TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TESIS
PRODUCCIÓN DE LACTOSTATINA EN CLOROPLASTOS DE *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

PRESENTA
Ana Rosa López Limón

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

TUTOR (ES)
Dr. José Francisco Morales Domínguez
Dra. Ruth Elena Soria Guerra

ASESOR (A)
Dra. Nora Lilia Vasco Méndez

Aguascalientes, Ags, 13 de Agosto del 2014

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

L.A.Q.B. ANA ROSA LÓPEZ LIMÓN
ALUMNO (A) DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL.
P R E S E N T E.

Estimado (a) alumno (a) López:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"PRODUCCIÓN DE LACTOSTATINA EN CLOROPLASTOS DE *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

A T E N T A M E N T E
Aguascalientes, Ags., 14 de agosto de 2014
"SE LUMEN PROFERRE"
EL DECANO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE AGUASCALIENTES
CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

c.c.p.- Archivo
JJRG,mjda

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES
CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
Departamento de Química

ANIVERSARIO
UAA

M en C. José de Jesús Ruiz Gallegos
Decano del Centro de Ciencias Básicas
P r e s e n t e:

Por medio de este conducto, le comunico que la alumna **Ana Rosa López Limón,** egresada de la Maestría en Ciencias en el área de Biotecnología Vegetal, ha concluido satisfactoriamente su trabajo de tesis titulado **"PRODUCCIÓN DE LACTOSTATINA EN CLOROPLASTOS DE *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*"** que defenderá en el examen de titulación correspondiente.

Por lo anterior se considera que puede proceder a realizar los trámites administrativos correspondientes y se le asigne la fecha de examen de grado.

ATENTAMENTE
"SE LUMEN PROFERRE"

Dr. Francisco Morales Domínguez
Tutor responsable

Aguascalientes, Ags. A 13 de agosto de 2014

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

San Luis Potosí, SLP, a 13 de Agosto del 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE SAN LUIS POTOSÍ

M en C. José de Jesús Ruiz Gallegos
Decano del Centro de Ciencias Básicas

P R E S E N T E

Por medio de este conducto, le comunico que la alumna **Ana Rosa López Limón** egresado de la Maestría en Ciencias en el área de Biotecnología Vegetal, ha concluido satisfactoriamente su trabajo de tesis titulado "**PRODUCCIÓN DE LACTOSTATINA EN CLOROPLASTOS DE *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII***" que defenderá en el examen de titulación correspondiente.

Por lo anterior se considera que puede proceder a realizar los trámites administrativos correspondientes y se le asigne la fecha de examen de grado.

Sin otro particular agradezco las finas atenciones prestadas a la presente solicitud

A T E N T A M E N T E

FACULTAD DE
CIENCIAS QUÍMICAS
Av. Dr. Manuel Nava Núm. 6
Zona Universitaria • CP 78210
San Luis Potosí, S.L.P.
tel. (444) 826 24 40 al 46
fax (444) 826 2372
www.uaslp.mx

Dra. Ruth E. Soria Guerra
Co-director de tesis
Profesor Investigador Nivel VI, SNI 1
Facultad de Ciencias Químicas, UASLP
Av. Dr. Manuel Nava No. 6. Tel 8262440 Ext. 6431
ruth.soria@uaslp.mx

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES

14 de Agosto del 2014

M en C. José de Jesús Ruiz Gallegos
Decano del Centro de Ciencias Básicas
P r e s e n t e:

Por medio de este conducto, me es grato comunicarle que considero finalizada la tesis de la alumna **Ana Rosa López Limón** estudiante de la Maestría en Ciencias en el área de Biotecnología Vegetal, quien ha concluido satisfactoriamente su trabajo de tesis titulado **"PRODUCCIÓN DE LACTOSTATINA EN CLOROPLASTOS DE *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*"**.

Requiriendo entre otros requisitos esta carta, para comenzar los trámites para su titulación.

ATENTAMENTE
"SE LUMEN PROFERRE"

Dra. Nora Lilia Vasco Méndez
Asesora de la Tesis

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA) y a CONACYT por el apoyo económico otorgado para el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. José Francisco Morales Domínguez y a la Dra. Ruth Elena Soria Guerra por su apoyo, aceptación, comprensión y confianza para el desarrollo del presente trabajo y realización del mismo, además de su asesoramiento científico y estímulo para seguir creciendo intelectualmente, por su disposición permanente e incondicional para aclarar mis dudas, por sus sustanciales sugerencias durante la realización de las actividades de laboratorio, por todo eso y muchas cosas más sólo me resta decirles GRACIAS!

A la Dra. Nora Vasco por su asesoramiento y buena disposición.

A la M en C Cristina Garcidueñas por su valiosa colaboración y buena voluntad en la realización de muchas de las actividades del laboratorio.

A todos mis compañeros del laboratorio 60 de la UAA y del laboratorio de Biorreactores de la UASLP, por su valiosa colaboración y buena voluntad en las actividades de laboratorio y porque más que compañeros varios se convirtieron en muy buenos amigos.

A todos mis compañeros de maestría

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

DEDICATORIA

A mis padres:

Federico Guillermo López Macías y Dolores Limón Ramos por su amor, comprensión y apoyo en todo momento, porque siempre están ahí cuando los necesito y porque a pesar de todo siempre creen en mí.

A mi hermano:

Carlos Aurelio López Limón por toda su ayuda.

A mis amigos y compañeros de carrera por brindarme su apoyo en todo momento.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ÍNDICE GENERAL.

ÍNDICE DE TABLAS..... 4

ÍNDICE DE FIGURAS..... 5

ACRÓNIMOS..... 7

RESUMEN..... 9

ABSTRACT..... 10

INTRODUCCIÓN..... 11

ANTECEDENTES..... 13

Cloroplastos..... 14

Vectores para la transformación genética de cloroplastos..... 15

Recombinación homóloga..... 16

Expresión de proteínas recombinantes en microalgas..... 16

Chlamydomonas reinhardtii..... 17

Transformación de C. reinhardtii..... 18

Bombardeo con microproyectiles..... 19

Producción de proteínas recombinantes en C. reinhardtii..... 21

Promotores utilizados..... 22

Marcadores de selección y genes reporteros..... 22

Péptidos bioactivos..... 25

Hipercolesterolemia..... 26

Lactostatina..... 31

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)..... 31

ELISA (Ensayo inmunológico ligado a enzimas)..... 32

ELISA Directo (ensayo ELISA simple de dos capas)..... 32

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ELISA Indirecto. 33

JUSTIFICACIÓN. 34

HIPÓTESIS. 35

OBJETIVOS. 36

OBJETIVO GENERAL. 36

OBJETIVOS PARTICULARES. 36

MATERIAL Y MÉTODOS. 37

Medios de cultivos para bacterias. 37

Medio de cultivo para Chlamydomonas reinhardtii. 38

Soluciones de antibióticos empleadas. 38

Cepas bacterianas. 38

Mantenimiento de los microorganismos. 38

Gen sintético y Plásmidos. 39

Gen sintético optimizado: 39

Vectores de expresión p463 y p464: 39

Vectores de clonación: 40

Oligonucleótidos. 40

Procedimiento experimental. 41

Transformación de bacterias y selección de transformantes. 41

Selección de clonas positivas. 41

Minipreparación de ADN plasmídico. 41

Digestión con enzimas de restricción. 42

Purificación de ADN a partir de geles de agarosa. 42

Ligación de fragmentos de ADN. 43

Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR. 43

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Electroforesis de ADN en geles de agarosa. 44

Preparación de suspensión de partículas de oro. 44

Preparación del material para bombardeo. 44

Bombardeo con partículas de oro. 45

RESULTADOS. 48

Diseño del gen optimizado de lactostatina. 48

Identificación del gen sintético mediante PCR 50

Ligación del gen sintético lactostatina en los vectores p463 y p464. 50

Confirmación de la construcción del cassette de clonación. 52

Selección de líneas transformantes de Chlamydomonas reinhardtii. 55

Confirmación de la integración del gen sintético lactostatina en el genoma de cloroplasto de Chlamydomonas reinhardtii. 56

Cuantificación de la proteína recombinante por ensayo de ELISA. 58

DISCUSIÓN DE RESULTADOS 60

CONCLUSIONES. 64

GLOSARIO 65

BIBLIOGRAFÍA 66

ANEXOS 78

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Marcadores de selección del genoma de cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii.* 24

Tabla 2.Genes reporteros disponibles para *Chlamydomonas reinhardtii.* 24

Tabla 3. Proteínas recombinantes de uso médico producidas en el cloroplasto de *C. reinhardtii.* 25

Tabla 4. Reactivos utilizados..... 37

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1: Representación esquemática de los métodos de expresión de transgenes en *Chlamydomonas reinhardtii.* 21

Figura 2. Prevalencia del colesterol ≥200mg/dL por grupos de edad y sexo en población urbana en México 27

Figura 3. Se muestra la prevalencia de diferentes niveles de hipercolesterolemia de acuerdo a grupos de edad, en la totalidad de la población detectada con hipertensión arterial. 28

Figura 4. Se muestra la prevalencia de diferentes niveles de hipercolesterolemia de acuerdo a grupos de edad, en la totalidad de la población sin hipertensión arterial. 28

Figura 5. Prevalencia de 4 factores de riesgo cardiovascular. Bajo cada columna OBS (Obesidad), HTA (hipertensión), HCL (hipercolesterolemia), GAA (Glucosa en ayuno). 28

Figura 6. Vector p463 y p464.. 39

Figura 7. Vector de clonación pBluescript SK- (3000pb) para los vectores p463 y p464. 40

Figura 8. Vector de clonación pUC57 (2710pb) para el gen sintético lactostatina... 40

Figura 9. Transformación de *Chlamydomonas* por biobalística 45

Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del pUC57-lactostatina y los vectores p463 y p464. 49

Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del ADN plasmídico obtenido de la propagación de los vectores pUC-lactostatina y p463 y p464. 49

Figura 12. Gel de agarosa al 0.8% correspondiente a la electroforesis de los productos de la PCR con oligonucleótidos específicos para el gen sintético de la lactostatina 50

Figura 13. Gel de agarosa al 0.8% correspondiente a la electroforesis de la digestión de los vectores con la enzima *Nco*I.. 51

Figura 14. Gel de agarosa al 1.8% correspondiente a la electroforesis de la digestión del vector pUC-lactostatina con *NcoI.* 51

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Figura 15. Gel de agarosa al 0.8% correspondiente a la electroforesis de los productos de PCR de la ligación del gen sintético lactostatina en los vectores p463 y p464 respectivamente.. 52

Figura 16. Gel de agarosa al 1% correspondiente a la electroforesis de la digestión con *Nco*I de las construcciones. 53

Figura 17. Se observa el resultado de la secuenciación de la construcción p464-Lacto. 54

Figura 18. Se observa el resultado de la secuenciación de la construcción p463-Lacto 55

Figura 19. Crecimiento de *Chlamydomonas* en medio TAP con espectinomicina a 25°C con un fotoperiodo de 16h luz /8h obscuridad 15 días después de la transformación. 55

Figura 20. Rondas de selección de posibles colonias transformantes en medio TAP con espectinomicina por 7 días a 25° C con un fotoperiodo de 16h luz /8h obscuridad. 55

Figura 21. Resiembra en medio TAP con espectinomicina a 25°C con un fotoperiodo de 16h luz /8h obscuridad, después de 3 rondas de selección. 56

Figura 22 .Mapa genómico del cloroplasto de *C. reinhardtii.* 56

Figura 23. A) Diagrama esquemático de cepa sin transformar (WT) y diagrama esquemático de clonas transformadas que contienen el casete de expresión *(*incluido el gen *lactostatina)*. B) Gel de electroforesis al 1% que nos muestra el amplicón de PCR utilizando oligonucleótidos que alinean en los genes *tscA* y *Ch1N* presentes en el genoma de *C. reinhardtii* 57

Figura 24. Gel de agarosa al 2% correspondiente a la electroforesis de los productos de la PCR con oligonucleótidos específicos para el gen sintético de la lactostatina y el gen de resistencia a espectinomicina (*aadA*). 58

Figura 25. Niveles de acumulación de la proteína recombinante lactostatina en las líneas transplastómicas seleccionadas.. 59

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ACRÓNIMOS.

%: porcentaje
°C: grados centígrados o Celsius
µg: microgramos
µL: microlitros
µM: micromolar
A: adenina
aadA: aminoglucósido-3'-adeniltransferasa
ADN: ácido desoxiribunucléico
ADNc: ácido desoxiribunucléico complementario
Ala: alanina
ALS: acetolactato sintasa
aphA-6: Aminoglucósido fosfotransferasa de *Acinetobacter baumannii*
aphVIII: aminoglucosido 3'-fosfotransferasa tipo VIII
ARN: ácido ribunucléico
Ars: arilsulfatasa
ATP: adenosin trifostafo
atpA: subunidad alfa de la ATPasa
C: citosina
Ca^{+}: ión Calcio
$CaCl_2$: Cloruro de Calcio
CYP7A1: Colesterol 7-alfa-hidroxilasa
Crgfp: proteína verde fluorescente condón optimizada para *Chlamydomonas*
cry1-1: gen que codifica para una proteína ribosómica mutada que confiere resistencia a cryptopleurina y emetina
Cyc6: citocromo c6
DMSO: dimetilsulfóxido
E. coli: *Escherichia coli*
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
ERK: serín treonín cinasa
g: gramos
G: guanina
GFP: proteína fluorescente verde
gfpCt: Proteína verde fluorescente de *A. victoria* con codones optimizados para cloroplastos
Glu: glutamina
h: horas
HDL (High Density Lipoprotein). Lipoproteína de alta densidad
HepG2: línea celular de hígado humano
Hsp70: proteína de choque térmico 70 A.
Ile: isoleucina
Kb: kilobases
L: litro
LB: Medio Luria-Bertani
LDL: (Low Density Lipoprotein) lipoproteínas de baja densidad
lucCP: Luciferasa de luciérnaga con codones optimizados para cloroplastos
luxCt: Luciferasa luxAB de *Vibrio harveyi* con codones optimizados para cloroplastos.
Lys: lisina

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

M: molaridad
MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno
mARNs: ácido ribonucleico mensajero
mg: miligramos
min: minutos
mL: mililitros
mM: milimolar
M-SAA: proteína amieloide A de suero de mamíferos
mt(+)/(-):tipo sexual materno/paterno
NcoI: enzima obtenida de Nocordia coralia I
ng: nanogramos
Nia1: nitrato reductasa
pb: pares de bases
PCR: Reacción en cadena de polimerasa
ppx1: gen mutado de la protoporfirinógeno oxidasa que confiere resistencia a herbicidas porfíricos
psbA: proteína D1 del fotosistema II
psi: libras por pulgada cuadrada
PTS: proteína total soluble
rARNs: ácido ribonucléico ribosomal
rbcL: ribulosa bifosfato carboxilasa
RbcS2: subunidad pequeña de la ribulosa bifostato carboxilasa/oxigenasa
RBS: Sitio de unión al ribosoma
Rluc: Luciferasa de *R. reniformis*
rpm: revoluciones por minuto
Rubisco: ribulosa-1.5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa
BSA: albúmina de suero bovino
s: segundos
S-23142: herbicida [*N* - (4-cloro-2-fluoro-5-propargiloxifenil) -3,4,5,6-tetrahidroftalimida],
SDS: dodecilsulfato sódico
T: timina
TAP: tris fosfato acetato
tARNs: ácido ribunucléico de transferencia
tscA: RNA implicado en el corte y unión en trans de los exones 1 y 2 de psaA
UTR´s: región no traducible
v/v: volumen/volumen
V: volts
VLDL: (Very low Density Lipoprotein) lipoproteínas de muy baja densidad
β: beta
β-*2-Tub*: β *-2-tubulina*

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

RESUMEN.

Una de las áreas de mayor impacto de la Biotecnología es la producción de proteínas recombinantes con aplicaciones terapéuticas, ya que éstas pueden producirse en grandes cantidades de forma segura y continua, con lo que es posible abastecer la gran demanda de éstas para el tratamiento de diversas enfermedades (Tran, et al., 2009). Recientemente, las microalgas verdes, y en particular la especie *Chlamydomonas reinhardtii*, han 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 a que son generalmente consideradas como inocuas para el ser humano (Mayfiel, et al., 2003).

En este estudio se diseñó un gen sintético que se basó en la secuencia de la lactostatina; un pentapéptido con actividad hipocolesterolémica derivado de la beta-lactoglobulina, con la finalidad de producir una proteína quimérica en cloroplastos de *Chlamydomonas reinhardtii.*

Este gen sintético contiene 9 repeticiones en tandem del pentapéptido de interés y una etiqueta de histidina para facilitar su caracterización; fue transferido a *Chlamydomonas reinhardtii* utilizando la técnica de biobalística. Las transformantes fueron seleccionadas después de 5 rondas de selección en medio con espectinomicina, se identificaron por PCR y se cuantificó la proteína quimérica por ensayo de ELISA obteniendo una producción de 2.2-5.5% de proteína total soluble. Estos resultados demuestran que el cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* puede servir como una plataforma de expresión para la producción de péptidos bioactivos.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ABSTRACT.

One of the greatest impact areas of biotechnology is the production of recombinant proteins for therapeutic applications, this kind of proteins can be produced in large quantities safely and continuously, so it is possible to supply the great demand for these in the treatment of various diseases (Tran, et al., 2009). Recently, the green algae, particularly *Chlamydomonas reinhardtii*, have emerged as a new and attractive alternative for the production of recombinant proteins, mainly due to its easy and economical culture, its high capacity to accumulate biomass and since they are generally considered harmless to humans (Mayfiel, et al., 2003).

In this study, a synthetic gene was designed based on the sequence of lactostatin, a pentapeptide with hypocholesterolemic activity derived from the beta-lactoglobulin, with the aim of producing a chimeric protein in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast.

This synthetic gene, containing 9 tandem repeats of the pentapeptide and a histidine tag was transferred to *Chlamydomonas reinhardtii* using biolistic technique. The transformants were selected after 5 rounds in selective medium with spectinomycin. The recombinant strains were identified by PCR and the chimeric protein was quantified by ELISA obtaining an output of 2.2 to 5.5% of total soluble protein. These results show that the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* can be used as an expression platform for the production of bioactive peptides.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

INTRODUCCIÓN.

Una de las áreas de mayor impacto de la Biotecnología es la producción de proteínas recombinantes, es decir, proteínas obtenidas por la tecnología de ADN recombinante con aplicaciones terapéuticas, ya que estas pueden producirse en grandes cantidades de forma segura y continua y con ello abastecer la gran demanda de estas para el tratamiento de diversas enfermedades (Tran, et al., 2009).

Entre los organismos modificados que actúan como "reactores biológicos o biofábricas" capaces de sintetizar proteínas recombinantes se encuentran bacterias, levaduras, insectos, plantas y 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 (Manuell, 2007).

Recientemente las microalgas verdes, y en particular la especie *Chlamydomonas reinhardtii*, han 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 a que son generalmente consideradas como inocuas para el ser humano (Mayfiel, et al., 2003).

En sus inicios, la producción de proteínas recombinantes se limitó al empleo de la ingeniería genética para manipular el material genético contenido en el citoplasma de algunas bacterias, y en el núcleo de levaduras y células animales, y aun en la actualidad la mayoría de las proteínas recombinantes disponibles comercialmente son producidas usando sistemas eucarióticos y procarióticos tradicionales, incluyendo aquellas de uso terapéutico humano y animal (Huang y McDonald, 2009). Sin embargo, en los últimos años el empleo de células vegetales y de los plástidos contenidos en ellas, en especial los cloroplastos, han cobrado importancia como medio de producción de proteínas recombinantes debido a que estos últimos son centros biosintéticos trascendentales que además de llevar a cabo el proceso de la fotosíntesis son responsables de la producción de importantes compuestos como proteínas, aminoácidos, carbohidratos complejos, ácidos grasos y pigmentos (McBride y Stalker, 2006). Mediante la modificación *in vitro* del genoma

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

de cloroplastos se puede lograr la expresión de diversas proteínas con importantes aplicaciones terapéuticas en la medicina.

