA
promotor	1	-----GCAAGTCTTAAGCATCCAGTGCAAACCTGCCGGGCATACATTTTTTAACCACTTA
CICY	61	TATTTTTGGCGCGTTGGTTTTGGTGTGTTGACATTGCGGCTTGAAAGGCAGCACTGCGGTGT
promotor	55	TATTTTTGGCGCGTTGGTTTTGGTGTGTTGACATTGCGGCTTGAAAGGCAGCACTGCGGTGT
CICY	121	AGGCGGGTACGTGTGCACCCAACCTGCCGGCCGGTGGAGCCACCTGAAACACCTTGC
promotor	115	AGGCGGGTACGTGTGCACCCAACCTGCCGGCCGGTGGAGCCACCTGAAACACCTTGC
CICY	181	CACGCGACAGGCTGCATTGTGACGTTTTCTTGGTGCAGTGGATGGGAACAAGCAGTATTT
promotor	175	CACGCGACAGGCTGCATTGTGACGTTTTCTTGGTGCAGTGGATGGGAACAAGCAGTATTT
CICY	241	GGTAAAGCCTATTGATAGCAATGGCGCGCAGGCTGAGCGAGGAGCTGTCCGGTGTCTGGG
promotor	235	GGTAAAGCCTATTGATAGCAATGGCGCGCAGGCTGAGCGAGGAGCTGTCCGGTGTCTGGG
CICY	301	TAGCGCTCCGCATTGGGGCGAGCAAGGCGTGTGTGCCAAGCGGCAGCAGCGGCATGACAC
promotor	295	TAGCGCTCCGCATTGGGGCGAGCAAGGCGTGTGTGCCAAGCGGCAGCAGCGGCATGACAC
CICY	361	GTAGTGTGGCAGCGACGCATGTGCTGAGTCGTCTGGCTGGCTCTGCTGTGGTGGCTTGA
promotor	355	GTAGTGTGGCAGCGACGCATGTGCTGAGTCGTCTGGCTGGCTCTGCTGTGGTGGCTTGA
CICY	421	CCACTGCTGGGCACCTGCTGGGTTCCGGTACGTGCCTGTTCCAGACCGATTCCGCTGTCAG
promotor	415	CCACTGCTGGGCACCTGCTGGGTTCCGGTACGTGCCTGTTCCAGACCGATTCCGCTGTCAG
CICY	481	GACCTGCCAGCCACTGTAACATGCTGAGTAGCTTTCTGCCTTCCGCCTGAGACGTGAAC
promotor	475	GACCTGCCAGCCACTGTAACATGCTGAGTAGCTTTCTGCCTTCCGCCTGAGACGTGAAC
CICY	541	CATGACTAGTTGTTAGCAGCCTGCACGGCAGCCACACGCCACCAGAGCTTTCATCAGGCT
promotor	535	CATGACTAGTTGTTAGCAGCCTGCACGGCAGCCACACGCCACCAGAGCTTTCATCAGGCT
CICY	601	GAGAGGCAGCGCAACCTGCACGCGCTAGGTCGCGACCCCGGCTATGTCCGGGCGATGAGG
promotor	595	GAGAGGCAGCGCAACCTGCACGCGCTAGGTCGCGACCCCGGCTATGTCCGGGCGATGAGG
CICY	661	TAGTTCGGCCTCAGACTTGCAGAGAGGCTCAGCCCTTTTCCCTCGGGAACCTCGATGCGA
promotor	655	TAGTTCGGCCTCAGACTTGCAGAGAGGCTCAGCCCTTTTCCCTCGGGAACCTCGATGCGA
CICY	721	CCGCAAAGGCTCTTGCCCGTCCCCCTTCGGGGCAAGGGGCAACCAACCTGTGCTGTCAT
promotor	715	CCGCAAAGGCTCTTGCCCGTCCCCCTTCGGGGCAAGGGGCAACCAACCTGTGCTGTCAT
CICY	781	CAAGAGAGTCCAGCTATCGAGGATGCAGGAAAGTCTTAGCACCAGGTGAGACCCAACCCA
promotor	775	CAAGAGAGTCCAGCTATCGAGGATGCAGGAAAGTCTTAGCACCAGGTGAGACCCAACCCA
CICY	841	AAGCGCCCCAGAACCCAAACCCACCCGATCCACCACAAAGCCCCACCCGAGCACACAA
promotor	835	AAGCGCCCCAGAACCCAAACCCACCCGATCCACCACAAAGCCCCACCCGAGCACACAA
CICY	901	ACCCAGCCCTTACGGACCCGAACCCCTAACCTACCCAGCCCTGTGCGCCACACCAAGCC
promotor	895	ACCCAGCCCTTACGGACCCGAACCCCTAACCTACCCAGCCCTGTGCGCCACACCAAGCC
CICY	961	CGGAGTTATGGCTATGAGTGGACTCTAGCCGTCGTTCCAGCCAGGCGTAGAGTGTGCTGC
promotor	955	CGGAGTTATGGCTATGAGTGGACTCTAGCCGTCGTTCCAGCCAGGCGTAGAGTGTGCTGC

CICY 1021 CAGCGCTGCTGATGGCAGCCGCTGAGGTCTTGCGGGCGTCCATACTACTATTGCGTGC
promotor 1015 CAGCGCTGCTGATGGCAGCCGCTGAGGTCTTGCGGGCGTCCATACTACTATTGCGTGC