Dentro de los beneficios inherentes a la expresión de transgenes insertados en el genoma de cloroplastos se pueden enfatizar:

a) Altos niveles de expresión, que en algunos casos son superiores al 70% de la proteína soluble total en plantas (Oey, et al., 2009),
b) Ausencia del silenciamiento de genes y de la variación de los efectos de posición (Maliga, 2003),
c) Habilidad para expresar diversos genes a partir de un único promotor (De Cosa, et al., 2001),
d) La prevención de la transmisión del ADN exógeno mediante el polen,
e) La integración de genes mediante el proceso de recombinación homóloga y
f) La eliminación de interacciones adversas en el citoplasma (Heifetz, 2000; McBride y Stalker, 2006).

Una célula vegetal típica puede contener aproximadamente 100 cloroplastos con cerca de 100 copias idénticas del genoma plastidial dentro de cada uno de estos, dando un posible total de hasta 10,000 genomas idénticos por célula (James, et al., 2005; Maliga, 2003; Heifetz, 2000) lo que hace a la modificación genética de cloroplastos un sistema de expresión sumamente rentable y prometedor.

La modificación del genoma del cloroplasto, tiene diversas ventajas y aplicaciones con respecto a la modificación nuclear y a la modificación de células no vegetales, pero para lograr esa modificación plastidial es necesario desarrollar antes tres áreas de investigación:

1) El diseño y construcción de un vector transformante específico que contenga las secuencias de ADN necesarias para lograr la modificación del genoma del cloroplasto, así como para la expresión de la proteína de interés (promotor y terminador);

2) El desarrollo de un protocolo de cultivo de tejidos vegetales que permita la regeneración de las células que han sido modificadas genéticamente. En esta segunda área es posible obtener diversos resultados, desde células que pueden

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

crecer en medios de cultivo líquidos, hasta plantas completas, quiméricas o no quiméricas, con cloroplastos cuyo genoma ha sido modificado y;

3) El establecimiento de la metodología de transformación genética por bombardeo de micropartículas para la especie vegetal en cuestión (Rasala, et al., 2010).

Por lo que en este trabajo se realizó el diseñó de un gen sintético basado en la secuencia de un pentapéptido con actividad hipocolesterolémica derivado de la beta-lactoglobulina llamado lactostatina, el cual fue transferido a los cloroplastos de *Chlamydomonas reinhardtii* utilizado técnica de biobalística con la finalidad de producir una proteína quimérica.

ANTECEDENTES.

Las células de algas y plantas terrestres contienen cloroplastos con genomas circulares autorreplicativos que pueden variar en tamaño desde 50 hasta 290 kb y una sola célula vegetal puede contener hasta 10,000 copias de un mismo genoma debido al número de cloroplastos contenidos en ella (Maliga, 2003). Estos cloroplastos tienen un sistema activo de recombinación homóloga, y como consecuencia de ello, el genoma se encuentra en un continuo estado de intercambio inter e intramolecular, facilitando así la precisa integración dirigida de secuencias de ADN exógeno que luego se propagan a todas las copias del genoma de este y de los demás cloroplastos de la célula (Heifetz, 2000). De esta forma la sobreexpresión de proteínas recombinantes dentro de células cuyo genoma plastidial ha sido modificado (células transplastómicas) ofrece entonces una alternativa atractiva en comparación con los sistemas convencionales en relación con los costos de producción inherentes a esta actividad al emplear a las plantas como biorreactores (James, et al., 2005).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Cloroplastos.

Los plástidos como los cloroplastos en plantas superiores son organelos semiautónomos que cuentan con su propia maquinaria de replicación, transcripción y traducción (Maliga, 2003). Son capaces de llevar a cabo el proceso de la fotosíntesis, y de sintetizar compuestos como aminoácidos, carbohidratos complejos, ácidos grasos y pigmentos, además de proteínas, por lo que al modificar su genoma es posible sintetizar proteínas recombinantes aprovechando su maquinaria de replicación, transcripción y traducción (McBride y Stalker, 2006).

El genoma del cloroplasto, altamente conservado en diversas especies, contiene cerca de 120 a 130 genes densamente empacados en dos regiones invertidas repetidas o en copias de dos regiones únicas (James, et al., 2005). Estos genes caen dentro de dos categorías: 1) genes relacionados con el proceso de la fotosíntesis y 2) genes implicados en la síntesis de rARNs, tARNs, proteínas ribosomales y subunidades de la ARN polimerasa. Sin embargo, la gran mayoría de las proteínas plastidiales se encuentran codificadas en el núcleo (Flügge, 2001).

Los plástidos también exhiben un particular arreglo y expresión de genes, presentando características únicas que son una mezcla de funciones procarióticas y eucarióticas. Por ejemplo, los genes plastidiales se organizan en operones y son co-expresados para producir mARNs policistronicos. Aún más, la regulación en la expresión de los genes ocurre a varios niveles, incluyendo la transcripción, el procesamiento y estabilidad del ARN, así como la traducción y procesos postraduccionales (James, et al., 2005).

El número de copias de genes codificadas en dos regiones invertidas repetidas de las plantas superiores alcanza cerca de las 20,000 copias, resultando en altos niveles de expresión de los transgenes. La expresión de algunas proteínas exógenas en plantas ha llegado a ser hasta del 70% de la proteína total soluble (Oey, et al., 2009).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Vectores para la transformación genética de cloroplastos.

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico que tienen todos los elementos para replicarse en una célula u organelo, pero no se replican de manera autónoma. La mayoría están constituidos por un ADN bicatenario circular cerrado de tamaño muy variable (1 a >200 Kb), que se pueden aislar de una bacteria en forma superenrollada. Se encuentran en una gran variedad de especies bacterianas, pero suelen tener un rango de huésped estrecho. Los plásmidos contienen con frecuencia genes que codifican para enzimas útiles para el sistema de expresión del huésped, como genes de resistencia a antibióticos, de degradación de compuestos orgánicos, de toxinas, y de producción de enzimas de restricción y modificación, entre otros (Tran, et al., 2009).

El diseño del plásmido depende del propósito y del experimento específico, y la manera de expresar los genes puede ser transitoria o permanente. La expresión transitoria indica que el vector se ha integrado a la célula pero no en su genoma, mientras que la expresión permanente o estable sugiere la incorporación de un fragmento del vector en el genoma de la célula, o en su caso del cloroplasto. Para que un fragmento de ADN, que contendrá los genes que se desean introducir y expresar, se inserte en el genoma del cloroplasto, se necesita que exista homología entre las regiones que flanquean a estos genes y una región del genoma del cloroplasto (Rasala, et al., 2010).

En cloroplastos, el tamaño de estas secuencias homólogas debe tener una longitud mínima de aproximadamente 1 Kb (en cada flanco de los genes a introducir) ya que secuencias más pequeñas pueden reducir la eficiencia en la recombinación (Koop, et al., 2007). Los cassettes de expresión en los vectores de transformación de cloroplastos requieren elementos regulatorios, como promotores, regiones 5’ no traducidas (ó 5’ UTRs por sus siglas en inglés), sitios de unión al ribosoma (ó RBS por sus siglas en inglés) y regiones 3’ no traducidas (ó 3’UTRs), que sean compatibles con la maquinaria de expresión del genoma plastidial (James y Daniell, 2005).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Recombinación homóloga.

La recombinación homóloga es un proceso fundamental en la célula, que permite la reorganización de genes dentro y entre cromosomas, participa en la reparación del ADN, asegura la segregación de los cromosomas en la división celular y es una potente fuerza evolutiva que promueve la diversidad genética y la conservación de la identidad genética (Heyer, et al., 2006).

Este tipo de recombinación se produce entre secuencias de ADN que son idénticas o con alto grado de similitud, y que se corresponden a regiones equivalentes de cromosomas homólogos. Se lleva a cabo en organismos diploides o haploides en estado de diploidia temporal. La recombinación homóloga ocurre entre dos cadenas (dúplex) de ADN. Su característica crítica es que las enzimas responsables pueden usar cualquier par de secuencias homólogas como sustratos (aunque a veces algunas se pueden favorecer) (Johnson y Symington, 1995).

Expresión de proteínas recombinantes en microalgas.

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos que van desde procariotas (cianobacterias) a un grupo evolutivo divergente de eucariotas. Las algas se pueden encontrar en cualquier agua dulce o de mar y contribuyen aproximadamente al 50% de la fijación global de carbono (Leon-Banares, et al., 2004). Algas presentes en la naturaleza se han usado durante mucho tiempo para la producción de alimentos, aditivos alimentarios y cosméticos.

Aunque ofrecen ventajas sobre los sistemas de expresión de proteínas convencionales, el gran potencial de las microalgas eucariotas no ha sido explotado.

En principio, las microalgas eucariotas ofrecen todas las ventajas de los sistemas de plantas transgénicas combinadas con las características especiales de los microorganismos, como crecimiento rápido y corto tiempo de transformación. Las microalgas tales como *Chlorella, Haematococcus* y *Dunaliella* que están en uso para la producción de productos naturales, no contienen toxinas y/o patógenos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

humanos como virus o priones y, por lo tanto, se consideran generalmente como seguros (Walker, 2005; Mayfiel y Franklin, 2005). Esto hace que el uso de algas sea atractivo para la producción de compuestos farmacéuticos, como, por ejemplo, la producción de vacunas comestibles, las cuales podrían administrarse sin extracción previa de la proteína. En contraste con las plantas transgénicas, el cultivo de microalgas puede llevarse a cabo en biorreactores autónomos, lo que excluye los problemas derivados de la liberación y el potencial de flujo de genes a otros organismos. En el caso poco probable de liberación no deseada, no hay ningún riesgo de propagación de las algas transgénicas, ya que las cepas de laboratorio utilizadas para la expresión, contienen varias mutaciones, lo que impide la supervivencia de estas bajo condiciones naturales. Debido al corto tiempo de generación (por ejemplo, 8 h en el caso de *Chlamydomonas reinhardtii* bajo crecimiento vegetativo) y la capacidad de alcanzar altas densidades de células en biorreactores, la biomasa producible en un tiempo y área determinada es mucho mayor que para las plantas (Huang y Mc Donald, 2005).

Por lo tanto, los costes de producción pueden mantenerse bajos, debido a que los medios de cultivo para estos organismos fotosintéticos contienen sólo algunas sales minerales en contraste a los cultivos celulares de mamíferos (Leon-Banares, et al., 2004).

***Chlamydomonas reinhardtii*.**

C. reinhardtii es una microalga verde eucarionte (clorofita) que ha sido empleada por casi sesenta años como modelo en estudios fisiológicos como la fotosíntesis, la biogénesis (formación) del cloroplasto y la función de los flagelos (Griesbeck, et al., 2006).

Se ha hecho referencia a esta microalga como “la levadura verde” debido a su rápida multiplicación y su fácil manipulación en cultivos de laboratorio. La cepa silvestre de *C. reinhardtii* presenta una morfología ovoide de aproximadamente 10 micrómetros de largo por 3 de ancho, y en su extremo anterior posee dos flagelos que le proporcionan movilidad, además de estar involucrados en la reproducción sexual (Franklyn y Mayfield, 2004).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

La mayor parte de su espacio intracelular (40%) está ocupado por un único cloroplasto con forma de copa, el cual posee aproximadamente 80 copias de su genoma. *C. reinhardtii* es capaz de desarrollarse mixotróficamente; es decir, de forma autótrofa (puede producir su propio alimento) o heterótrofa (obtiene su alimento de fuentes externas), según la disponibilidad de compuestos orgánicos y la intensidad lumínica. Su transformación genética (la introducción de material genético externo a la célula) es relativamente fácil, tanto a nivel nuclear como de cloroplasto, y el tiempo entre la transformación de la microalga hasta la producción de una proteína recombinante puede ser de sólo seis semanas (Griesbeck, et al., 2006).

Transformación de *C. reinhardtii*.

Varios métodos han sido desarrollados para la transformación del genoma nuclear de *Chlamydomonas.*

El método más común consiste simplemente en la agitación de las células con perlas de vidrio en presencia de polietilenglicol y el ADN transformante (Kindle, 1990). Generalmente, se utilizan células mutantes deficientes de pared, pero también las células completas se pueden transformar después de la degradación enzimática de la pared celular. Un método similar incluye el uso de whiskers de carburo de silicio utilizando células intactas (Dunahay, 1993).

La electroporación también se ha utilizado con éxito para la transformación del genoma nuclear de cepas con pared y sin pared (Tang, et al., 1995; Shimogawara, et al., 1998).

Otro método de suministro de ADN consiste en el bombardeo de células con partículas de oro y/o tungsteno recubiertas de ADN a través de una pistola de partículas (Debuchy, et al., 1989). Este método se utiliza rutinariamente para la transformación del genoma del cloroplasto (Boynton, et al., 1988).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Bombardeo con microproyectiles.

El bombardeo con microproyectiles o biolística, es el método alternativo al plásmido Ti más importante para transferir ADN a plantas. La técnica consiste en bañar partículas esféricas de oro o tungsteno (aproximadamente de 0,4-1,2 micrómetros de diámetro) con ADN, el cual ha sido precipitado con $CaCl_2$, espermidina o polietilenglicol. Las partículas bañadas con ADN son aceleradas a altas velocidades (300-600 metros/segundo) con un equipo especial llamado pistola de partículas (o pistola de genes). La versión original de esta pistola de partículas utilizaba una pequeña cantidad de pólvora para acelerar las micropartículas (Boyton, et al., 1998).

Actualmente se usa helio a altas presiones como fuente para la propulsión. Los proyectiles acelerados van a penetrar la pared y la membrana celular, aunque la densidad de partículas utilizadas no va a resultar significativamente dañina para la misma. El alcance de la penetración de las partículas en las células vegetales puede ser controlada variando la intensidad del estallido, alterando la distancia en que las partículas han de atravesar la célula o utilizando partículas de diferentes tamaños (Dunahay, 1993).

Una vez dentro de la célula, el ADN se desprende de los microproyectiles debido a las modificaciones del entono iónico y en la mayoría de los casos, es integrado dentro del genoma de las plantas. El bombardeo con microproyectiles es utilizado para transferir ADN exógeno a suspensiones celulares de plantas, a cultivos de callos, a tejidos meristemáticos, a embriones inmaduros y a polen, todos ellos obtenidos a partir de un amplio rango de plantas diferentes, incluidas monocotiledóneas y coníferas, las cuales son consideradas como plantas menos susceptibles de la infección por *Agrobacterium*. Además, este método ha sido utilizado para transferir ADN a cloroplastos y mitocondrias (Boyton, et al., 1998).

De forma convencional, los plásmidos de ADN disueltos en tampón son precipitados sobre la superficie de los microproyectiles. Este procedimiento tiene como objetivo aumentar la frecuencia de células transformadas al aumentar la cantidad de plásmido de ADN; no obstante, una elevada cantidad de plásmido puede resultar inhibitoria. Se estima que aproximadamente 10,000 células son transformadas con cada bombardeo. Con esta técnica, las células transformadas,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

que son detectadas por la expresión de un gen marcador, a veces solo expresan el ADN transferido de forma transitoria (Kindle, 1990).

La configuración de los vectores que son utilizados en biolística para introducir genes foráneos a plantas influye tanto en la integración como en la expresión de dichos genes. De este modo, la transformación resulta más eficaz cuando se usa ADN linear en vez de circular. Además, los plásmidos de tamaños superiores a 10 Kb, a diferencia de los pequeños, pueden ser fragmentados durante el bombardeo con microproyectiles, produciendo una tasa menor de células transformadas. El método de bombardeo de micropartículas es una de las técnicas de transferencia génica más importante, ya que por su naturaleza totalmente física, es independiente del tipo de célula blanco y ha sido utilizado no sólo para introducir ADN exógeno a células vegetales, sino a células de una gran variedad de organismos tales como bacterias, algas, hongos, células animales, y aún animales y plantas intactas (Boyton, et al., 1998).

La biobalística ha sido utilizada con éxito para producir plantas transgénicas y transplastómicas a partir de una gran variedad de tejidos vegetales, entre los que se incluyen hojas, meristemos, embriones en desarrollo, embriones maduros, callos embriogénicos, suspensiones celulares, etc. Los principales logros en la obtención de plantas transgénicas por este método incluyen especies de gran interés económico como son la soja, el maíz, el arroz, el sorgo, la papaya, la caña de azúcar, el trigo y el espárrago. También se ha utilizado para transformar microorganismos como levaduras, el moho *Aspergillus* y el alga *Chlamydomonas* (Dunahay, 1993).

Esta metodología de transformación tiene ciertas limitaciones. Algunos tejidos oponen una resistencia natural a la penetración de las partículas, dada por cutículas endurecidas, paredes celulares lignificadas o superficies vellosas. Sin embargo, los principales limitantes del método continúan siendo la baja relación entre el total de células sometidas al bombardeo y el número de células que logran incorporar de manera permanente la información genética transferida (Griesbeck, et al., 2006).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Producción de proteínas recombinantes en *C. reinhardtii*.

En general, hay dos formas factibles de expresar un gen foráneo en *Chlamydomonas*: desde el genoma nuclear con la posibilidad de modificaciones posteriores a la traducción y direccionamiento de la proteína, por ejemplo, secreción en el medio; y dentro del cloroplasto a partir del genoma de plástidos (Figura 1). En contraste con una integración dirigida de ADN exógeno en el genoma cloroplástico por integración homóloga, los transgenes se insertan aleatoriamente en el genoma nuclear (Debuchy, et al., 1989). Por lo tanto, los transformantes obtenidos por transformación nuclear pueden variar ampliamente en los niveles de expresión de los transgenes. El silenciamiento de transgenes por los mecanismos de transcripción (por ejemplo, la metilación de la citosina) y pos-transcriptional, deteriora además la expresión de proteínas nucleares (Cerutti, et al., 1997; Schroda, 2005).

La utilización de promotores fisiológicos y elementos genéticos tales como 3'-UTRs o, y en el caso de la expresión nuclear, de intrones, provoca también un aumento en la expresión del transgén (Lumbreras, et al., 1998; Bames, et al., 2005). Para la expresión en cloroplastos, se han reportado niveles de 0,5-5% (Tabla 3) de la proteína total soluble (PTS) (Sun, et al., 2003; Mayfield, et al., 2003; Franklin, et al., 2002). Recientemente se han reportado trabajos, como en el caso de la proteína amieloide A de suero de mamíferos (M-SAA), con un nivel de expresión del 10% de PTS (Manuell, et al., 2007) y la proteína VP28 del virus de la mancha blanca, con una producción 20,9% de PTS (Surzycki, et al., 2009) utilizando en ambas ocasiones el promotor el *psbA*.

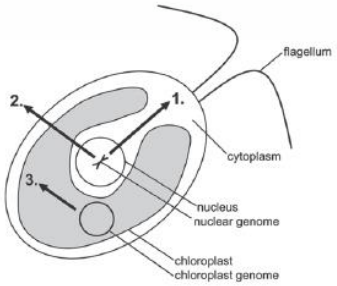


Figura 1: Representación esquemática de los métodos de expresión de transgenes en *Chlamydomonas reinhardtii.*(1) Expresión nuclear y orientación de la proteína en el citoplasma. (2)

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Expresión nuclear y secreción de la proteína al medio a través del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi (estos organelos se han omitido en el dibujo). La proteína puede ser modificada después de la traducción. (3) Expresión de proteínas en el cloroplasto. El producto se acumula en el cloroplasto; la secreción y modificaciones post-traduccionales no son posibles (Debuchy, et al., 1989).

Promotores utilizados.