CICY 1081 CGCTGGCTCGTGAGATCCGTCAGCGGATTCCGCATGTAGCCAATCTTCGTTGGTCCACGT
promotor 1075 CGCTGGCTCGTGAGATCCGTCAGCGGATTCCGCATGTAGCCAATCTTCGTTGGTCCACGT

CICY 1141 CAAATTCGGAAGAAATCAAGACCCAGAACCCTCCCCTGTGTGTAAGGGGGAGGGGGG
promotor 1135 CAAATTCGGAAGAAATCAAGACCCAGAACCCTCCCCTGTGTGTAAGGGGGAGGGGGG

CICY 1201 GGTGTCGGTGGGACGTGGGAAACCAAGGAAAGCTGCCGATCGGTTCTACCTCGTAAGCC
promotor 1195 GGTGTCGGTGGGACGTGGGAAACCAAGGAAAGCTGCCGATCGGTTCTACCTCGTAAGCC

CICY 1261 TCACGGGTAAACTCCCTATCGTCCCACCGCCCGTCCCGATTCCGCGTTTAGGCCGTC
promotor 1255 TCACGGGTAAACTCCCTATCGTCCCACCGCCCGTCCCGATTCCGCGTTTAGGCCGTC

CICY 1321 CATGCTTGGTGTGGTTCGCTGGTTCACAGCTTTGCAAGGCCGGCCGACATGAAGCCCGAT
promotor 1315 CATGCTTGGTGTGGTTCGCTGGTTCACAGCTTTGCAAGGCCGGCCGACATGAAGCCCGAT

CICY 1381 TAGCCGCGGGTCCGTCGTTTATGGGTTACGTCAAGGATTCTTGGAGCTATGCGAACTGAG
promotor 1375 TAGCCGCGGGTCCGTCGTTTATGGGTTACGTCAAGGATTCTTGGAGCTATGCGAACTGAG

CICY 1441 GTGGACCCGGCGATTGTCAGACAGGCTGACTGAATTGGTTGAAGGCCCGTCGCAGTCGCG
promotor 1435 GTGGACCCGGCGATTGTCAGACAGGCTGACTGAATTGGTTGAAGGCCCGTCGCAGTCGCG

CICY 1501 CGAAAGTTTCGGGAAGTTCGCCATCTTACTGGCGAATGACAACGCTTCCGGCGCCAGGTA
promotor 1495 CGAAAGTTTCGGGAAGTTCGCCATCTTACTGGCGAATGACAACGCTTCCGGCGCCAGGTA

CICY 1561 TTAGTCGTGTCCCTTGTGTCGTACGATTGGACCCACCCGCTTCCCGCGGATTTAGCC
promotor 1555 TTAGTCGTGTCCCTTGTGTCGTACGATTGGACCCACCCGCTTCCCGCGGATTTAGCC

CICY 1621 CGATCCCGCTTGCATGGGGTGGTCTGACTGCATGGATCGCGGACTCCATAAATAGCCGAT
promotor 1615 CGATCCCGCTTGCATGGGGTGGTCTGACTGCATGGATCGCGGACTCCATAAATAGCCGAT

CICY 1681 GTGCCAGACTTGGCGGTCCTGAATCACAGCTTGAGAATACATAAACTCAATCGCCAAGCA
promotor 1675 GTGCCAGACTTGGCGGTCCTGAATCACAGCTTGAGAATACATAAACTCAATCGCCAAGCA

CICY 1741 ACAAAGCTACAGCCCTATATCGGCAGTTGCAACATCCCAGCGGGGGTTTCGACTGCGTA
promotor 1735 ACAAAGCTACAGCCCTATATCGGCAGTTGCAACATCCCAGCGGGGGTTTCGACTGCGTA

CICY 1801 ATTACGAGCGTCGTTGAGCCGAGTTTGAACCATGATGCTGTGAGGCCGACCTGCAATT
promotor 1795 ATTACGAGCGTCGTTGAGCCGAGTTTGAACCATGATGCTGTGAGGCCGACCTGCAATT

CICY 1861 GCGCCTTCAGTGCTCGTCGAACTAGCCTCCAACGCGGAGCGCTCGCTTTCCAATCGGCGC
promotor 1855 GCGCCTTCAGTGCTCGTCGAACTAGCCTCCAACGCGGAGCGCTCGCTTTCCAATCGGCGC

CICY 1921 GGCTGGTACCTCAACGGCCCGCGCCACTTGCCGTCGCGCATCGTTTGTGCCAGCGCCA
promotor 1915 GGCTGGTACCTCAACGGCCCGCGCCACTTGCCGTCGCGCATCGTTTGTGCCAGCGCCA

CICY 1981 TCTTCGGATCC
promotor 1975 TCTTC-----

Anexo 7 Alineamiento promotor del *CRGPDH3* de tamaño de 1466 pb (promB).