El uso de promotores endógenos de genes altamente expresados, en combinación con su correspondiente 3'-UTRs, han demostrado incrementar la expresión del transgén en el genoma nuclear de *Chlamydomonas*. Los promotores más comunes son el promotor *RbcS2*, de una subunidad pequeña de la ribulosa bisfosfato carboxilasa y el promotor β-*2-Tub,* del gen de la β *-2-tubulina* (Slevens, 1996; Davies, 1992). El promotor *Hsp70* de la proteína de choque térmico 70A sirve como un activador de la transcripción cuando se coloca río arriba de los promotores *RbcS2* y β-*2-Tub.* (Schroda, 2000). Los promotores inducibles como *Cyc6* (citocromo c6) y *Nia1* (nitrato reductasa) facilitan la expresión controlada y reversible de los genes mediante cambios en la composición del medio de cultivo (Quinn, 2003; Loppes, et al., 1999).

Los promotores más eficientes para la expresión de proteínas recombinantes en cloroplastos también son de origen endógeno. Las secuencias promotoras de la subunidad grande de la ribulosa bifosfato carboxilasa (rbcL), subunidad alfa de la ATPasa (atpA) y proteínas D1 del fotosistema II (psbA) se utilizan predominantemente para la expresión de transgenes en el cloroplasto (Sun et al., 2003; Mayfiel, et al., 2003; Mayfield, et al., 2004 y Franklin, 2002).

Marcadores de selección y genes reporteros.

En la Tabla 1 se enlistan una serie de marcadores de selección disponibles, algunos de los cuales sólo se pueden utilizar para la transformación del cloroplasto. Cuatro marcadores para la transformación nuclear operan por complementación de mutantes metabólicos: *arg7* (Debuchy, et al., 1989), *Nia1* (Kindle, et al., 1989), *Nic7*

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

(Ferris, 1995), y *Thi10* (Ferris, 1995), los cuales resultan interesantes para aplicaciones biotecnológicas debido a que reemplazan la co-transformación de genes de resistencia a antibióticos, lo que se visualiza como una contribución a la seguridad biológica de los usuarios. Sin embargo, su uso está restringido a las cepas mutantes correspondientes o bien la mutación apropiada tiene que ser introducida en la cepa receptora deseada por cruzamiento sexual antes de crear la transformante real. Un segundo grupo de marcadores de selección se basa en los genes modificados de *Chlamydomonas*. El gen *cry1-1* codifica para una proteína ribosómica mutada que confiere resistencia a cryptopleurina y emetina (Nelson, 1994). El gen mutado de la protoporfirinógeno oxidasa *ppx1* induce resistencia a los herbicidas porfíricos como S-23142 (Randolph-Anderson, et al., 1998), y una variante del gen de la acetolactato sintasa (ALS) permite la selección utilizando herbicidas tales como sulfometurón metilo (Koyar, et al., 2002). Por último, varios marcadores de selección de bacterias se han adaptado para el uso en *C. reinhardtii.* La expresión de las fosfotransferasas *aph7"* y *aphVII*I conduce a la resistencia contra higromicina B (Berthold, 2002) y paromomicina / kanamicina (Sizova, et al., 2001), respectivamente. El gen *aadA*, que codifica para una adenina aminoglucósido transferasa, que brinda resistencia contra la espectinomicina/estreptomicina se ha usado para la transformación tanto nuclear como del cloroplasto, pero debido a la inestabilidad de la resistencia a la espectinomicina después de la transformación nuclear, actualmente es utilizado sólo para la transformación del genoma del cloroplasto (Golschmidt-Clermont, 1991; Cerutti, et al., 1997b). Otra fosfotransferasa, llamada *aphA-6,* ha sido desarrollada como un marcador de selección para la transformación de cloroplastos y permite la selección en kanamicina o amikacina (Bateman y Purton, 2000). Además de la selección de numerosos marcadores, varios genes indicadores o reporteros para análisis de la expresión nuclear o en el genoma del cloroplasto se muestran en la Tabla 2. Un gen endógeno que permite realizar estudios del promotor es la arilsulfatasa (Ars) (Davies, 1992). Su actividad puede ensayarse mediante sustratos cromogénicos en ensayos colorimétricos. A medida que el gen endógeno se activa bajo limitación de azufre, este reportero sólo se puede utilizar en condiciones donde la enzima endógena no es detectable. Dos genes indicadores o reporteros muy populares, que también se usan a menudo como proteínas de fusión, son la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

proteína fluorescente verde (GFP) de *Aequorea victoria* y la luciferasa de *Renilla reniformis*, ambos están disponibles para la expresión nuclear y del genoma cloroplástico para co-expresar la síntesis de los genes foráneos en *Chlamydomonas*. El gen *crgfp* para GFP adaptado al uso de codones al genoma nuclear, fue el primer ejemplo para la mejora de la expresión génica y se ha utilizado para estudiar la expresión y localización de varias proteínas (Fuhrmann, et al., 1999; Ruiz-Binder, et al., 2002). La luciferasa se ha utilizado como un reportero de la expresión génica cloroplástica combinando el ADNc de *Renilla* con UTRs endógenos (Rluc) (Minko, et al., 1999). El gen bacteriano *luxAB* de la luciferasa y GFP de *A. victoria* también fueron modificados para la expresión óptima en el genoma del cloroplasto y fueron nombrados *luxCt* y *gfpCt*, respectivamente (Mayfiel, et al., 2004; Franklin, 2002). Recientemente, un gen de la luciferasa de luciérnaga, con codones optimizados para el cloroplasto, se ha desarrollado como un reportero de bioluminiscencia (Matsuo, et al., 2006).

Tabla 1. Marcadores de selección del genoma de cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii.*

Marcador	Descripción
aadA	Eubacteria aminoglucósido adenin tranferesa, resistencia a espectinomicina/estreptomicina.
aphA-6	Aminoglucósido fosfotransferasa de *Acinetobacter baumannii* resistencia a kanamicina/amikacina.

Tabla 2.Genes reporteros disponibles para *Chlamydomonas reinhardtii.*

Reportero	Descripción
gfpCt	Proteína verde fluorescente de *A. victoria* con codones optimizados para cloroplastos
Rluc	Luciferasa de *R. reniformis.*
luxCt	Luciferasa luxAB de *Vibrio harveyi* con codones optimizados para cloroplastos.
lucCP	Luciferasa de luciérnaga con codones optimizados para cloroplastos.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Tabla 3. Proteínas recombinantes de uso médico producidas en el cloroplasto de *C. reinhardtii.*

Gen expresado	Tipos de proteína	Función	Promotor + 5´UTR/3UTR´	Rendimiento (proteína total soluble PTS)	Aplicación	Referencia
HSV8-Isc	Anticuerpo	Actividad contra la glicoproteína D del virus del herpes simple	*atpA/rbcL*	0.5%	Anticuerpos monoclonales	Mayfield, et al., 2003
83K7C	Anticuerpo derivado de IgG1	Actividad contra el antígeno PA83 del ántrax	LC: *psbA/rbcL* HC: *psbA/psbA*	0.1% de biomasa seca	Anticuerpos monoclonales	Tran, et al., 2009
CTB-D2	Subunidad B de la toxina del cólera fusionada con el dominio D2 de la proteína de unión a la fibronectina	Vacuna oral contra *S. aureus*	*rbcL/rbcL*	0.7%	Vacuna oral	Dressen, et al., 2010
hTRAIL	Factor de necrosis tumoral	Tratamiento del cáncer	*atpA/rbcL*	0.43%-0.67%	Terapéutico	Yang, et al., 2006
M-SAA	Suero bovino amiloide asociado a las glándulas mamarias	Estimulación de la producción de mucina en el intestino para inmunizar a recién nacidos	*psbA/psbA*	10%	Terapéutico	Manuell, et al., 2007
hGAD65	Descarboxilasa de ácido glutámico humano 65	Diagnóstico temprano de la diabetes tipo I	*rbcL/rbcL*	0.25-0.3%	Terapéutico	Wang, et al., 2008
M-SAA-10NF3	Dominio 10 de la fibronectina III humana	Símil de anticuerpo	*psbA/psbA*	~3.0%	Terapéutico	Rasala, et al., 2010
14NF3	Dominio 14 de la fibronectina III humana	Símil de anticuerpo	*psbA/psbA*	3%	Terapéutico	Rasala, et al., 2010

Péptidos bioactivos.

Los péptidos bioactivos juegan un papel importante como mediadores de las funciones biológicas fundamentales, y sus propiedades únicas, en términos de eficacia, selectividad, especificidad y baja toxicidad, los hacen particularmente atractivos como reactivos terapéuticos, profilácticos y de diagnóstico para diversas indicaciones, tales como la alergia, enfermedades cardiovasculares, enfermedades infecciosas, trastornos inmunológicos, disfunción gastrointestinal y cáncer. La distinción entre el péptido y la proteína terapéutica puede ser ambigua, ya que cualquier polímero de dos o más aminoácidos unidos por enlaces peptídicos se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

considera un péptido, pero el número mínimo de residuos de aminoácidos necesarios para formar una proteína es arbitrario. Un trabajo previo definió el valor de corte como 100, de modo que cualquier cadena de menos de 100 aminoácidos se considera un péptido y no una proteína (Lien y Lowman, 2003).

La síntesis química de péptidos es muy cara y difícil de escalar, lo que resulta en el desarrollo de varios enfoques que permiten a las células vegetales ser utilizadas como fábricas de péptidos (Bray, 2003).

Las microalgas verdes, y en particular la especie *Chlamydomonas reinhardtii,* ha surgido como una alternativa nueva y atractiva para la producción de péptidos recombinantes, debido principalmente a su cultivo fácil y económico, su gran capacidad para acumular biomasa y a que son generalmente consideradas como inocuas para el ser humano. Además se consideran una plataforma valiosa para la producción de péptidos recombinantes por la seguridad que resulta de la incapacidad de las microalgas para permitir la replicación de los virus humanos, y la capacidad de las microalgas para sintetizar péptidos que son estructural y funcionalmente idénticos a sus contrapartes nativas (Obembe, et al., 2011 ; Rybicki, 2010).

Las microalgas producen grandes cantidades de biomasa sin necesidad de medios de cultivo costosos y su producción se puede escalar de acuerdo con los requisitos del mercado (Liénard, et al., 2007). Cabe mencionar que los componentes principales de la biomasa de microalgas son habitualmente proteínas (30-60%), carbohidratos (20-30%), lípidos (10-30%) y cenizas (5-10%) (Rebolloso-Fuentes, et al., 2000, 2001). Estos porcentajes varían en función de la especie y condiciones de cultivo. La producción a elevadas velocidades de crecimiento favorece el aumento del contenido en proteínas y reduce el contenido en lípidos, mientras que a baja velocidad de crecimiento el comportamiento es opuesto.

Hipercolesterolemia.

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) siguen siendo la principal causa de muerte que representan alrededor del 30% de todas las muertes en el mundo (Gaziano, et al., 2010). Aunque las tasas de mortalidad cardiovasculares han

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

disminuido en países altamente desarrollados en las últimas décadas, las muertes y las enfermedades cardiovasculares han aumentado a un ritmo acelerado en los países subdesarrollados y en desarrollo. Entre otros factores, las enfermedades cardiovasculares se correlacionan principalmente con hipercolesterolemia. La hipercolesterolemia, a su vez, está provocada por la obesidad y estilo de vida sedentario. También puede ser debido a un defecto genético y podría ser agravada por el consumo excesivo de alcohol y / o fumar cigarrillos (Bridget y Fuster, 2010).

En México, existe mayor prevalencia de hipercolesterolemia en los estratos medios y altos, en la población del norte del país y a mayor edad. La prevalencia global de hipercolesterolemia en México (43.3%) como se muestra en la Figura 2, sigue siendo mayor en personas de 50 años en delante (Figura 3) y en la Figura 5 nos muestra que de los 4 principales factores que causan riesgo cardiovascular, la hipercolesterolemia es el que representa mayor riesgo (Lara, et al., 2004).

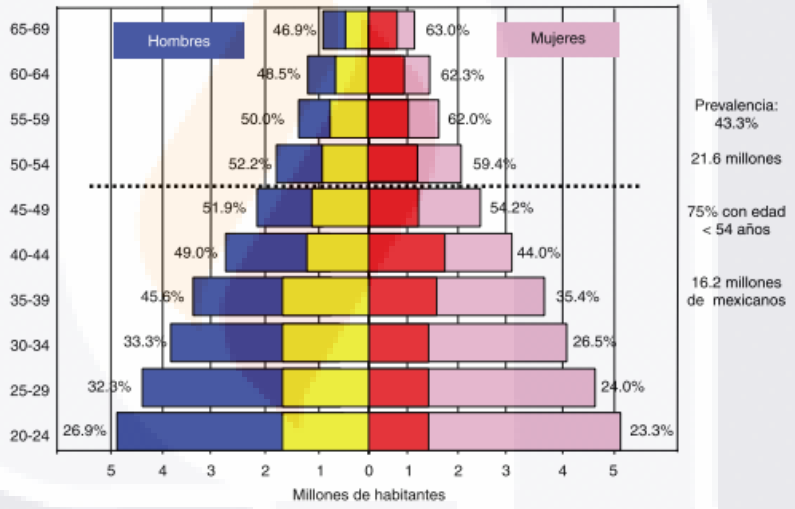


Figura 2. Prevalencia del colesterol ≥200mg/dL por grupos de edad y sexo en población urbana en México (Lara, et al., 2004).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

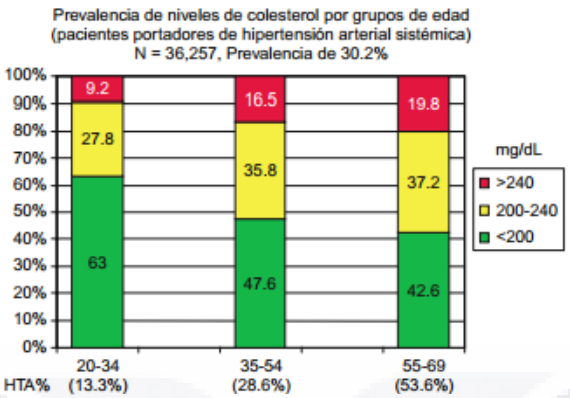


Figura 3. Se muestra la prevalencia de diferentes niveles de hipercolesterolemia de acuerdo a grupos de edad, en la totalidad de la población detectada con hipertensión arterial. En la base de cada columna se muestra el grupo de edad y su correspondiente tasa de hipertensión. Nótese que a medida que avanza la edad, los niveles de colesterol se incrementan de forma significativa (Lara, et al., 2004).

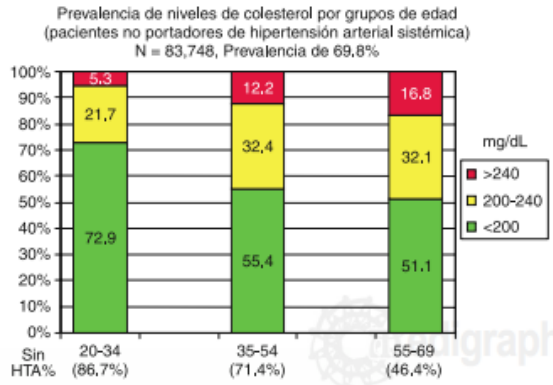


Figura 4. Se muestra la prevalencia de diferentes niveles de hipercolesterolemia de acuerdo a grupos de edad, en la totalidad de la población sin hipertensión arterial. En la base de cada columna se muestra el grupo de edad. Nótese que a medida que avanza la edad, los niveles de colesterol se incrementan aunque en menor proporción, lo cual confirma la importante asociación entre hipertensión e hipercolesterolemia (Lara, et al., 2004).

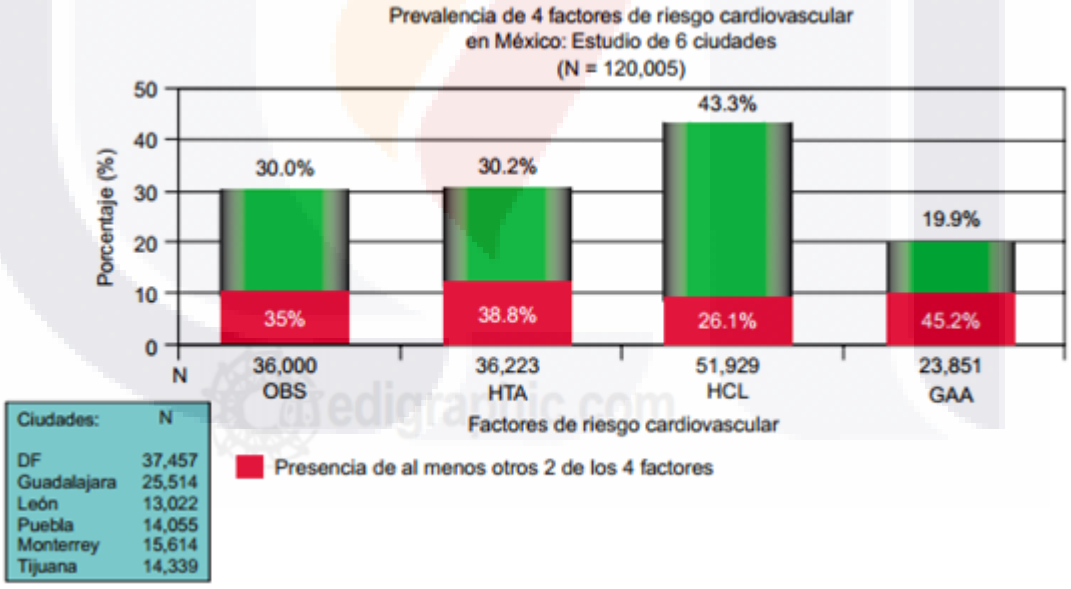


Figura 5. Prevalencia de 4 factores de riesgo cardiovascular. Bajo cada columna OBS (Obesidad), HTA (hipertensión), HCL (hipercolesterolemia), GAA (Glucosa en ayuno). Nótese como la hipercolesterolemia es el factor que presenta mayor riesgo cardiovascular (Lara, et al., 2004).

El colesterol es una sustancia tipo grasa que se produce en el hígado y que también se encuentra naturalmente en los alimentos de origen animal como carnes,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

leches, quesos, yema de huevo, mantequilla, etc. El colesterol circula en la sangre unido a proteínas que dependiendo de su peso se denominan:

HDL: forma el colesterol HDL (High Density Lipoprotein). Molécula de mayor tamaño que se conoce como “colesterol bueno” por su efecto barredor o de acarreo del colesterol depositado en las arterias y que lo transporta hacia el hígado, evitando de este manera su acumulación en los vasos sanguíneos.

LDL: forma el colesterol LDL (Low Density Lipoprotein). Molécula de menor tamaño que a través de la sangre transporta el colesterol a todo el organismo. Se conoce como colesterol malo porque se deposita en las arterias.

VLDL: forma el colesterol VLDL (Very Low Density Lipoprotein). Determina una molécula muy pequeña que transporta triglicéridos y colesterol, sirve para la formación de LDL colesterol (Harrison, 2005).

Las “hipercolesterolemias o dislipidemias” son una serie de enfermedades que se caracterizan por una alteración en los niveles sanguíneos del colesterol total, y/o del colesterol HDL y/o del colesterol LDL, y que algunas veces se acompaña, además, de niveles altos de triglicéridos (hipertrigliceridemia). Existen varios tipos:

a) Hipercolesterolemia aislada con elevación sólo del colesterol LDL
b) Hipertrigliceridemia aislada con elevación sólo de los triglicéridos
c) Hiperlipidemia mixta con elevación del colesterol LDL y de los triglicéridos
d) Colesterol HDL bajo (Velázquez-Monroyo, et al., 2002).

Las hipercolesterolemias pueden ser genéticas, es decir, son personas productoras de colesterol. Un 4% de las hipercolesterolemias son de origen familiar y se caracterizan por niveles especialmente elevados de colesterol y/o triglicéridos (Lara, et al., 2004).

También pueden ser secundarias a dietas inadecuadas, altas en grasas, especialmente saturadas y ácidos grasos trans. Estos últimos están presentes en los denominados aceites/grasas animales y/o vegetales hidrogenados (Harrison, 2005).