CICY1B 1 GAATTCCTTCCGCCTGAGACGTGAACTCATGACTAGTTGTTAGCAGCCTGCACGGCAGCC
promotor 1 -----CTTCCGCCTGAGACGTGAACTCATGACTAGTTGTTAGCAGCCTGCACGGCAGCC

CICY1B 61 TGCACGGCAGCCACACGCCACCAGAGCTTTCATCAGGCTGAGAGGCAGCGCAACCTGCAC
promotor 55 TGCACGGCAGCCACACGCCACCAGAGCTTTCATCAGGCTGAGAGGCAGCGCAACCTGCAC

CICY1B 121 GCGCTAGGTCGCGACCCCGGCTATGTCCGGGCGATGAGGTAGTTCCGGCCTCAGACTTGCG
promotor 115 GCGCTAGGTCGCGACCCCGGCTATGTCCGGGCGATGAGGTAGTTCCGGCCTCAGACTTGCG

CICY1B 181 GAGAGGCTCAGCCCTTTTCCCTCGGGAACTCGATGCGACCGCAAAGGCTCTTGCCCGTC
promotor 175 GAGAGGCTCAGCCCTTTTCCCTCGGGAACTCGATGCGACCGCAAAGGCTCTTGCCCGTC

CICY1B 241 CCCCTTCGGGGCAAGGGGCAAAACCAACCTGTCGTGTCATCAAGAGAGTCCAGTATCGAG
promotor 235 CCCCTTCGGGGCAAGGGGCAAAACCAACCTGTCGTGTCATCAAGAGAGTCCAGTATCGAG

CICY1B 301 GATGCAGGAAAGTCCTAGCACCAGGTGAGACCCAACCCAAAGCGCCCCAGAACCCAAACC
promotor 295 GATGCAGGAAAGTCCTAGCACCAGGTGAGACCCAACCCAAAGCGCCCCAGAACCCAAACC

CICY1B 361 CACCCGATCCACCCACAAAGCCCCACCCGAGCACACAAACCCAGCCCTTACGGACCCGA
promotor 355 CACCCGATCCACCCACAAAGCCCCACCCGAGCACACAAACCCAGCCCTTACGGACCCGA

CICY1B 421 ACCCCTAACCTACCCAGCCCTGTCGCCACACCAAGCCCGGAGTTATGGCTATGAGTGG
promotor 415 ACCCCTAACCTACCCAGCCCTGTCGCCACACCAAGCCCGGAGTTATGGCTATGAGTGG

CICY1B 485 ACTCTAGCCGTCGTTACGCCAGCGGTAGAGTGTGCTGCCAGCGCTGCTGATGGCAGGCC
promotor 475 ACTCTAGCCGTCGTTACGCCAGCGGTAGAGTGTGCTGCCAGCGCTGCTGATGGCAGGCC

CICY1B 541 GCTGAGGTCTTGCGGGCGTCCATACTACTATTGCGTGCTCGCTGGCTCGTGAGATCCGTC
promotor 535 GCTGAGGTCTTGCGGGCGTCCATACTACTATTGCGTGCTCGCTGGCTCGTGAGATCCGTC

CICY1B 601 AGCGGATTCGCATGTAGCCAATCTTCGTTGGTCCACGTCAAATTCGGAAAGAAATCAAG
promotor 595 AGCGGATTCGCATGTAGCCAATCTTCGTTGGTCCACGTCAAATTCGGAAAGAAATCAAG

CICY1B 661 ACCCAGAACCTCCCGTGTGTGAAGGGGGAGGGGGCGGTGTCGGTGGGACGTGGGA
promotor 655 ACCCAGAACCTCCCGTGTGTGAAGGGGGAGGGGGCGGTGTCGGTGGGACGTGGGA

CICY1B 721 AACCAAGGAAAGCTGCCGATCGGTCTACCTCGTAAGCCTCACGGGTTAAACTCCCTATC
promotor 715 AACCAAGGAAAGCTGCCGATCGGTCTACCTCGTAAGCCTCACGGGTTAAACTCCCTATC

CICY1B 781 GTCCCACGGCCCCGTCCCGATTCCGCGTTTAGGCCGTCCATGCTTGGTGTCCGGTCCGTC
promotor 775 GTCCCACGGCCCCGTCCCGATTCCGCGTTTAGGCCGTCCATGCTTGGTGTCCGGTCCGTC

CICY1B 841 GTCACAGCTTTCGAAGGCCGCGCACATGAAGCGCCGATTAGCCGCGGTCCGTCGTTTA
promotor 835 GTCACAGCTTTCGAAGGCCGCGCACATGAAGCGCCGATTAGCCGCGGTCCGTCGTTTA

CICY1B 901 TGGGTTACGTCAAGGATTCTTGGAGCTATGCGAACTGAGGTGGACCCGGCGATTGTCAGA
promotor 895 TGGGTTACGTCAAGGATTCTTGGAGCTATGCGAACTGAGGTGGACCCGGCGATTGTCAGA

CICY1B 961 CAGGCTGACTGAATTGGTTGAAGGCCCGTCGCAGTCGCGCGAAAGTTTCGGGAAGTTCGC
promotor 955 CAGGCTGACTGAATTGGTTGAAGGCCCGTCGCAGTCGCGCGAAAGTTTCGGGAAGTTCGC

CICY1B 1021 CATCTTACTGGCGAATGACAACGCTTCCGGCGCCAGGTATTAGTCGTGTCCCTTGTGTG
promotor 1015 CATCTTACTGGCGAATGACAACGCTTCCGGCGCCAGGTATTAGTCGTGTCCCTTGTGTG

CICY1B 1081 GTCACGATTGGACCCACCCGCTTCCCGCGGATTTAGCCCGATCCCGCTTGCATGGGGTG
promotor 1075 GTCACGATTGGACCCACCCGCTTCCCGCGGATTTAGCCCGATCCCGCTTGCATGGGGTG

CICY1B 1141 GTCTGACTGCATGGATCGCGGACTCCATAAATAGCCGATGTGCCAGACTTGGCGGTCTCT
promotor 1135 GTCTGACTGCATGGATCGCGGACTCCATAAATAGCCGATGTGCCAGACTTGGCGGTCTCT

CICY1B 1201 AATCACAGCTTGAGAATACATAAACTCAATCGCCAAGCAACAAAGCTACAGCCCTATATC
promotor 1195 AATCACAGCTTGAGAATACATAAACTCAATCGCCAAGCAACAAAGCTACAGCCCTATATC

CICY1B 1261 GGCAGTTGCAACATCCCAGCGCGGGGGTTCGACTGCGTAATTACGAGCGTCGTTGAGCCG
promotor 1255 GGCAGTTGCAACATCCCAGCGCGGGGGTTCGACTGCGTAATTACGAGCGTCGTTGAGCCG

CICY1B 1321 AGTTTGCAACCATGATGCTGTGTCAGGCCGCACCTGCAATTGCGCCTTCAGTGCTCGTCGAA
promotor 1315 AGTTTGCAACCATGATGCTGTGTCAGGCCGCACCTGCAATTGCGCCTTCAGTGCTCGTCGAA

CICY1B 1381 CTAGCCTCCAACCGGAGCGCTCGCTTTCCAATCGGCGCGGCTGGTACCTCAACGGCCCG
promotor 1375 CTAGCCTCCAACCGGAGCGCTCGCTTTCCAATCGGCGCGGCTGGTACCTCAACGGCCCG

CICY1B 1441 CGGCCACTTGCCGTCGCGCATCGTTTGTGCCAGCGCCATCTTCGGATCC
promotor 1435 CGGCCACTTGCCGTCGCGCATCGTTTGTGCCAGCGCCATCTC-----

Anexo 8 Alineamiento del promotor del *CrGPDH3* de tamaño de 938 pb (promC).

CICY1C 1 GAATCCGGGCGTCCATACTACTATTGCGTGCTCGCTGGCTCGTGAGATCCGTCAGCGGAT
promotor 1 -----GGGCGTCCATACTACTATTGCGTGCTCGCTGGCTCGTGAGATCCGTCAGCGGAT

CICY1C 61 TCCGCATGTAGCCAATCTTCGTTGGTCCACGTCAAATTCGGAAAGAAATCAAGACCCAGA
promotor 55 TCCGCATGTAGCCAATCTTCGTTGGTCCACGTCAAATTCGGAAAGAAATCAAGACCCAGA

CICY1C 121 ACCCTCCCGTGTGTGTAAGGGGGGAGGGGGCGGTGTCGGTGGGGACGTGGGAAACCAAG
promotor 115 ACCCTCCCGTGTGTGTAAGGGGGGAGGGGGCGGTGTCGGTGGGGACGTGGGAAACCAAG

CICY1C 181 GAAAGCTGCCGATCGGTTCTACCTCGTAAGCCTCACGGGTAAACTCCCTATCGTCCCAC
promotor 175 GAAAGCTGCCGATCGGTTCTACCTCGTAAGCCTCACGGGTAAACTCCCTATCGTCCCAC

CICY1C 241 CGGCCCCGTCCCGATTCCGCGTTTAGGCCGTCCATGCTTGGTGTCCGGTCCGCTGGTCCACAG
promotor 235 CGGCCCCGTCCCGATTCCGCGTTTAGGCCGTCCATGCTTGGTGTCCGGTCCGCTGGTCCACAG

CICY1C 301 CTTTGCAAGGCCGCGCCGACATGAAGCGCCGATTAGCCGCGGGTCCGTCGTTTATGGGTTA
promotor 295 CTTTGCAAGGCCGCGCCGACATGAAGCGCCGATTAGCCGCGGGTCCGTCGTTTATGGGTTA

CICY1C 361 **CGTCAAGGATTCCTGGAGCTATGCGAACTGAGGTGGACCCGGCGATTGTCAGACAGGCTG**
 promotor 355 **CGTCAAGGATTCCTGGAGCTATGCGAACTGAGGTGGACCCGGCGATTGTCAGACAGGCTG**

CICY1C 421 **ACTGAATTGGTTGAAGGCCCGTCGCAGTCGCGCGAAAGTTTCGGGAAGTTCGCCATCTTA**
 promotor 415 **ACTGAATTGGTTGAAGGCCCGTCGCAGTCGCGCGAAAGTTTCGGGAAGTTCGCCATCTTA**

CICY1C 485 **CTGGCGAATGACAACGCTTCCGGCGCCAGGTATTAGTCGTGTCCCTTGTTGTGTCACGA**
 promotor 475 **CTGGCGAATGACAACGCTTCCGGCGCCAGGTATTAGTCGTGTCCCTTGTTGTGTCACGA**

CICY1C 541 **TTGACCCACCCGCTTCCC GCGGATTAGCCCGATCCCGCTTGCATGGGGTGGTCTGAC**
 promotor 535 **TTGACCCACCCGCTTCCC GCGGATTAGCCCGATCCCGCTTGCATGGGGTGGTCTGAC**