Además, las personas con hipotiroidismo no tratado, enfermedades renales y diabetes mellitus pueden presentar hipercolesterolemias. El síndrome de resistencia a insulina, la intolerancia a la glucosa, la diabetes y los problemas renales presentan además, niveles altos de triglicéridos, que determina un alto riego para el desarrollo

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

de ateroesclerosis y de enfermedad cardiovascular. Frecuentemente, con altos niveles de triglicéridos coexiste el antecedente de obesidad y de una dieta desbalanceada, con alto contenido de azúcar y alcohol (Velazquez-Monroyo, et al., 2002).

La hipercolesterolemia es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades al corazón. Al depositarse en las arterias, fenómeno denominado ateroesclerosis, disminuye la elasticidad de las arterias, lo que facilita el desarrollo de hipertensión arterial y disminuye el lumen de las arterias, dificultando de este modo la circulación sanguínea. Esto se constituye a su vez un riesgo para enfermedades cerebrovasculares como hemorragias cerebrales e infarto al corazón. El denominado Síndrome Metabólico o Síndrome X, que se acompaña de hipertrigliceridemia, resistencia a la insulina, diabetes, hipertensión arterial y obesidad, es considerado como la principal causa de ateroesclerosis y por ende de enfermedad cardiovascular. Niveles altos de triglicéridos pueden ser un factor de riesgo para el desarrollo de pancreatitis (Harrison, 2005).

Las principales medidas son el control médico y el consumo de una dieta baja en grasas, especialmente grasas saturadas y colesterol, además alta en verduras y frutas. Se recomienda una baja de peso en caso de sobrepeso y obesidad. Además se debe eliminar el alcohol, el tabaco y se debe aumentar la actividad física. El médico puede indicar medicamentos de acuerdo a la evaluación de cada caso (Lara, et al., 2004). El tratamiento contra la hipercolesterolemia generalmente implica costos debido a la medicación continua y estricta y a las restricciones dietéticas a largo plazo. Durante mucho tiempo se ha trabajado en el desarrollo de alimentos funcionales con mayor valor nutracéutico y propiedades bioactivas que puedan ayudar en la prevención de las enfermedades. (Tandang-Silva, et al., 2011; Maruyama, et al., 2011). Se ha reportado que la lactostatina es un péptido bioactivo con actividad hipocolesterolemiante superior al sitosterol, un medicamento anti-hipercolesterolémico conocido (Morikawa, et al., 2007).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Lactostatina

La lactostatina es un pentapéptido hipocolesterolémico (IIAEK: Ile-Ile-Ala-Glu-Lys) derivado de la beta-lactoglobulina de la leche bovina, que actúa para disminuir en suero lipoproteínas de baja densidad y tiene una mayor actividad hipocolesterolémica que el β-sitosterol, un fármaco conocido para el tratamiento de la hipercolesterolemia (Morikawa, et al., 2007).

Por otra parte, está reportado que la degradación del colesterol mediada por lactostatina implica una nueva vía de regulación en el canal del calcio relacionada con la vía de señalización MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno) (Morikawa, et al., 2007).

Para aclarar el mecanismo de la acción hipocolesterolemiante de lactostatina, se ha examinado el gen diana y la vía de transducción de señal inducida por lactostatina en HepG2, una línea celular de hígado humano. Se encontró que la lactostatina solubilizada en agua puede activar la expresión de genes de la colesterol 7-alfa-hidroxilasa (CYP7A1). También se encontró que la lactostatina regula la fosforilación de la serín treonín cinasa (ERK) y la concentración de Ca^{2+} intracelular. Con ello se demostró la implicación de una nueva vía de regulación en los canales de calcio de la señalización MAPK con la vía de señalización de lactostatina mediada por la degradación de colesterol. Por lo tanto, la lactostatina puede ser considerado como una molécula prometedora para la prevención de la hipercolesterolemia y la aterosclerosis (Morikawa, et al., 2007).

A continuación se describen algunas técnicas que se utilizarán en el proyecto de tesis para la amplificación, detección, caracterización y cuantificación del péptido de interés.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es un método para amplificar rápidamente una pequeña cantidad de ADN usando una polimerasa estable al calor y dos cebadores de oligonucleótidos, uno complementario a la cadena (+) en un extremo de la secuencia a amplificar, y uno

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

complementaria a la hebra (-) en el otro extremo. Mediante una serie (típicamente 30) de ciclos de temperatura, el ADN es repetidamente desnaturalizado, reconocido por los cebadores y una cadena hija se extiende desde los cebadores. A medida que las propias cadenas hijas actúan como plantillas para los ciclos posteriores, los fragmentos de ADN que coinciden con los cebadores se amplifican exponencialmente. Por lo tanto, el ADN original no necesita ser ni puro ni abundante (Flügge, 2001).

ELISA (Ensayo inmunológico ligado a enzimas)

El ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoadsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un substrato especifico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro (Voller, et al., 1978).

ELISA Directo (ensayo ELISA simple de dos capas).

Las placas de ELISA se preparan recubriendo los pocillos con una solución de proteína total soluble de las soluciones en las que se sospecha se encuentra el antígeno (etiqueta de histidinas). Se incuban con anticuerpos marcados anti etiqueta de histidinas (His-tag). Indica la presencia de la etiqueta de histidinas en la solución analizada. Es necesario incluir controles negativos (muestra de *Chlamydomonas reinhartii* sin transformar CC-125 wild type mt+ [137c]). Asimismo se incluyen controles positivos (soluciones donde se encuentra el antígeno buscado, en este caso el (gen sintético lactostatina propagado en *E. coli*)

Consta de las siguientes etapas:

• Fijación al soporte insoluble de antígenos específicos. Se realiza un lavado para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

• Adición de anticuerpos marcados (“conjugados”) con una enzima; si los anticuerpos reaccionan con los antígenos, el complejo quedará solubilizado. Se realiza un lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.

• Adición de un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.

• Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado (Voller, et al., 1978).

ELISA Indirecto.

Las placas ELISA se preparan de la misma forma a la anterior. Los controles positivos y negativos son los mismos. El sistema de detección emplea dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno y uno secundario marcado contra el primario. La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpos secundarios por cada primario.

Consta de las siguientes etapas:

• Fijación al soporte insoluble de antígenos específicos para los anticuerpos objeto de estudio. Lavado para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados.

• Adición del suero problema, de tal forma que sus anticuerpos reaccionarán específicamente con los antígenos fijados al soporte. Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.

• Adición de anti-anticuerpos conjugados con una enzima, los cuales reaccionan con los anticuerpos específicos añadidos en el paso anterior y que se encuentran fijados a los antígenos. Lavado para eliminar los anti-anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.

• Adición de un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.

• Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado (Lequin, 2005).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

JUSTIFICACIÓN.

Estudios previos han demostrado que la lactostatina un pentapéptido hipocolesterolémico derivado de la beta-lactoglobulina de la leche bovina actúa para disminuir en suero lipoproteínas de baja densidad y tiene una mayor actividad hipocolesterolémica que el β-sitosterol, un fármaco conocido para el tratamiento de la hipercolesterolemia, además se ha reportado que la degradación del colesterol mediada por lactostatina implica una nueva vía de regulación en el canal del calcio relacionada con la vía de señalización MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno), así como la capacidad de activar la expresión de genes de la colesterol 7-alfa-hidroxilasa (CYP7A1). En base a esto se dice que la lactostatina es una molécula prometedora para la prevención de la hipercolesterolemia, por lo que mediante el uso de técnicas de ingeniería genética basadas en la expresión de una proteína de fusión, se propone la expresión de este péptido bioactivo en *Chlamydomonas reinhardtii,* ya que ha demostrado ser un organismo muy versátil que puede ser usado tanto en estudios de ciencia básica como en diversas aplicaciones biotecnológicas, y que es una alternativa muy atractiva para la producción de proteínas recombinantes con aplicación médica, debido a su rápido crecimiento, bajos costos de cultivo, su capacidad de acumular biomasa y a que es clasificada como GRAS (por sus siglas en inglés: generalmente considerada como segura); además existe evidencia científica en donde se ha reportado la expresión exitosa de diversas proteínas con relevancia farmacéutica obtenidas mediante transformación nuclear y de cloroplastos, lo que demuestra la capacidad de esta microalga para aplicaciones biotecnológicas.

Se espera que los fragmentos activos del polipéptido (después de la hidrolisis que ocurre naturalmente por las proteasas gastrointestinales) tengan actividad potente para disminuir las lipoproteínas de baja densidad en suero.

Este proyecto proporciona una nueva estrategia para producir péptidos hipocolesterolémicos con potencial para tratar y prevenir la hiperlipidemia como una estrategia tendente a disminuir la incidencia en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares; problema de salud que prevalece no solo en México sino que es un factor de riesgo a nivel mundial.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

HIPÓTESIS.

La creación de un gen sintético que contenga las secuencias IIAEK será funcional para transformar a la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* y además sirva como plataforma para la expresión eficiente y estable en la producción a gran escala de péptidos hipocolesterolémicos.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Generar un péptido multímero hipocolesterolémico con potencial para tratar y prevenir la hiperlipidemia, como una estrategia tendente a disminuir la incidencia para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Diseñar y optimizar un gen sintético que codifique para un péptido multímero hipocolesterolémico basado en la secuencia del gen de la lactostatina.
2. Confirmar la construcción con el gen de interés mediante perfil de restricción y secuenciación.
3. Expresar el péptido multímero en cloroplastos de *C. reinhardtii* mediante biobalística.
4. Analizar las posibles transformantes mediante PCR (Reacción en Cadena de la polimerasa).
5. Caracterizar y cuantificar la proteína recombinante.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

MATERIAL Y MÉTODOS.

Tabla 4. Reactivos utilizados

Reactivo	Laboratorio
Agarosa grado biología molecular	Invitrogen
Peptona para medio de cultivo	Becton-Dickinson (EUA)
Extracto de levadura	Bioxon
Cloruro de sodio	J.T. Baker (EUA),
Agar-agar grado bacteriológico	Bioxon
Cloruro de Calcio	Karal
Glicerol	IBI
Tris Base	karal
Enzima de restricción *NcoI*	New England Biolabs (EUA)
Marcador de peso molecular 1kb	Promega (EUA)
Kit de PCR	Fermentas (Canadá)
T4 ADN ligasa	New England Biolabs (EUA)
Fosfatasa alcalina	New England Biolabs (EUA)
Kit purificación de ADN (minipreps)	Promega (EUA)
Kit extracción de ADN de gel	QIAGEN
Gen sintético lactostatina	GenScript
Oligonucléotidos	Integrated DNA Technologies
Cloruro de amonio (NH_4Cl)	karal
Sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	Phytotecnology laboratorios
Difosfato ácido de potasio (K_2HPO_4)	Sigma-Aldrich
Fosfato de potasio (KH_2PO_4)	Sigma-Aldrich
EDTA	Phytotecnology laboratorios
Sulfato de Zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	Phytotecnology laboratorios
Ácido Bórico (H_3BO_3)	Karal
Cloruro de Manganeso ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	Karal
Cloruro de Cobalto ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	Karal
Molibdato de amonio ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	Karal
Sulfato ferroso ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	Phytotecnology laboratorios
Sulfato cuproso ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	Sigma-Aldrich
Ácido acético glacial	Sigma-Aldrich
Ácido clorhídrico	Sigma-Aldrich
SDS	Bioxon
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sodio	Bioxon
Etanol	Bioxon

Medios de cultivos para bacterias.

Medio Luria-Bertani (LB): Peptona 10 g/L; Extracto de levadura 5 g/L; NaCl 10g/L. Para lograr medios sólidos de cultivo se adicionó 15 g/L de agar-agar grado bacteriológico. El medio se esterilizó en autoclave por 20 min a 121°C y 15 psi.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Medio de cultivo para *Chlamydomonas reinhardtii*.

Medio Tris-Fosfato-Acetato (TAP): **Sales TAP:** NH_4Cl 15 g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 4 g/L; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 2g/L. **Solución de fosfato:** K_2HPO_4 28.8 g/100mL; KH_2PO_4 14.4 g/100mL. **Solución de metales**: Sal disódica de EDTA 63.69g/250mL, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 22g/100mL; H_3BO_3 11.4 g/200mL; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 5.06 g/50mL; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 1.61 g/50mL; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1.57g/50mL; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$/50mL, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 4.99g/50mL, hasta un volumen final de 1L.

Para hacer el medio final se mezcló lo siguiente: 2.42 g de Tris base, 25 ml de sales TAP, 0.375 mL de solución de fosfatos, 1.0 ml de solución de metales. Se ajustó el pH a 7 con ácido acético glacial e hidróxido de potasio, se aforó con agua a 1 litro. Para lograr medios sólidos, se adicionó 20 g/L de agar-agar grado bacteriológico. El medio se esterilizó en autoclave por 20 min a 121°C y 15 psi.

Soluciones de antibióticos empleadas.

Para selección de bacterias se preparó una solución stock 1000X=100 mg/mL de ampicilina (Amp) en H_2O.

Para selección de *Chlamydomonas reinhardtii* se preparó una solución stock 1000X=100mg/mL de espectinomicina en H_2O.

Cepas bacterianas.

La cepa bacteriana se creció en medio LB en placas de Petri con 20 mL de medio sólido.

Se utilizaron bacterias químicamente competentes de *Escherichia coli* DH5α para propagar el gen de la Lactostatina y los vectores p463 y p464.

Mantenimiento de los microorganismos.

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se mantuvieron viables resembrandolas en medio LB sólido cada 4 semanas y guardándose a 4º C. Por

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

otra parte, las células competentes se mantuvieron a través de congelación a – 70 °C resuspendidas en DMSO al 7%.

Gen sintético y Plásmidos.

Gen sintético optimizado: el gen quimérico fue sintetizado por la compañía GenScript con la siguiente secuencia optimizada para su expresión en cloroplastos de *Chlamydomonas reinhardtii*, consta de 207pb y tiene un contenido de GC de 28.25%:

CCATGGTACATCATCATCATCATATTATTGCTGAAAAACGTATTATTGCTG
AAAAACGTATTATTGCTGAAAAACGTATTATTGCTGAAAAACGTATTATTGCTG
AAAAACGTATTATTGCTGAAAAACGTATTATTGCTGAAAAACGTATTATTGCA
GAAAAACGTATTATTGCTGAAAAACGTTAAAGGAGGACAGCCATGG

Vectores de expresión p463 y p464: Estos vectores (Figura 6) fueron seleccionados debido a que en trabajos anteriores han mostrado buenos resultados en la expresión de proteínas recombinantes en cloroplastos de *Chlamydomonas reinhardtii* (Campos-Quevedo, et al. 2012).

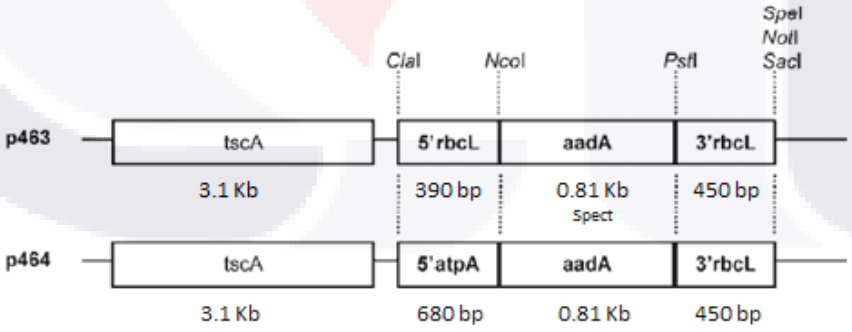


Figura 6. Vector p463 y p464. tscA: Región del genoma del cloroplasto utilizado para recombinación homóloga entre el plásmido de inserción y el genoma de *Chlamydomonas*. 5´rbcL: promotor de la ribulosa bifosfato carboxilasa cloroplastídica (RuBisCO). 5´atpA; promotor subunidad alfa de la ATP sintasa. aadA: aminoglucósido adenintransferasa que proporciona resistencia a espectinomicina /estreptomicina. 3´rbcL: terminador de la ribulosa bifosfato carboxilasa cloroplastídica (RuBisCO).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Vectores de clonación: el gen sintético lactostatina fue clonado en el vector pUC57 (Figura 8) el cual cuenta con 2710pb, además incluye el gen de resistencia a ampicilina que se utiliza como selección de bacterias transformantes. Los cassettes de expresión que se muestran en la Figura 6, fueron insertadas en una región del vector pBluescript sk(-) de 3000pb (Figura 7). De tal manera que a cada vector se le asignó un nuevo nombre correspondiente al inserto clonado: p463 y p464 (estos vectores fueron donados por el Laboratorio de Biofarmacéuticos Recombinantes de la UASLP, Facultad de Ciencias Químicas.)

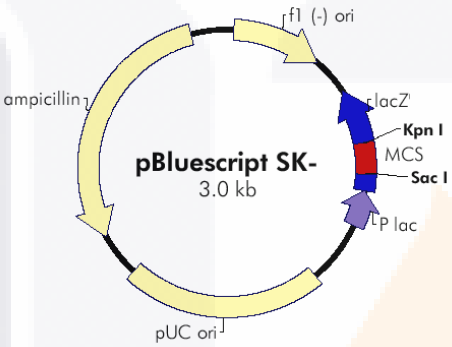


Figura 7. Vector de clonación pBluescript SK- (3000pb) para los vectores p463 y p464.

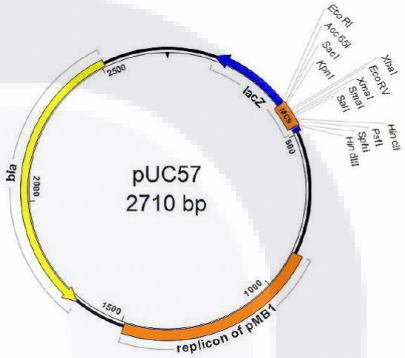


Figura 8. Vector de clonación pUC57 (2710pb) para el gen sintético lactostatina

Oligonucleótidos.

Para amplificar la secuencia del gen sintético lactostatina se diseñaron los cebadores 5´ Lactostatina (CCATGGTACATCATCATCAT) y 3´ Lactostatina (CCATGGCTGTCCTCCTTTA). El diseño se realizó con la ayuda del programa primer3 (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/). Una vez diseñados los oligonucleótidos fueron sintetizados por la compañía Integrated DNA Technologies (PAIS).

Para analizar el sentido de la ligación se utilizaron los cebadores 5´ lactostatina y el 3´del gen *aadA*.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Procedimiento experimental.

Transformación de bacterias y selección de transformantes.

Las células competentes se prepararon cultivando la bacteria *E. coli* (DH5α) en medio LB sólido a 37°C durante 16-20h. Se tomó una colonia aislada y se sembró en 3mL de LB, se incubó con agitación a 37°C durante 16-20h. Se inoculó 1mL de las células del día anterior en 10mL de LB a 37°C por 3h, se sembró 1mL de cultivo en 10mL de LB y se incubó con agitación a 37° durante 3h aproximadamente, se repartió el cultivo en 10 microtubos de 1.5mL y se enfrió en hielo durante 10min, se centrifugó a 1200rpm durante 15s, se eliminó el sobrenadante en solución con cloro y se resuspendió la pastilla muy suavemente con 1mL de $CaCl_2$ (0.1M) estéril y frío, se incubó en hielo por 10 min, se centrifugó a 1200rpm durante 15s. Se eliminó el sobrenadante y se secó la pastilla, después se resuspendió la pastilla muy suavemente con 30µL de $CaCl_2$ (0.1M con DMSO al 7%) y se almacenó a -20°C. La transformación se llevó a cabo por el método de "choque térmico" (Sambrook, et al., 1989).

Selección de clonas positivas.

Se siguió el crecimiento de cada placa hasta las 18h de incubación, momento en el cuál, se seleccionaron todas las colonias que estuvieran aisladas. Cada colonia fue recuperada utilizando un palillo estéril, con estría se inoculó en medio sólido con ampicilina (50mg/L) y posteriormente el palillo se depositó en un tubo falcon que contenía 3mL de medio líquido LB con ampicilina (50mg/L) y se incubó a 37°C con agitación constante a 200rpm durante toda la noche.