CICY1C 601 **TGCATGGATCGCGGACTCCATAAATAGCCGATGTGCCAGACTTGGCGGTCCCTGAATCACA**
 promotor 595 **TGCATGGATCGCGGACTCCATAAATAGCCGATGTGCCAGACTTGGCGGTCCCTGAATCACA**

CICY1C 721 **GCTTGAGAATACATAAACTCAATCGCCAAGCAACAAAGCTACAGCCCTATATCGGCAGTT**
 promotor 715 **GCTTGAGAATACATAAACTCAATCGCCAAGCAACAAAGCTACAGCCCTATATCGGCAGTT**

CICY1C 781 **GCAACATCCCAGCGCGGGGGTTCGACTGCGTAATTACGAGCGTCGTTGAGCCGAGTTTGC**
 promotor 775 **GCAACATCCCAGCGCGGGGGTTCGACTGCGTAATTACGAGCGTCGTTGAGCCGAGTTTGC**

CICY1C 841 **AACCATGATGCTGTCAGGCCGCACCTGCAATTGCGCCTTCAGTGCTCGTCAACTAGCCT**
 promotor 835 **AACCATGATGCTGTCAGGCCGCACCTGCAATTGCGCCTTCAGTGCTCGTCAACTAGCCT**

CICY1C 901 **CCAACGCGGAGCGCTCGCTTCCAATCGGCGCGGCTGGTACCTCAACGGGATCC**
 promotor 895 **CCAACGCGGAGCGCTCGCTTCCAATCGGCGCGGCTGGTACCTCAACG-----**

Anexo 9 Alineamiento del gen reportero GUsPlus de 2053 pb.

CICY5GusPlus 1 **ACTGGATCCGCAACAATGGTAGATCTGAGGGTAAATTTCTAGTTTTCTCCTTCATTTTC**
 GusPlusGenBankAF354045.1 1 -----ATGGTAGATCTGAGGGTAAATTTCTAGTTTTCTCCTTCATTTTC
 CICY6GusPlus 1 **ACTGGATCCGCAACAATGGTAGATCTGAGGGTAAATTTCTAGTTTTCTCCTTCATTTTC**

CICY5GusPlus 61 **TFGGTFAGGACCCTTTTCTCTTTTATTTTTTTGAGCTTTGATCTTCTTTAAACTGATC**
 GusPlusGenBankAF354045.1 46 **TFGGTFAGGACCCTTTTCTCTTTTATTTTTTTGAGCTTTGATCTTCTTTAAACTGATC**
 CICY6GusPlus 61 **TFGGTFAGGACCCTTTTCTCTTTTATTTTTTTGAGCTTTGATCTTCTTTAAACTGATC**

CICY5GusPlus 121 **TATTTTTTAATTGATTGGTTATGGTGTAATATTACATAGCTTAACTGATAATCTGATT**
 GusPlusGenBankAF354045.1 106 **TATTTTTTAATTGATTGGTTATGGTGTAATATTACATAGCTTAACTGATAATCTGATT**
 CICY6GusPlus 121 **TATTTTTTAATTGATTGGTTATGGTGTAATATTACATAGCTTAACTGATAATCTGATT**

CICY5GusPlus 181 **ACTTTATTTTCGTGTGCTATGATGATGATGATAGTTACAGAACCAGCAACTAGTCTGTA**
 GusPlusGenBankAF354045.1 166 **ACTTTATTTTCGTGTGCTATGATGATGATGATAGTTACAGAACCAGCAACTAGTCTGTA**
 CICY6GusPlus 181 **ACTTTATTTTCGTGTGCTATGATGATGATGATAGTTACAGAACCAGCAACTAGTCTGTA**

CICY5GusPlus 241 **CCCGATCAACACCGAGACCCGTTGGCGTCTTCGACCTCAATGGCGTCTGGAACCTCAAGCT**
 GusPlusGenBankAF354045.1 226 **CCCGATCAACACCGAGACCCGTTGGCGTCTTCGACCTCAATGGCGTCTGGAACCTCAAGCT**
 CICY6GusPlus 241 **CCCGATCAACACCGAGACCCGTTGGCGTCTTCGACCTCAATGGCGTCTGGAACCTCAAGCT**

CICY5GusPlus	301	GGACTACGGGAAAGGACTGGAAGAGAAGTGGTACGAAAGCAAGCTGACCGACACTATTAG
GusPlusGenBankAF354045.1	286	GGACTACGGGAAAGGACTGGAAGAGAAGTGGTACGAAAGCAAGCTGACCGACACTATTAG
CICY6GusPlus	301	GGACTACGGGAAAGGACTGGAAGAGAAGTGGTACGAAAGCAAGCTGACCGACACTATTAG
CICY5GusPlus	361	TATGGCCGTCCTCAAGCAGTTACAATGACATTGGCGTGACCAAGGAAATCCGCAACCATAT
GusPlusGenBankAF354045.1	346	TATGGCCGTCCTCAAGCAGTTACAATGACATTGGCGTGACCAAGGAAATCCGCAACCATAT
CICY6GusPlus	361	TATGGCCGTCCTCAAGCAGTTACAATGACATTGGCGTGACCAAGGAAATCCGCAACCATAT
CICY5GusPlus	421	CGGATATGTCTGGTACGAACGTGAGTTCACGGTGCCGGCCTATCTGAAGGATCAGCGTAT
GusPlusGenBankAF354045.1	406	CGGATATGTCTGGTACGAACGTGAGTTCACGGTGCCGGCCTATCTGAAGGATCAGCGTAT
CICY6GusPlus	421	CGGATATGTCTGGTACGAACGTGAGTTCACGGTGCCGGCCTATCTGAAGGATCAGCGTAT
CICY5GusPlus	481	CGTGCTCCGCTTCGGCTCTGCAACTCACAAGCAATTGTCTATGTCAATGGTGAGCTGGT
GusPlusGenBankAF354045.1	466	CGTGCTCCGCTTCGGCTCTGCAACTCACAAGCAATTGTCTATGTCAATGGTGAGCTGGT
CICY6GusPlus	481	CGTGCTCCGCTTCGGCTCTGCAACTCACAAGCAATTGTCTATGTCAATGGTGAGCTGGT
CICY5GusPlus	541	CGTGGAGCACAAGGGCGGATTCTGCCATTGGAAGCGGAAATCAACAACCTCGCTGCGTGA
GusPlusGenBankAF354045.1	526	CGTGGAGCACAAGGGCGGATTCTGCCATTGGAAGCGGAAATCAACAACCTCGCTGCGTGA
CICY6GusPlus	541	CGTGGAGCACAAGGGCGGATTCTGCCATTGGAAGCGGAAATCAACAACCTCGCTGCGTGA
CICY5GusPlus	601	TGGCATGAATCGCGTACCCGTCGCGTGGACAACATCCTCGACGATAGCACCCCTCCCGGT
GusPlusGenBankAF354045.1	586	TGGCATGAATCGCGTACCCGTCGCGTGGACAACATCCTCGACGATAGCACCCCTCCCGGT
CICY6GusPlus	601	TGGCATGAATCGCGTACCCGTCGCGTGGACAACATCCTCGACGATAGCACCCCTCCCGGT
CICY5GusPlus	661	GGGGCTGTACAGCGAGCGCCACGAAGAGGGCCTCGGAAAAGTCATTCTGAACAAGCCGAA
GusPlusGenBankAF354045.1	646	GGGGCTGTACAGCGAGCGCCACGAAGAGGGCCTCGGAAAAGTCATTCTGAACAAGCCGAA
CICY6GusPlus	661	GGGGCTGTACAGCGAGCGCCACGAAGAGGGCCTCGGAAAAGTCATTCTGAACAAGCCGAA
CICY5GusPlus	721	CTTCGACTTCTTCAACTATGCAGGCCTGCACCGTCCGGTGAAAATCTACACGACCCCGTT
GusPlusGenBankAF354045.1	706	CTTCGACTTCTTCAACTATGCAGGCCTGCACCGTCCGGTGAAAATCTACACGACCCCGTT
CICY6GusPlus	721	CTTCGACTTCTTCAACTATGCAGGCCTGCACCGTCCGGTGAAAATCTACACGACCCCGTT
CICY5GusPlus	781	TACGTACGTTCGAGGACATCTCGGTTGTGACCGACTTCAATGGCCCAACCGGGACTGTGAC
GusPlusGenBankAF354045.1	766	TACGTACGTTCGAGGACATCTCGGTTGTGACCGACTTCAATGGCCCAACCGGGACTGTGAC
CICY6GusPlus	781	TACGTACGTTCGAGGACATCTCGGTTGTGACCGACTTCAATGGCCCAACCGGGACTGTGAC
CICY5GusPlus	841	CTATACGGTGGACTTTCAAGGCAAAGCCGAGACCGTGAAAGTGTTCGGTTCGTGGATGAGGA
GusPlusGenBankAF354045.1	826	CTATACGGTGGACTTTCAAGGCAAAGCCGAGACCGTGAAAGTGTTCGGTTCGTGGATGAGGA
CICY6GusPlus	841	CTATACGGTGGACTTTCAAGGCAAAGCCGAGACCGTGAAAGTGTTCGGTTCGTGGATGAGGA
CICY5GusPlus	901	AGGCAAAGTGGTTCGAAGCACCGAGGGCCTGAGCGGTAACGTGGAGATTCCGAATGTCAT
GusPlusGenBankAF354045.1	886	AGGCAAAGTGGTTCGAAGCACCGAGGGCCTGAGCGGTAACGTGGAGATTCCGAATGTCAT
CICY6GusPlus	901	AGGCAAAGTGGTTCGAAGCACCGAGGGCCTGAGCGGTAACGTGGAGATTCCGAATGTCAT
CICY5GusPlus	961	CCTCTGGGAACCACTGAACACGTATCTCTACCAGATCAAAGTGGAACTGGTGAACGACGG
GusPlusGenBankAF354045.1	946	CCTCTGGGAACCACTGAACACGTATCTCTACCAGATCAAAGTGGAACTGGTGAACGACGG
CICY6GusPlus	961	CCTCTGGGAACCACTGAACACGTATCTCTACCAGATCAAAGTGGAACTGGTGAACGACGG
CICY5GusPlus	1021	ACTGACCATCGATGTCTATGAAGAGCCGTCGGCGTGCGGACCGTGGAAAGTCAACGACGG

GusPlusGenBankAF354045.1 1006 ACTGACCATCGATGCTATGAAGAGCCGTTCCGGCTGCGGACCGTGGAAAGTCAACGACGG
CICY6GusPlus 1021 ACTGACCATCGATGCTATGAAGAGCCGTTCCGGCTGCGGACCGTGGAAAGTCAACGACGG