Las colonias transformantes fueron analizadas mediante digestión enzimática del ADN plasmídico y mediante la amplificación del inserto por PCR.

Minipreparación de ADN plasmídico.

La purificación de ADN plasmídico se realizó mediante el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979), con modificaciones que se describen a continuación: Una alícuota de 1.5mL de cultivo bacteriano crecido en agitación, se centrifugó a 12000rpm durante 2 min (este procedimiento se puede repetir hasta dos veces). El precipitado obtenido se resuspendió en 100µL Birboim I (25 mM Tris-HCl

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

pH 8; 50 mM glucosa; 10 mM EDTA) se incubó en hielo por 5 min. Seguido, se agregó 200µL de Birboim II (0.2 N NaOH; 1% v/v SDS) y se incubó durante 5 minutos. Luego se neutralizó con 150µL de Birboim III (60mL 5M acetato de potasio, 11.55mL de ácido acético glacial y 28.5mL de H_2O) y se incubó en hielo durante 5 minutos. Se realizó una centrifugación a 12000rpm por 5 minutos. Posteriormente se realizan dos extracciones, una con 200µL de fenol-cloroformo y otra con 200µL de cloroformo-alcohol isoamílico para eliminar proteínas y se precipitó el ADN plasmídico presente en la fase acuosa por el agregado de 1 volumen de isopropanol. Se centrifugó por 5 minutos a 12000rpm. El precipitado obtenido se lavó con 200µL de etanol al 70% y por último se resuspendió en 20µL de agua destilada estéril. Para el caso de muestras que se mandarían a secuenciar la extracción se realizó con Kit Wizard® Plus SV Minipreps Sistema de purificación de ADN (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Digestión con enzimas de restricción.

Para la digestión con enzima de restricción, en este caso *Nco*I, se utilizaron 5µL de ADN purificado, para el caso de los vectores p463 y p464 se utilizaron 2µL de ADN, 0.5µL de enzima, 2µL de buffer de restricción D 10X, 0.2µL de BSA, 0.5µL RNAsa y agua en un volumen final de 20µL. La reacción se incubó toda la noche a 37°C. La liberación del fragmento de lactostatina (207pb) se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio al 0.05%.

Purificación de ADN a partir de geles de agarosa.

El procedimiento que se utilizó es el que se detalla en el protocolo del kit QIAquick gel Extraction (QIAGEN). El fragmento de gel, que contenía el ADN, se recuperó disolviendo el fragmento de agarosa con 3 volúmenes de Buffer QG, posteriormente se calentó a 50°C por 10 min. A la agarosa disuelta se le agregó 1 volumen de isopropanol, se mezcló y se colocó en la columna de absorción, colocada en el tubo colector y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. La solución que contenía el ADN se centrifugó 1 min a 2000rpm. El ADN se retuvo en la columna. La solución que pasó al tubo colector se descartó. Posteriormente se le agregó 0.5mL de buffer QG y se centrifugó 1 min. La columna se lavó con 0.75mL

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

de Buffer PE y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. En seguida se centrifugó primero a 2000rpm por 30s, y se descartó nuevamente el líquido del tubo colector y, se volvió a centrifugar a 12000rpm por 1 min. Se colocó la columna con un tubo de 1.5mL y se le agregó a la misma 20µL de Buffer EB o agua destilada estéril. Se incubó por 5 min y por último se centrifugó a 12000rpm por 1 min. La fracción eluída contenía el ADN de interés.

Ligación de fragmentos de ADN.

Previo a la reacción de ligación los vectores fueron tratados con fosfatasa alcalina para evitar su religación siguiendo las indicaciones sugeridas por el fabricante; la reacción de ligación se realizó con la enzima T4 ADN Ligasa (Invitrogen). El volumen de trabajo fue de 10µL y se siguió con las condiciones de reacción sugeridas por el fabricante. El tubo de reacción se incubó a 4°C por 16 a 18h.

Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR.

Para la reacción en cadena de la polimerasa (Saiki, 1990) se utilizó el kit de fermentas utilizando una PCR Master Mix 2X y Agua libre de nucleasa.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador Pelther Thermal Cycler. El ADN molde (0.5µL) se mezcló con los correspondientes oligonucleótidos (1µL de 3´ lactostatina y 1µL de 5´lactostatina) (10µM) para el caso de la amplificación del gen lactostatina de 207 pb. Para verificar el sentido de la ligación de los vector p463 y p464 con el gen de la lactostatina, se utilizó el oligonucleótido 3´ lactostatina y el oligonucleótido 5´ para el gen *aadA* (810pb), esperando un fragmento de 1000pb aproximadamente. La Master Mix contiene los cuatro desoxinucleótidos (dNTP), Taq polimerasa y el $MgCl_2$.Tras una desnaturalización previa a 94°C durante 5 min, cada uno de los 30 ciclos de la reacción de PCR consistió en: 40s para la desnaturalización a 94°C, 40s para la hibridación de los oligonucleótidos con el ADN a 52°C y 1 min para la elongación de las cadenas a 72°C.

Concluidos todos los ciclos, las muestras se sometieron a 72°C durante 10 min para completar la síntesis de las cadenas y 30 min a 10° para finalizar.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Para la separación de fragmentos de ADN se utilizaron geles horizontales de agarosa a una concentración variable según el amplicón esperado (0.8%-2%). Estos fueron preparados en tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y se añadió bromuro de etidio al 0.05% antes de su polimerización. La muestra se mezcló con 6X Mass Ruler Loading Dye Solution de fermentas, y como marcador de peso molecular 1 Kb ADN Ladder, como buffer se utilizó un tampón compuesto por TAE 1X y después de cargar el gel se le aplicó una corriente de 75 V.

Los fragmentos de ADN se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

Preparación de suspensión de partículas de oro.

Se pesaron 50mg de partículas de oro de 1μm de diámetro en un eppendorf, se le agregó 1mL de etanol (grado biología molecular) al 100% y se agitó vigorosamente por 3 min, se sedimentaron las partículas centrifugando 5 min a 14000rpm y se descartó el sobrenadante, se le agregó 1mL de etanol al 70% y se agitó vigorosamente por 2 min, se incubó el tubo 15 min a temperatura ambiente y cada 5 min se agitaron, al finalizar el tiempo, se centrifugó a 14000rpm durante 3 min y se descartó el sobrenadante, después se le agregó 1mL de agua destilada y se agitó vigorosamente por 1 min, se dejaron asentar las partículas a temperatura ambiente y luego se centrifugó 2 min a 14000rpm y se descartó el sobrenadante, el lavado se repitió por dos veces, se agregó glicerol al 50% (v/v) para dejar las partículas a una concentración de 60mg/mL. Las partículas preparadas se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Preparación del material para bombardeo.

Las mallas de retención, los discos de ruptura, discos de acarreo y los anillos se sumergieron en isopropanol al 100% durante 10 min, después se dejaron secar, todo esto se realizó en campana de flujo laminar.

Para el recubrimiento de las partículas de oro con el ADN de interés, se tomaron 50μL de partículas de oro y se les agregó 10μL de ADN plasmídico a una concentración de 1μg/μL y se agitó vigorosamente por 5 min, se le adicionaron también 50 μL de $CaCl_2$ 2M estéril y 20 μL de espermidina en agitación continua. Posteriormente se agitó nuevamente la mezcla por 20 min a 4°C, seguidamente se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

le agregaron 200µL de etanol absoluto a temperatura ambiente, se agitó por 5s y se centrifugó por 30s a 800g. Se removió el sobrenadante y se repitió este paso por 4 veces para finalmente resuspender el pellet en 30µL de etanol al 100%, las partículas se colocaron el hielo hasta su uso.

Bombardeo con partículas de oro.

Para la transformación de cloroplastos de *Chlamydomonas reinhardtii* se utilizó la cepa WT 137 c (mt+), se tomó una colonia y se dejó crecer en 20mL de medio TAP (Tris- Acetato-Fosfato) líquido durante 3 días, después, este cultivo se resembró a un matraz que contenía 200mL de medio TAP hasta llegar a su fase logarítmica bajo luz blanca durante un fotoperiodo de 16h luz, 8h oscuridad en agitación constante a 120rpm. Las células se cosecharon mediante centrifugación a 4000rpm durante 5 min y se resuspendieron en medio TAP. Aproximadamente 2.4 $x10^6$células/100µL fueron esparcidas en cajas Petri en medio TAP. La transformación de cloroplastos se llevó a cabo por el método de biobalística (Daniel, et al. 2001) utilizando partículas de oro recubiertas con las diferentes construcciones (p463-Lacto y p464-Lacto). El equipo de balística utilizado fue el sistema PDS-1000/He (Bio- Rad, Hercules, CA, USA), los parámetros del bombardeo fueron: distancia 9cm, vacío de 15 pulgadas de Hg, Helio presurizado a 1100psi y partículas de oro de 1µm de diámetro recubiertas con ADN plasmídico a una concentración de 1µg/µL. Las líneas transgénicas fueron seleccionadas por resiembras sucesivas cada dos semanas en medio TAP adicionado con espectinomicina (150mg/L).

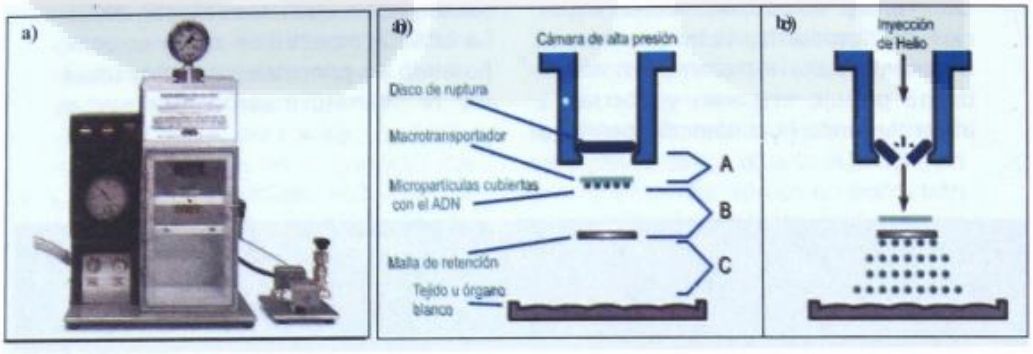


Figura 9. Transformación de *Chlamydomonas* por biobalística a) dispositivo PDS-1000/He (BioRad), empleado en biobalística. b) Esquema previo al disparo c) El helio inyectado en la cámara de alta presión provoca que el disco de ruptura se fracture. El gas rápidamente descomprimido impulsa el macrotransportador contra la malla de retención liberando las micropartículas con el ADN, que viajan

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

hasta penetrar el tejido blanco. Las distancia A, B y C pueden ser modificadas y determinan la velocidad final que alcanzarán las micropartículas y por lo tanto la capacidad de penetración en el tejido bombardeado.

Análisis por PCR de las clonas transformadas.

Después de 5 rondas de selección en medio TAP con espectinomicina, se tomaron diferentes colonias obtenidas con cada una de las construcciones y se crecieron en medio líquido. Se extrajo ADN de acuerdo al protocolo descrito por Goldschmidt-Clemont (1991). Se realizó un análisis por PCR para evaluar la presencia del gen sintético lactostatina utilizando los oligonucleóticos específicos.

Al mismo tiempo se realizó un análisis por PCR para el gen de resistencia al antibiótico utilizando los oligonucleótidos *aadA*-sentido y *aadA*-antisentido. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Para asegurar la homoplastia de las transformantes se realizó una PCR utilizando el oligonucleótido sentido del gen *tscA* y el oligonucleótido antisentido del gen *ch1N* estos genes son propios del genoma de *C. reinhardtii*. Además se comprobó la inserción del casete de interés por el tamaño de las bandas obtenidas.

Extracción de proteínas y análisis por ensayo de ELISA

Para el análisis por ELISA se obtuvo el extracto de proteína total soluble (PTS) de *C. reinhardtii* de un cultivo líquido de la misma, se concentró 3 veces centrifugando por 3 min a 4000rpm, se desechó el sobrenadante y a la pastilla que se obtuvo se le añadió 200µL de buffer de extracción, se sonicó a una potencia al 24%, 4 veces por 4s, entre cada sonicación se dejó reposar 4s; posteriormente se procedió a centrifugar a 8000rpm durante 15 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -70°C. Las PTS de las cepas transformadas así como de una no transformada (WT) se cuantificaron por el método de Bradford (Bradford, 1976). Para la cuantificación por ELISA se colocó un volumen de 50µL en cada pozo ajustando a una concentración de 50ng de PTS en cada uno y se le añadió el volumen necesario de buffer de carbonatos para completar el volumen señalado, la placa se tapó con aluminio y se incubó toda la noche a 4°C, se lavó 3 veces con PBS-T, se puso a bloquear 1 hora a temperatura ambiente con leche al

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

6% disuelta en PBS, se lavó 3 veces con PBS-T, se le añadió el anticuerpo primario dirigido contra la etiqueta de Histidinas) a una dilución 1:3000 y se incubó 1 hora a 37°C, se lavó 3 veces con PBS-T y se añadió el anticuerpo secundario (anti ratón peroxidasa de rábano picante) a una dilución 1:2000 y se incubó 1 hora a temperatura ambiente, se lavó 3 veces con PBS-T y se preparó el sustrato ABTs (ácido 2,2'–azino–bis–(3–etillbenzotiazolin–6–sulfónico), para ello se descongeló el stock de ABTs, se tomó el volumen necesario y se le añadió peróxido de hidrógeno al 3%. Una vez preparado, se adicionó en un volumen de 50µL a cada pozo y se registró la absorbancia cada 5 minutos a una longitud de onda de 405nm. Para la cuantificación por el ensayo de ELISA se utilizaron 50ng de proteína en cada pozo tanto de la cepa sin transformar (WT) como de las transformantes, se cuantificaron utilizando una curva de una proteína que contenía una repetición del péptido de interés. Para los análisis estadísticos se utilizó el programa Minitab Versión 6.0

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

RESULTADOS.

Diseño del gen optimizado de lactostatina.

El gen sintético basado en el pentapéptido hipocolesterolémico lactostatina fue sintetizado por la compañía GenScript con la siguiente secuencia optimizada.

Secuencia de la proteína:

IIAEKRIIAEKRIIAEKRIIAEKRIIAEKRIIAEKRIIAEKRIIAEKRIIAEKR

IIAEK (9 repeticiones) corresponden al pentapéptido (Ile-Ile-Ala-Glu-Lys) lactostatina separadas por un conector de arginina (R) que corresponde al sitio de corte de la tripsina.

Secuencia optimizada:

CCATGGTACATCATCATCATCATCATATTATTGCTGAAAAACGTATTATTGCTGA
AAAACGTATTATTGCTGAAAAACGTATTATTGCTGAAAAACGTATTATTGCTGAA
AAACGTATTATTGCTGAAAAACGTATTATTGCTGAAAAACGTATTATTGCAGAAA
AACGTATTATTGCTGAAAAACGTTAAAGGAGGACAGCCATGG

Que incluye:

CCATGG:	Sitio de restricción *Nco I*	**CGT :**	Arginina (Arg) Sitio de corte para la tripsina
CATCATCATCATCATCAT:	Etiqueta de Histidinas	**TAA :**	Codón de Paro
ATT:	Isoleucina (Ile)	**AGGAGG:**	Sitio de unión al ribosoma
GCT:	Alanina (Ala)		
GAA:	Glutamato (Glu)		
AAA:	Lisina (Lys)		

Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa del vector pUC57-lactostatina que se mandó sintetizar y de los vectores p463 y p464 (proporcionados por el Laboratorio de Biofarmacéuticos Recombinantes de la Facultad de Ciencias Químicas, UASLP) para visualizar los fragmentos. Como los plásmidos son circulares, las distintas bandas que se observan en la Figura 10 se deben a las isoformas que puede adoptar un plásmido cuando migra durante la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

electroforesis éstas son las siguientes: relajado, lineal y superenrollado, siendo este último el que migra más.

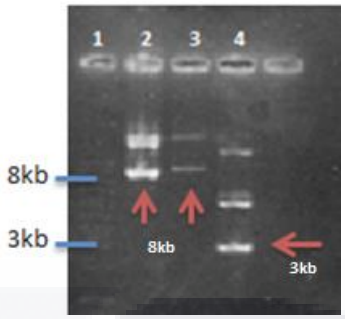


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del pUC57-lactostatina y los vectores p463 y p464. Carriles: 1) marcador de peso molecular 1kb, 2) vector p463 (~8kb), 3) vector p464 (~8kb) y 4) pUC-lactostatina (~3kb)

Para tener suficiente cantidad de plásmido se realizó una propagación de los vectores p463 y p464 así como también del vector que porta el gen sintético de la lactostatina (pUC57- lactostatina) utilizando para ello la transformación por choque térmico en células calcio-competentes DH5A ALFA O CUAL??? y la posterior obtención del ADN plasmídico mediante minipreps. En la Figura 11 se observa la electroforesis correspondiente al ADN plasmídico de los vectores p463 (~8kb), p464 (8Kb) que contienen parte del vector pBluescript SK- y el pUC57-lactostatina (3.0kb).

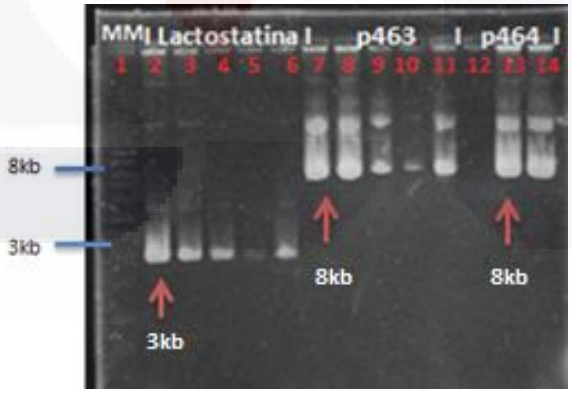


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del ADN plasmídico obtenido de la propagación de los vectores pUC-lactostatina y p463 y p464. Carriles: 1) marcador de peso molecular 1kb, 2-6) vector pUC-lactostatina, 7-11) vector p463, 12-14) vector p464.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Identificación del gen sintético mediante PCR

Para demostrar la presencia del gen sintético lactostatina dentro del vector pUC-57 se procedió a una amplificación mediante PCR, analizando diferentes temperaturas de alineamiento 50°C, 52°C, 55°C y 57°C, y diferentes concentraciones de ADN y oligonucleótidos. La temperatura óptima de alineamiento fue de 55°C, una concentración de ADN de 0.5ng y oligonucleótidos 0.1 ng. En la Figura 12, se observa la amplificación del gen sintético de lactostatina con un peso molecular de 207pb con las condiciones antes mencionadas.

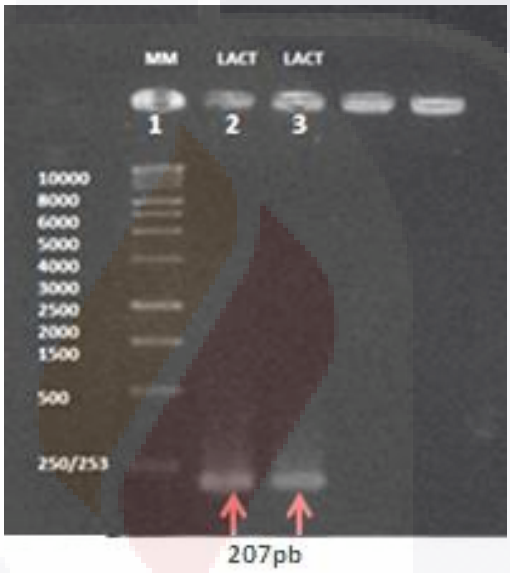


Figura 12. Gel de agarosa al 0.8% correspondiente a la electroforesis de los productos de la PCR con oligonucleótidos específicos para el gen sintético de la lactostatina, carriles: 1) marcador de peso molecular, 2-3) gen sintético lactostatina.