CICY5GusPlus 1081 CAAGTTCCTCATCAACAACAAACCCTTCTACTTCAAGGGCTTTGGCAAACATGAGGACAC
GusPlusGenBankAF354045.1 1066 CAAGTTCCTCATCAACAACAAACCCTTCTACTTCAAGGGCTTTGGCAAACATGAGGACAC
CICY6GusPlus 1081 CAAGTTCCTCATCAACAACAAACCCTTCTACTTCAAGGGCTTTGGCAAACATGAGGACAC

CICY5GusPlus 1141 TCCTATCAACGGCCGTTGGCTTTAACGAAGCGAGCAATGTGATGGATTCAATATCTCAA
GusPlusGenBankAF354045.1 1126 TCCTATCAACGGCCGTTGGCTTTAACGAAGCGAGCAATGTGATGGATTCAATATCTCAA
CICY6GusPlus 1141 TCCTATCAACGGCCGTTGGCTTTAACGAAGCGAGCAATGTGATGGATTCAATATCTCAA

CICY5GusPlus 1201 ATGGATCGGGCCAAACAGCTTCCGGACCGCACACTATCCGTACTCTGAAGAGTTGATGCC
GusPlusGenBankAF354045.1 1186 ATGGATCGGGCCAAACAGCTTCCGGACCGCACACTATCCGTACTCTGAAGAGTTGATGCC
CICY6GusPlus 1201 ATGGATCGGGCCAAACAGCTTCCGGACCGCACACTATCCGTACTCTGAAGAGTTGATGCC

CICY5GusPlus 1261 TCTTGGGATCGCGAGGGTCTGGTCTGATCGACGAGACTCCGGCAGTTGGCGTGCACCT
GusPlusGenBankAF354045.1 1246 TCTTGGGATCGCGAGGGTCTGGTCTGATCGACGAGACTCCGGCAGTTGGCGTGCACCT
CICY6GusPlus 1261 TCTTGGGATCGCGAGGGTCTGGTCTGATCGACGAGACTCCGGCAGTTGGCGTGCACCT

CICY5GusPlus 1321 CAACTTCATGGCCACCACGGGACTCGGCGAAGGCAGCGAGCGCGTCACTACCTGGGAGAA
GusPlusGenBankAF354045.1 1306 CAACTTCATGGCCACCACGGGACTCGGCGAAGGCAGCGAGCGCGTCACTACCTGGGAGAA
CICY6GusPlus 1321 CAACTTCATGGCCACCACGGGACTCGGCGAAGGCAGCGAGCGCGTCACTACCTGGGAGAA

CICY5GusPlus 1381 GATTGGGACGTTTGAGCACCATCAAGACGTTCTCCGTGAACTGGTGTCTCGTGACAAGAA
GusPlusGenBankAF354045.1 1366 GATTGGGACGTTTGAGCACCATCAAGACGTTCTCCGTGAACTGGTGTCTCGTGACAAGAA
CICY6GusPlus 1381 GATTGGGACGTTTGAGCACCATCAAGACGTTCTCCGTGAACTGGTGTCTCGTGACAAGAA

CICY5GusPlus 1441 CCATCCAAGCGTCGTGATGTGGAGCATCGCCAACGAGGCGGCGACTGAGGAAGAGGGCGG
GusPlusGenBankAF354045.1 1426 CCATCCAAGCGTCGTGATGTGGAGCATCGCCAACGAGGCGGCGACTGAGGAAGAGGGCGG
CICY6GusPlus 1441 CCATCCAAGCGTCGTGATGTGGAGCATCGCCAACGAGGCGGCGACTGAGGAAGAGGGCGG

CICY5GusPlus 1501 GTACGAGTACTTCAAGCCGTTGGTGGAGCTGACCAAGGAACTCGACCCACAGAAGCGTCC
GusPlusGenBankAF354045.1 1486 GTACGAGTACTTCAAGCCGTTGGTGGAGCTGACCAAGGAACTCGACCCACAGAAGCGTCC
CICY6GusPlus 1501 GTACGAGTACTTCAAGCCGTTGGTGGAGCTGACCAAGGAACTCGACCCACAGAAGCGTCC

CICY5GusPlus 1561 GGTACCGATCGTGTGTTTGTGATGGCTACCCCGGAGACGGACAAAGTCGCCGAAGTGT
GusPlusGenBankAF354045.1 1546 GGTACCGATCGTGTGTTTGTGATGGCTACCCCGGAGACGGACAAAGTCGCCGAAGTGT
CICY6GusPlus 1561 GGTACCGATCGTGTGTTTGTGATGGCTACCCCGGAGACGGACAAAGTCGCCGAAGTGT

CICY5GusPlus 1621 TGACGTCATCGCGCTCAATCGCTATAACGGATGGTACTTCGATGGCCGTGATCTCGAAGC
GusPlusGenBankAF354045.1 1606 TGACGTCATCGCGCTCAATCGCTATAACGGATGGTACTTCGATGGCCGTGATCTCGAAGC
CICY6GusPlus 1621 TGACGTCATCGCGCTCAATCGCTATAACGGATGGTACTTCGATGGCCGTGATCTCGAAGC

CICY5GusPlus 1681 GGCCAAAGTCCATCTCCGCCAGGAATTTACGCGTGGAACAAGCGTTGCCAGGAAAGCC
GusPlusGenBankAF354045.1 1666 GGCCAAAGTCCATCTCCGCCAGGAATTTACGCGTGGAACAAGCGTTGCCAGGAAAGCC
CICY6GusPlus 1681 GGCCAAAGTCCATCTCCGCCAGGAATTTACGCGTGGAACAAGCGTTGCCAGGAAAGCC

CICY5GusPlus 1741 GATCATGATCACTGAGTACGGCGCAGACACCGTTGCGGGCTTTACGACATTGATCCAGT
GusPlusGenBankAF354045.1 1726 GATCATGATCACTGAGTACGGCGCAGACACCGTTGCGGGCTTTACGACATTGATCCAGT
CICY6GusPlus 1741 GATCATGATCACTGAGTACGGCGCAGACACCGTTGCGGGCTTTACGACATTGATCCAGT

CICY5GusPlus	1801	GATGTTACCCGAGGAATATCAAGTCGAGTACTACCAGGCGAACCACGTCGTGTTTCGATGA
GusPlusGenBankAF354045.1	1786	GATGTTACCCGAGGAATATCAAGTCGAGTACTACCAGGCGAACCACGTCGTGTTTCGATGA
CICY6GusPlus	1801	GATGTTACCCGAGGAATATCAAGTCGAGTACTACCAGGCGAACCACGTCGTGTTTCGATGA
CICY5GusPlus	1861	GTTTGAGAACTTCGTGGGTGAGCAAGCGTGGAACCTTCGCGGACTTCGCGACCTCTCAGGG
GusPlusGenBankAF354045.1	1846	GTTTGAGAACTTCGTGGGTGAGCAAGCGTGGAACCTTCGCGGACTTCGCGACCTCTCAGGG
CICY6GusPlus	1861	GTTTGAGAACTTCGTGGGTGAGCAAGCGTGGAACCTTCGCGGACTTCGCGACCTCTCAGGG
CICY5GusPlus	1921	CGTGATGCGCGTCCAAGGAAACAAGAAGGGCGTGTTCACTCGTGACCGCAAGCCGAAGCT
GusPlusGenBankAF354045.1	1906	CGTGATGCGCGTCCAAGGAAACAAGAAGGGCGTGTTCACTCGTGACCGCAAGCCGAAGCT
CICY6GusPlus	1921	CGTGATGCGCGTCCAAGGAAACAAGAAGGGCGTGTTCACTCGTGACCGCAAGCCGAAGCT
CICY5GusPlus	1981	CGCCGCGCACGTCTTTCGCGAGCGCTGGACCAACATTCAGATTCGGCTACAAGAACGC
GusPlusGenBankAF354045.1	1966	CGCCGCGCACGTCTTTCGCGAGCGCTGGACCAACATTCAGATTCGGCTACAAGAACGC
CICY6GusPlus	1981	CGCCGCGCACGTCTTTCGCGAGCGCTGGACCAACATTCAGATTCGGCTACAAGAACGC
CICY5GusPlus	2041	TAGCCATCACCATCACCATCACGTGTGAGCGGCCGCGCAAATC
GusPlusGenBankAF354045.1	2026	TAGCCATCACCATCACCATCACGTGTGA-----
CICY6GusPlus	2041	TAGCCATCACCATCACCATCACGTGTGAGCGGCCGCGCAAATC

Anexo 10 Protocolo de transformación de biobalística de *C. reinhardtii*.

Preparación de las células

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

A los 7 días del cultivo, se recolectaron 900 µL del cultivo para conteo celular y en un tubo Falcón se recolectaron los 49 mL restantes, los cuales fueron centrifugados a 3220g por 5 minutos a 4 °C.

Se retiró el sobrenadante y se re suspendieron las células en el volumen necesario para obtener 40 millones de células en 100 µL. Esta cantidad se inoculó en cada caja de Petri con 50 mL de medio TAP sólido y se dejó secar en la campana de flujo laminar para eliminar el exceso de medio líquido del inóculo.

Esterilización de las membranas

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

Protocolo de transformación por biobalística.

Antes de empezar el protocolo de transformación se verificó que todas las soluciones a usar (cloruro de calcio, la solución de oro, espermidina (Anexo 6) y plásmidos, de este último fue tomado el volumen necesario para una concentración de 2 μg de cada plásmido) estuvieran descongeladas y se mantuvieran en hielo hasta su uso.

Una vez preparadas las partículas de oro, se colocaron las membranas macroacarreadoras secas en los portamacroacarreadores secos con ayuda de una tapa de tubo de ensayo estéril; cuidando que la parte cóncava estuviera hacia arriba.

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

Se abrió el tubo eppendorf que contenía el oro, y ya con la punta de la pipeta lista, se agitó por vortex la mezcla y antes de dejar de agitar se tomaron 5 μL de la muestra y se esparció esta en el centro de la membrana macroacarreadora, tratando de que todo quedara de forma homogénea. Se dejaron secar las muestras. Las cajas bombardeadas fueron colocadas a 10 cm del cañón (nivel 2) de la cámara de biobalística. Las cajas bombardeadas y los controles se dejaron a baja intensidad de luz, en una repisa que no les diera la luz directa, por 24 horas aproximadamente. Pasadas las 24 horas fueron recuperadas las células transformadas lavando cada caja con 900 μL de medio de selección TAP líquido. Las cajas se lavaron de forma de que el medio llegara a todas las partes de las mismas y se recuperará la mayor cantidad de células posibles.

128