Ligación del gen sintético lactostatina en los vectores p463 y p464.

Los vectores se linealizaron con la enzima de restricción *NcoI* (Figura 13), para p463 (carriles 8 a11) y para p464 (carriles 2 a 3) obteniendo un solo fragmento de alrededor de 8kb.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

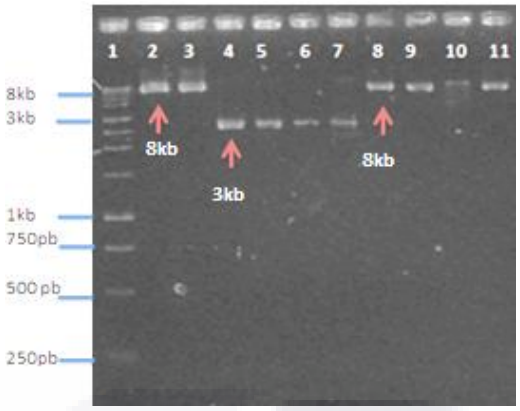


Figura 13. Gel de agarosa al 0.8% correspondiente a la electroforesis de la digestión de los vectores con la enzima *Nco*I. Carriles: 1) Marcador de peso molecular 1kb, 2-3) vector p464 (~8kb), 4-7) pUC57-lactostatina (~3kb), 8-11) vector p463.

En el caso del vector pUC57-lactostatina, se observa solamente el vector con un peso de alrededor de 3000pb (Figura 13 carriles 4-7) y no el fragmento deseado (207pb), por lo que se utilizó una concentración mayor de ADN (6µg) y de enzima (10-20U), obteniéndose la liberación del fragmento deseado de 207pb como se observa en la Figura 14.

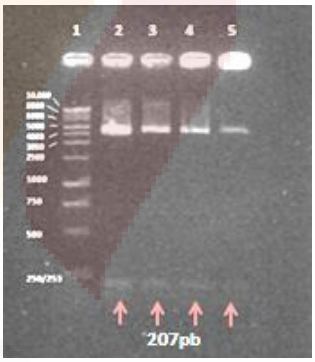


Figura 14. Gel de agarosa al 1.8% correspondiente a la electroforesis de la digestión del vector pUC-lactostatina con *NcoI.* Carriles: 1) marcador de peso molecular 1kb, 2-3) digestión del vector pUC-lactostatina utilizando 20U de enzima 4-5) digestión de lactostatina utilizando 10U de enzima.

Posterior a esto se realizó la purificación de los fragmentos del gen sintético lactostatina a partir de gel de agarosa y con los productos obtenidos se realizó la ligación, tal como se describe en la metodología. Para comprobar el sentido correcto de la ligación del gen de lactostatina en los vectores p463 y p464, se realizó una PCR utilizando el oligonucleótido sentido que alinea en el extremo 5´ del gen lactostatina y como antisentido el oligonucleótido que amplifica dentro del gen de selección *aadA.* Como se observa en la Figura 15 el fragmento obtenido es de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

alrededor de 1000pb, en el carril 4 y 5 se incluyeron controles negativos, es decir, los vectores p463 y p464, donde podemos observar ausencia de amplificación tal como se esperaba.

Figura 15. Gel de agarosa al 0.8% correspondiente a la electroforesis de los productos de PCR de la ligación del gen sintético lactostatina en los vectores p463 y p464 respectivamente. Carriles: 1) marcador de peso molecular 1kb. 2): ligación p464-lactostatina. 3) ligación p463-lactostatina. 4) control negativo (vector p463). 5) control negativo (vector p464).

Confirmación de la construcción del cassette de clonación.

Se confirmó la construcción con el gen de interés mediante perfil de restricción usando la enzima *Nco*I (Figura 16) y secuenciación para confirmar el sentido de la ligación p464-Lacto (Figura 17) y p463-Lacto (Figura 18) utilizando el oligonucleótido sentido de la lactostatina (5´-CCATGGTACATCATCATCAT-3´). Las muestras fueron secuenciadas con el método de didesoxinucleótidos marcados utilizando el secuenciador 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT). Los resultados fueron analizados utilizando expasy translate (http://web.expasy.org/translate) para cambiar de nucleótidos a aminoácidos; posteriormente las secuncias de aminoácidos fueron alineadas utilizando el programa ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/), y se realizó un Blastx en la base de datos de la NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para determinar a qué proteínas correspondían esas secuencias y así verificar el sentido correcto de la construcción (Figura 17 y 18).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

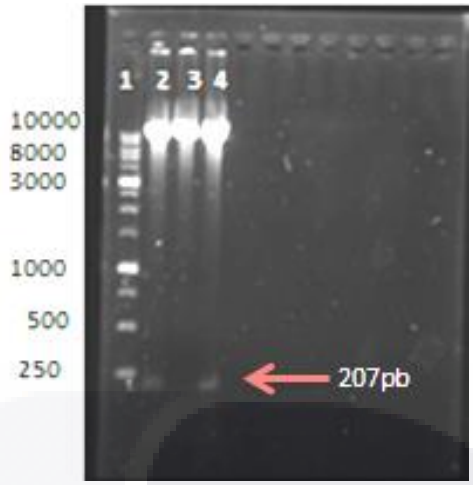


Figura 16. Gel de agarosa al 1% correspondiente a la electroforesis de la digestión con *Nco*I de las construcciones. Carriles: 1) marcador de peso molecular 1kb., 2) Digestión p464-lactostatina 3) Digestión p464 (control negativo) 4) Digestión p463-lactostatina.

```
cttggcttgaaaacgtattattgctgaaaaacgtattattgctgaaaaacgtattattgc
L  G  L  K  T  Y  Y  C  -  K  T  Y  Y  C  -  K  T  Y  Y  C
tgaaaaacgtagagtgctgaaaaacgtattattgctgaaaaacgtattattgctgaaaaa
-  K  T  -  S  A  E  K  R  I  I  A  E  K  R  I  I  A  E  K
cgtattattgcagaaaaacgtattattgctgaaaaacgttaaaggaggacagccatggct
R  I  I  A  E  K  R  I  I  A  E  K  R  -  R  R  T  A  M  A
cgtgaagcggttatcgccgaagtatcaactcaactatcagaggtagttggcgtcatcgag
R  E  A  V  I  A  E  V  S  T  Q  L  S  E  V  V  G  V  I  E
cgccatctcgaaccgacgttgctggccgtacatttgtacggctccgcagtggatggcggc
R  H  L  E  P  T  L  L  A  V  H  L  Y  G  S  A  V  D  G  G
ctgaagccacacagtgatattgatttgctggttacggtgaccgtaaggcttgatgaaaca
L  K  P  H  S  D  I  D  L  L  V  T  V  T  V  R  L  D  E  T
acgcggcgagctttgatcaacgacctttttggaaacttcggcttcccctggagagagcgag
T  R  R  A  L  I  N  D  L  L  E  T  S  A  S  P  G  E  S  E
attctccgcgctgtagaagtcaccattgttgtgcacgacgacatcattccgtggcgttat
I  L  R  A  V  E  V  T  I  V  V  H  D  D  I  I  P  W  R  Y
ccagctaagcgcgaactgcaatttggagaatggcagcgcaatgacattcttgcaggtatc
P  A  K  R  E  L  Q  F  G  E  W  Q  R  N  D  I  L  A  G  I
ttcgagccagccacgatcgacattgatctggctatcttgctgacaaaagcaagagaacat
F  E  P  A  T  I  D  I  D  L  A  I  L  L  T  K  A  R  E  H
agcgttgccttggtaggtccagcggcggaggaactctttgatccggttcctgaacaggat
S  V  A  L  V  G  P  A  A  E  E  L  F  D  P  V  P  E  Q  D
ctatttgaggcgctaaatgaaaccttaacgctatggaactcgccgcccgactgggctggc
L  F  E  A  L  N  E  T  L  T  L  W  N  S  P  P  D  W  A  G
gatgagcgaaatgtagtgcttacgttgtccccgcattttggtacagcgcagtaaccgggc
D  E  R  N  V  V  L  T  L  S  P  H  F  G  T  A  Q  -  P  G
aaaatcgcgcccgaaggatgtcgcttgccgactgggcaaatggagcgccctgcccggccc
K  I  A  P  E  G  C  R  L  P  T  G  Q  M  E  R  P  A  R  P
caatatccacccccgtcataactttgaaagcctagacagggcttattctttgggaccaaga
Q  Y  P  P  R  H  N  F  E  S  L  D  R  A  Y  S  L  G  P  R
aaaaagaatcgctttgggccctccccgccccaaatccagtttggaaaagaaattttgtcc
K  K  N  R  F  G  P  S  P  P  Q  I  Q  F  G  K  E  I  L  S
ccctaacgtgaaaaaggcgaagaatcccctaacggtagtttggcaaaattaactggccag
P  -  R  E  K  G  E  E  S  P  N  G  S  L  A  K  L  T  G  Q
```


TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

```
gccaatgccaagccttggtacttcaagcttggtaaacgaaaaggttcgtggaacccttttt
A  N  A  K  P  W  Y  F  K  L  G  K  R  K  G  S  W  N  P  F
gcttcggtggaaaggttgggcccacacgtaattctcgtttcaagcctttgggttaaaaat
A  S  V  E  R  L  G  P  H  V  I  L  V  S  S  L  W  V  K  N
gtgggtccttctccaagaaaaacctttttggccgtgcctcgtcgcacactagttggtttgt
V  G  P  S  P  R  K  T  F  W  P  C  L  V  A  H  -  L  V  C
gaaaagaggtcatg
E  K  R  S
```

Figura 17. Se observa el resultado de la secuenciación de la construcción utilizando el oligonucleótido sentido de la lactostatina, donde se observa al inicio (color azul) parte de la secuencia correspondiente al gen sintético de la lactostatina, seguido de la secuencia que corresponde al gen *aadA* lo que indica la correcta ligación del gen sintético lactostatina en el vector p464, con amarillo se indica la secuencia que corresponde a la enzima *Nco*I.

```
agggctgaaaaacgtaattattgctgaaaaacgtattattgctgaaaaacgtattattgct
  G  L  K  N  V  I  I  A  E  K  R  I  I  A  E  K  R  I  I  A
gaaaaacgtattattgctgaaaaacgtattattgctgaaaaacgtattattgctgaaaaa
 E  K  R  I  I  A  E  K  R  I  I  A  E  K  R  I  I  A  E  K
cgtattattgcagaaaaacgtattattgctgaaaaacgttaaaggaggacagccatggct
 R  I  I  A  E  K  R  I  I  A  E  K  R  -  R  R  T  A  M  A
cgtgaagcggttatcgccgaagtatcaactcaactatcagaggtagttggcgtcatcgag
 R  E  A  V  I  A  E  V  S  T  Q  L  S  E  V  V  G  V  I  E
cgccatctcgaaccgacgttgctggccgtacatttgtacggctccgcagtggatggcggc
 R  H  L  E  P  T  L  L  A  V  H  L  Y  G  S  A  V  D  G  G
ctgaagccacacagtgatattgatttgctggttacggtgaccgtaaggcttgatgaaaca
 L  K  P  H  S  D  I  D  L  L  V  T  V  T  V  R  L  D  E  T
acgcggcgagctttgatcaacgacctttttggaaacttcggcttcccctggagagagcgag
 T  R  R  A  L  I  N  D  L  L  E  T  S  A  S  P  G  E  S  E
attctccgcgctgtagaagtcaccattgttgtgcacgacgacatcattccgtggcgttat
 I  L  R  A  V  E  V  T  I  V  V  H  D  D  I  I  P  W  R  Y
ccagctaagcgcgaactgcaatttggagaatggcagcgcaatgacattcttgcaggtatc
 P  A  K  R  E  L  Q  F  G  E  W  Q  R  N  D  I  L  A  G  I
ttcgagccagccacgatcgacattgatctggctatcttgctgacaaaagcaagagaacat
 F  E  P  A  T  I  D  I  D  L  A  I  L  L  T  K  A  R  E  H
agcgttgccttggtaggtccagcggcggaggaactctttgatccggttcctgaacaggat
 S  V  A  L  V  G  P  A  A  E  E  L  F  D  P  V  P  E  Q  D
ctatttgaggcgctaaatgaaaccttaacgctatggaactcgccgcccgactgggctggc
 L  F  E  A  L  N  E  T  L  T  L  W  N  S  P  P  D  W  A  G
gatgagcgaaatgtagtgcttacgttgtcccgcatttggtacagcgcagtaaccggcaaa
 D  E  R  N  V  V  L  T  L  S  R  I  W  Y  S  A  V  T  G  K
atcgcgccgaaggatgtcgctgccgactgggcaatggagcgcctgccggcccagtatcag
 I  A  P  K  D  V  A  A  D  W  A  M  E  R  L  P  A  Q  Y  Q
cccgtcatacttgaagctagacaggcttatcttggacaagaagaagatcgcttggcctcg
 P  V  I  L  E  A  R  Q  A  Y  L  G  Q  E  E  D  R  L  A  S
gcgcgcagatcagttgggaagaatttgtcccactacgtgaaaggcgagatcactaaacgt
 A  R  R  S  V  G  K  N  L  S  H  Y  V  K  G  E  I  T  K  R
agttggcaaataactgcaaggcatgcaagcttgtactcaagctcgtaacgaaaggtcgtg
 S  W  Q  I  T  A  R  H  A  S  L  Y  S  S  S  -  R  K  V  V
accttgcttcgtgaaaggtggccgacgtaatttcggttcagctttgttaatgggtcctcc
 T  L  L  R  E  R  W  P  T  -  F  R  F  S  F  V  N  G  S  S
agaactttgctgcctgcaatgtgaaagttgaaaggaattaattcgattggaatccctatt
 R  T  L  L  P  A  M  -  K  L  K  G  I  N  S  I  G  I  P  I
gcacaaaacctttaatttatatt
```


TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Figura 18. Se observa el resultado de la secuenciación de la construcción utilizando el oligonucleótido sentido de la Lactostatina, donde se observa al principio parte de la secuencia correspondiente al gen sintético de la lactostatina (color azul), seguido de la secuencia que corresponde al gen *aadA* lo que indica la correcta ligación del gen sintético lactostatina en el vector p463, con amarillo se indica la secuencia que corresponde a la enzima *Nco*I.

Selección de líneas transformantes de *Chlamydomonas reinhardtii.*

Después del bombardeo a las células de *Chlamydomonas reinhardtii,* se procedió a la selección de líneas transformantes, para lo cual se realizaron rondas de selección en medio TAP sólido adicionado con espectinomicina (150mg/L) (Figura 19,20 y 21).

Figura 19. Crecimiento de *Chlamydomonas* en medio TAP con espectinomicina a 25°C con un fotoperiodo de 16h luz /8h obscuridad 15 días después de la transformación.

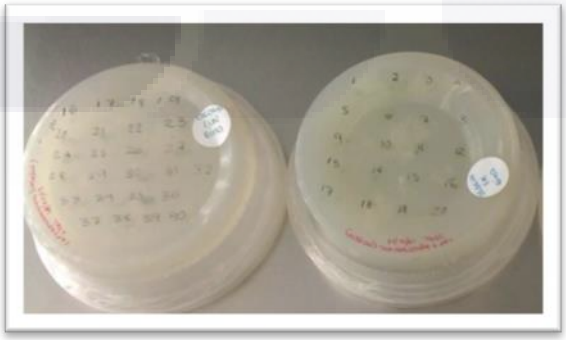


Figura 20. Rondas de selección de posibles colonias transformantes en medio TAP con espectinomicina por 7 días a 25° C con un fotoperiodo de 16h luz /8h obscuridad.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Figura 21. Resiembra en medio TAP con espectinomicina a 25°C con un fotoperiodo de 16h luz /8h obscuridad, después de 3 rondas de selección.

Confirmación de la integración del gen sintético lactostatina en el genoma de cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii*.

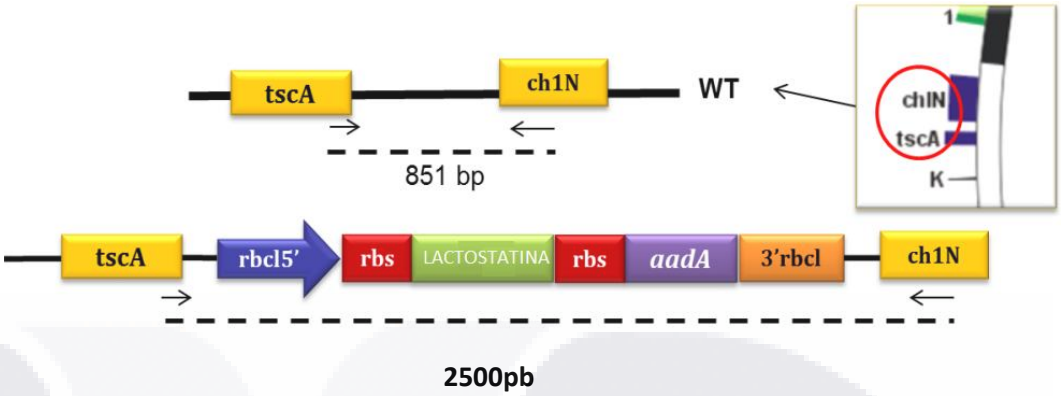
Después de 5 resiembras seleccionamos algunas clonas y se crecieron en medio líquido, después de extraer su ADN y se realizó una PCR para determinar homoplastia (Fig. 23), usando oligonucleótidos dirigidos a secuencias presentes en el cloroplasto de *Chlamydomonas* como se observa en la Figura 22 y así como también fueron analizadas por PCR para determinar la presencia del gen de selección que le confiere resistencia a la espectinomicina (*aadA)* y el gen sintético basado en la secuencia lactostatina (Fig. 24)

Figura 22 **.Mapa genómico del cloroplasto de *C. reinhardtii.* Se resalta la posición de los genes *tscA* y *ch1N.***

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

A)



B)

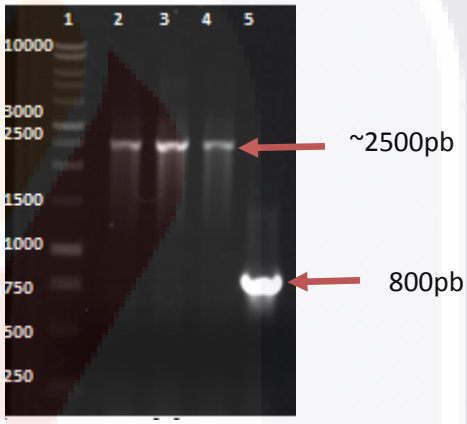


Figura 23. A) Diagrama esquemático de cepa sin transformar (WT) que contiene los genes *tscA* y *ch1N* y diagrama esquemático de clonas transformadas que contienen el casete de expresión *(*incluido el gen *lactostatina)*. B) Gel de electroforesis al 1% que nos muestra el amplicón de PCR utilizando oligonucleótidos que alinean en los genes *tscA* y *Ch1N* presentes en el genoma de *C. reinhardtii* para observar la homoplastia, utilizándose como control negativo la cepa sin modificar (WT). Carriles: 1) Marcador de peso molecular 2) línea transplastómica 4, 3) línea transplastómica 22, 4) línea transplastómica 23, 5) Control negativo WT.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

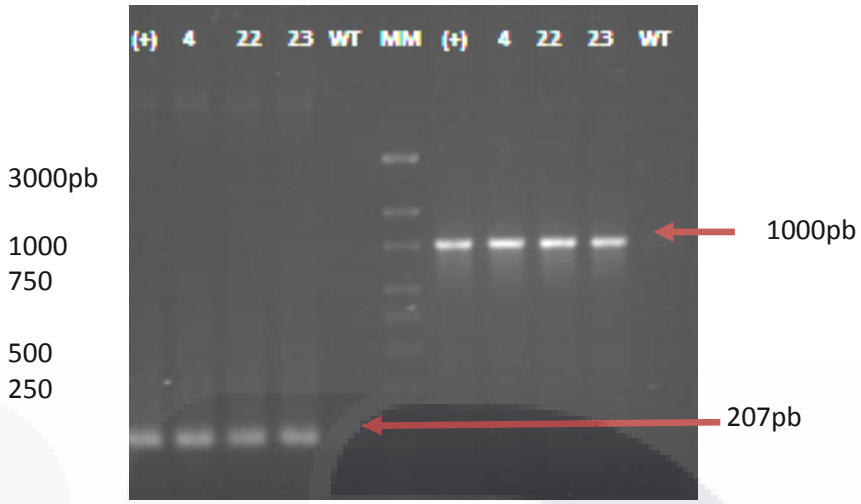


Figura 24. Gel de agarosa al 2% correspondiente a la electroforesis de los productos de la PCR con oligonucleótidos específicos para el gen sintético de la lactostatina y el gen de resistencia a espectinomicina (*aadA*). De izquierda a derecha: carriles: (+) Control positivo lactostatina, carriles 4,22 y 23: líneas transplastómicas, Carril WT: control negativo. Carril MM: marcador de peso molecular de 100 bp, (+) control positivo *aadA, carriles* 4,22 y 23: líneas transplastómicas, carril WT: control negativo.

Cuantificación de la proteína recombinante por ensayo de ELISA.

Una vez determinada la homoplastia y presencia de los genes de interés en las 3 líneas transplastómicas seleccionadas, se procedió a la cuantificación utilizando el ensayo de ELISA, las lecturas fueron tomadas en el espectofotómetro de UV visible. Las absorbancias obtenidas fueron las siguientes:

WT	Línea 4	Línea 22	Línea 23
0.330668	0.697749	0.676094	0.677840
0.256363	0.579848	0.600770	0.711332
0.274813	0.670035	0.689393	0.827058

Se obtuvo un promedio de las tres réplicas y se les restó la lectura promedio de la WT. Se determinó la cantidad de la proteína producida mediante una curva estándar obtenida con una proteína pura que contiene una copia del pentapéptido de interés. Interpolando las lecturas de absorbancia de las muestras problema en la curva estándar y mediante relaciones de masa molecular apropiadas se determinó que la líneas transplastómicas tuvieron una producción de 2.2 a 5.5% de PTS recombinante como se observa en la siguiente gráfica (Figura 24).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

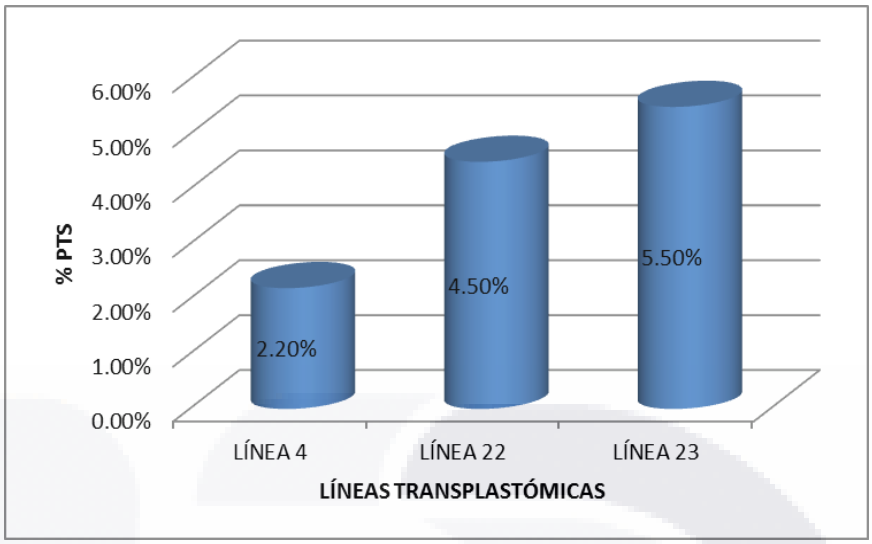


Figura 25. Niveles de acumulación de la proteína recombinante lactostatina en las líneas transplastómicas seleccionadas. Una cuantificación por ensayo de ELISA utilizando el anticuerpo anti-histidinas de la proteína recombinante, fue determinada utilizando una concentración conocida de una proteína pura que contiene un copia del péptido de interés con la que se realizó un curva lineal con cantidades conocidas de dicha proteína. Las líneas transplastómicas fueron comparadas con la WT, la cual presentó diferencia estadisticamente significativa con todas las líneas trasnplastómicas a un valor de p <0.05, pero no hubo diferencia significativa entre éstas (ANEXOS). La línea 4 muestra una producción de 2.20% de PTS, la línea 22, de 4.5% de PTS y la línea 23, de 5.5% de PTS.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Los péptidos hipocolesterolémicos son una alternativa para la prevención y/o tratamiento de la hipercolesterolemia, una de las principales causas de desarrollo de enfermedades cardiovasculares; las cifras de muertes tanto a nivel mundial como nacional se han incrementado por ésta enfermedad (Kannel, et al., 1961; Valeta, et al., 2005). El tratamiento de este padecimiento se lleva a cabo con estatinas, un grupo de fármacos que inhiben selectivamente la HMG-CoA reductasa (3-hidroximetil-3-metilglutaril-coenzima A), que es la enzima reguladora y limitante de la velocidad en la biosíntesis del colesterol. Dentro de este grupo podemos encontrar estatinas naturales (lovastatina y pravastatina), semi-sintéticas (simvastatina) y sintéticas (atorvastatina y fluvastatina) (Manzoni, et al., 2002). Estos compuestos disminuyen los niveles de colesterol; particularmente las lipoproteínas de baja densidad o colesterol de baja densidad (colesterol malo); con un ligero aumento de las lipoproteínas de alta densidad (colesterol bueno), por consiguiente, previenen la acumulación de la placa de colesterol dentro de las arterias (Alberts, et al., 1980; Manzoni, et al., 1999), cabe mencionar que estos tienen que ser acompañados de una dieta baja en grasas, pérdida de peso y ejercicio, además de que estos fármacos pueden presentar ciertas reacciones secundarias: acidez estomacal, estreñimiento, dolor de estómago, náuseas, dolor de cabeza, pérdida de la memoria o el olvido confusión, por lo que, actualmente diversos científicos e investigadores están prestando mayor atención a los componentes bioactivos de fuentes naturales (animales y vegetales) que tengan un efecto hipocolesterolémico sobre el organismo humano (Torruco-Uco, et al., 2008).

Por lo anterior, el proyecto aquí descrito incide en establecer una nueva alternativa para la prevención y tratamiento de la hipercolesterolemia, el cual radica en la modificación genética de la microalga comestible, *C. reinhardtii*.

C. reinhardtii se ha mostrado como un sistema eficiente de expresión de proteínas recombinantes debido a que no causa daños en la salud de las personas, su cultivo es fácil, presenta una transformación estable y puede ser escalable. En este trabajo se realizó la transformación de *C. reinhardtii* con el gen sintético basado en la secuencia de la lactostatina que codifica para un péptido con actividad hipocolesterolémica, en cuanto al diseño, se incluyeron 9 repeticiones en tandem

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

del pentapeptido de interés debido a que se ha observado en trabajos previos que esto genera niveles más altos de producción (Heitzer, et al., 2007). Los codones para el gen lactostatina fueron optimizado para *Chlamydomonas reinhardtii* para lograr una mayor expresión de la proteína recombinante en el cloroplasto, esto debido a un aumento en la eficiencia de la traducción del gen de interés (Rasala, et al., 2010). En cuanto a los vectores, seleccionamos los vectores llamados p463 y p464 debido a que en estudios anteriores se ha reportado que ambos muestran altos niveles de expresión de proteínas recombinantes en cloroplastos de *Chlamydomonas reinhardtii* (Campos, et al., 2012). La selección de uno u otro vector es difícil, debido a que se ha observado que existe variación en los niveles de producción dependiendo de la proteína producida. Esta reportado en unos trabajos que es mejor utilizar el promotor de la ATPa sintasa (vector p464) y en otros sugirieren que es mejor el uso del promotor RbcL (vector p463) (Fletcher, et al., 2007; Hallmann, 2007).

La selección de transformantes mediante 5 resiembras en medio selectivo se basó en lo que menciona Bock (2001), el evento de transformación inicial involucra la integración del ADN transformante en una o unas pocas copias del genoma plastídico presentes en cada célula. Durante las subsecuentes divisiones de células y organelos, la presencia de altas concentraciones del agente selectivo (generalmente espectinomicina) favorece la multiplicación de los plástidos que contengan su genoma transformado. De esta forma, luego de sucesivas rondas de regeneración en un medio selectivo, puede alcanzarse un estado denominado homoplastía, en el que cada copia del plastoma es recombinante. Esto lo comprobamos al realizar análisis de PCR y obtener en las tres líneas analizadas homoplastia al observar los amplicones del tamaño esperado.

El análisis de PCR con oligonucleótidos diseñados para el gen sintético lactostatina nos muestra la integración sitio dirigida del gen en el cloroplasto de *Chlamydomonas*, así como también la del gen de selección *aadA*.

Cabe mencionar que tuvimos un bajo rendimiento en la transformación, debido a que sólo se obtuvieron tres colonias que resistieron las 5 resiembras, esto pudo deberse a varios factores: a) la cantidad de ADN no fue la adecuada, b) fue poca la cantidad de ADN pudo llegar al cloroplasto, y c) la cantidad de balas fue

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

poca. Sin embargo es importante mencionar que todas las colonias nos dieron positivas en todos los análisis.

Las 3 líneas transgénicas muestran producción del péptido observándose mayor producción en la línea 23. Los resultados muestran que el cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* puede ser un sistema efectivo para la producción y acumulación de péptidos bioactivos. Usando el anticuerpo anti-Histidinas en el ensayo de ELISA y tomando como control una proteína purificada que contiene una repetición del péptido de interés, se determinó que los niveles de producción de la proteína recombinante varían desde 2.2% hasta 5.5% de PTS.

En cuanto a la cuantificación de la producción de la proteína recombinante de interés en las tres líneas transplastómicas seleccionadas, observamos que tienen diferentes niveles de producción, observándose un mayor porcentaje de PTS en la línea 23 con un 5.5%. Una posible explicación en cuanto a los rendimientos variables entre las líneas obtenidas podría estar relacionado con la variación asociada a modificaciones genotípicas resultantes del proceso de transformación (Surzycki, et al., 2009) como lo son los transformosomas. Según los autores, se sugiere que las líneas individuales tienen características únicas que pueden ser afectadas por inserciones nucleares, interfiriendo así con la expresión de los genes del cloroplasto necesarios para la fotosíntesis o con proteínas implicadas en la translocación. Debido a la naturaleza poliploide del plastoma también es posible que la variación observada en los rendimientos de la producción de la proteína recombinante pueda atribuirse a la heteroplastía. Sin embargo, los rendimientos obtenidos son similares a los reportados para otras proteínas recombinantes expresadas en los cloroplastos *C. reinhardtii* utilizando el mismo promotor (atpA/rbcL), por ejemplo, para el anticuerpo HSV8-lsc se reportó una producción del 0.5% de PTS (Mayfield, et al., 2003), para el factor de necrosis tumoral (hTRAIL) de un 0.43 a 0.67% de PTS (Yang, et al., 2006) y para la descarboxilasa de ácido glutámico humano 65 de un 0.25 a0.3% de PTS (Wang, et al., 2008). Estos datos, junto con el hecho que las 3 clonas regeneradas acumularon la proteína quimérica en niveles mayores a los reportados para otras proteínas recombinantes (2.2-5.5 % de PTS), confirma que los cloroplastos de *C. reinhardtii* son capaces de producir proteínas heterólogas. Se espera que este estudio sirva de base para la generación de plataformas convenientes para la producción de péptidos bioactivos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

hipocolesterolémicos utilizando técnicas de ADN recombinante, ingeniería genética y microalgas como hospederos de expresión atractivos.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

CONCLUSIONES.

Se diseñó un gen sintético con secuencias en tándem para la lactostatina el cual fue introducido a la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* mediante biobalística. La integración de este gen quimera en cloroplasto fue confirmada mediante PCR y la proteína se cuantificó por ELISA. *C. reinhardtii* puede utilizarse como un sistema de expresión eficiente y estable para la producción a gran escala de péptidos hipocolesterolémicos.

Este trabajo proporciona una nueva estrategia para producir el péptido bioactivo lactostatina, con potencial para tratar y prevenir el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

GLOSARIO.

1) ADN: El ácido desoxirribonucleico, abreviado como ADN, es un ácido nucleico que contiene instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos conocidos y algunos virus, y es responsable de su transmisión hereditaria.
2) Bicistrónico: dos genes bajo la regulación de un único promotor.
3) Biobalística: método de transferencia directa de genes en una célula, con el objetivo de crear organismos transgénicos. Consiste en propulsar los genes de interés dentro de las células con la ayuda de un cañón de ADN, con lo cual se modifica el ADN de las células
4) *Chlamydomonas reinhardtii:* alga unicelular de 10 micrómetrosde diámetro que nada con dos flagelos.
5) Cloroplasto: orgánulos celulares que en los organismos eucariontes fotosintetizadores se ocupan de la fotosíntesis.
6) Líneas homoplásticas: líneas celulares que son iguales, es decir, que todas las copias del genoma presentan el gen deseado.
7) Optimización de codones: procedimiento mediante el cual los codones de un gen clonado, que no son los que generalmente utiliza el sistema de traducción de la célula hospedera, se cambian por mutagénesis *in vitro* a los codones seleccionados sin que cambien los aminoácidos.
8) Proteína recombinante: proteína que se obtiene a partir de una especie o una línea celular distinta a la célula original.
9) Recombinación homóloga: integración dirigida de secuencias de ADN exógeno que luego propagan a todas las copias del genoma de ese y los demás cloroplastos de la célula.
10) Secuenciación: proceso que determina el orden preciso de los nucleótidos.
11) Trasgen: gen que se moviliza o se transfiere entre dos organismo distintos o líneas celulares de una manera no sexual.
12) Vector de clonación: son moléculas transportadoras que transfieren y replican fragmentos de ADN que llevan insertados mediante técnicas de ADN recombinante.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

BIBLIOGRAFÍA.

- Alberts, A., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V., Huff, J., Hoffman, C., Rothrock, J., López, M., Joshua, H., Harris, E., Patchett, A., Monaghan, R., Currie, S., Stapley, E., Albers-Schonberg, G., Henses, O., Hirsdfield, J., Hoogsteen, K., Liesch, J. y Springer, J.(1980). *Mevinolin a highly potent competitive inhibitor of hodroxymethylglutaryl CoA reductase and a cholesterol-lowering agent*. Proc.Natl. Acad. Sci. 77:3957-3961.
- Barnes, M., Franklin, T. y Schultz, J. (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.
- Bateman, J. y Purton, S. (2000). *Tools for chloroplast transformation in* Chlamydomonas: *expression vectors and a new dominant selectable marker.* Mol. Gen. Genet. 263: 404-410.
- Berthold, P., Schmitt, R. y Mages, W. (2002). *An engineered* Streptomyces hygroscopicus *aph 7" gene mediates dominant resistance against hygromycin B in* Chlamydomonas reinhardtii*.* Protist. 153**:** 40-412.
- Birnboim, H. y Doly, J. (1979). *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res. 24:13-23.
- Bock, R. (2001). *Transgenic Plastids in Basic Research and Plant Biotechnology.* J. Molecular Biology. 312: 425-438.
- Boynton, J., Gillham, N. y Harris, E. (1988). *Chloroplast transformation in* Chlamydomonas *with high velocity microprojectiles.* Science. 240**:** 1534-1538.
- Bradford, M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem. 72:248-254.
- Bray, B. (2003*). Large-scale manufacture of peptide therapeutics.* Nat Rev Drug. 2:587-593.
- Bridget, B. y Fuster, V. (2010). *Promoting cardiovascular health in the developing world: a critical challenge to achieve global health.* National Academies Press, Washington, DC. The JNC 7 report. J Am Med Assoc. 289:2560-2572.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

- Campos-Quevedo, N., Rosales-Mendoza, S., Paz-Maldonado, L., Martínez-Salgado, L., Guevara-Arauza, J. y Soria-Guerra, R. (2013). *Producction of milk-derived bioactive peptides as precursor chimeric proteins in chloroplasts of* Chlamydomonas reinhardtii. Plant Cell Tiss Organ Cult. 113:217-225.
- Cerutti, H., Johnson, M., Gillham, W. y Boynton, J. (1997a). *A eubacterial gene conferring spectinomycin resistance on* Chlamydomonas reinhardtii*: integration into the nuclear genome and gene expression.* Genetics. 145**:** 97-110.
- Cerutti, H., Johnson, M., Gillham, W. y Boynton, J. (1997b). *Epigenetic silencing of a foreign gene in nuclear transformants of* Chlamydomonas. Plant Cell. 9**:** 925-945.
- Davies, J., Weeks, D., y Grossman, A. (1992). *Expression of the arylsulfatase gene from the beta 2-tubulin promoter in* Chlamydomonas reinhardtii*.* Nucleic Acids Res*.* 20**:** 2959-2965.
- De Cosa, B., Moar, W., Lee, S., Miller, M. y Daniell H. (2001). *Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals*. Nat. Biotechnol. 19:71-74.
- Debuchy, R., Purton, S., y Rochaix, J. (1989). *The argininosuccinate lyase gene of* Chlamydomonas reinhardtii*: an important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus.* EMBO J*.* 8**:** 2803-2809.
- Dreesen, I., Charpin-El Hamri, G. y Fussenegger, M. (2010) *Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from* Staphylococcus aureus *infection.* J Biotechnol 145:273-280.
- Dunahay, T. (1993). *Transformation of* Chlamydomonas reinhardtii *with silicon carbide whiskers.* Biotechniques. 15: 452-460.
- Ferris, P. (1995*). Localization of the nic-7, ac-29 and thi-10 genes within the mating-type locus of* Chlamydomonas reinhardtii*.* Genetics. 141: 543-549.
- Fletcher, S., Muto, M. y Mayfield, S. (2007) *Optimization of recombinant protein expression in the chloroplasts of green algae*. Landes Bioscience and Springer Science Business. 616: 90–98
- Flügge, I. (2001). *Plant chloroplast and other plastids*. Encyclopedia of Life Sciences 1-7.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

- Franklin, S. y Mayfield, S. (2004). *Prospects for molecular farming in the green alga* Chlamydomonas*.* Curr. Opin. Plant Biol. 7**:** 159-165.
- Franklin, S., Ngo, B., Efuet, E. y Mayfield, S. (2002). *Development of a GFP reporter gene for* Chlamydomonas reinhardtii *chloroplast.* Plant J. 30**:** 733-744.
- Fuhrmann, M., Hausherr, A., Ferbitz, L., Schödl, T., Heitzer, M. y Hegemann, P. (2004). *Monitoring dynamic expression of nuclear genes in* Chlamydomonas reinhardtii *by using a synthetic luciferase reporter gene.* Plant Mol. Biol*.* 55: 869-881.
- Fuhrmann, M., Oertel, W., y 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.
- Gaziano, T., Bitton, A., Anand, S., Abrahams-Gessel, S. y Murphy, A. (2010). *Growing epidemic of coronary heart disease in low and middle-income countries*. Curr Probl Cardiol. 35:72-115.
- Goldschmidt-Clermont, M. (1991). *Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker of site-directed transformation of* Chlamydomonas*.* Nucleic Acids Res. 19**:** 4083-4089.
- Griesbeck, C., Kobl, I. y Heitzer M. (2006). Chlamydomonas reinhardtii*. A protein expression system for pharmaceutical and biotechnological proteins.* Molecular Biotechnology*.* 34: 213-223.
- Hallmann, A. (2007). *Algal transgenics and biotechnology*. Transgenic Plant J 1:81-98
- Harrison, T. (2005). *Principios de Medicina Interna*. (17ª ed.). Editorial Mc-Graw Hill. Capítulo 350-Trastornos del metabolismo de las lipoproteínas. 2416-2429.
- Heifetz, P. (2000). *Genetic engineering of the chloroplast*. Biochimie Elsevier 655-666.
- Heitzer, M., Eckert, A. y Fuhrmann, M. (2007). I*nfluence of codon bias on the expression of foreign genes in microalgae*. Transgenic Microalgae as Green Cell Factories, Adv Exp Med Biol. 12: 53-46.
- Heyer, W., Li, X, Rolfsmeier, M. y Zhang X. (2006). *Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination?* Nucleic Acids Res. (15): 4115 a 4125.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

- Huang, T. y McDonald, R. (2009). *Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures*. Biochemical Engineering Journal. 12: 168-184.
- James, G. y Daniell, H. (2005). *Cloroplast genetic engineering: recent advances and future perspectives.* Critical Reviews in Plant Sciences. 32: 83-107.
- Johnson, R. y Symington L. (1995). *Functional differences and interactions among the putative RecA homologs RAD51, RAD55, and RAD57*. Mol Cell Biol 15:4843-4850.
- Kagawa, W., Kurumizaka, H., Ishitani, R., Fukai, S., Nureki, O., Shibata, T. y Yokoyama S. (2002). *Crystal structure of the homologous-pairing domain from the human Rad52 recombinase in the undecameric form*. Mol Cell 10:359-371.
- Kannel, W., Dawber, T.,Kaban, A. y Revotskie, S. (1961). *Factors of risk in the development of coronary heart disease six year follow up experience; the Farmingham study*. Ann Intern Med. 40: 602-609.
- Kawamoto, T., Araki, K., Sonoda, E., Yamashita, M., Harada, K., Kikuchi, K., Masutani, C., Hanaoka, F., Nozaki, K., Hashimoto, N. y Takeda, S. (2005). *Dual roles for DNA polymerase.* Mol Cell 7: 28-32.
- Kindle, K. (1990). *High-frequency nuclear transformation of* Chlamydomonas reinhardtii*.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1228-1232.
- Kindle, K., Schnell, R., Fernandez, E. y Lefebvre, P. (1989). *Stable nuclear transformation of* Chlamydomonas *using the* Chlamydomonas *gene for nitrate reductase.* J. Cell Biol. 109: 2589–2601.
- Komarova, T., Baschieri, S., Doninim, M., Marusic, C., Benvenuto, E. y Dorokhov, Y. (2010). *Transient expression systems for plant derived biopharmaceuticals.* Expert Rev Vaccines 9:859-876.
- Koop, H., Herz, S., Golds, T. y Nickelsen J. (2007). *The genetic transformation of plastids. Cell and Molecular Biology of Plastids* Vol.19. Edit. Springer Berlin / Heidelberg. 12: 457-510.
- Kovar, J., Zhang, J., Funke, R. y Weeks, D. (2002). *Molecular analysis of the acetolactate synthase gene of* Chlamydomonas reinhardtii *and development*

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

of a genetically engineered gene as a dominant selectable marker for genetic transformation. Plant J. 29**:** 109-117.

- Lara, A., Rosas, M., Pastelin, G., Aguilar, C., Attie, F. y Velázquez, O. (2004). *Hipercolesterolemia e hipertensión arterial en México. Consolidación urbana actual con obesidad, diabetes y tabaquismo*. Encuesta nacional de Salud. Archivos de cardiología en México. 74:3 231-245.
- León-Banares, R., González-Ballester, D., Galván, A. y Fernández, E. (2004). *Transgenic microalgaeas green cell-factories.* Trends Biotechnol*.* 22: 45-52.
- Lequin, R. (2005). *Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).* Clin. Chem*.* 51:12 2415-2420.
- Lien, S. y Lowman, H. (2003). *Therapeutic peptides*. Trends Biotechnol 21:556-562.
- Liénard, D., Sourrouille C., Gomord, V. y Faye L. (2007). *Pharming and transgenic plants*. Biotechnol Annu Rev 13:115-147.
- Loppes, R., Radoux, M., Ohresser, M. y Matagne, R. (1999). *Transcriptional regulation of the Nia1 gene encoding nitrate reductase in* Chlamydomonas reinhardtii*: effects of various environmental factors on the expression of a reporter gene under the control of the Nia1 promoter.* Plant Mol. Biol*.* 41: 701-711.
- Lumbreras, V., Stevens, D. y Purton, S. (1998). *Efficient foreign gene expression in* Chlamydomonas reinhardtii *mediated by an endogenous intron.* Plant J**.** 14: 441-447.
- Maliga, P. (2003). *Plastid transformation in higher plants*. Reviews in Advance*.* 289-304.
- Manuell, A., Beligni, M. Elder, V., Siefker, D., Tran, M., Webber, A., McDonald T. y Mayfield S. (2007). *Expression of a bioactive mammalian protein in* Chlamydomonas *chloroplast.* Plant biotechnology journal. 5: 402-412.
- Maruyama, N., Mikami, B., y Utsumi S. (2011). *The development of transgenic crops to improve human health by advanced utilization of seed storage proteins*. Biosci Biotechnol Biochem 75:823-828.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

- Matsuo, T., Onai, K., Okamoto, K., Minagawa, J. y Ishiura, M. (2006). *Real-time monitoring of chloroplast gene expression by a luciferase reporter: evidence for nuclear regulation of chloroplast circadian period.* Mol. Cell. Biol. 26: 863-870.
- Mayfield, S. y Franklin, S. (2005). *Expression of human antibodies in eukaryotic micro-algae.* Vaccine 23: 1828-1832.
- Mayfield, S. y Schultz, J. (2004). *Development of a luciferase reporter gene, luxCt, for* Chlamydomonas reinhardtii *chloroplast.* Plant J. 37**:** 449-458.
- Mayfield, S., Franklin, S. y Lerner, R. (2003). *Expression and assembly of a fully active antibody in algae.* Proc. Natl. Acad. Sci. *USA* 100: 438-442.
- Mayfield, S. y Franklin S. (2005). *Expression of human antibodies in eukaryotic micro-algae.* Vaccine 23:1828-1832.
- Mayfield, S., Franklin, S. y Lerner, R. (2003). *Expression and assembly of a fully active antibody in algae*. PNAS. 100:2 438-442.
- McBride, K. E. y Stalker, D. M. (2006). *Expresión Mejorada en un plástido de Planta.* Oficina Española de Patentes y Marcas. 2: 252–260.
- Minko, I., Holloway, S. y Nikaido, S. (1999). Renilla luciferase *as a vital reporter for chloroplast gene expression in* Chlamydomonas*.* Mol. Gen. Genet*.* 262: 421-425.
- Monzani, E., Bonafe, A., Fallarini, C., Redaelli, L., Casella, L., Minchiotti, L. y Galliano, M. (2002). *Enzymatic properties of human hemalbumin*. Biochim. Biophys. Acta. 1547:302–312.
- Monzani, E., Gatti, A., Profumo, A., Casella, L. y Gullotti, M. (1999). *Oxidation of phenolic compounds by lactoperoxidase: evidence for the presence of a low-potential compound II during catalytic turnover.* Biochemistry. 36:1918-1926.
- Morikawa, K., Kondo, I., Kanamaru, Y. y Nagaoka, S. (2007). *A novel regulatory pathway for cholesterol degradation via lactostatin.* Biochem Biophys Res Commun 352:697-702.
- Nelson, J., Savereide, P. y Lefebvre, P. (1994). *The CRY1 gene in* Chlamydomonas reinhardtii*: structure and use as a dominant selectable marker for nuclear transformation.* Mol. Cell. Biol*.* 14: 4011-4019.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

- Obembe, O., Popoola, J., Leelavathi, S. y Reddy, S. (2011*). Advances in plant molecular farming.* Biotechnol Adv. 29: 210-222.
- Oey, M., Lohse, M., Kreikemeyer, B. y Bock, R. (2009). *Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic.* The plant Journal. 57: 436-445.
- Quinn, J., Kropat, J. y Merchant, S. (2003). *Copper response element and Crr1-dependent Ni (2^+)-responsive promoter for induced, reversible gene expression in* Chlamydomonas reinhardtii*.* Eukaryot Cell. 2: 995-1002.
- Randolph-Anderson, B., Sato, R. y Johnson, A. (1998). *Isolation and characterization of a mutant protoporphyrinogen oxidase gene from* Chlamydomonas reinhardtii *conferring resistance to porphyric herbicides.* Plant Mol. Biol. 38: 839-859.
- Rasala, B., Muto, M., Lee, P., Jager, M., Cardoso, R., Behnke, C., Kirk, P., A. Hokanson, C., Crea, R., Mendez, M. y Mayfiels, S. (2010). *Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of* Chlamydomonas reinhardtii*.* Plant Biotechnology J. 8: 1-15.
- Rebolloso, M., Acién, F., Sánchez, J., Gil, M. y Guil, J. (2000). *Composición nutritiva de la biomasa de la microalga* Porphyridium cruentum. Food Science and Technology International 6: 129-135.
- Rebolloso-Fuentes, M., Camacho, M., Navarro, A. y Guil, J. (2001). *Biomass nutrient profiles of the microalga* Nannochloropsis spp. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 2966-2972.
- Ruiz-Binder, N., Geimer, S. y Melkonian, M. (2002). *In vivo localization of centrin in the green alga* Chlamydomonas reinhardtii*.* Cell Motil. Cytoskeleton. 52: 43–55.
- Rybicki, E. (2010). *Plant-made vaccines for humans and animals*. Mol. Farming. 8:620-637.
- Saiki, R.K. (1990). *Amplification of genomic DNA. In: Iinnis MA, Gelfand DH, Sninski JJ and White TJ. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. San Diego. 13-20.
- Sambrook, J., Fritschi, E. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

- Schroda, M. (2005). *RNA silencing in* Chlamydomonas: *mechanisms and tools.* Curr. Genet. 49: 69-84.
- Schroda, M., Blocker, D., y Beck, C. (2000). *The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in* Chlamydomonas*.* Plant J. 21:121-131.
- Shimogawara, K., Fujiwara, S., Grossman, A., y Usuda, H. (1998). *High-efficiency transformation of* Chlamydomonas reinhardtii *by electroporation.* Genetics. 148**:** 1821-1828.
- Shinmyo, A. y Kato, K. (2010). *Molecular farming: production of drugs and vaccines in higher plants.* J Antibiot 63:431-433.
- Sizova, I., Fuhrmann, M. y Hegemann, P. (2001). *A* Streptomyces rimosus *aphVIII gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to* Chlamydomonas reinhardtii*.* Gene. 277: 221-229.
- Stevens, D., Rochaix, J. y Purton, S. (1996). *The bacterial phleomycin resistance gene ble as a dominant selectable marker in* Chlamydomonas*.* Mol. Gen. Genet**.** 251: 23-30.
- Sun, M., Qian, K., Su, N., Chang, H., Liu, J. y Chen, G. (2003). *Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in* Chlamydomonas reinhardtii *chloroplast.* Biotechnol. Lett*.* 25: 1087-1092.
- Surzycki, R., Greenham, K., Kitayama, K., Dibal, F., Wagner, R., Rochaix, J.D., Ajam, T. y Surzycki, S. (2009). *Factors effecting expression of vaccines in microalgae.* Biologicals*.* 37:8-133.
- Tandang-Silvas M., Tecson-Mendoza E., Mikami B., Utsumi S. y Maruyama N. (2011). *Molecular design of seed storage proteins for enhanced food physicochemical properties*. Annu Rev Food Sci Technol 2:59-73.
- Tang, D., Qiao, S. y Wu, M. (1995). *Insertion mutagenesis of* Chlamydomonas reinhardtii *by electroporation and heterologous DNA.* Biochem. Mol. Biol**.** 36: 1025-1035.
- Torruco-Uco, J., Domínguez, M., Dávila, G.,Martínez, A., Chel, L., Betancur, D., . (2008). *Antihypertensive peptides, an alternative for treatment of natural origin: a review*. Cienc. Tecnol. Aliment. 6:158-168

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application.* Proc Natl Acad Sci U S A. 76: 9 4350-4354.
- Tran, M., Zhon, P., Petterson, R., González M. y Mayfield S. (2009). *Synthesis and assembly of a full-lenght human monoclonal antibody in algal chloroplasts.* Biotechnology and Bioengineering. 104:4 663-673.
- Valera, H., Gomes, J., Lakshmi, S., Gururaja, R., Suryanarayan, S. y Kumar, D. (2005). *Lovastatin production by solid state fermentation using Aspergillus flavipes.* Enzyme Microb. Technol. 37: 521-526. Velazquez, M., Rosas, P., Lara, E., Hernández, G., Sánchez-Castillo, C., Attie, F. y Tapia, C. (2002). *Prevalence and interrelations of noncommunicable chronic diseases and cardiovascular risk factors in Mexico*. Arch Cardiol Mex. 72: 71-84.
- Voller, A., Bartlett, A., y Bidwell, D. (1978). Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. J Clin Pathol. 31:507-520
- Walker, T. L., Purton, S., Becker, D. K. y Collet, C. (2005). *Microalgae as bioreactors.* Plant Cell Rep. 24: 629-641.
- Wang, X., Brandsma, M. y Tremblay, R. (2008). *A novel expression platform for the production of diabetes-associated autoantigen human glutamic acid decarboxylase (hGAD65).* BMC Biotechnol 8:87.
- Yang, L., Wakasa, Y. y Takaiwa, F. (2008). *Biopharming to increase bioactive peptides in rice seed*. J AOAC Int. 91:957-964.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ANEXOS.

Ensayo de ELISA

WT	4	22	23
0.330668	0.697749	0.676094	0.677840
0.256363	0.579848	0.600770	0.711332
0.274813	0.670035	0.689393	0.827058

ANOVA unidireccional: C1, C2, C3, C4

```
Fuente  GL       SC       CM      F      P
Factor   3  0.36400  0.12133  35.40  0.000
Error    8  0.02742  0.00343
Total   11  0.39142

S = 0.05855   R-cuad. = 92.99%   R-cuad.(ajustado) = 90.37%


                              ICs de 95% individuales para la media
                              basados en Desv.Est. agrupada
Nivel  N    Media  Desv.Est.  -------+---------+---------+---------+--
C1     3  0.28728    0.03869  (----*----)
C2     3  0.64921    0.06165                    (----*---)
C3     3  0.65542    0.04779                    (----*----)
C4     3  0.73874    0.07829                         (----*----)
                              -------+---------+---------+---------+--
                                  0.32      0.48      0.64      0.80

Desv.Est. agrupada = 0.05855


Agrupar información utilizando el método de Tukey

    N    Media  Agrupación
C4  3  0.73874  A
C3  3  0.65542  A
C2  3  0.64921  A
C1  3  0.28728    B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.


Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones en parejas

Nivel de confianza individual = 98.74%


Se restó C1 a:

    Inferior   Centro  Superior     +---------+---------+---------+---------
C2   0.20880  0.36193   0.51506                    (-----*------)
C3   0.21501  0.36814   0.52126                     (-----*-----)
C4   0.29834  0.45146   0.60459                        (-----*-----)
                                   +---------+---------+---------+---------
                                -0.25      0.00      0.25      0.50
```

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

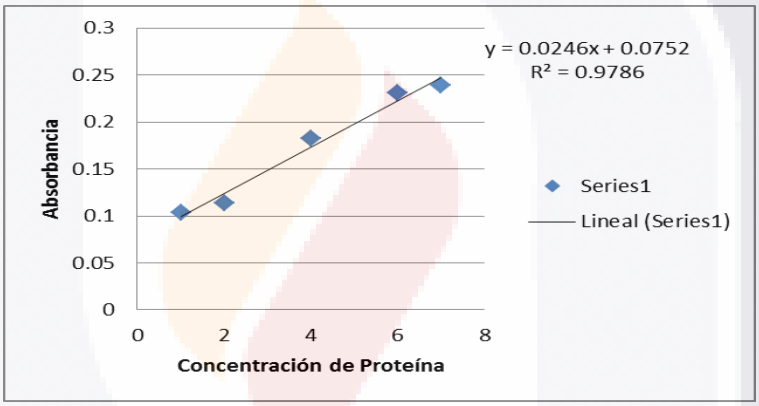
```
Se restó C2 a:

    Inferior   Centro  Superior      +---------+---------+---------+---------
C3  -0.14692  0.00621   0.15933           (-----*-----)
C4  -0.06359  0.08953   0.24266              (------*-----)
                                    +---------+---------+---------+---------
                                  -0.25      0.00      0.25      0.50

Se restó C3 a:

    Inferior   Centro  Superior      +---------+---------+---------+---------
C4  -0.06980  0.08332   0.23645           (-----*-----)
                                    +---------+---------+---------+---------
                                  -0.25      0.00      0.25      0.50
```

Curva estándar para determinar la concentración de la proteína recombinante



WT	LÍNEA 4	LÍNEA 22	LÍNEA 23
0.330668	0.697749	0.676094	0.677840
0.256363	0.579848	0.600770	0.711332
0.274813	0.670035	0.689393	0.827058
PROMEDIO 0.28728133	**PROMEDIO 0.6249415**	**PROMEDIO 0.6450815**	**PROMEDIO 0.769195**

ECUACIÓN DE LA RECTA (y=mx+b)
y=0.0246X+0.0752, despejando x tenemos:

x=y-0.0775/0.0246 *y= promedio de cada línea – promedio WT

X_4=(0.6249415-0.28728133) - 0.0775/0.0246 = 10.67 µg/µL
X_{22}=(0.6450815-0.28728133) - 0.0775/0.0246 = 11.48 µg/µL
X_{23}=(0.769195-0.28728133) - 0.0775/0.0246 = 16.53µg/µL

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN
Masa molecular de la proteína control: 14660.04 g/mol
Masa molecular del pentapéptido lactostatina: 573 g/mol

Con la prueba de Bradford se determinaron las concentraciones y en cada pozo se aseguró que hubiera la misma cantidad de proteína (50ng), con los cálculos correspondientes se obtuvo que en la línea 4 se colocó 3.3 µL de la proteína total obtenida, en la línea 22 se colocó 1.8 µL y en la linea 23 se colocó 2.1µL

Para la línea 4 tenemos:
10.67ng - 3.3µL
X - 1 µL x=3.2 ng/µL de proteína total

Esa cantidad equivale a la proteína control, necesitamos saber que cantidad de esa proteína equivale a la proteína de interés, basándonos en sus masas moleculares tenemos que:

3.2 ng/µL – 14660.04
X - 573 x= 0.1250 ng/µL

Esto equivale a una repetición, pero recordemos que nuestro diseño contenía 9 repeticiones, por lo tanto, el resultado debemos multiplicarlo por 9
0.1250 ng/µL * 9 = 1.13ng/µL

En porcentaje tenemos
50ng- 100%
1.13 - x X =2.26% PTS

Para la línea 22 tenemos:
11.48 ng – 1.8µL
X - 1 µL x=6.4 ng/µL de proteína total

Esa cantidad equivale a la proteína control, necesitamos saber que cantidad de esa proteína equivale a la proteína de interés, basándonos en sus masas moleculares tenemos que:

6.4 ng/µL – 14660.04
X - 573 x= 0.250 ng/µL

Esto equivale a una repetición, pero recordemos que nuestro diseño contenía 9 repeticiones, por lo tanto, el resultado debemos multiplicarlo por 9
0.250 ng/µL * 9 = 2.25ng/µL

En porcentaje tenemos
50ng- 100%
2.25 - x X =4.5% PTS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Para la línea 23 tenemos:
16.53 ng – 2.1µL
X - 1 µL x=7.87 ng/µL de proteína total

Esa cantidad equivale a la proteína control, necesitamos saber que cantidad de esa proteína equivale a la proteína de interés, basándonos en sus masas moleculares tenemos que:

7.87 ng/µL – 14660.04
X - 573 x= 0.310 ng/µL

Esto equivale a una repetición, pero recordemos que nuestro diseño contenía 9 repeticiones, por lo tanto, el resultado debemos multiplicarlo por 9
0.310 ng/µL * 9 = 2.79ng/µL

En porcentaje tenemos
50ng- 100%
2.79 - x X =5.58% PTS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS