



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología

TESIS

Análisis de flujos metabólicos de *Chlamydomonas reinhardtii* durante la producción de un anticuerpo recombinante de camélido

Presentada para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

Por:

Jessica Álvarez Ramírez

Ingeniero Biotecnólogo

Dirigida por:

Dr. Edgar Salgado Manjarrez

Dr. Noé Valentín Durán Figueroa

Ciudad de México, Enero 2017



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 14:00 horas del día 19 del mes de diciembre del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI para examinar la tesis titulada:
Análisis de flujos metabólicos de Chlamydomonas reinhardtii durante la producción de un anticuerpo recombinante de camélido

Presentada por el alumno:

Álvarez	Ramírez	Jessica
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)
Con registro:		
A	1	5
1	1	3
0		

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Bioprocesos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Edgar Salgado Manjarrez

Dr. Noé Valentín Durán Figueroa

Dr. Juan Silvestre Aranda Barradas

Dr. Jesús Agustín Badillo Corona

Dr. José Luis Castrujón Flores

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

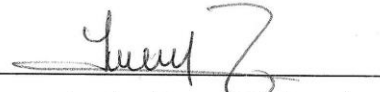
Dr. Ramón Villanueva Arce



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Declaración de originalidad


Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y, finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita.



Jessica Álvarez Ramírez



Vo. Bo. Director de tesis.
Dr. Edgar Salgado Manjarrez



Vo. Bo. Director de tesis.
Dr. Noé Valentín Durán Figueroa

Autorización de uso de obra

Instituto Politécnico Nacional
P r e s e n t e

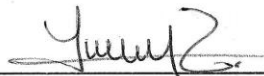
Bajo protesta de decir verdad el que suscribe **Jessica Alvarez Ramirez**, manifiesto ser autora y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada "**Análisis de flujos metabólicos de *Chlamydomonas reinhardtii* durante la producción de un anticuerpo recombinante de camélido**", en adelante "La Tesis" y de la cual se adjunta copia, por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 fracción II, inciso b) de la Ley Federal del Derecho de Autor, otorgo a el Instituto Politécnico Nacional, en adelante El IPN, autorización no exclusiva para comunicar y exhibir públicamente total o parcialmente en medios digitales "La Tesis" por un periodo de **(12 meses)** contado a partir de la fecha de la presente autorización, dicho periodo se renovará automáticamente en caso de no dar aviso expreso a "El IPN" de su terminación.

En virtud de lo anterior, "El IPN" deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de "La Tesis".

Adicionalmente, y en mi calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de "La Tesis", manifiesto que la misma es original y que la presente autorización no contraviene ninguna otorgada por el suscrito respecto de "La Tesis", por lo que deslindo de toda responsabilidad a El IPN en caso de que el contenido de "La Tesis" o la autorización concedida afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros y asumo las consecuencias legales y económicas de cualquier demanda o reclamación que puedan derivarse del caso.

México, D. F., 19 de Diciembre de 2016.

Atentamente



Jessica Alvarez Ramirez

RESUMEN

En la era moderna, el cálculo *in silico* de los flujos intracelulares en los sistemas biológicos es una herramienta de la cual los investigadores se han ayudado para seguir de cerca las posibles rutas que puede seguir uno o más metabolitos de interés; y por tanto, su uso ha ido en aumento. Este método se basa en la hipótesis de que estos sistemas funcionan de forma óptima respecto a cierto criterio biológico y que presentan in estado pseudo- estacionario así mismo, se hacen conjeturas en cuanto a restricciones físico-químicas y experimentales. Estos elementos permiten obtener, a través de la construcción de un modelo metabólico a través de herramientas como programación lineal, un espacio vectorial que contienen los flujos metabólicos en una red de reacciones bioquímicas. Las posibles soluciones que son generadas pueden, alguna de ellas puede verse como una función objetivo en un sistema biológico, la cual puede ser maximizadas o minimizadas según se requiera.

Dichas herramientas han sido utilizadas en diferentes sistemas biológicos y para obtener conocimiento acerca de la síntesis de diversos metabolitos, desde biocombustibles hasta moléculas complejas como proteínas. Particularmente, en este trabajo nos interesó una proteína del tipo biofarmacéutico, un nanocuerpo contra la proteína L1 del virus del papiloma humano.

En este trabajo reportamos la construcción del casete NanoVPHL1 el cual contiene al nanocuerpo (VHHL1) y entre otras particularidades una proteína fluorescente (mCherry). También se reporta la expresión de dicho casete en *Escherichia coli* y la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* y para este último microorganismo, el modelo metabólico y el respectivo análisis de flujos metabólicos.

ABSTRACT

In the modern era, the *in silico* calculation of intracellular fluxes in biological systems is a tool from which researchers have been helped to follow closely the possible routes that one or more metabolites of interest may follow; and therefore, its use has been increasing. This method is based on the hypothesis that these systems work optimally with respect to a certain biological criterion and are presented in pseudo-stationary state, as well as conjectures regarding physical-chemical and experimental constraints. These elements allow us to obtain, through the construction of a metabolic model through tools such as linear programming, a vector space containing the metabolic fluxes in a network of biochemical reactions. The possible solutions that are generated may, some of them can be seen as an objective function in a biological system, that can be maximized or minimized as necessary.

These tools have been used in different biological systems and to obtain knowledge on the synthesis of various metabolites, from biofuels to complex molecules like proteins. Particularly in this work we were interested in a biopharmaceutical, a nanobody against the human papillomavirus L1 protein.

In this work we report the construction of the NanoVPHL1 cassette containing the nanobody (VHHL1) and among others a fluorescent protein (mCherry). The expression of this cassette in *Escherichia coli* and the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* is also reported, and for the last microorganism, the metabolic model and the respective the metabolic fluxes analysis.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a cada uno de los miembros de mi comité tutorial y doy especial énfasis al Dr. Edgar Salgado y Dr. Noé Valentín, los cuales estuvieron en todo momento al pendiente de mi avance y comprensión de este proyecto. Sin su apoyo y comprensión jamás hubiese podido concluir esta etapa de crecimiento profesional.

Muchas gracias a aquellos alumnos de doctorado que fueron vitales en mi entendimiento “práctico” en el laboratorio y ahora son buenos amigos: Andy, Daniel y Octavio..... Gracias por todo.

Un muy especial agradecimiento a dos mujeres a las cuales admiro, profesional y personalmente, sin ellas este trabajo sencillamente no se hubiera realizado; una de ellas es mi amiga desde aquel semestre en Procesos de separación en la Facultad de Química... Dorian. Y Karla a la cual conocí desde hace varios años y seguramente debíamos volver a encontrarnos en UPIBI para saber la gran persona que eres. Muchas gracias por su tiempo, consejos, conocimiento compartido y amistad.

Agradecimientos infinitos para Anna, Adriana, Shantal y por supuesto a toda mi familia que siempre se han preocupado por mi bienestar, avance profesional y personal. Todo lo que tengo y he conseguido hasta este momento no hubiera sido posible sin ustedes. Un agradecimiento muy especial a MIS PADRES que son seres dignos de admiración, siempre han sido y serán mis héroes; nunca olvidaré la fuerza y entereza que ponen en cada cosa que hacen día a día.

Por supuesto, gracias a Orlando por ser incondicional. Muchas gracias por todo lo que me ayudaste durante la maestría y hacer tuyas mis preocupaciones; pero aún más importante, muchas gracias por estar presente en mi vida y ser parte fundamental de mi felicidad.

Seguramente tengo a muchas personas a las cuales agradecer y pido una disculpa por no hacerlo de manera particular, espero sepan que siempre les estaré muy agradecida.

Muchas gracias a la institución en la cual se llevó a cabo este proyecto UPIBI-IPN por haberme permitido desarrollar este trabajo y brindarme las herramientas necesarias para su progreso.

Finalmente, gracias a CONACyT por el apoyo económico que me aportó durante estos 2 años a través de la beca de Maestría y a la SIP a través de la Beca de Estímulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI)

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INDICE DE FIGURAS	xi
INDICE DE TABLAS	xiii
CAPÍTULO 1.	1
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	3
1.3. OBJETIVOS	4
1.3.1. Objetivo general.....	4
1.3.2. Objetivos específicos.....	4
CAPÍTULO 2.	5
MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
2.1. MATERIALES	5
2.1.1. Enzimas.....	5
2.1.3. Medios de cultivo	5
2.1.4. gBlock y primers	6
2.1.5. Plásmidos	7
2.2. MÉTODOS.....	11
2.2.1. Metodología general.....	11
2.2.2. Manipulación de <i>Escherichia coli</i>	11
2.2.3. Manipulación de <i>Chamydomonas reinhardtii</i>	25
2.2.4. Herramientas Bioinformaticas	28
2.2.5. Manipulación de <i>Chamydomonas reinhardtii</i> para muestras de cinéticas (técnicas analíticas)	30
2.2.5.1. Puesta en marcha de cinética para <i>C. reinhardtii</i>	30
2.2.5.2. Monitoreo de crecimiento celular	30
2.2.5.3. Cuantificación de biomasa por peso seco	31
2.2.5.4. Cuantificación de Proteína por el método del ácido bicinonínico (BCA)	31
2.2.5.5. Cuantificación de Clorofila	33
2.2.5.6. Cuantificación Carbohidratos por el método fenol-sulfúrico.....	34
2.2.5.7. Cuantificación Lípidos.....	36
2.2.5.8. Cuantificación Amonio	37

2.2.5.9. Cuantificación ADN y ARN	38
CAPÍTULO 3.	39
DISEÑO DE UN ANTICUERPO RECOMBINANTE DE CAMÉLIDO (NANO 1) Y SU EXPRESIÓN EN <i>Escherichia coli</i>	39
3.1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	39
3.1.1. Anticuerpos tetraméricos.....	39
3.1.2. Los nuevos anticuerpos: Nanocuerpos o Nanobodies	40
3.1.3. Expresión de proteínas heterólogas en <i>Escherichia coli</i>	42
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
3.2.1. Diseño del gen NanoVPHL1	43
3.2.2. Flujo de trabajo para el diseño del NanoVPHL1	44
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
3.3.1. Diseño del gBlock y selección de secuencia VHHL1	46
3.3.2. Modelado molecular del casete NanoVPHL1	48
3.3.3. Validación <i>in silico</i> del Modelado molecular del casete NanoVPHL1	51
3.3.4. Transformación y expresión del gen NanoVPHL1 en <i>Escherichia coli</i> con el vector pET28 b(+)	56
3.3.5. Extracción de proteína total soluble y purificación del conjunto de proteínas codificadas por NanoVPHL1 a partir de <i>Escherichia coli</i>	59
3.3.6. Conclusiones.....	62
CAPÍTULO 4.	64
EXPRESIÓN DE NANOVPHL1 EN <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	64
4.1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	64
4.1.1. Expresión de proteínas recombinantes en sistemas no bacterianos	64
4.1.2. La microalga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , una nueva fábrica.....	65
4.1.2.1. Particularidades del Cloroplasto de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	67
4.1.2.2. Producción de proteínas heterólogas en el cloroplasto de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	68
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	70
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	70
4.3.1. Transformación de los plásmidos p320 OP8 & OP9.....	70
4.3.2. Bombardear a <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> con el vector p320 OP8.....	73
4.3.3. Identificación de colonias transformadas de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> con el vector p320 OP8	75

4.3.4. Análisis de colonias transformadas de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> por Microscopia Confocal de Barrido Laser	78
4.3.5. Expresión de NanoVPHL1 en <i>C. reinhardtii</i>	80
4.4. Conclusiones.....	86
CAPÍTULO 5.	88
ANÁLISIS DE FLUJOS METABÓLICOS DURANTE LA PRODUCCIÓN DE NANOVPHL1 EN <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	88
5.1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	88
5.1.1. El avance de la ingeniería metabólica	88
5.1.2. Análisis De Flujos Metabólicos (MFA) y Análisis de Balance de Flujos (BFA)	89
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	95
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	96
5.3.1. Ajuste de datos con modelo de caja negra	96
5.3.2. Análisis de Flujos Metabólicos	100
5.3.3. Análisis de Rutas Bioquímicas	107
5.4. Conclusiones.....	110
CAPÍTULO 6.	111
ANEXOS	111
ANEXO I. SECUENCIAS VHH DE <i>Lama glama</i>	111
ANEXO II. EVALUACIÓN DE RESIDUOS DEL GRAFICO DE RAMACHANDRAN A PARTIR DE LA PLATAFORMA <i>RAMPAGE</i>	114
ANEXO III. EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE VALIDACIÓN 3D-1D.....	116
ANEXO IV. CURVA TIPO DE BSA POR MÉTODO DE BRADFORD.....	117
ANEXO V. CURVAS DE CALIBRACIÓN.....	118
CAPÍTULO 7.	121
BIBLIOGRAFÍA.....	121

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa del plásmido p320 OP9.	9
Figura 2. Mapa del plásmido pet28b(+)	10
Figura 3. Digestión de plásmidos p320 OP8, OP9, OP8N, OP9N, pET28 b(+)	13
Figura 4. Productos de ligación de vectores y el gen NanoVPHL1.	16
Figura 5. Concentraciones de curva tipo BSA. Concentración final de cada uno de los pozos para la curva tipo de BSA por Bradford.....	22
Figura 6. Representación general de un anticuerpo convencional (A) y un anticuerpo no convencional –camélido(B) (Muyldermans et al. 2009)	41
Figura 7. Diagrama de flujo para el diseño del Nanobody nombrado NanoVPHL1	44
Figura 8. Secuencia de a.a. de la cadena pesada variable en mAbs.	45
Figura 9. Alineamiento múltiple.	46
Figura 10. Secuencia consenso original y modificado	47
Figura 11. Secuencia del gen sintetizado para NanoVPHL1 y orden de los componentes del gen.	47
Figura 12. Modelo molecular de NanoVPHL1 y porcentaje de modelado	48
Figura 13. Modelado molecular de NanoVPHL1.	51
Figura 14. Gráfico de Ramachandran a partir de la plataforma SAVES.	53
Figura 15. Gráfico de Ramachandran a partir de la plataforma RAMPAGE	55
Figura 16. Digestión de pET28b(+)	56
Figura 17. Expresión del gen NanoVPHL1 en células de <i>E. coli</i> BL21.	57
Figura 18. Fluorescencia de células de <i>E.coli</i> BL21 transformada con pET28b.....	58
Figura 19. Secuencia del gen sintetizado para NL1 y orden de los componentes del gen.	59
Figura 20. Expresión de proteína total en <i>E. coli</i> BL21(DE3).	60
Figura 21. SDS-PAGE y Western Blot de la expresión de NanoVPHL1 en <i>E.coli</i> BL21.	62
Figura 22. Biofarmacéuticos producidos en <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	68
Figura 23. Electroforesis de digestión enzimática del vector p320 OP9 transformado con el gen NanoVPHL1.....	72
Figura 24. Digestión del vector p320 OP8 transformado con el gen NanoVPHL1.	73
Figura 25. Bombardeo de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> con plásmido p320 OP9. Placas después de una semana de ser bombardeadas. a), b), d) y e) bombardeadas con partículas de Tungsteno recubiertas con ADN plasmídico p320 OP9;c) Ctrl + bombardeo con partículas de Tungsteno recubierto de ADN plasmídico p320 OP3 y f) Ctrl (-) placa sin bombardear.	74
Figura 26. Bombardeo de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> con plásmido p320 OP8.	74
Figura 27. Líneas transformadas de <i>C.reinhardtii</i> con vector p320 OP8.....	75
Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) del producto de PCR de líneas transplásticas obtenidas con el vector p320 OP8.....	76
Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% (p/v) del producto de PCR de líneas transplásticas obtenidas con el vector p320 OP8.....	77
Figura 30. Micrografías de células de <i>C. reinhardtii</i> obtenidas por Microscopia Confocal de Barrido Laser.	80

Figura 31. Expresión de la proteína recombinante NanoVPHL1 en <i>C. reinhardtii</i>	81
Figura 32. Western blot de la proteína recombinante NanoVPHL1 en <i>C. reinhardtii</i>	81
Figura 33. Western blot de la purificación de la proteína recombinante NanoVPHL1 en <i>C. reinhardtii</i>	84
Figura 34. Composición de la Matriz Estequiométrica S.....	95
Figura 35. Sistema para cinéticas de <i>C. reinhardtii</i>	96
Figura 36. Ajuste de resultados para cinética de <i>C. reinhardtii</i> silvestre por medio de modelo de caja negra.....	98
Figura 37. Ajuste de resultados para cinética de <i>C. reinhardtii</i> transformada por medio de modelo de caja negra.....	99
Figura 38. Análisis de flujos metabólicos para la cepa silvestre de <i>C. reinhardtii</i> etapa de mixotrofia.....	103
Figura 39. Análisis de flujos metabólicos para la cepa silvestre de <i>C. reinhardtii</i> etapa de autotrofia.....	104
Figura 40. Análisis de flujos metabólicos para la cepa transformada de <i>C. reinhardtii</i> etapa de mixotrofia.....	105
Figura 41. Análisis de flujos metabólicos para la cepa transformada de <i>C. reinhardtii</i> etapa de autotrofia.....	106
Figura 42. Rendimientos de Proteína total/sustrato vs Proteína recombinante/sustrato en condiciones de mixotrofia cepa transformada de <i>C. reinhardtii</i>	108
Figura 43. Rendimientos de Proteína total/sustrato vs Proteína recombinante/sustrato en condiciones de autotrofia cepa transformada de <i>C. reinhardtii</i>	109
Figura 44. Curva tipo de BSA método de Bradford.....	117
Figura 45. Correlación entre Absorbancia vs. Peso seco de muestras a partir de los cultivos de <i>C. reinhardtii</i> silvestre.....	118
Figura 46. Curva tipo de BSA método de Bradford.....	118
Figura 47. Curva tipo de Carbohidratos.....	119
Figura 48. Curva tipo de Lípidos método Red-Nile.....	119
Figura 49. Curva tipo de Amonio.....	120

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sales para el medio de cultivo TAP.....	5
Tabla 2. Solución de fosfatos para el medio de cultivo TAP	6
Tabla 3. Primers empleados para la secuenciación de plásmidos y amplificar secuencias dentro de gblock para confirmación de colonias transformadas en <i>C. reinhardtii</i>	7
Tabla 4. Digestión de plásmidos p320 OP8, OP9, OP8N, OP9N, pET28 b(+) y casete de expresión NanoVPHL1.....	14
Tabla 5. Secuencias ligadas para insertar en <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	15
Tabla 6. Preparación para geles de poliacrilamida. Los geles se preparan al 15% y el volumen está calculado para hacer 2 geles.	23
Tabla 7. Componentes para llevar a cabo las reacciones de PCR con un volumen total de 25 μ L...	28
Tabla 8. Resumen de Tm, Text y número de ciclos utilizados para correr reacciones de PCR para los fragmentos VHHL1 y mCherry del gen NanoVPHL1	28
Tabla 9. Condiciones de cultivo para cinéticas de <i>C. reinhardtii</i> silvestre y transformada.....	30
Tabla 10. Comparación características de los sistemas de producción de proteínas recombinantes tradicionales con las de las microalgas (Rivera et al. 2011)(Rivera et al. 2011)	65
Tabla 11. Resumen de concentración de proteína de la purificación de <i>C. reinhardtii</i> . μ g/ μ L de proteína utilizados para realizar Western Blot de la purificación de proteína heteróloga a partir de la microalga y sus controles positivos a partir de E. coli BL21.....	82
Tabla 12. Resultados de velocidades y rendimientos ajustados para cinética de <i>C. reinhardtii</i> silvestre	99
Tabla 13. Resultados de velocidades y rendimientos ajustados para cinética de <i>C. reinhardtii</i> transformada.....	100
Tabla 14. Constitución de CHONSP de metabolitos acumulados	101
Tabla 15. Velocidades de flujo usadas para el cálculo de flujos metabólicos para la cepa silvestre en dos etapas de fermentación	101
Tabla 16. Velocidades de reacción usadas para el cálculo de flujos metabólicos para la cepa transformada en 2 etapas en dos etapas de fermentación	101
Tabla 17. Resultados Absorbancia curva tipo BSA.	117

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El análisis de flujos metabólicos (MFA) forma parte de las herramientas en la Ingeniería metabólica la cual ha sido de gran interés en los últimos 20 años. El AFM es hoy de gran utilidad en el área de biología de sistemas pero con el avance de la tecnología y conocimiento se han desarrollado nuevas metodologías tales como: Análisis de balance de flujos (BFA) y el análisis de rutas metabólicas (MPA), cada una de ellas se utiliza de acuerdo al objetivo del análisis y será de acuerdo a esta la funcionalidad de una u otra herramienta. Para poder implementar cualquiera de estas metodologías cuantitativas es necesario contar con un modelo estequiométrico el cual describe la bioquímica del microorganismo.

Algunas de estas herramientas han sido aplicadas en distintos organismos tales como: bacterias *Pseudomonas aeruginosa* (R et al. 2006), levaduras tal como *Saccharomyces cerevisiae* (Nissen et al. 1997), células eucariotas CHO (Niklas et al. 2010), microalgas tal es el caso de *Chlamydomonas reinhardtii* (Boyle & Morgan 2009), entre otras. Cada uno de estos sistemas es de gran valor dentro de la investigación y tiene características particulares de entre todos los microorganismos existentes. Uno de ellos que ha mostrado gran auge en los últimos años han sido las microalgas y especialmente *Chlamydomonas reinhardtii* la cual es una microalga verde eucarionte que ha sido empleada por casi sesenta años como modelo en estudios fisiológicos como la biosíntesis de metabolitos, la biogénesis del cloroplasto y la función de los flagelos. Una de sus características principales es su único cloroplasto, el cual ocupa la mayor parte de su espacio intracelular (40%), tiene forma de copa y posee aproximadamente 80 copias de su genoma. Algunas de las particularidades de las algas y por lo cual ha ido en aumento su estudio es debido a que son eficientes en la producción de proteínas complejas y cuentan con la maquinaria necesaria para plegar y ensamblar proteínas complejas de múltiples componentes (Mayfield et al. 2003).

Una proteína compleja y de gran interés biofarmacéutico son los anticuerpos y tomando en cuenta que aproximadamente el 30% de los fármacos en desarrollo son biológicos y que la mayor parte de estos son anticuerpos usados como tratamiento para las enfermedades inflamatorias, el cáncer y las alergias este mercado se ha vuelto de gran interés para todos los campos (Steeland et al. 2016). Dentro del área de los anticuerpos podemos encontrar un nuevo tipo de ellos llamado “nanobodies” los cuales son el fragmento capaz de llevar a cabo la unión a antígeno (VHH) y forman parte de los anticuerpos de cadena pesada o heavy chain antibodies (HCAbs) encontrados en el suero de los camélidos. Los VHHs son las moléculas más pequeñas conocidas en la naturaleza capaces de reconocer a otra y ser capaces de neutralizarla (Minaeian et al. 2012), algunos ejemplos de esta capacidad se ha demostrado con moléculas del polipéptido más venenoso a partir del veneno del escorpión (Abderrazek et al. 2009), el virus de la Influenza H5N1 (Ibañez et al. 2011), la proteína mayor de la cápside L1 del virus del papiloma humano (Minaeian et al. 2012), entre otros. Con un prometedor antecedente como este y la preocupación acerca de que mujeres <20 años de edad fueron más a menudo infectadas con el VPH, y la vacuna contra el VPH tetravalente (tipos 16, 18, 6 y 11), disponible actualmente en México no confiere protección frente a un subconjunto de los genotipos de VPH identificados en un estudio (58, 31, 70 y 35) (Ortega-cervantes et al. 2016), en este trabajo buscamos diseñar una fragmento VHH contra la proteína mayor de la cápside L1 del VPH y analizar la expresión de esta proteína en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* haciendo uso de herramientas como MFA y MPA de tal suerte que podamos vislumbrar alguna ruta metabólica la cual modifique satisfactoriamente la expresión de nuestra proteína heteróloga.

1.2. JUSTIFICACIÓN

El cálculo de flujos metabólicos es una herramienta que permite organizar el conocimiento de una red de reacciones bioquímicas de un microorganismo, es fundamental y practica sobre todo cuando se habla de la producción de proteínas heterólogas. A pesar de la importancia de dichas biomoléculas, la bibliografía sobre este tema es reducido. Como contribución a este campo se plantea estudiar como sistema biológico a *Chlamydomonas reinhardtii* y como proteínas heteróloga un nanocuerpo sintético (nanobody) contra el Virus del Papiloma Humano (VPH). Se desea investigar si durante la producción de dicha proteína los flujos de aminoácidos se ven afectados y si esto conduce a una distribución de flujos diferente; por ejemplo, si al aumentar los flujos de aminoácidos incrementa la producción de proteínas. El análisis podría permitir optimizar la producción de proteínas heterólogas, una vez entendidos los flujos metabólicos de *C. reinhardtii* o al menos algunos de ellos, se podrían incidir en el más prometedor o el más relacionado con todos los demás flujos y de este modo podríamos suponer que al cambiar uno, todos los demás se modificarán.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo general

Analizar los flujos metabólicos de *Chlamydomonas reinhardtii* durante la producción de un nanocuerpo (nanobody) contra la proteína mayor de la cápside L1 del virus del papiloma humano (VPH)

1.3.2. Objetivos específicos

- Diseñar y construir el vector de transformación que contenga el nanocuerpo contra el virus del papiloma humano y los elementos necesarios para su transcripción y traducción en el cloroplasto de *C. reinhardtii*
- Transformar genéticamente el genoma del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* por medio de biolística para obtener líneas transplastómicas
- Establecer un modelo metabólico de *Chlamydomonas reinhardtii* usando la información bioquímica y genética reportada en bases de datos
- Realizar un Análisis de Rutas Metabólicas para la evaluación teórica del efecto en la expresión de la proteína heteróloga sobre el metabolismo
- Llevar a cabo el Análisis de Flujos Metabólicos para la cepa nativa y modificada de *C. reinhardtii* para identificar experimentalmente el cambio de metabolismo

CAPÍTULO 2.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1. Enzimas

Las enzimas utilizadas para los diferentes protocolos realizados en este trabajo fueron: Sal I, Nco I y su respectivo buffer 3.1 10X de la marca New England Biolabs[®] Inc. Para realizar ligación del inserto y plásmido se utilizó la T4 DNA ligasa y el buffer 10X proveniente de Thermo Scientific. También se utilizó la enzima Taq Polymerase para realizar PCR's de la marca Thermo Scientific. Por último, se utilizó RNAsa A de la marca New England Biolabs

2.1.3. Medios de cultivo

Se utilizan principalmente dos medios de cultivo, uno para la microalga *C. reinhardtii* y otro para la bacteria *E. coli*. El cultivo para las cepas de *C. reinhardtii* modificadas para el análisis de los nanocuerpos se llevará a cabo en medio TAP (Tris–acetate–phosphate). Este es el medio más utilizado para trabajar con *C.reinhardtii*. TAP es un medio bien amortiguado y relativamente bajo en fosfatos, esto lo hace el mejor medio para estudios que requieren claridad óptica en el medio. El medio TAP contiene 17.4 mM de acetato en su fórmula original. Se creció la microalga a 27°C, en periodos 12:12 (luz:oscuridad) con aproximadamente 15000 lux y agitación rotatoria de 100-150 r.p.m.

Solución stock 1: Sales TAP

Tabla 1. Sales para el medio de cultivo TAP

Reactivos	Gramos (g)
NH ₄ Cl	15.0
MgSO ₄ * 7H ₂ O	4.0
CaCl ₂ * 2H ₂ O	2.0
Mezclar en 1 L de agua	

Solución stock 2: Solución de fosfatos

Tabla 2. Solución de fosfatos para el medio de cultivo TAP

Reactivo	Gramos (g)
K ₂ HPO ₄	28.8
KH ₂ PO ₄	14.4
Mezclar en 100 mL de agua	

Para obtener el medio TAP final mezclar: 2.42 g de TRIS, 25 mL de solución stock 1, 0.375 mL de la solución stock 2, 1.0 mL de elementos traza de Hutner, 1.0 mL de ácido acético glacial en 1 L de agua. Si se requiere el medio sólido, sólo se agregan de 8-15 g de agar por litro y se esteriliza.

La bacteria *E. coli* fue sembrada en medio LB para lo cual se utilizó 10g/L de triptona, 5g/L de extracto de levadura y 10 g/L de NaCl y se utiliza agua destilada para llevarlo al volumen deseado. Para medio sólido se adicionan 8g/L de agar, se esteriliza en autoclave por 15 min a 121°C, 15 psi.

2.1.4. gBlock y primers

Se envió a sintetizar la secuencia del NanoVPHL1 previamente diseñado en un formato diferente a un gen sintético, este formato es *gBlock gene fragments* son bloques genómicos de cadena doble y secuenciados que se ensamblan utilizando las mismas químicas utilizadas para fabricar oligonucleótidos Ultramer® de mayor calidad. Los fragmentos de genes se envían rápidamente para la construcción o modificación de genes rápidos y fáciles, o para el uso en la mayoría de las aplicaciones que requieren ADN de doble hebra de alta calidad. Son de bajo costo en comparación con otras construcciones de genes sintéticos. Una diferencia notable de los gBlocks con respecto a los genes sintéticos MiniGene™ es que estos últimos se suministran en vectores de convenientes y los gBlocks no se encuentran dentro de ningún vector (como producto de PCR). El casete sintetizado se encuentra flanqueado en el extremo 5' por la enzima de restricción NcoI y en el extremo 3' por Sall. Así mismo, se diseñaron y enviaron para su síntesis distintos primers para poder amplificar distintas regiones pertenecientes al gBlock para poder verificar su inserción dentro del cloroplasto de *C. reinhardtii*. A continuación, se muestra una tabla 3 con el nombre y secuencia de los primers:

Tabla 3. Primers empleados para la secuenciación de plásmidos y amplificar secuencias dentro de gblock para confirmación de colonias transformadas en *C. reinhardtii*

Nombre	Secuencia	Característica
NVDF186	CTACGAGCCATGGCAGAG	Forward, amplificar gblock completo, incluye sitios de restricción
NVDF187	CTGGAAGTCGACTCTACGTG	Reverse, amplificar gblock completo, incluye sitios de restricción
NVDF188	ATGGCAGAGGTTTCAGTTA	Forward, amplificar gblock completo, NO incluye sitios de restricción
NVDF189	TCTACGTGCACCAAGCC	Reverse, amplificar gblock completo, NO incluye sitios de restricción
NVDF190	ACTTGAAACTGTTACTTGAG	Reverse, amplificar solo nanobody
NVDF191	GTATCTAAAGGTGAAGAGGA	Forward, amplificar solo mCherry
NVDF192	TTTGTATAACTCATCCATTCC	Reverse, amplificar solo mCherry
BlockBWbis	CTGGAA	Reverse, amplificar gblock completo, incluye sitios de restricción incluye codón STOP.
LCT37	GGTACCTCGAGTCGACGGATCCA CGTAAGCGCATTCTTACAATC	Reverse, 3rbcL
qfJABC8	CGGAAACAGCGTTTTAGAGC	Forward , amplifica la región que codifica para el gen AphA6

2.1.5. Plásmidos

Se utilizaron 2 vectores para *C. reinhardtii* que fueron previamente construidos dentro del grupo de trabajo de Biotecnología Molecular de UPIBI-IPN y se trabajó con sólo un vector para poder introducir el gBlock en *E. coli* el cual fue pET28b(+):

- a) Plásmido modificado p320 OP8 y OP9:** Estos plásmidos se construyeron en el grupo de trabajo de de UPIBI, es una modificación del plásmido p-322, el cual es parte de una librería genómica de cloroplasto de *C. reinhardtii*. Al p-320 se le eliminó un sitio BamHI remanente del sitio

múltiple de clonación de pBlueScript KS+ en el cual se construyó p-322 mediante digestión con XbaI y EcoRI, rasurado de extremos cohesivos y posteriormente se ligó de nuevo. Contiene un fragmento de ADN del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* cepa CC-2534 DCMU4 er-u-1^a de 5.5 kpb delimitado por los sitios de restricción EcoRI y XhoI. Dicho fragmento contiene la secuencia del intrón 4 y exón 5 del gen de psbA, la secuencia completa del gen 5S rARN y parte de la secuencia del extremo 5' del gen 23S ARN. Existe una mutación en la secuencia del exón 5 del gen de psbA, que causa el cambio del aminoácido 264 (Ser→Ala) confiriendo resistencia a DCMU (diclofenildimetilrea), además existe otra mutación puntual en la base 2622 del gen 23S ARN (C→T) que confiere la resistencia a eritromicina. También contiene un gen que confiere resistencia a ampicilina en cepas de *E.coli*. La diferencia entre p320 OP8 y OP9 radica en la región intergénica que esta presente en cada vector (OP8 y OP9); dicha secuencia se encuentra ubicada entre la región promotora para el gen *rbcl* y el gen *AphA6* el cual confiere resistencia al antibiótico kanamicina (Figura 1).

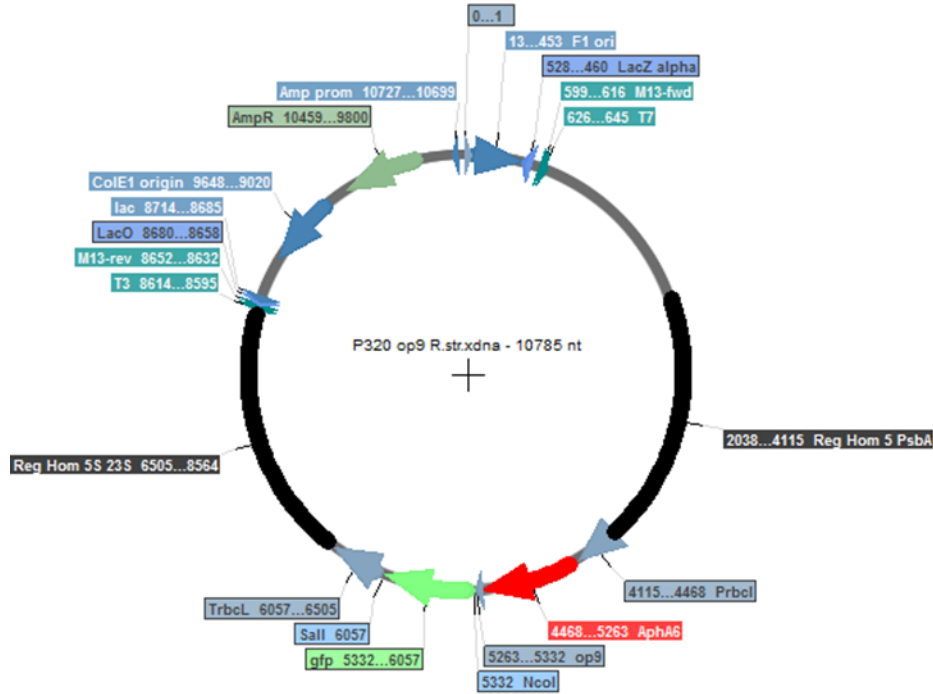


Figura 1. Mapa del plásmido p320 OP9.

Construcción original del plásmido p320 que cuenta con la región intergénica OP9, el vector original muestra un espacio para la secuencia para la proteína fluorescente GFP en donde se introdujo el gen de este trabajo NanoVPHL1.

b) Se utilizó un vector para poder introducir el gblock en *E. coli* el cual fue pET28b(+) (Novagen, EU): Este es un vector de 5368 pb desarrollado para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*, usando el promotor fuerte de bacteriófago T7 que es inducido por la RNA polimerasa de la célula hospedera. La polimerasa RNA T7 es muy selectiva y activa casi en su totalidad los recursos de la célula para convertirlos en la expresión del gen objetivo. Los sistemas de expresión basados en la ARN polimerasa del bacteriófago T7 ofrecen como mayor ventaja el que una vez inducido el promotor T7, la maquinaria de transcripción de la célula huésped no puede competir con la RNA polimerasa del bacteriófago y casi toda la transcripción de la célula tiene lugar a partir del promotor T7. El producto deseado puede comprender más de un 50% de la proteína celular total en pocas horas después de la inducción. Otro beneficio importante de este sistema es que permite mantener silenciados los genes transcripcionales diana en el estado no inducido. pET28b incluye una cola de

histidinas y la secuencia de reconocimiento de la trombina en el extremo N-terminal de la región de expresión como se puede apreciar en la figura 2. La inserción de dichos aminoácidos facilita la detección y posterior purificación de la proteína sobreexpresada. Una vez establecido en el hospedero, los plásmidos son transferidos dentro de células de expresión que contienen una copia cromosomal del gen de la polimerasa ARN T7 bajo el control de lacUV5, y la expresión es inducida por adición de IPTG.

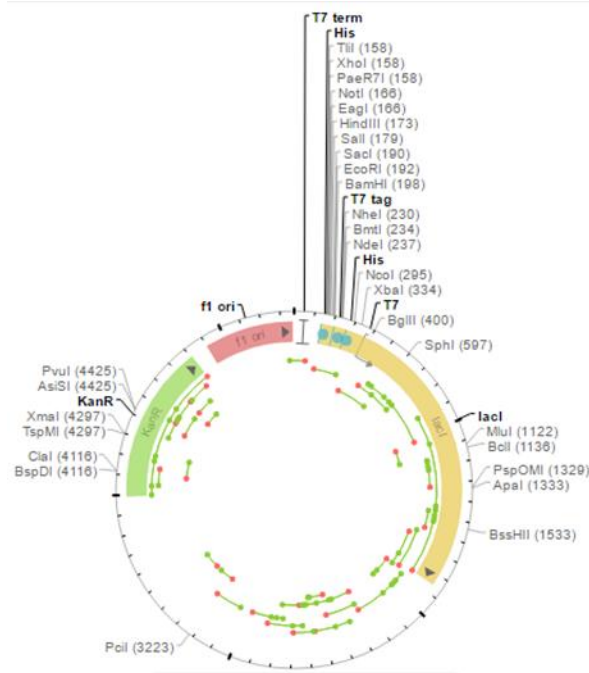
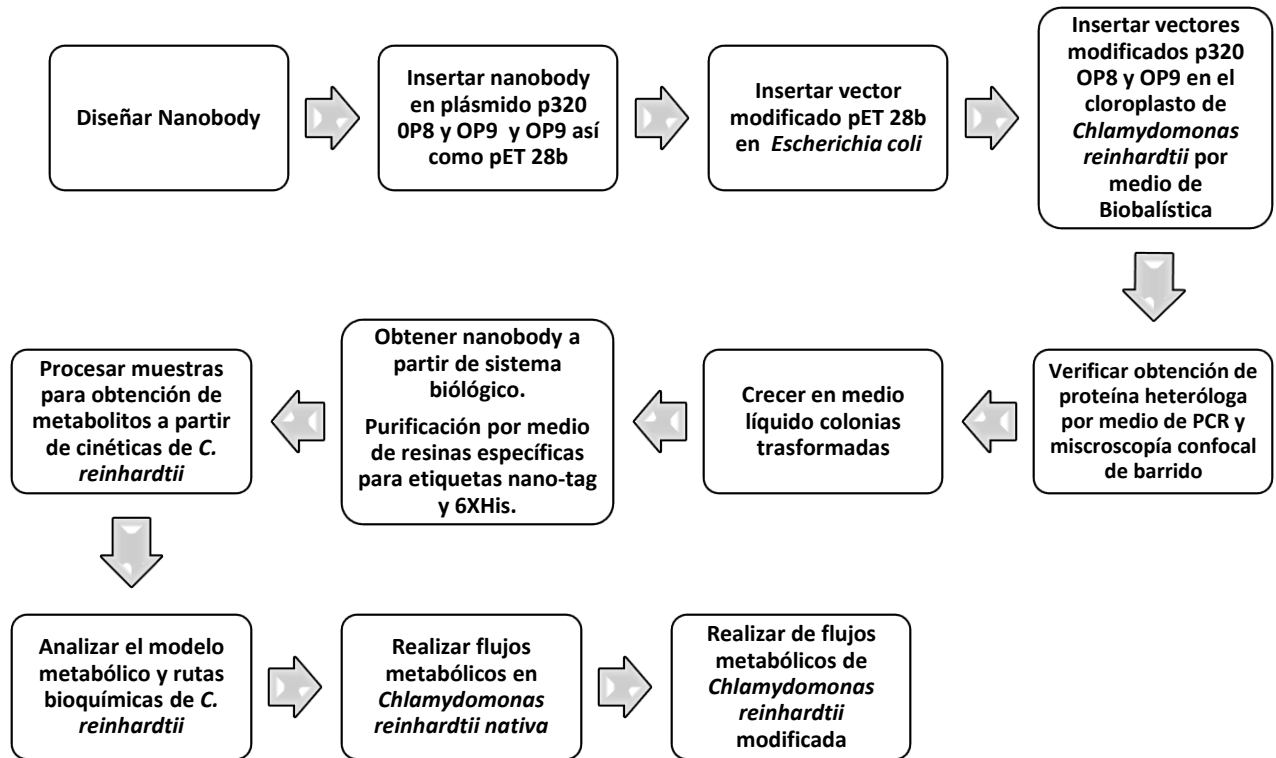


Figura 2. Mapa del plásmido pet28b(+)

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Metodología general

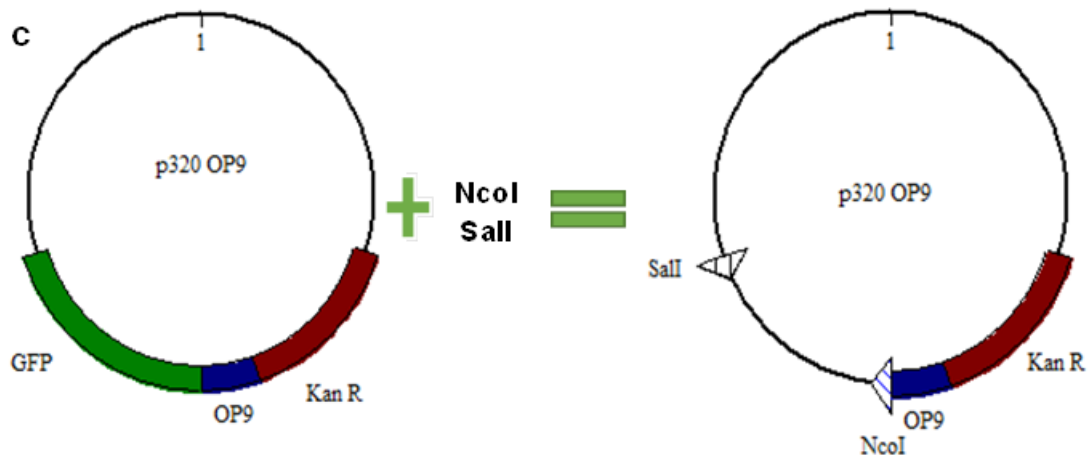
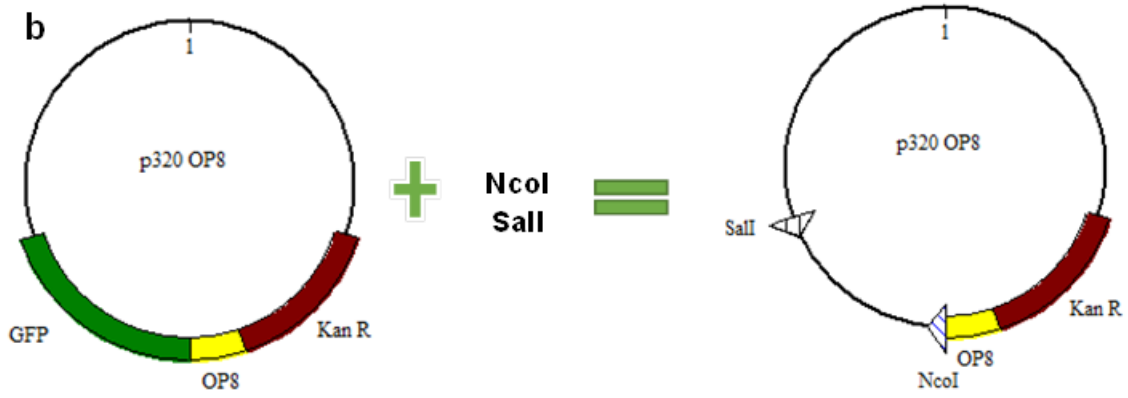
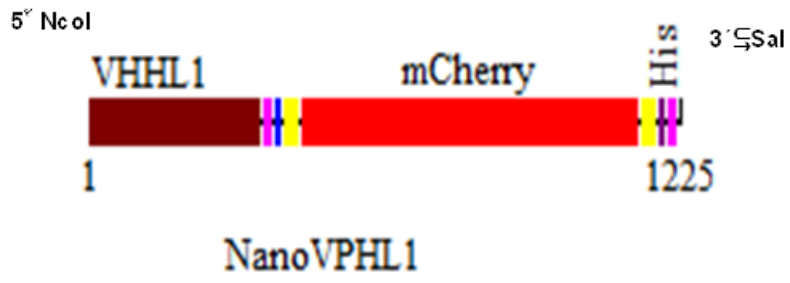


2.2.2. Manipulación de *Escherichia coli*

2.2.2.1. Digestión de los vectores p320 OP8, p320 OP9, pET28b(+), OP9N, OP8N y el casete de expresión NanoVPHL1

La reacción de digestión se llevó a cabo como se muestra en la tabla 4 y figura 3, se colocan las cantidades en tubos de 200 μ L y se incuban por 24 horas a 37°C. Ya que el primer vector que fue transformado fue p320 OP9 y se llamó OP9N, se partió de este último (OP9N) para obtener el casete NanoVPHL1 e insertarse en el segundo vector transformado que fue p320 OP8 y se llamó OP8N y para transformar pet28b(+) se digirió OP8N.

a



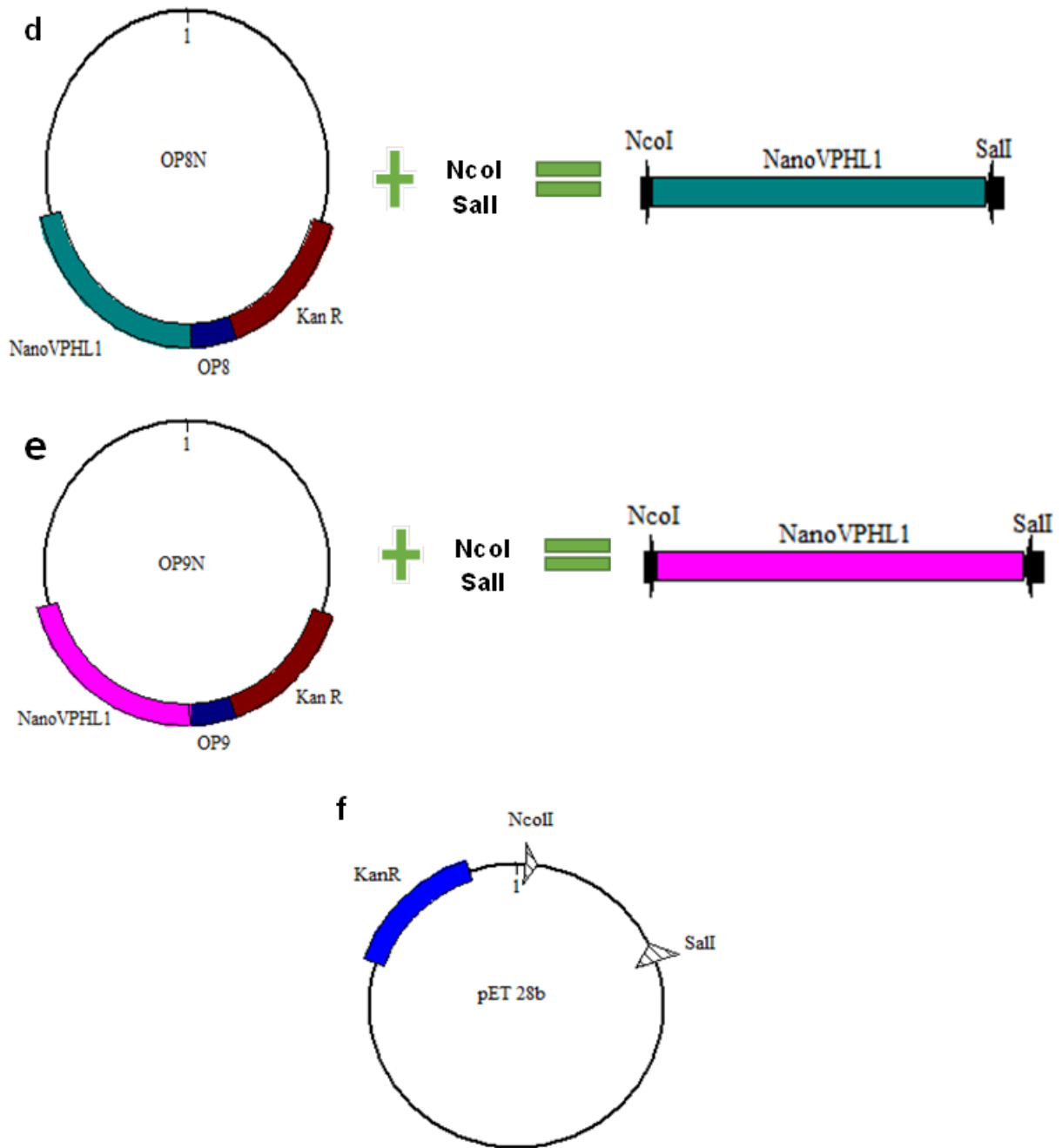


Figura 3. Digestión de plásmidos p320 OP8, OP9, OP8N, OP9N, pET28 b(+) y casete de expresión NanoVPHL1.

En las imagen a) gen NanoVPHL1 digerido; b y c) vectores p320 OP8 y OP9 en donde con la digestión interesó extraer el gen de GFP; d y e) vectores p320 OP8N y OP9N en donde con la digestión se extrajo el gen NanoVPHL1 y f) digestión del vector pET28 b.

Tabla 4. Digestión de plásmidos p320 OP8, OP9, OP8N, OP9N, pET28 b(+) y casete de expresión NanoVPHL1

Volumen del reactivo (µL)	Secuencias a digerir					
	Plásmido p320 OP9	Plásmido p320 OP8	Casete de expresión NanoVPHL1	Plásmido OP9N	Plásmido pET28b(+)	Plásmido OP8N
Enzima de restricción NcoI [10 U/µL]	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	0.5
Enzima de restricción Sall [10 U/µL]	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	0.5
Buffer 10X (3.1 NEB)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Volumen de Vector o inserto	3.0	5.0	25.0	10.0	3.0	10.0
H ₂ O estéril	14	11.0	22.0	6.0	14.0	7.0
Volumen final	20.0	20.0	50.0	20.0	20.0	20.0

2.2.2.2. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Los geles que se prepararon fueron al 1% y 1.5% para observar los fragmentos de ADN correspondientes a plásmidos completos y para observar la fracción VHHL1 que se encuentra al inicio del gen sintetizado NanoVPHL1, respectivamente. Para el gel al 1% se pesaron 0.3g de agarosa y se disuelve en 30 mL de TBE 0.5X (para 1 L de TBE 5X pesar 54g de TRIS, 27.5g de ácido bórico y añadir 20 mL de EDTA 0.5 M a pH 8.0 y después se midieron 100mL de TBE 5X y disolvieron en 900mL de H₂O estéril para 1L de TBE 0.5X) y para el gel a 1.5% se pesó 0.5g de agarosa y se disolvió en 30mL de buffer, se calentó la solución de 30-60 seg en horno de microondas hasta no observar grumos. Se decantó en una canastilla para geles de agarosa. Una vez solidificada la agarosa se pasó a una cámara de electroforesis la cual se lleva hasta la marca indicada o hasta que cubra la canastilla con la agarosa con buffer TBE 0.5X. Las muestras se prepararon con 2 µL de buffer de carga (el cual contiene rojo Texas) y el volumen de la muestra, se mezcló bien y se depositó en los pozos del gel. Los geles se corrieron de 80-95V

por aproximadamente 45 minutos. El tamaño de los fragmentos de ADN se pudo estimar con los marcadores de peso molecular de 1kb y 100bp (ThermoScientific)

2.2.2.3. Corte y purificación de bandas con fragmentos de ADN objetivo en gel de Agarosa

El gel que se preparó para la purificación de bandas objetivo se realiza igual que como se describe en el punto 2.2.2.2., la única diferencia es que antes de realizar el vaciado en la canastilla se le colocaron 0.5 µL de SyBR Green, se mezcló y se continuó el protocolo. Al finalizar el corrimiento del gel este se colocó en el equipo Safe Imager™ Blue-Light Transilluminator y se cortó el fragmento de ADN objetivo con una navaja de bisturí, se debe de cortar la menor cantidad de agarosa extra de la banda y se guardó en un tubo de 1.5 mL previamente pesado para que por diferencia se obtuviera el peso de la banda. La purificación de las bandas de gel se llevó a cabo con el kit *Wizard® SV gel and PCR clean-up system* de la marca Promega y se siguieron las instrucciones del protocolo rápido o “Quick protocol

2.2.2.4. Ligación de fragmentos de ADN

La reacción de ligación se llevó a cabo con los siguientes volúmenes y muestras (tabla 5 y figura 4). Se incubaron las ligaciones a 4°C por al menos 24 horas

Tabla 5. Secuencias ligadas para insertar en *Chlamydomonas reinhardtii*

Volumen del reactivo (µL)	Secuencias a ligar		
	Plásmido p320 OP9 + NanoVPHL1	Plásmido p320 OP8 + NanoVPHL1(digerido de vector OP9N)	Plásmido pET28b(+) + NanoVPHL1(digerido de vector OP8N)
Enzima T4 Ligasa	1.0	1.0	1.0
Buffer 10X	2.0	2.0	20
Volumen de vector digerido	2.0	3.0	3.0
Volumen de inserto digerido(NanoVPHL1)	8.0	12.0	12.0
H ₂ O estéril	14	2.0	2.0
Volumen final	20.0	20.0	20.0

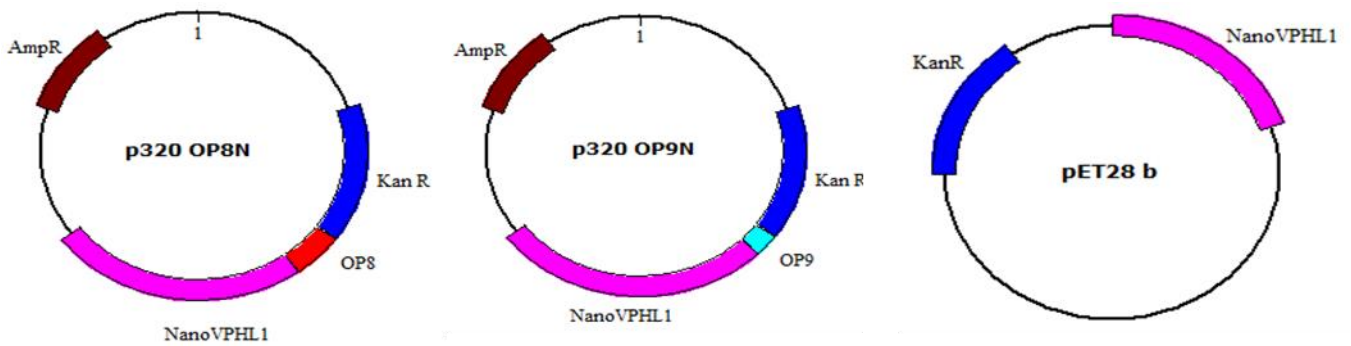


Figura 4. Productos de ligación de vectores y el gen NanoVPHL1.

. Vectores esperados después de la ligación de los vectores p320 OP8, p320 OP9 y pET28 b con el gen NanoVPHL1

2.2.2.5. Elaboración de células calcio-competentes de *Escherichia coli* cepas TOP10 y BL21

Se picó una colonia de *E. coli* y se inoculó en un tubo de ensaye que contenía 5 mL de medio LB y se incubó toda la noche en agitación (100-120 rpm) a 37°C. Pasado el tiempo, se transfirió 1 mL del tubo a un matraz que contenía 50 mL de medio LB y se dejó en agitación de 100-120 rpm por 4-5 horas (DO_{600nm} 1.2-1.4). Después se colocó en hielo el matraz y se mantuvo por 15 minutos y se transfirieron los 50 mL a un tubo Falcon para centrifugarlo a 4000rpm por 10 min a 4°C; al terminar el tiempo, se decanta el medio. Se resuspendió en 20 mL de una solución estéril de $CaCl_2$ 0.1M mediante pipeteo suave, se dejó en hielo por 15 minutos y se centrifugó nuevamente a 4000rpm por 10 min a 4°C, se decantó el medio y este último paso se repite pero con un volumen de 10 y 7.5 mL de $CaCl_2$ 0.1M. Al terminar con el último lavado, se decantó el medio y el botón se resuspendió en 2 mL de $CaCl_2$ 0.1M/15% de glicerol estéril y de este volumen se hicieron alícuotas de 50 μ L en tubos de 1.5 mL. Finalmente, se congelaron los tubos a -80°C.

2.2.2.6. Transformación de *Escherichia coli* cepa TOP10 & BL21 por choque térmico

Con la previa preparación de células competentes de *E. coli* que tienen un volumen de 50 μ L se les agregó 5 μ L de la reacción de ligación (si la reacción proviene de un producto de lisis alcalina, mini-prep o maxi-prep con 1-2 μ L es suficiente) y los

tubos se colocaron en hielo por 5 minutos pasado el tiempo, se colocaron en baño maria o termoblock a una temperatura de 42-45°C por 30 segundos y después de les agregó 300 µL de medio LB, para promover el crecimiento de las células. Se incubaron los tubos por al menos 1 hora a 37°C en agitación. Cuando el tiempo de incubación finalizó, se dio un “spin” a los tubos y se decantó el sobrenadante. Con lo poco que sobró del medio, se resuspendieron las células y se plaqueó en medio LB con el antibiótico requerido (depende del plásmido utilizado es el antibiótico, para la familia p320 se utiliza Ampicilina 100 µg/ mL y para la familia pET28b(+); kanamicina 50 µg/ mL) y las placas fueron incubadas toda la noche a 37°C. Después de la incubación, se observó crecimiento de colonias de las cuales se eligió una de ellas y se inoculó en un tubo con 5 mL de medio LB y se le agregó el antibiótico requerido.

2.2.2.7. Extracción de ADN plasmídico de *Escherichia coli* por Lisis Alcalina

A partir del tubo que se obtuvo al final del protocolo descrito en el punto 2.2.2.6 se centrifugaron 5 mL a 12 000 G por 30 segundos y se removió la mayor cantidad del sobrenadante. Después se adicionaron 100 µL de la solución de lisis I la cual debe estar refrigerada a 4°C (50 mM glucosa, 25mM Tris-HCl pH:8, 10 mM EDTA pH:8 y RNAsa) y se mezcló por medio de vortex hasta disolver la pastilla; se agregaron 200 µL de la solución de lisis II recién preparada (0.2 N NaOH y 1% w/v SDS) y se mezcló invirtiendo el tubo con cuidado, después se incubó por 5 minutos en hielo. Pasado el tiempo, se le adicionaron 150 µL de solución III fría (para preparar 100 mL se mezclan 60 mL de una solución de acetato de potasio 5M, 11.5 mL de ácido acético glacial y 28.5 mL de H₂O estéril) y se mezcló invirtiendo el tubo de modo suave y se incubó por otros 5 minutos en hielo; después, se centrifugó a 13 000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se agregan 2 volúmenes de EtOH absoluto, se mezcló invirtiendo el tubo suavemente, se incubó por 5 minutos en hielo, se centrifugó a 13 000 rpm por 10 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante. Este último paso se repitió pero ahora con EtOH al 70%, se centrifugó a 13 000 rpm por 5 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante. Se permitió que el remanente de EtOH se evaporara y se resuspendió la pastilla en 25-50 µL de agua milli-Q estéril

con RNAsa (a 1 mL de H₂O se le agrega 1 µL de RNAsa) y se guardaron las muestras a -20°C.

2.2.2.8. Extracción de ADN plasmídico de *Escherichia coli* por Miniprep

Una vez que se corrió el gel de Agarosa para verificar la presencia del gen de interés NanoVPHL1, se volvió a transformar *E. coli* como se marca en el protocolo 2.2.2.6, con el producto de lisis alcalina. Una vez que se tiene un tubo con 5 mL suplementado con Ampicilina (100 µg/mL) y se procedió a la obtención del ADN plasmídico por medio del Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de la marca Promega y se siguieron las instrucciones del protocolo rápido o “Quick protocol” de acuerdo a las instrucciones del manual

2.2.2.9. Transformación de cepa BL21 de *E. coli* con pET28b(+)

Con la previa preparación de células competentes de *E. coli* que tienen un volumen de 50 µL se les agregó 2 µL del mini-prep de una de las colonias obtenidas a partir de la transformación de *E. coli* TOP10 con el vector pET28b(+) con el inserto de NanoVPHL1(sección 2.2.2.6.), los tubos se colocaron en hielo por 5 minutos; pasado el tiempo, se colocaron en agua a una temperatura de 42-45°C por 30 segundos y después de les agregó 300 µL de medio LB, para promover el crecimiento de las células. Se incubaron los tubos por al menos 1 hora a 37°C en agitación. Cuando el tiempo de incubación finalizó, se dio un spin a los tubos y se decantó el sobrenadante. Con lo poco que sobró del medio, se resuspendieron las células y se plaqueó en medio LB con el antibiótico kanamicina (50 µg/mL) y las placas fueron incubadas toda la noche a 37°C. Después de la incubación, se observó crecimiento de colonias de las cuales se eligió una de ellas y se inoculó en un tubo con 5 mL de medio LB y se le agregan 5 µL de kanamicina (50 µg/ mL).

2.2.2.10. Fermentación de *E. coli* transformada con pET28b(+) con el inserto de NanoVPHL1

A partir del tubo de la sección anterior (2.2.2.9) el cual se incubó por 12-14 h a 37°C con agitación vigorosa. El volumen completo (5 mL) del tubo se inocularon en un matraz de 500 mL con 250 mL de medio LB y 25 µg de kanamicina (50

µg/mL), se incubó a 37°C con agitación durante 16 horas, a partir de ese momento el cultivo fue inducido IPTG 0.4 mM. Posteriormente, el cultivo se dejó crecer aproximadamente 10 horas post-inducción y se tomó una muestra de 1 mL cada dos horas y se trató como se indica la sección 2.2.2.11 inciso a.

2.2.2.11. Purificación de proteína heteróloga por medio de sistema Ni-NTA

La purificación de la proteína recombinante consta de tres pasos:

a) Lisis celular de *E.coli*

Una vez concluida la fermentación, el cultivo celular que fue de 250 mL, se centrifugó a 6000 rpm durante 15 minutos a 4°C en tubos de 50 mL. El sedimento bacteriano se resuspendió en 5 mL de Buffer de Lavado 1 (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0). La mezcla se sonicó (Branson 2500) durante 4 horas a 4°C. El lisado celular fue centrifugado a 6000 rpm, 4°C por 15 minutos (Lamla & Erdmann 2004)modificado. La fracción soluble fue colectada y conservada a -70°C hasta su concentración.

b) Concentración de la proteína recombinante NanoVPHL1

La fracción soluble obtenida en el inciso anterior (a) se pasó a un proceso unitario de ultrafiltración. Se utilizó el *Kit Amicon® Ultra- 0.5 Centrifugal Filter Devices (Ultracel® - 30 K)*. La membrana con corte de 30 kDa se insertó en un microtubo de 2 mL, enseguida se adicionaron 500 µL de la fracción soluble en la membrana. y fue centrifugado a 13,400 rpm durante 10 minutos o hasta que quedarán 50 µL en la membrana. Para recuperar el permeado, se colocó la membrana de manera invertida en un tubo nuevo y se centrifugó a 3,000 rpm por 1 min.

c) Uso del kit HisPur™ Ni-NTA Spin Columns en condiciones nativas

El primer paso es la preparación de la muestra, para lo cual un volumen de 100 μL del permeado obtenido en el inciso a (Lisis celular) se mezclaron con 300 μL de Buffer de equilibrio (20 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl , 10 mM Imidazol, pH 7.4). El segundo paso es preparar la columna la parte inferior de la columna se removió suavemente y se colocó en un microtubo de 2 mL, después se centrifugó a 3,000 rpm durante 1 min para remover el buffer almacenado. La columna se equilibró con 400 μL del buffer de equilibrio y se centrifugó a 3,000 rpm por 1 min. La columna se tapó en la parte inferior y la muestra previamente preparada se vertió sobre la resina de la columna y se mezcló durante 30 min. Posteriormente, se quitó el tapón, la columna se introdujo en un microtubo nuevo de 2 mL y se centrifugó a 3,000 rpm durante 1 min para recolectar la fracción que no fue adsorbida (FT). La columna se lavó con 400 μL de Buffer de Lavado (20 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl , 25 mM Imidazol, pH 7.4) para remover uniones inespecíficas de las proteínas unidas a la resina. La columna se centrifugó a 3,000 rpm durante 1 min y se colectó la fracción en un microtubo (L1). La columna se lavó dos veces más y cada fracción se colectó en un microtubo (L2, L3). En seguida la proteína se eluyó con 200 μL de Buffer del Elución (20 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl , 250 mM Imidazol, pH 7.4) y se colectó la fracción en un microtubo (E1). La columna se eluyó dos veces más y cada fracción se colecta en un microtubo (E2, E3). Las muestras se tomaron en cada etapa para monitorear la retención y elución de la proteína por SDS-PAGE (Sección 2.2.2.14).

2.2.2.12. Extracción de la proteína total de *E. coli*

Durante la cinética de crecimiento de *E. coli* se tomaron muestras para el análisis en SDS-PAGE, para esto se tomó 1 mL de muestra cada 2 horas durante 10 horas y se colocaron en un microtubo estéril de 1.5 mL. Las células se centrifugaron a 13400 rpm por 6 min, posteriormente se retiró el sobrenadante. La pastilla fue resuspendida en buffer de carga (7 mL de 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 (se utilizó 60.55 g de Trizma base

en 400 mL de agua desionizada), 3.0 g de glicerol, 1 g de SDS, 0.6 mL de 2- β -mercaptoetanol y 1.2 mg de azul de bromofenol.), seguida de un calentamiento a 95°C por 10 min. Se tomaron 25 μ L para analizar en SDS-PAGE (Sección 2.2.1.14). El crecimiento de las cepas de *E. coli* fue medido por DO₆₀₀, la concentración de proteína en cada carril fue normalizada para cargar un volumen que representara la concentración de 50 μ g/ μ L

2.2.2.13. Determinación de proteína por método de Bradford

La determinación de la cantidad de proteína se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante para el protocolo de ensayo estándar en micro placa (*Quick Start™ Bradford Protein Assay, Bio-Rad*). El reactivo de Bradford se mezcló en el bote, se tomó una alícuota en un tubo de 15 mL y se mantuvo a 4°C. Se preparó una curva de proteína estándar con Albúmina sérica bovina (BSA) de 0-2000 μ g/mL en agua estéril MiliQ. Se colocaron 5 μ L de la muestra de BSA de concentración conocida en diferentes pozos (figura 5), para el blanco se adicionó 5 μ L agua estéril MiliQ, y en cada pozo se adicionaron 250 μ L del reactivo de Bradford. Las muestras se mezclaron por agitación 15 s, y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente, entonces se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de placas. Se realizó una gráfica de la concentración absorbancia contra la concentración de proteína para la curva estándar (Anexo IV). Las muestras de concentración de proteína desconocida fueron analizadas colocando 5 μ L en cada pozo, y adicionando 250 μ L del reactivo de Bradford, se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min y se leyó su absorbancia a 595 nm. Para determinar la concentración de proteína se comparó el valor de la absorbancia contra la curva estándar.

Tube #	Standard Volume (µl)	Source of Standard	Diluent Volume (µl)	Final [Protein] (µg/ml)
1	20	2 mg/ml stock	0	2,000
2	30	2 mg/ml stock	10	1,500
3	20	2 mg/ml stock	20	1,000
4	20	Tube 2	20	750
5	20	Tube 3	20	500
6	20	Tube 5	20	250
7	20	Tube 6	20	125
8 (blank)	–	–	20	0

Figura 5. Concentraciones de curva tipo BSA. Concentración final de cada uno de los pozos para la curva tipo de BSA por Bradford.

2.2.2.14. Preparación y montaje de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se prepararon los geles de poliacrilamida al 15% con las siguientes soluciones las cuales se hicieron previamente: Tris-HCl 1.875 M con pH=8.8, Tris-HCl 0.6 M a pH= 6.8, un stock de acrilamida (se pesó 38.93 g de Acrilamida (Sigma- Aldrich) y 1.07 g de Bis-Acrilamida (Sigma Aldrich) para un volumen final de 100 mL y se aforó con agua destilada posteriormente se filtró la solución con membranas de 0.22 µm.), SDS 10% y persulfato de amonio al 10%. Antes de preparar los geles, los vidrios (1mm) fueron lavados con agua y alcohol al 70% y perfectamente limpios y secos fueron montados en el acrílico. Los peines al igual fueron lavados y se dejaron reposar al menos 3 horas en etanol absoluto, después se enjuagaron con agua destilada y se secaron. Una vez que los vidrios se probaron vertiendo agua destilada entre ellos y se observó que no existía fuga en la parte inferior, se extrajo el agua con papel filtro y se preparó el gel de corrimiento como se muestra en la tabla 6 (el volumen fue calculado para hacer 2 geles) y se depositó entre los vidrios con cuidado de no dejar burbujas, al finalizar se agregó Isopropanol absoluto hasta el tope para quitar las burbujas que hayan quedado. Se dejó solidificar la mezcla y después de aproximadamente 10 min, se retiró con papel filtro el exceso de isopropanol. En seguida, se preparó el gel separador (tabla 6) y con cuidado y evitando la formación de burbujas se depositó arriba del otro gel entre los vidrios y rápidamente se colocó el peine en la parte superior de los vidrios y se dejó solidificar (aprox. 10 min).

Tabla 6. Preparación para geles de poliacrilamida. Los geles se preparan al 15% y el volumen está calculado para hacer 2 geles.

Gel de corrimiento		Gel Separador	
Solución	Volumen (mL)	Solución	Volumen (mL)
Tris-HCl 1.875 M pH=.8.8	2	Tris-HCl 0.6 M pH= 6.8	0.5
H ₂ O destilada	2.85	H ₂ O destilada	0.75
Stock acrilamida	5	Stock acrilamida	3.75
SDS 10%	0.1	SDS 10%	0.050
Persulfato de amonio 10%	0.05	Persulfato de amonio 10%	0.025
TEMED	0.01	TEMED	0.007

Una vez que se prepararon los geles, se preparan las muestras las cuales se mezcla el volumen deseado de las mismas y se completa a 20 μ L con buffer de carga 2x Laemmli Sample buffer (10 mL de agua desionizada estéril, 7 mL de 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 3.0 g de glicerol, 1 g de SDS, 0.6 mL de 2- β -mercaptoetanol y 1.2 mg de azul de bromofenol) y se calentaron las muestras a 95°C por 5 minutos. Después, los vidrios se montan en la cámara de corrimiento y se verificó que no existieran fugas, se cargó cada muestra en los pozos del gel y se cargaron 3 μ L de marcador en el carril número uno; se llevó al volumen requerido dentro de la cámara con el buffer de corrimiento Laemmli 5X (se pesaron 4.5g de Tris, 21.6 de glicina, 1.6 g SDS y se mezcló en 300g de agua destilada. Se diluyo 1:5 con agua destilada). Se tapó la cámara y conectó a la fuente de poder, los primero 15 minutos el gel se corrió a 60 Volts y después a 120 Volts por 2 horas aproximadamente o hasta que las bandas lleguen al final del gel evitando se salgan del mismo. Al finalizar, uno los geles se transfirió a un recipiente con solución teñidora (0.5 g de Azul de Coomasie en 500 mL de solución desteñidora) cubriéndolo completamente y dejándolo teñir durante toda la noche. Posteriormente, el gel se pasó a solución desteñidora (400 mL de metanol, 100 mL de ácido acético y 500 mL de agua desionizada) durante un día. Una vez

desteñido el gel se tomó fotografía con escáner. El otro gel, se trató siguiendo el apartado 2.2.2.15.

2.2.2.15. Transferencia de proteínas y Western-Blot

La transferencia de proteínas se realizó colocando los filtros en buffer de transferencia en un recipiente previamente lavado y enjuagado con agua destilada (para una solución de un litro se pesó 3.02 g de Tris, 14.41 g de glicina, se adicionaron 10 mL de SDS al 10 % y 200 mL de metanol, se aforó a un litro con agua destilada y se ajustó el pH a 8.3.) durante un mínimo de 30 min. Se cortó la membrana de nitrocelulosa (Immun-Blot PVDF membrane for protein blotting) haciendo un esquema del gel y se colocó en un recipiente con 15 a 30 mL de metanol durante 15 min al menos. Después, se colocó en buffer de transferencia la membrana durante 30 min, con agitación. Uno de los geles que se corrieron en el apartado 2.2.2.14 se colocó en un recipiente con buffer de transferencia durante 15 min en agitación. Posteriormente, en el equipo Trans-blot (Bio-Rad) se colocó uno de los filtros (que estaba en buffer de transferencia) después la membrana de nitrocelulosa, a la cual se realizó una marca para reconocer el frente del gel de electroforesis el cual se colocó encima de la membrana. Y después otro filtro que estaba en buffer de transferencia. Se quitó el exceso de líquido y se cuidó que entre los filtros y la membrana no quedaran burbujas. Se conectó la fuente de poder y se transfirió durante 1 h a 18 V. Pasado el tiempo se procedió al tratamiento para Western-Blot.

La membrana de la transferencia de proteínas se colocó en un recipiente con la solución de bloqueo (2.5 g de leche descremada en polvo disuelta en 50 mL PSB-Tween el cual se preparó 100 mL de PBS 10X y 1 mL de Tween y aforando a 1L) durante toda la noche. Pasado el tiempo del bloqueó, se retiró la solución y se realizaron 5 lavados con PSBT 1X durante 10 min, cada lavado en agitación continua. Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo específico (1 μ L de Anti-His-HRP en 15 mL de PBST-Tween) durante al menos 1 h. Al pasar el tiempo, se retiró el anticuerpo y se hacen 5 lavados con PSBT 1X durante 10 min, cada lavado en agitación continua. Después se colocó la solución de revelado (Kit

Western-Light-hing plus-ECL) y se colocó la membrana en el transiluminador para revelarse cuidando que no se formaran burbujas.

2.2.2.16. Secuenciación de DNA

La secuenciación de DNA fue llevada a cabo por Macrogen Inc, Seoul, Korea. El plásmido que se envió para esta técnica fue solo el vector p320 OP8N transformado en *E. coli* TOP10. El producto de secuenciación fue analizado por el paquete informático *Codon Code Aligner* y *BLAST*. Los *primers* utilizados para este análisis fueron: qfJAB C8 como *forward* y LC37 en dirección *reverse*. Dichos primer se encuentran descritos en la sección 2.1.4 gBlock y *primers*.

2.2.3. Manipulación de *Chamydomonas reinhardtii*

2.2.3.1. Bombardeo de *Chamydomonas reinhardtii* con ADN plasmídico de los vectores p320 OP8N y OP9N

El método de bombardeo de partículas se puede resumir en 4 etapas:

a) **Lavar partículas de tungsteno:** Se prepararon las partículas que fueron utilizadas para los bombardeos. Se pesaron 30 mg de micropartículas de tungsteno en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se lavaron con 1 mL de etanol al 70% y en seguida se agitó vigorosamente por medio de vortex por 3-5 minutos. Las partículas se dejaron remojando en el etanol durante 15 min y después se centrifugaron dando un spin 1 minuto para obtener un pellet. Se desechó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 mL de agua mili-Q estéril, se agitaron las partículas en vortex por 1 minuto, se dejaron asentar por 1 minuto y se centrifugaron dando un spin 1 minuto para obtener un pellet; en seguida se retiró el sobrenadante y se repitió 2 veces más este paso. Al finalizar el tercer lavado, se llevó a un volumen final de 500 μ L en una solución de glicerol al 50% (v/v). Se almacenó la suspensión a -20°C (puede ser hasta 3 semanas).

b) **Recubrir partículas con ADN:** Se agitaron en vortex las partículas previamente preparadas y se transfirieron 50 μ L de la

suspensión, después se agregaron de manera secuencial 5 µg del plásmido o plásmidos que sean utilizados, 50 µL de CaCl₂ 2.5 M y 20 µL de espermidina 0.1 M todo esto se agregó mientras el tubo se mantuvo en agitación. A continuación se cerró el tubo y se continuó en agitación por 3 minutos, al pasar el tiempo se dejaron asentar las partículas por 1 minuto y se centrifugó la mezcla por 10 segundos dando un spin para obtener un pellet. Se removió el sobrenadante y se lavó la pastilla una vez con 140 µL de etanol 70% (grado HPLC), se centrifugó la mezcla por 10 segundos dando un spin y se retiró el sobrenadante. Finalmente, se resuspendió el pellet suavemente en 150 µL de etanol absoluto (grado HPLC).

- c) **Bombardear a *Chlamydomonas reinhardtii***: Se esparcieron 10 - 25 µL de las partículas recubiertas con ADN en un disco macroacarreador y se dejaron hasta que el etanol se evaporó. Se colocaron 200 µL (aproximadamente 1×10^7 - 1×10^8 células de *C. reinhardtii*) en el centro de una caja de medio TAP sólido con Kanamicina (100 µg/mL) y se dejaron reposar en oscuridad 2 h antes de ser bombardeadas. Los 200 µL del cultivo de *C. reinhardtii* provino de un matraz con volumen final de 200 mL el cual fue cosechado en un tubo Falcon de 50 mL a 5000 rpm por minutos hasta terminar con los 200 mL y obtener un pellet el cual se resuspendió en 5 mL del mismo medio TAP y fue tapado con aluminio hasta su uso (ya que las células de *C. reinhardtii* deben estar en oscuridad). Posteriormente, con ayuda del equipo Biolistic PDS.1000/He de Bio- Rad con discos de ruptura de 1110 psi y 20 mm Hg de vacío en la cámara. La distancia de la rejilla de paro al objetivo fue de 9 cm. Después de bombardear las cajas se mantuvieron en oscuridad por 24 horas antes de transferirse a la

cámara de crecimiento a 27°C con un fotoperiodo de 16/8h de luz/oscuridad.

- d) **Recuperar transformantes:** Se mantuvieron las cajas en un cuarto de cultivo a 27°C con un fotoperiodo de 16/8h de luz/oscuridad durante un promedio de 4 semanas. Pasado este tiempo, las colonias resistentes a kanamicina se transfieren a cajas Petri nuevas con medio TAP (agar 10% y kanamicina 100 µg/mL) tres veces seguidas, con un intervalo aproximado de 2-3 semanas entre resiembras.

2.2.3.2. Extracción de ADN celular de *Chamydomonas reinhardtii*

Cuando las placas presumiblemente transformadas de *C. reinhardtii* lograron sobrevivir al tercer cambio de placa, se realizó extracción de ADN por medio del kit *Wizard® Genomics DNA Purification System Kit* de la marca Promega y se siguieron las instrucciones del protocolo rápido paratejido de planta o “Quick protocol for plant tissue”:

2.2.3.3. Confirmación de colonias transformadas de *Chlamydomonas reinhardtii* con vectores OP8 & OP9 por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para poder verificar que alguna de las colonias que habían mostrado resistencia al antibiótico utilizado, en este caso Kanamicina, contenían al gen NanoVPHL1 o en su defecto, alguno de los fragmentos de los cuales estaba compuesto el mismo se llevó a cabo amplificaciones del ADN con primers específicos (ver sección 2.1.4. gblock y primers) a cada uno de dichos fragmentos y del gen completo. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en dos diferentes termocicladores, la enzima utilizada fue Taq Pol y se siguieron las instrucciones del proveedor para montar las reacciones. A continuación se presenta la tabla 7 con el resumen de componentes y volúmenes utilizados y la tabla 8 en la que se presentan las temperaturas de alineamiento (T_m) y el tiempo de extensión que se utilizó durante el programa por cada fragmento que compone el gen NanoVPHL1.

Tabla 7. Componentes para llevar a cabo las reacciones de PCR con un volumen total de 25 μ L

Componente	10X thermoPol reaction buffer	10mM dNTP's	10 μ M forward primer	10 μ M reverse primer	DNA template	Taq DNA Pol	Agua estéril
Volumen (μ L)	2.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.125	20.375

Tabla 8. Resumen de T_m , Text y número de ciclos utilizados para correr reacciones de PCR para los fragmentos VHHL1 y mCherry del gen NanoVPHL1

Fragmentos del gen NanoVPHL1	Par de primers utilizados	T_m	Tiempo de extensión	Ciclos
VHHL1	NVDF 186 & NVDF 190	54°C	1 minuto	30
mCherry	NVDF191 & NVDF 192	48°C	1 minuto	30

2.2.4. Herramientas Bioinformaticas

Las herramientas bioinformáticas utilizadas fueron:

- NCBI-National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>): El NCBI ha tenido la responsabilidad de hacer accesible la base de datos de secuencias de ADN de GenBank desde 1992. GenBank se coordina con laboratorios individuales y otras bases de datos de secuencias tales como las del *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) y la Base de Datos de ADN de Japón (DDBJ). En este caso se utilizó para la búsqueda de secuencias de nanobodies.
- BLAST-Basic Local Alignment Search Tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>): Este programa forma parte de las herramientas con las que cuenta la plataforma del NCBI y su objetivo es encontrar regiones de similitud entre las secuencias biológicas. El programa compara las secuencias de nucleótidos o proteínas con bases de datos de secuencias y calcula la significancia estadística.
- PDB-Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>): Este recurso es alimentado por el archivo de datos del banco de datos de

proteínas sobre las formas 3D de proteínas, ácidos nucleicos y conjuntos complejos que ayuda a los estudiantes y los investigadores a comprender todos los aspectos de la biomedicina y la agricultura, desde la síntesis de proteínas hasta la salud y la enfermedad.

- JalView (<http://www.jalview.org>): Es un programa gratuito para la edición, visualización y análisis de múltiples alineaciones de secuencias. Utilizado para ver y editar alineaciones de secuencias, analizarlas con diagramas filogenéticos y análisis de componentes principales (PCA) y explorar las estructuras moleculares y la anotación.
- VMD-Visual Molecular Dynamics (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd>): VMD está diseñado para el modelado, visualización y análisis de sistemas biológicos como proteínas, ácidos nucleicos, conjuntos de bicapa lipídica, etc. Puede ser usado para ver moléculas más generales, ya que VMD puede leer los archivos estándar del Banco de Datos de Proteínas (PDB) La estructura contenida. VMD ofrece una amplia variedad de métodos para representar y colorear una molécula: puntos y líneas simples, esferas y cilindros de CPK, enlaces de regaliz, tubos y cintas de espina dorsal, dibujos de dibujos animados y otros. VMD se puede utilizar para animar y analizar la trayectoria de una simulación de dinámica molecular (MD).
- PyMOL (<https://www.pymol.org>): Es un sistema de visualización molecular, este software puede producir imágenes 3D de alta calidad de pequeñas moléculas y macromoléculas biológicas, como las proteínas.
- SAVES-UCLA MBI (<https://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>): Este metaserver ejecuta 6 programas para verificar y validar estructuras de proteínas durante y después del refinamiento del modelo.
- RAMPAGE (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>): Este servidor ejecuta un programa para verificar y validar estructuras de proteínas obteniendo el análisis del gráfico Ramachandran.

- **Phyre²-Protein Homology/Analog Recognition Engine** (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>): Es un servidor para la predicción de la estructura de proteínas. Phyre es uno de los métodos más populares para la predicción de la estructura de proteínas que han sido citados más de 1500 veces. Al igual que otras técnicas de reconocimiento de homología a distancia, es capaz de generar modelos de proteínas confiables regularmente cuando otros métodos ampliamente utilizados como PSI-BLAST no pueden. Phyre2 ha sido diseñado para garantizar una interfaz fácil de usar para los usuarios inexpertos en los métodos de predicción de la estructura de proteínas.

2.2.5. Manipulación de *Chamydomonas reinhardtii* para muestras de cinéticas (técnicas analíticas)

2.2.5.1. Puesta en marcha de cinética para *C. reinhardtii*

Las condiciones utilizadas para las cinéticas que se llevaron a cabo para la microalga se muestran en la tabla WW, dichos ensayos fueron por triplicado en matraces de 1 L.

Tabla 9. Condiciones de cultivo para cinéticas de *C. reinhardtii* silvestre y transformada

Condición	Valor numérico
Inóculo	10% (50 mL)
Volumen de trabajo	500 mL
Fuente y cantidad de Luz	Leds, 10,000-12,500 Lux
Tiempo de prueba	10-15 días
Muestreo	1 día
Temperatura	27°C
Medio de cultivo	TAP(Cepa silvestre) y TAP +kanamicina [20µg/mL] (cepa transformada)
Agitación	100-120 rpm

2.2.5.2. Monitoreo de crecimiento celular

Con el propósito de monitorear el crecimiento de la cinética fue monitoreada por medio de la Absorbancia medida en espectrofotómetro a una longitud de onda de 675 nm. Se utilizaron cubetas de 1 mL propias del equipo y se realizaron

diluciones 1:2 cuando la absorbancia era mayor a 1.0. Se utilizó como blanco medio de cultivo TAP fresco y estéril.

2.2.5.3. Cuantificación de biomasa por peso seco

Para la determinación de peso seco del cultivo de microalgas se tomó una muestra de 10 mL de cultivo en crecimiento previamente homogeneizado de cada matraz (triplicado); dicha muestra, se hizo pasar por filtros de acetato de celulosa de 0.45 μm (Millipore), los cuales fueron colocados con el respectivo rotulo dentro de charolas de aluminio, los filtros se secaron previamente a 70°C en una estufa por 2 días y a continuación se mantuvieron aproximadamente entre 2-3 días más en un desecador para remover la mayor cantidad de humedad posible, los filtros se pesaron cada día hasta obtener un peso constante. La muestra fue filtrada con ayuda de una bomba de vacío.

Una vez que se filtró la muestra, las charolas de aluminio con los filtros y la biomasa de cada muestra se metieron a la estufa a 70°C por 2 días y después entre 2-3 días más en un desecador para remover la mayor cantidad de humedad posible, los filtros se pesaron cada día hasta obtener un peso constante.

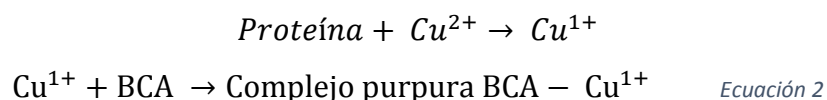
Una vez que se obtuvieron los pesos para cada muestra se hace una relación entre la absorbancia y el peso que se obtuvo en cada tiempo de muestreo (Anexo V).

$$\text{Contenido de biomasa} = \frac{\text{Peso del Filtro} - \text{Peso de la muestra seca con filtro}}{\text{mL de la muestra tomada}} \quad \text{Ecuación 1}$$

2.2.5.4. Cuantificación de Proteína por el método del ácido bicinonínico (BCA)

El ensayo del ácido Bicinonínico depende de la conversión de Cu^{+2} a Cu^{+} en condiciones alcalinas. Este Cu^{+} es luego detectado por reacción con el BCA. Tanto el ensayo de Lowry como el de BCA son similares en sensibilidad, pero el BCA es más estable bajo condiciones alcalinas, y además tiene la ventaja de que puede ser llevado a cabo en un solo paso comparado con los dos pasos requeridos en Lowry.

La reacción resulta en el desarrollo de un color púrpura intenso con un máximo de absorbancia a 562 nm. Ya que la producción de Cu^{1+} en esta prueba es función de la concentración de la proteína y el tiempo de incubación, el contenido de proteínas de muestras desconocidas puede ser determinado espectrofotométricamente por comparación con unos patrones de proteína estándar.



Otra ventaja del método de BCA es que presenta poca interferencia con sustancias como si lo presenta el método de Lowry. En particular, no es afectado por detergentes ni agentes desnaturalizantes como la urea o el cloruro de guanidina, aunque es más sensible a la presencia de azúcares reductores.

Para esta técnica se realizó una curva tipo con Albúmina con una concentración máxima de 100 $\mu\text{g/mL}$ y a partir de esta solución madre se realizaron diluciones para tener concentraciones de 0-100 $\mu\text{g/mL}$ (Anexo V).

Reactivos a preparar: La técnica consta de dos reactivos A y B donde el A está compuesto de: BCA 1%, Na_2CO_3 2%, tartrato sódico 0,16%, NaOH 0,4% y $NaHCO_3$ 0,95% y ajustar a pH 11,25 con NaOH, echo para 100 mL de agua. Y el reactivo B: $CuSO_4$ al 4%, hacer solo 10 mL. Una vez listos ambos, se prepara el reactivo de trabajo, que basta con mezclar 100 volúmenes de A con 2 volúmenes de B. Esta mezcla se hace al momento de su uso y es estable. Los reactivos por otra parte A y B no deben ser utilizados pasados 3 meses. También, es necesario preparar SDS 2%

Procedimiento: Para esta metodología es suficiente tomar 100 μL de muestra y se colocaron dentro de un tubo de ensaye de 15 mL. Se depositaron 20-40 μL (depende si la muestra contiene más o menos biomasa) de SDS 2% y se agitó en vortex. Después, se colocaron 2 mL del reactivo de trabajo y se volvió a agitar con ayuda de vortex. A continuación los tubos se taparon y se introdujeron en la estufa por 30 minutos a una temperatura de 60-70°C. Una vez pasado el tiempo, las muestra se sacaron de la estufa y se dejaron enfriar a TA, después se tomó

lectura en un espectrofotómetro a $\lambda = 562$ nm. El blanco se prepara con 100 μ L agua y la muestra se trata exactamente como las muestras, al igual que las muestras de la curva tipo.

2.2.5.5. Cuantificación de Clorofila

Esta metodología detalla el procedimiento de análisis en laboratorio para la cuantificación por espectrofotometría de la Clorofila a, b y c (método tricromático).

Reactivos a preparar: Para llevar a cabo esta metodología es suficiente preparar acetona al 90%.

Procedimiento: Se tomó 1 mL de cultivo como muestra en un tubo de 1.5 mL para esta técnica y se centrifugó para poder remover el sobrenadante. Al botón se le agregó 1 mL de acetona al 90% y previamente se habían cubierto los tubos con aluminio ya que la técnica es sensible a la luz. Las muestras se dejaron incubar por 10 min a -20°C . Una vez que el tiempo de incubación terminó, las muestras se sonicaron por 20 min (todo el tiempo se mantienen cubiertas las muestras con aluminio). Después, las muestras se pasaron a un tubo de 15 mL y se les agregó 1 mL más de acetona al 90%, estos tubos también deben de cubrirse con aluminio y se incubaron por 24 horas a 4°C . Al pasar el tiempo de incubación, los tubos fueron centrifugados a 4000 rpm por 15 min a TA. Se extrajo el sobrenadante con cuidado y se realizó la lectura en una celda de cuarzo de 2 mL con el espectrofotómetro para cuatro longitudes de onda, $\lambda = 630, 647, 664$ y 750 nm.

Cálculo de los resultados: Los cálculos para encontrar la cantidad de clorofila-a en mg/m^3 se realizan aplicando las ecuaciones de Jeffrey & Humphrey (1975), que se describen a continuación.

$$(C_a) \text{ Clorofila-a} = 11.85*(E664) - 1.54*(E647) - 0.08*(E630) \quad \text{Ecuación 3}$$

$$(C_b) \text{ Clorofila-b} = 21.03*(E647) - 5.43*(E664) - 2.66*(E630) \quad \text{Ecuación 4}$$

$$(C_c) \text{ Clorofila-c} = 24.52*(E630) - 7.60*(E647) - 1.67*(E664) \quad \text{Ecuación 5}$$

Dónde:

E: Es la absorbancia obtenida a las diferentes longitudes de onda. A cada longitud de onda se le debe restar la lectura control (750 nm) hace antes de aplicar la ecuación, (664nm-750nm; 647nm-750nm y 630nm-750nm).

Finalmente, después de aplicar las ecuaciones anteriores, la concentración de clorofila a, b o c, en la muestra, se cuantifica de la siguiente manera:

$$\text{Clorofila a, } \frac{\text{mg}}{\text{m}^3} = \frac{C_a * \text{Volumen del extracto (L)}}{\text{Volumen de la muestra (m}^3)} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:

C_a es la concentración de Clorofila a ó b ó c

2.2.5.6. Cuantificación Carbohidratos por el método fenol-sulfúrico

Este procedimiento se basa en la técnica descrita para la determinación espectrofotométrica de carbohidratos, mono y polisacáridos (Dubois M, 1956) además del procedimiento descrito por (Arredondo, 2007) para el análisis de carbohidratos de microalgas. Los métodos clásicos en análisis cuantitativo de carbohidratos están basados en la formación de productos coloreados al tratar los analitos con ácidos inorgánicos fuertes y la condensación del producto final funciona con agentes cromogénicos fuertes (usualmente fenol o una amina aromática).

El método de Dubois et al. 1956, fue originalmente descrito como una técnica no específica para carbohidratos, pero posteriormente fue comparado con el método de la antrona y con el N-etilcarbazol y se encontró que era el más adecuado para el análisis de carbohidratos. El método colorimétrico de fenol-ácido sulfúrico (Dubois) involucra el tratamiento de la solución que contiene los carbohidratos (5-100 mg/mL) con una solución acuosa de fenol (5% m/v) y el ácido sulfúrico concentrado: un producto característico de color amarillo es producido, con una absorción máxima para las hexosas en 490 nm y 480 nm para las pentosas, deoxi azucares y ácido urónico. Este método es sensible a una amplia variedad de

carbohidratos, incluyendo azúcares, azúcares metilados y polisacáridos ácidos y neutros; es poco sensible a la interferencia con proteínas y el color producido es muy estable. Su único inconveniente es la interferencia de las pentosas de los ácidos nucleicos, pero por su gran simplicidad es el de uso más extendido en las investigaciones con especies microalgales. El fenol es un alcohol altamente reactivo que reacciona con los azúcares reductores. Este proceso requiere una gran cantidad de energía, proporcionada por la reacción entre el ácido sulfúrico y el agua. El producto resultante es un compuesto amarillo-marrón, con pico de absorción a 485 nm, longitud a la cual la relación entre la concentración y la intensidad del color es lineal.

La curva de calibración se obtiene usando un gradiente de concentración de Dextrosa preparadas a partir de una solución de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Todas las diluciones se preparan por triplicado y una vez que se tienen las diferentes concentraciones de glucosa, se continúa la curva de calibración, utilizando el mismo procedimiento que para las muestras problema (Anexo V).

Reactivos a preparar: Se preparó H_2SO_4 1M y fenol al 5% para llevar a cabo la metodología.

Procedimiento: Para este procedimiento se tomaron 3 mL de muestra en un tubo de 15 mL, los cuales fueron centrifugados y se removió el sobrenadante. La técnica se realizó en dos etapas; 1) Etapa de lisis: Al tubo que contenía la biomasa de los 3 mL de muestra se le agregaron 3 mL de H_2SO_4 1M, se agitaron en vortex, se sonicaron las muestras por 20 minutos y se volvieron a agitar con el vortex por aproximadamente 30 segundos. Después, los tubos se cubrieron con aluminio en la parte inferior de modo que la muestra quede cubierta y se calentaron por al menos 1 hora con agua en ebullición (93°C). Al pasar la hora, se dejaron enfriar las muestras y evitar que la luz de directamente a la muestra. 2) Etapa de cuantificación: Las muestras se centrifugaron a 4000 rpm por 20 minutos a 4°C y a partir del sobrenadante se tomó 1 mL y se pasó a un tubo de vidrio con tapa al cual se le adicionó 1 mL de fenol al 5% (incluyendo al blanco el cual contiene 1 mL de H_2SO_4 1M), las muestras se taparon y fueron agitadas con vortex. Se dejaron

incubar por 40 min a TA y se agitaron 2-3 veces durante este periodo suavemente. Al finalizar el tiempo de incubación, se agregaron a cada tubo 3 mL de H₂SO₄ concentrado, los tubos se taparon y se agitaron con vortex. Finalmente, se dejaron enfriar las muestras y se cuantificaron colocando un volumen de 2 mL en una celda de cuarzo y con ayuda del espectrofotómetro a una $\lambda = 485\text{nm}$. Esta técnica debido a que se utilizan ácidos concentrados y fenol demanda llevarla a cabo en una campana de extracción.

2.2.5.7. Cuantificación Lípidos

La determinación del contenido de lípidos consta del uso de un marcador fluorescente conocido como Nile Red, el cual se une a las moléculas de lípidos y después las muestras se leen en el fluorímetro Jenway 6280 y se puede conocer la concentración de lípidos totales.

Reactivos a preparar: Se prepararon para esta técnica DMSO al 25% y rojo de Nilo a 250 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ disuelto con Acetona y esta última solución se cubrió con aluminio y se refrigeró a 4°C.

Procedimiento: Para esta determinación se tomaron 160 μL de muestra del cultivo de *C. reinhardtii* y se colocaron en un tubo de 2 mL. Las muestras se calentaron por 40 segundos en el microondas y después a este tubo se le colocaron 160 μL de DMSO al 25% y 4 μL de la solución de rojo de Nilo (evitar que la luz haga contacto con la muestra) y se agitaron las muestras con vortex. Estas muestras se calientan por 10 min a 60°C en la estufa. Después de este periodo se llevaron a un volumen final de 2 mL con DMSO al 25% y se dejaron enfriar completamente las muestras evitando el contacto con la luz. Las muestras se leyeron en una celda de 2 mL en el fluorímetro Jenway 6280, se tomaron de 3-5 lecturas hasta que se observó estable dicha lectura. Para la curva de calibración (Anexo V) se utilizó trioleína (sigma) con densidad de 0.91 g/mL ; se pesó en un vial previamente lavado y secado a 45 °C por 24 horas una pequeña cantidad de trioleína (2.2 μL ó 11.4 μL). Por diferencia de pesos calcular la masa pesada. Disolver en isopropanol : cloroformo en una relación 19:1. Por ejemplo si se disuelve en 2 mL poner 1900

μL de isopropanol y $100 \mu\text{L}$ de cloroformo. Calcular la concentración en $\mu\text{g}/\text{mL}$ y realizar una segunda dilución si es necesario. Si no tomar esta solución stock y a partir del stock realizar las diluciones necesarias para obtener concentración de entre 5 y $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ y las muestras de la curva se tratan igual que una muestra problema.

2.2.5.8. Cuantificación Amonio

La determinación del contenido de amonio se basa en la obtención de un color azul intenso formado por la reacción de amonio con el fenol favorecido por el ion de hipoclorito en condiciones alcalinas, catalizada por el nitroprusiato de sodio el cual favorece la intensidad del color en la reacción.

Preparación de soluciones: Para esta determinación se prepararon 4 soluciones. 1) Alcohol-Fenol (50 mL) se pesaron 5.0 g de fenol y la solución fue aforada con 50 mL de etanol. 2) Nitroprusiato de sodio (50mL), se pesaron 0.25 g de nitroprusiato con cuidado y se aforó con 50 mL de agua desionizada (estable un mes). 3) Solución alcalino-complejante, la cual se preparó el día de su uso con 20 g de citrato de trisodio, 1 g de NaOH y se aforó a 100 mL con agua desionizada. 4) Solución oxidante, esta solución se preparó con la solución 3 e Hipoclorito de sodio limpio en una relación 1:4 , respectivamente (ejemplo, para 100 muestras se colocan 100 mL de la sol. 3 y 25 mL del Hipoclorito de sodio).

Procedimiento: Para esta técnica se utilizan $500 \mu\text{L}$ del sobrenadante de las muestras y se vertió dicho volumen en un tubo de ensaye que contiene $4500 \mu\text{L}$ de agua destilada para obtener un volumen final de 5 mL. Después, se agregó a cada tubo $200 \mu\text{L}$ de la solución 1, $200 \mu\text{L}$ de la solución 2 y $500 \mu\text{L}$ de la solución 4 y se mezclaron con ayuda de vortex las muestras por al menos 1 minuto. A continuación, se dejaron reposar las muestras por 2-3 horas en oscuridad y agitando aproximadamente cada 15 min las muestras y pasado este tiempo, se tomaron las lecturas en el espectrofotómetro a una $\lambda = 630 \text{ nm}$ en celda de cuarzo. Se realizó el blanco con medio de cultivo estéril. Y se realizó una curva de calibración con NH_4Cl (Anexo V) en concentraciones de 0-10 ppm previamente secado a 60°C y recibieron el mismo tratamiento que las muestras problema.

Para los cálculos, los resultados obtenidos después de interpolar la absorbancia en la curva tipo, fueron multiplicados por 10 ya que dichos resultados se encontraban al 10%.

2.2.5.9. Cuantificación ADN y ARN

Para la extracción de ADN y ARN se tomó una muestra de 5 mL y se utilizó el reactivo TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) y se siguió el protocolo según lo marca el proveedor para el aislamiento de ADN y ARN. Finalmente, dichas muestras se cuantificaron en el equipo NanoDrop 2000.

CAPÍTULO 3.

DISEÑO DE UN ANTICUERPO RECOMBINANTE DE CAMÉLIDO (NANO 1) Y SU EXPRESIÓN EN *Escherichia coli*

3.1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

3.1.1. Anticuerpos tetraméricos

Los anticuerpos son las proteínas que unen antígenos, se encuentran en la membrana de las células B y los secretan las células plasmáticas. Los anticuerpos son heterodímeros e independientemente de su especificidad tienen una estructura común, consistente de cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas idénticas de 55-70 kDa denominadas con la letra H (Heavy), unidas covalentemente a un oligosacárido, y un par idéntico de cadenas ligeras no glicosiladas de 24 kDa denominadas con la letra L (Light). Un puente disulfuro y otras uniones no covalentes unen a las cadenas pesadas con las ligeras. Las cadenas pesadas también están unidas entre sí por al menos un puente disulfuro, tal unión está localizada en una región conocida como “bisagra”, región formada por aproximadamente 12 residuos de aminoácidos que proporciona una gran flexibilidad a la molécula, éstos residuos están expuestos a la ruptura química y enzimática (figura 6) La papaína es una enzima que divide a las inmunoglobulinas en dos fragmentos idénticos conocidos como Fab (Antigen Binding Fragment) que en la actualidad se sabe que son los que se unen al antígeno, y en un fragmento que posee la propiedad de ser fácilmente cristizable denominado Fc (Crystalline Fragment). Alrededor de los 110 primeros aminoácidos de la región amino terminal de una cadena ligera o pesada varían de modo considerable entre anticuerpos de distinta especificidad. Estos segmentos de secuencia muy variable se conocen como regiones “V”: en las cadenas ligeras se llaman “VL” y en las pesadas “VH”. Todas las diferencias de especificidad que poseen los anticuerpos pueden seguirse hasta variaciones en las secuencias de aminoácidos de las regiones V. De hecho, la mayor parte de las diferencias entre los anticuerpos se encuentra dentro de las regiones V, llamadas regiones determinantes complementarias

(CDR), sea en la cadena ligera o la pesada. Estas regiones son las que constituyen los sitios de unión al antígeno. En contraste, dentro de la misma clase de anticuerpos se observan mucho menos diferencias cuando se comparan secuencias a lo largo del resto de la molécula. Las regiones de secuencia relativamente constantes más allá de las regiones variables se han designado como regiones “C”: en la cadena ligera “CL” y “CH” en la pesada (figura 6).

Los anticuerpos son glucoproteínas; con pocas excepciones, los sitios de fijación de carbohidratos están restringidos a la región constante. No se comprende por completo el papel que tiene la glicosilación de anticuerpos, pero es probable que incremente la solubilidad de las moléculas. La glicosilación inapropiada, o la falta de ella, afecta el índice al cual se eliminan anticuerpos del suero y disminuye la eficiencia de la interacción entre el anticuerpo y el sistema del complemento y entre anticuerpos y receptores Fc (A.Goldsby et al. 2004; Piedra landa & Sanabria Ayala 2007)

3.1.2. Los nuevos anticuerpos: Nanocuerpos o Nanobodies

Una notable excepción a las estructuras convencionales de anticuerpos de mamíferos IgG se encuentra en el suero de los camélidos. Los camélidos son una familia de mamíferos artiodáctilos (flia. Camelidae, orden Artiodactyla) pertenecientes al suborden Tylopoda, de los cuales actualmente existen tres géneros: Lama (Lama glama y Lama guanicoe), Vicugna (Vicugna vicugna y Vicugna pacos) y Camelus (una joroba- Camelus dromedarius y dos jorobas- Camelus bactrianus). La diferenciación y especiación de estos animales ha sido producto de un largo y complejo proceso evolutivo de millones de años.

Además de los anticuerpos convencionales heterotetraméricos, este suero posee anticuerpos IgGs especiales. Estos anticuerpos se conocen como anticuerpos de cadenas pesadas o heavy-chain antibodies (HCAbs) y sus características principales son: la ausencia de cadenas polipeptídicas ligeras (L) y la falta del primer dominio en las cadenas pesadas (CH1). En su región N-terminal, la cadena pesada de la proteína homodimérica contiene un dominio variable el cual tiene el nombre de VHH o nanobody el cual sirve para asociarse al antígeno

relacionado. El nanobody en los HCAs es, en función y estructura, el equivalente al fragmento Fab (antigen-binding fragment) en los anticuerpos convencionales (Figura 6). Debido a la ausencia de cadenas ligeras (L) y del CH1 el peso molecular de los HCAs es de aproximadamente 90,000 Da en comparación con los 150,000 Da que es el peso molecular de los anticuerpos convencionales. El porcentaje de HCAs y anticuerpos convencionales IgG en el suero de camélidos es variable: en camellos puede alcanzar valores de 50-80% y en las especies de camellos de Sudamérica los valores son menores de 10-25%; con estos significantes valores, podemos comprobar la importancia que guardan los HCAs en el sistema inmune de los camélidos (Muyldermans 2013). A pesar de que los camélidos presentan anticuerpos de cadenas pesadas (HCAs) es su suero, otros artiodáctilos como los Suiformes (cerdo e hipopótamo) y Ruminantes (bovinos, cabra, oveja, antílope y otros) no presentan HCAs funcionales (Vanina 2010; Muyldermans 2013).

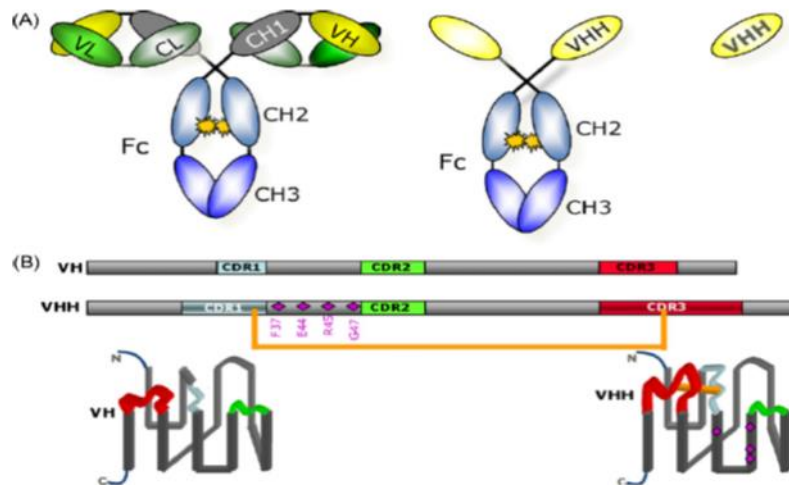


Figura 6. Representación general de un anticuerpo convencional (A) y un anticuerpo no convencional –camélido(B) (Muyldermans et al. 2009)

Diversos isotipos de IgGs carentes de cadenas L circulan en la sangre periférica de los camélidos, aun cuando ha sido complicado diferenciar estas moléculas, se han logrado con algunos de ellos, para la especie dromedario: IgG1a, IgG1b,

IgG2a, IgG2c, IgG3 y para llama: IgG1a, IgG1b, IgG2a, IgG2b, IgG2c e IgG3 (De Genst et al. 2006; Muyldermans 2013).

Debido a sus distintivas características los VHHs han sido de gran interés en la industria biotecnológica; los nanoanticuerpos han sido utilizados como agentes de captura en la proteómica y como biosensores, también como inmunomoduladores de función enzimática, además como inhibidores de citoquinas proinflamatorias, como agentes terapéuticos anticancerígenos, así como para proveer inmunoprotección contra virus y bacterias patógenos, parásitos y toxinas, también en tratamientos orales contra infecciones del tracto gastrointestinal y finalmente como inmunoterapéuticos en el tratamiento de enfermedades neurológicas (Teh & Kavanagh 2010)

3.1.3. Expresión de proteínas heterólogas en *Escherichia coli*

Las proteínas recombinantes o también llamadas heterólogas son aquellas que se producen al utilizar la tecnología del DNA recombinante, que comenzó a inicios de la década de los 70's. Dichos métodos pretenden la expresión del gen de una proteína de interés en un organismo en el cual no existe producción de la misma de forma natural (Walker & Rapley 2009). La capacidad de manipular las secuencias de DNA permite alterar los genes, introducirlos en vectores y expresarlos en sistemas biológicos que actúan como "reactores" biológicos a manera de obtener proteínas con propiedades funcionales mejoradas, corregir defectos genéticos o simplemente sobreexpresar el producto.

Al paso de los años se ha observado que la expresión de grandes cantidades de proteínas recombinantes es relativamente simple, pero sólo para aquellas cuya expresión se realiza en bacterias. La bacteria como hospedera más utilizada e importante para la producción de proteínas recombinantes es *Escherichia coli* aun cuando las cepas bacterianas silvestres no puede llevar a cabo modificaciones post-traduccionales y es una de las desventajas que afecta la elección de dicha plataforma, cuenta con diversas ventajas importantes: i) su genoma es conocido hace varios años, lo cual ayuda ampliamente en la manipulación genética, ii) existe una gran cantidad de conocimiento acumulado sobre su fisiología,

bioquímica y metabolismo, iii) en el mercado hay una cantidad considerable de vectores para producción de proteínas heterólogas específicamente en *E. coli*, iv) el crecimiento se lleva a cabo en medios de cultivo simples y de manera rápida con altos rendimientos. Actualmente, cerca del 30 % de las PR de uso terapéutico son producidas empleando *E. coli*. De un total de 58 productos aprobados por la FDA en el periodo 2006-2010, 17 son producidos usando *E. coli* y 32 empleando células de mamífero (Whitaker 2011). Debido a estas características *E. coli* es utilizada además de producción en masa, para poder comprobar el correcto diseño de genes construidos por medio de bioinformática, lo cual es importante para este trabajo de investigación ya que es el objetivo de este capítulo.

En el presente proyecto se diseñó y construyó un gen compuesto por varios bloques: Nanobody (NanoVPHL1), etiquetas para purificar (cola de Histidinas y Nano-tag), sitio de reconocimiento para una proteasa, linkers y una proteína fluorescente para una fácil visualización de la expresión del gen en la bacteria.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de este capítulo se utilizaron las siguientes técnicas descritas en el punto 2.2.2. Manipulación de *E. coli* y 2.2.4. Herramientas bioinformáticas; todas ellas contenidas en el capítulo 2.

Así mismo, se muestra a continuación un diagrama de flujo y la técnica en detalle de cómo se llevó a cabo el diseño del casete sintetizado NanoVPHL1.

3.2.1. Diseño del gen NanoVPHL1

Para el diseño del casete sintetizado el cual lleva por nombre NanoVPHL1 se siguió el diagrama de flujo (Figura 7) que se muestra a continuación:

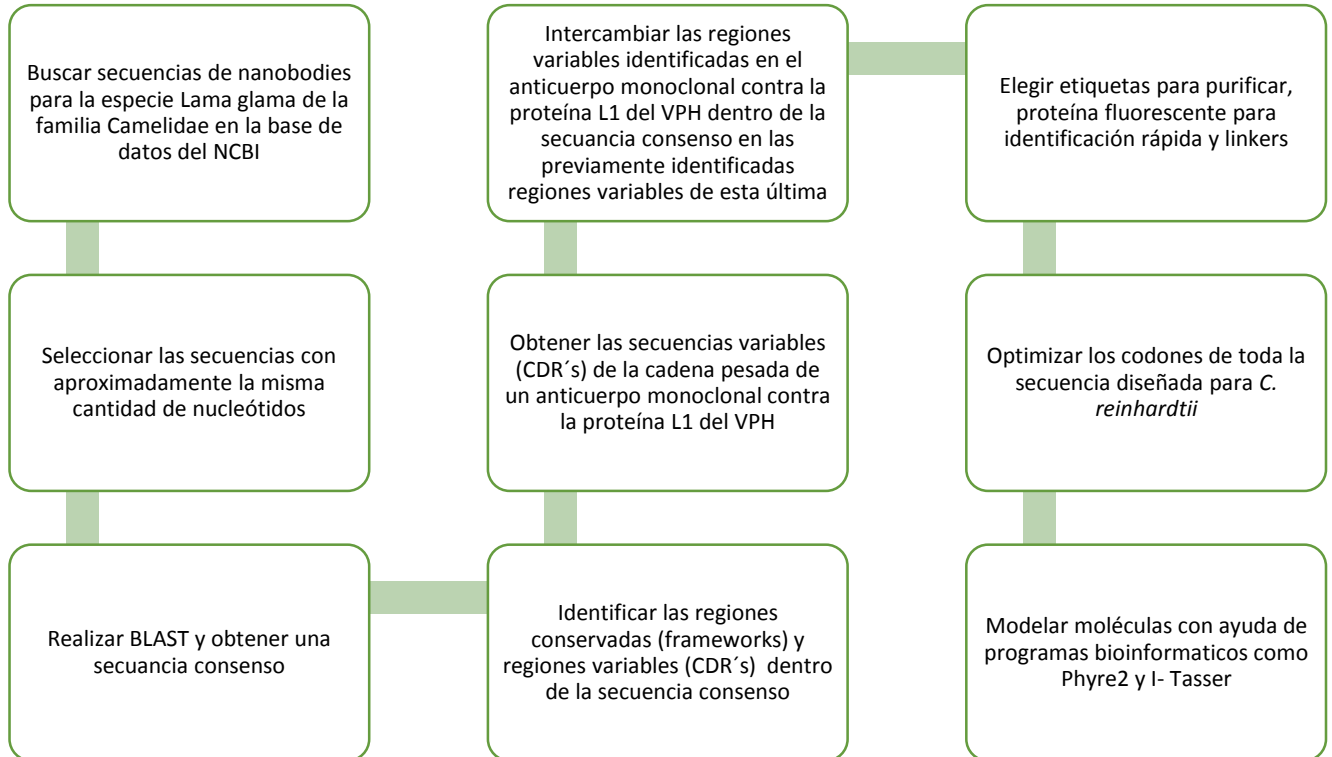


Figura 7. Diagrama de flujo para el diseño del Nanobody nombrado NanoVPHL1

3.2.2. Flujo de trabajo para el diseño del NanoVPHL1

1. Se buscaron secuencias VHH's (regiones variables de la cadena pesada) en la página del NCBI referentes a la familia Camelidae, especie *Lama glama* (llama) que tuvieran como objetivo diferentes antígenos (Ag). Después, se eligieron estas tomando en cuenta los siguientes criterios: a) Longitud similar de la cadena, b) cuál es el blanco de la secuencia VHH, c) evitar un número mayor a 3 secuencias repetidas; es decir, las secuencias debían tener un objetivo distinto

2. El siguiente paso fue realizar un alineamiento múltiple con las combinaciones de las secuencias previamente seleccionadas con la finalidad de obtener una secuencia consenso. Al realizar cada uno de los estos alineamientos se debe evaluar la mejor combinación posible buscando tener los espacios correspondientes a cada CDR (1-3) dentro de la secuencia consenso. Para este paso, se utilizaron programas como ClustalX2 y preferentemente Jalview.

3. Se buscó un artículo en cual se tienen registradas las secuencias referentes a la cadena variable pesada y ligera (VH & VL respectivamente) de un anticuerpo monoclonal (mAb) que tiene como blanco la proteína L1 del virus del papiloma humano (VPH) (Wang et al. 2014)

4. Del artículo “*Characterization of two new monoclonal antibodies against human papillomavirus type 16 L1 protein*” se tomó la secuencia correspondiente a la cadena variable pesada VH del mAb HPV16 AE3 Figura 8.



Figura 8. Secuencia de a.a. de la cadena pesada variable en mAbs.

Comparación de aminoácidos de VH entre los anticuerpos monoclonales (mAbs) AE3 y AG7(Wang et al. 2014)

5. Realizamos el intercambio de los CDRs del mAb AE3 en los CDRs identificados en la secuencia consenso para de este modo obtener un Nanobody® que tiene como objetivo la proteína L1 del VPH. Este pequeño fragmento de todo el casete que se mandó a sintetizar se llama VHHL1

6. Se llevó a cabo el mejoramiento de codones para la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* con todo el casete que fue nombrado NanoVPHL1.

7. Como último paso, se modeló la secuencia correspondiente al NanoVPHL1 con ayuda de los programas I-Tasser, Phyre2 y como visualizadores VMD y PyMOL.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Diseño del gBlock y selección de secuencia VHHL1

Como primer resultado se obtuvo la lista de secuencias de nanobodies (Anexo 1) que fueron utilizadas para para obtener una secuencia consenso a nivel de aminoácidos, esta se muestra en la Figura 10 en la cual se pueden observar los 3 sitios variables o CDRs en los cuales se insertaron las secuencias de aminoácidos correspondientes de acuerdo a la secuencia VH del anticuerpo monoclonal descrita en la Figura 9.

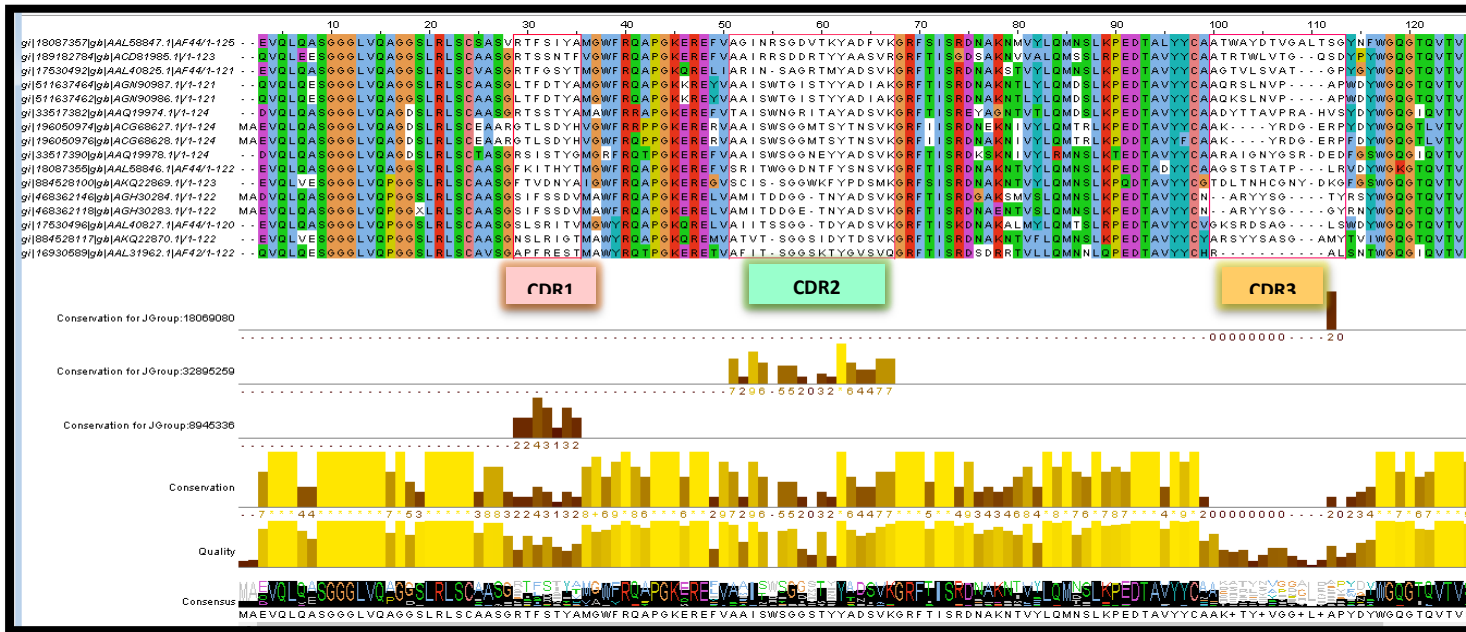


Figura 9. Alineamiento múltiple.

Alineamiento múltiple para obtener secuencia consenso en la cual se muestran los 3 sitios CDRs en el alineamiento. De izquierda a derecha: CDR1, CDR2 y CDR3. Los aminoácidos que se muestran fueron intercambiados: Para CDR1: DTYIH; CDR2: RIDPANGNTRYDKPKFQG; y para CDR3: GGAYWGQGT(Wang et al. 2014)

a)

MAEVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGR**TFSTY**AMGWFRQAPGKEREFV**AAISW**
SGGSTYYADSVKGRFTISRDNANKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCA**AK+TY+VGG+-**
+APYDYWGQGTQVTVSS

b)

MAEVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASG**DTYIH**MGWFRQAPGKEREFV**RIDPANGN**
TKYDPKFQGGGRFTISRDNANKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAG**GGAYWGQGT**YDYW
GQGTQVTVSS

Figura 10. Secuencia consenso original y modificado

a) Secuencia consenso original a partir de la Figura 4 se resaltan los sitios CDRs(1-3) de izquierda a derecha. b) Secuencia consenso con las regiones variables(1-3) del mAbs AE3

A continuación en la Figura 11 se muestra la secuencia de nucleótidos y el orden de los fragmentos que forman el gBlock que fue enviado a sintetizar en el cual se muestra que en el extremo 5' se encuentra la secuencia de aminoácidos que codifica para el casete NanoVPHL1 y en el extremo 3' la secuencia codificante las etiquetas: cola de Histidinas y nano-tag respectivamente. La secuencia del gen se encuentra flanqueada por las enzimas de restricción NcoI y Sall en dirección 5'-3' respectivamente.

CCATGGCAGAGGTTCAAGTACAAGCTAGTGGTGGTGGTTAGTTCAAGCAGGTGGCTCATTAAAGATTA
TCATGTGCTGCATCTGGTGATACTTACATTCACATGGGATGGTTTCGTCAAGCTCCAGGTAAAGAACGT
GAATTCGTACGTATTGATCCTGCAAACGGCAATACAAAATACGATCCAAAATTCCAAGGTGGTAGATTCA
CTATTAGTCGTGATAACGCAAAAAATACAGTTTACTTACAGATGAATAGTTTAAAACCAGAAGATACAGCT
GTTTATTACTGTGACAGGTGGAGCTTATTGGGGTCAAGGAACATACGATTATTGGGGACAAGGAACTCAA
GTAACAGTTTCAAGTGATGTAGAAGCTTGGCTTGGTGCACGTGATGACGATGACAAAGCTGAAGCAGCT
GCAAAGAAGCTGCAGCTAAAGCAGTATCTAAAGGTGAAGAGGATAATATGGCTATTATCAAAGAGTTTA
TGCGTTTCAAAGTACATATGGAAGGTTCTGTTAATGGTCACGAATTTGAAATAGAAGGTGAAGGCGAAG
GCCGTCCATATGAAGGCACTCAAACAGCTAAATTAAGTAAGTAAAGGTGGACCATTACCATTTCGCTTG
GGATATTCTTTACCACAATTCATGTATGGTTCTAAAGCATATGTTAAACATCCAGCTGATATTCCAGATT
ATCTTAAATTATCTTTCCCTGAAGGATTTAAATGGGAGAGAGTTATGAACTTTGAAGATGGTGGCGTTGT
TACAGTAACACAAGACTCTTCATTACAGGATGGTGAATTCATCTACAAAGTAAAATTACGTGGTACTAATT
TTCCATCTGATGGCCCTGTTATGCAAAAAAAACTATGGGTTGGGAAGCATCATCAGAACGTATGTACCC
TGAAGATGGTGCACCTAAAGGCGAGATTAACAACGTTTAAAATTAAGACGGTGGTGCATTATGATGCT
GAAGTAAAAACAACATATAAAGCTAAAAAACCTGTACAATTACCAGGTGCTTACAATGTAAACATTA
TGATATCACTAGTCACAATGAAGACTATACAATTGTTGAACAATACGAACGTGCAGAAGGTCGTCACAGT
ACAGGTGGAATGGATGAGTTATACAAAGCAGAGGCTGCAGCTAAAGAAGCTGCAGCTAAAGCTCATCAC
CATCACCATCACGATGTTGAAGCTTGGCTTGGTGCACGTAGAG**GTCTGAC**

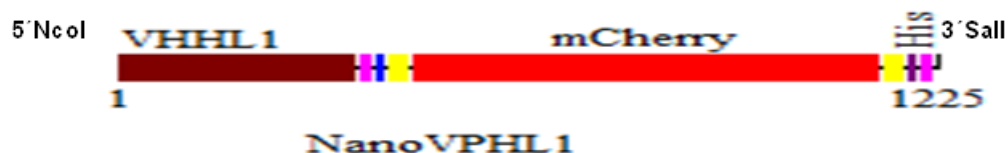


Figura 11. Secuencia del gen sintetizado para NanoVPHL1 y orden de los componentes del gen.

En negritas se muestra la secuencia para las enzimas de restricción NcoI y Sall en dirección 5'-3'; así mismo, el codón de inicio ATG resaltado en color fucsia. En la secuencia de NanoVPHL1 las regiones pequeñas de colores fucsia, azul y amarillo corresponden a Nano-Tag, proteasa y linker, respectivamente.

3.3.2. Modelado molecular del casete NanoVPHL1

Se realizó el modelado molecular del casete NanoVPHL1 utilizando el programa Phyre2 (Kelly et al. 2015). Obteniendo un 82% de los residuos modelados con una confiabilidad >90% como se observa en la Figura 12.

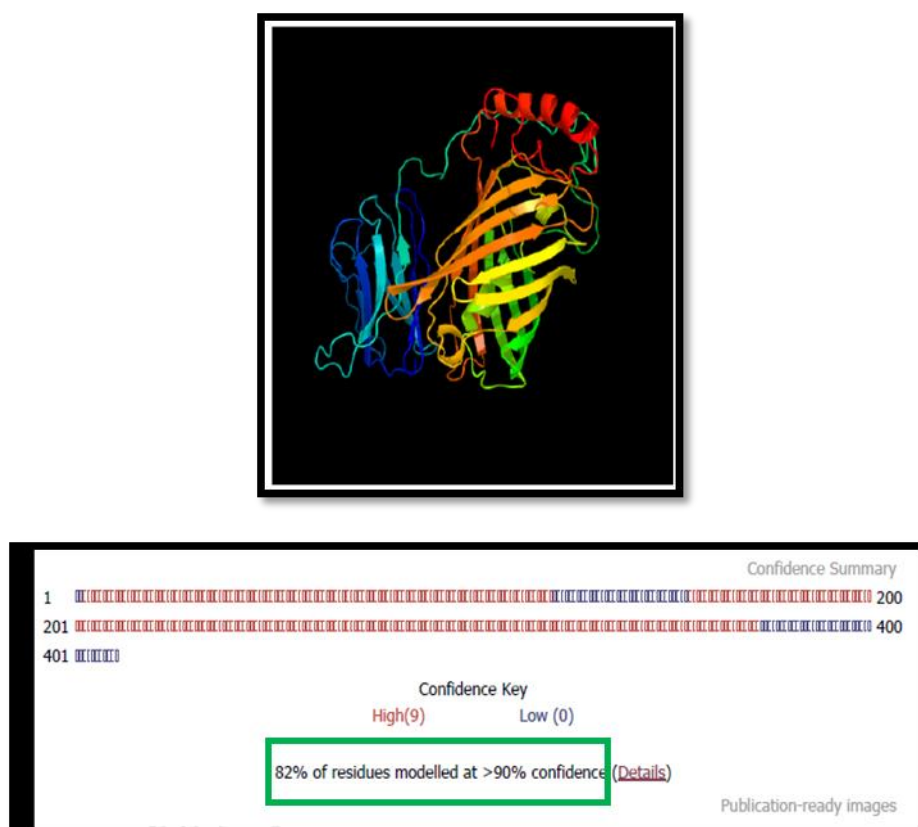
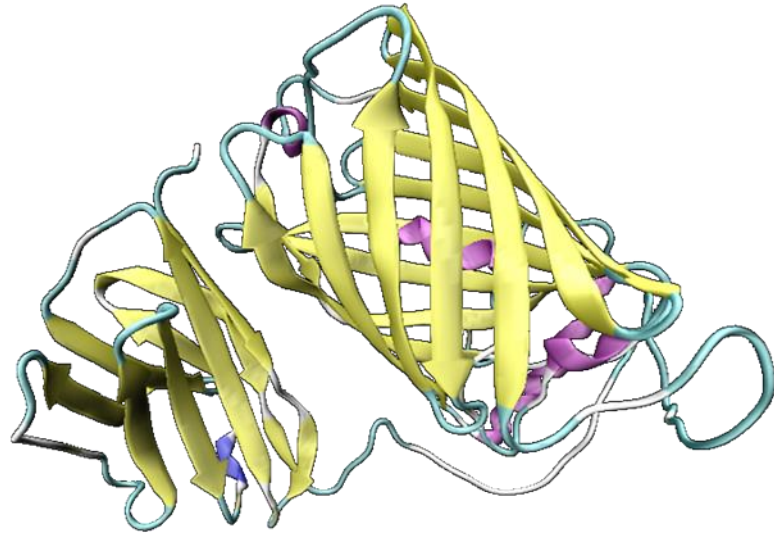


Figura 12. Modelo molecular de NanoVPHL1 y porcentaje de modelado

Resultado del modelado de NanoVPHL1 por medio de la plataforma Phyre2, utilizado un tipo de modelado intensivo y mostrando un 82% de los residuos modelados con una confiabilidad >90%.

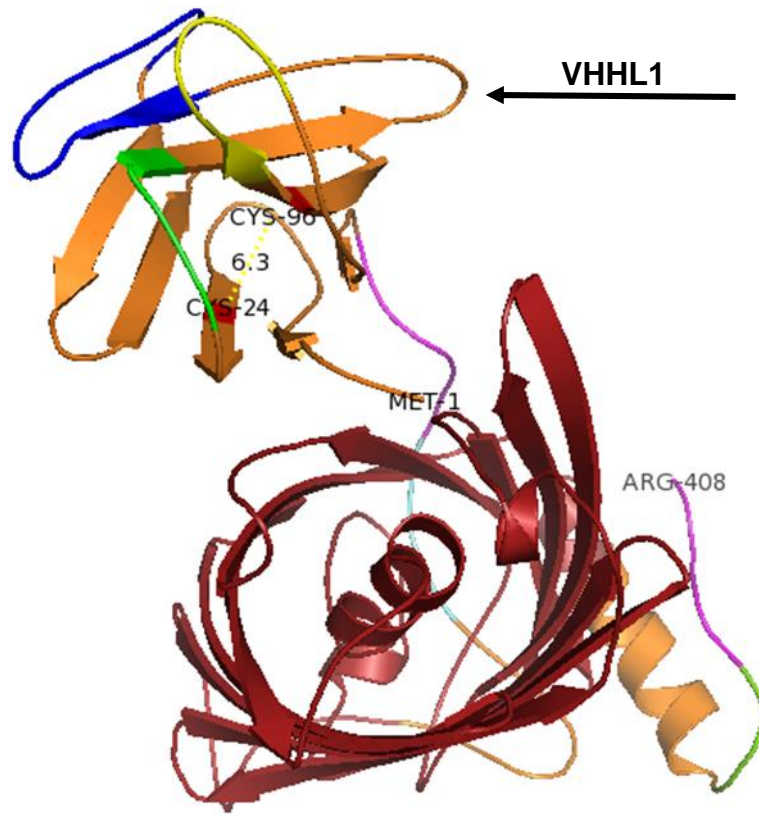
Con ayuda de algunos programas que sirven como visualizadores de modelos moleculares como PyMOL y VDM 1.9.2. se obtuvieron las siguientes imágenes de nuestra proteína heteróloga:

a)



b.1)





b.2)

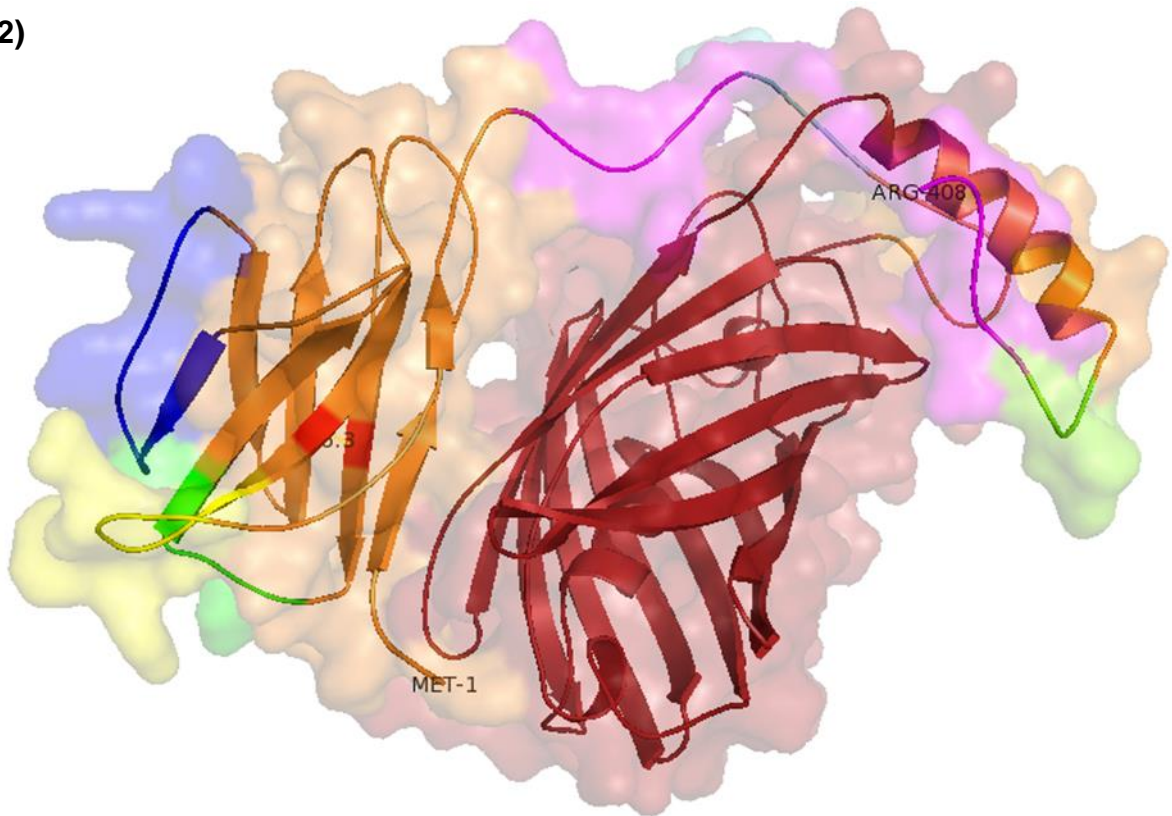


Figura 13. Modelado molecular de NanoVPHL1.

a) Se observa de manera general, a nivel de estructura secundaria. En color amarillo los segmentos referentes a hojas β -plegada, morado son α -hélice y en verde agua-blanco loops. b.1). Se muestra el orden de los segmentos que conforman el gen sintetizado NanoVPHL1 del Amino terminal- carboxilo terminal con el código un código de colores igual al utilizado en los modelos mostrados en la parte inferior.

En la figura 13a se puede observar que las dos secciones mayores dentro de la construcción del gen NanoVPHL1, esto es, la sección perteneciente a VHHL1 y la sección que contiene a mCherry se encuentran considerablemente separadas gracias al linker que está presente entre una y otra. Por lo que, se puede aseverar que el impedimento estérico que podría presentarse al momento en que la proteína sea plegada dentro de la plataforma de expresión de interés puede verse disminuida lo cual es benéfico ya que al presentar algún problema al momento del plegamiento puede incidir en la funcionalidad de la proteína. También, podemos observar claramente en la figura 13 b1 y 13 b2 como se encuentran totalmente expuestas las secciones correspondientes a los CDRs en orden del 1-3 con los colores verde, azul y amarillo respectivamente en el fragmento del VHHL1 lo cual es importante ya que son los sitios que reconocen el antígeno y deben poder ser accesibles.

3.3.3. Validación *in silico* del Modelado molecular del casete NanoVPHL1

Los modelos moleculares preferentemente deben ser validados, esto con ayuda de algunas plataformas que contienen herramientas bioinformáticas que permitan evaluar los resultados de dichos modelos. En este caso se utilizaron dos evaluaciones para validar el modelo del gen NanoVPHL1:

a) El gráfico de Ramachandran: el cual dada una estructura tridimensional proteica se grafican las combinaciones de ángulos diedros (torsionales) phi (ϕ) y psi (ψ) para cada aminoácido y puede verse fácilmente si algún aminoácido de la proteína posee una combinación no permitida de ángulos torsionales (Gopalakrishnan et al. 2007).

b) 3D-1D score: Determina la compatibilidad de un modelo atómico (3D) con su propia secuencia de aminoácidos (1D) asignando una clase estructural basada en su ubicación y entorno (alfa, beta, bucle, polar, no polar, etc.) y comparando los resultados con buenas estructuras.

Estos métodos de validación se llevaron a cabo con ayuda de dos plataformas que se pueden encontrar en la red:

1) El servidor SAVES administrado por el Instituto de Biología Molecular de la Universidad de California (UCLA). SAVES contiene 6 programas con los cuales se pueden verificar y validar estructuras de proteínas durante y después del refinamiento del modelo. En nuestro caso, se utilizaron dos programas: *Ramachandran Plot* y *Verify 3D*

2) Servidor *RAMPAGE* es administrado por la Universidad de Cambridge y es específico para obtener un gráfico de Ramachandran que proporciona el porcentaje de aminoácidos que se encuentran en las zonas favorables y permitidas, dado esto, el análisis se vuelve cuantitativo y no solo cualitativo.

Los resultados obtenidos a partir de la plataforma SAVES para el método *Verify 3D* se obtuvo un gráfico mostrado en el Anexo III, también señala que el 92.46% de los residuos muestran un promedio de $3D/1D \geq 0.2$. En general, un valor referente de $3D/1D$ mayor a 0.0 es un buen resultado (ref); así mismo, el tamaño del polipéptido genera un promedio de $3D/1D$ mayor. Por lo que, cuanto mayor sea la longitud de la cadena de aminoácidos el valor referente a este parámetro aumentará y se observarán mejores resultados (Lüthy et al. 1992). Al disgregar el modelado 3D hasta su mínima expresión que es la secuencia de aminoácidos (1D) y obtener una gráfica como la mostrada en el Anexo III podemos comprobar que existe una relación entre los resultados del modelado molecular, teniendo un 82% de residuos modelados con una fidelidad del 90%, y los resultados con este método de validación ya que más del 92% de los residuos muestran homología en su relación de estructura terciaria y primaria. Por lo cual la estructura terciaria de la proteína quedó validada sabiendo que más del 90% de los residuos muestran un buen modelado y que como bien se muestra en el gráfico, del residuo 20-60 aproximadamente se debe de buscar un método mas fino de modelado ya que es una sección que tanto en los resultados arrojado por el programa *Phyre2* y *Verify 3D* muestran baja homología. bien

Después, con los resultados obtenidos a partir de la plataforma SAVES para la gráfica de Ramachandran pudimos aproximar *a priori* cuál será la estructura secundaria del péptido, ya que existen combinaciones de ángulos típicas para cada estructura y de este modo validar el modelado molecular. En la figura 14 se observan el total de los aminoácidos que conforman el gen NanoVPHL1, se espera que la mayoría de las combinaciones de los residuos se encuentren en las zonas rojas y/o amarillas. Cada zona permite suponer la estructura secundaria que presentará la proteína. En el primer cuadrante la combinación

de átomos que se encuentran sobre las zonas antes mencionadas son combinaciones que serán estructuras α -hélice que muestran un giro a la izquierda. En el segundo cuadrante se encuentran las combinaciones de la hoja β y en el tercer cuadrante se hallan la hélice α con giro a la derecha y los giros o bucles (loops). Para las glicinas particularmente se usa el símbolo (+). Y se les permite una ubicación casi sin restricción dentro de la gráfica ya que debido a que sólo tiene un H como cadena lateral provoca menores problemas estéricos. (Ramachandran, G.N. Ramakrishnan, C. Sasisekharan 1963; Santos 2009). De manera cualitativa se observó que la mayoría de los residuos se encuentran dentro de las zonas permitidas y/o favorecidas; además, que la mayoría de los aminoácidos se concentran en el 2^{do} cuadrante lo cual concuerda con nuestro modelado ya que en su mayoría está conformado por estructuras de láminas β . Ya que este análisis es cualitativo, se utilizó la plataforma RAMPAGE para validar los resultados obtenidos a partir de SAVES; además, obtener un valor numérico y de este modo poseer una validación cuantitativa y no solo cualitativa.

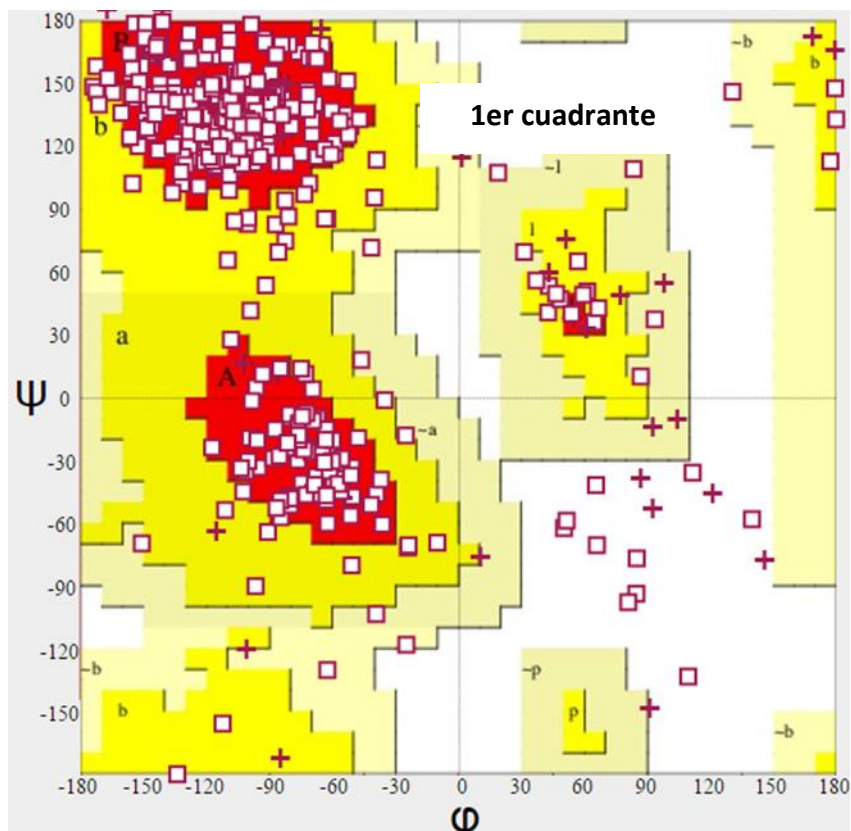


Figura 14. Gráfico de Ramachandran a partir de la plataforma SAVES.

La grafica muestra el total de los aminoácidos que conforman al gen NanoVPHL1 La gráfica se divide en 4 cuadrantes, comienzan a partir del 1^{ero} y el sentido es en contra de las manecillas del reloj(←). En los lugares sombreados del 2^{do} cuadrante se encuentran

los aminoácidos que están favorecidos a tener una estructura secundaria de hoja β y en la zona sombreada del 3^{er} cuadrante las combinaciones de aminoácidos tenderán a formar estructuras del tipo α -hélice y loops.

En la figura 15 se muestra el resultado a partir de RAMPAGE. Esta plataforma nos permitió observar de un modo detallado los aminoácidos que se encuentran fuera de las zonas favorecidas/permitidas. En general, la interpretación es la misma en cuanto a que las zonas sombreadas son las áreas en las que debiéramos encontrar la mayor cantidad de residuos pero además, este software analiza por separado un aminoácido que tiene una característica muy especial y no es la glicina, la prolina por ser el único aminoácido capaz de tener enlaces CIS y TRANS. Con este análisis un poco más fino, los resultados obtenidos fueron que: el 87% de un total de los a.a. que conforman al gen se encuentran dentro de las zonas favorecidas; el 5.9% están dentro de las regiones permitidas y el 7.1% de los a.a. se encuentran fuera de las zonas permitidas/favorecidas. Por lo tanto, dado que la mayoría de los residuos se encuentran en una combinación adecuada, la probabilidad de que exista algún impedimento estérico al momento del plegamiento es muy baja. Con ambas plataformas y métodos de validación *in silico* podemos aseverar que el modelado de la proteína tiene una calidad suficiente y la probabilidad de que existan problemas estereoquímicos es baja, como se pudo observar de manera cualitativa al observar el modelado de la proteína heteróloga.

En la figura 15 se muestra el resultado a partir de RAMPAGE. Esta plataforma nos permitió observar de un modo detallado los aminoácidos que se encuentran fuera de las zonas favorecidas/permitidas. En general, la interpretación es la misma en cuanto a que las zonas sombreadas son las áreas en las que debiéramos encontrar la mayor cantidad de residuos pero además, este software analiza por separado un aminoácido que tiene una característica muy especial y no es la glicina, la prolina por ser el único aminoácido capaz de tener enlaces CIS y TRANS. Con este análisis un poco más fino, los resultados obtenidos fueron que: el 87% de un total de los a.a. que conforman al gen se encuentran dentro de las zonas favorecidas; el 5.9% están dentro de las regiones permitidas y el 7.1% de los a.a. se encuentran fuera de las zonas permitidas/favorecidas. Por lo tanto, dado que la mayoría de los residuos se encuentran en una combinación adecuada, la probabilidad de que exista algún impedimento estérico al momento del plegamiento es muy baja. Con ambas plataformas y métodos de validación *in silico* podemos aseverar que el modelado de la proteína tiene una calidad suficiente y la probabilidad de que

existan problemas estereoquímicos es baja, como se pudo observar de manera cualitativa al observar el modelado de la proteína heteróloga.

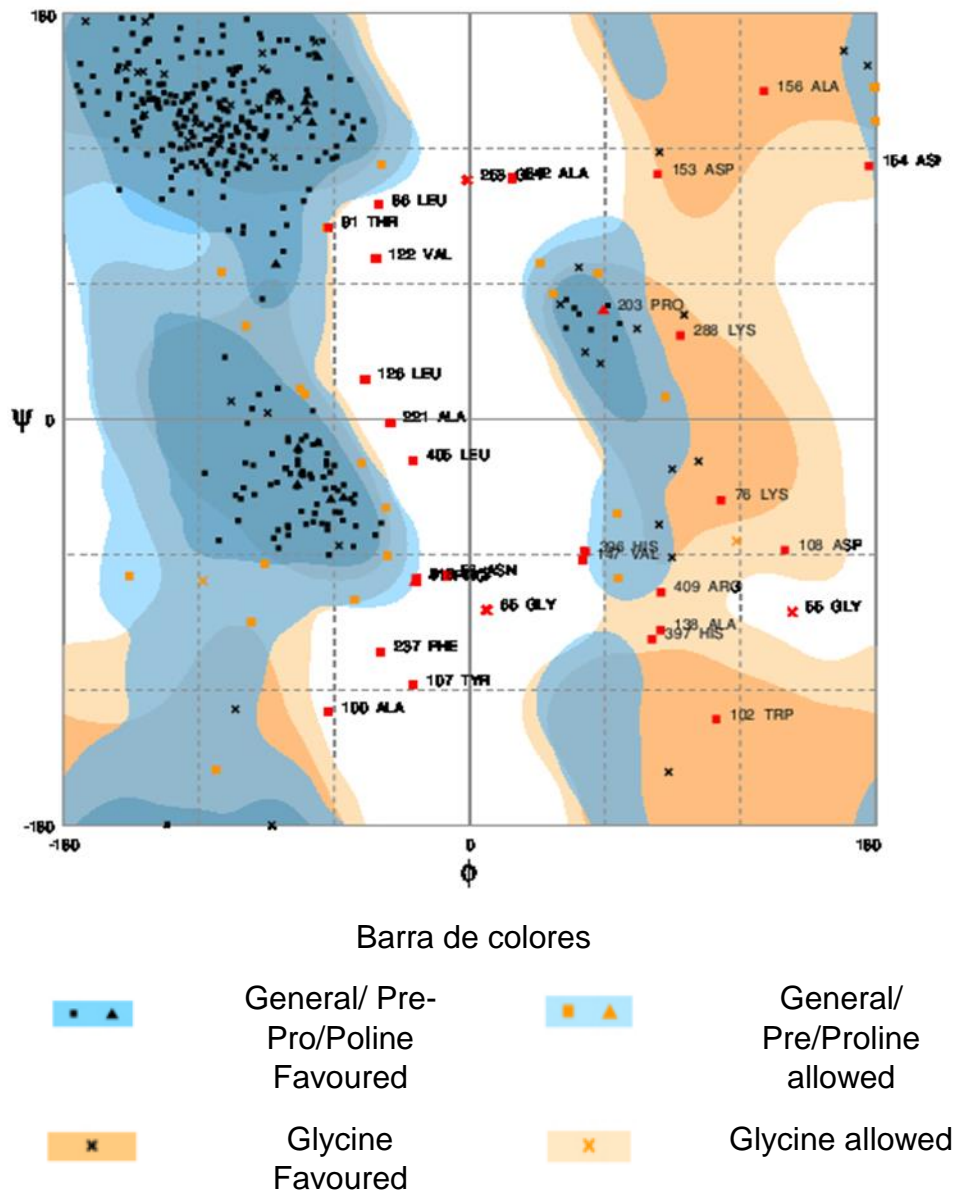


Figura 15. Gráfico de Ramachandran a partir de la plataforma RAMPAGE .

Se observan los aminoácidos que están fuera de las áreas favorecidas/permitidas y aquellos que cumplen con lo requerido para ser parte de las áreas permitidas/favorecidas. El resultado final de este análisis es que el 87% de un total de los a.a. que conforman al gen se encuentran dentro de las zonas favorecidas; el 5.9% están dentro de las regiones permitidas y el 7.1% de los a.a. se encuentran fuera de las zonas permitidas/favorecidas.

3.3.4. Transformación y expresión del gen NanoVPHL1 en *Escherichia coli* con el vector pET28 b(+)

Para confirmar que el diseño del gen NanoVPHL1 se puede expresar adecuadamente, se propuso como primer aproximación, expresarlo en *E.coli*, para lo esto se llevó a cabo la inserción del casete NanoVPHL1 en el vector pET28b(+) usando las enzimas NcoI y Sall con la metodología mostrada en la sección 2.2.2.1.. Una vez hecha la ligación del gen con que el vector pET28b se transformó en *E.coli* cepa TOP10 con la metodología mostrada en las secciones 2.2.2.2 a 2.2.2.7. Para confirmar la correcta ligación del inserto con el vector, se realizó el análisis por digestión enzimática del plásmido.

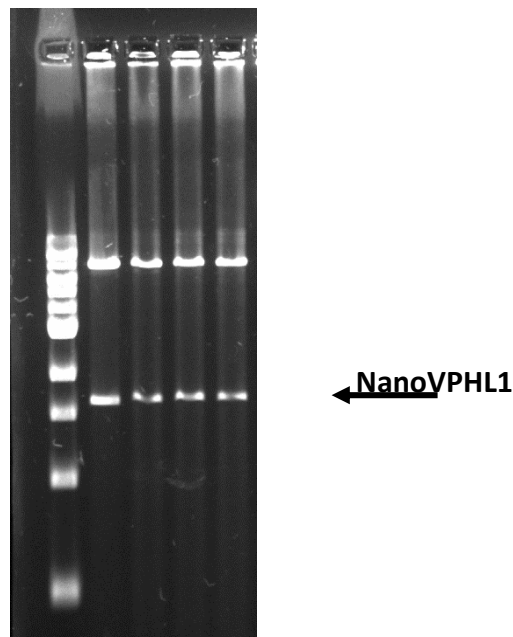


Figura 16. Digestión de pET28b(+) transformado con el gen NanoVPHL1.

Se muestra el fragmento liberado con ayuda de las enzimas de restricción NcoI y Sall. Del lado izquierdo se observa el marcador de 1 kb (Biolabs®) y del lado derecho el gel con 5 carriles. En el carril 1 se encuentra el marcador (M) y del carril 1-4 las digestiones de pET28b(+) transformado con el gen NanoVPHL1. Eliminar la imagen del marcador y colocar los valores de PM directamente en la imagen del gel.

En la figura 16 podemos observar la banda referente al fragmento que corresponde al gen de NanoVPHL1, liberada gracias al corte con las enzimas de restricción NcoI y Sall. El peso molecular del fragmento insertado fue de ~1500 pb y es un número aproximado con respecto a el fragmento liberado por las enzimas de restricción. Es importante señalar que cuando se diseñó el gen NanoVPHL1 este estaba formado por 1224 pb pero la empresa que sintetizó el gen señaló que tuvo algunos conflictos para hacerlo, entre ellos la pureza y la

síntesis de una cantidad extra de nucleótidos que más adelante podremos observar, no afectaron al momento de expresar el gen en *E.coli*.

Una vez confirmado que el gen NanoVPHL1 está presente en el vector, se transformaron células de *E. coli* BL21 como se indica en la sección 2.2.2.6. Los resultados de la transformación son visibles de manera física debido a que el casete NanoVPHL1 presenta un gen reportero que es una proteína fluorescente mCherry, usado como un marcador y deriva de una proteína aislada de *Discosoma sp*, su fotoestabilidad en comparación con otros fluoróforos monoméricos es mayor y es por esto que se prefiere por sobre otros fluoróforos.



Figura 17. Expresión del gen NanoVPHL1 en células de *E. coli* BL21.

Lado izquierdo se observan matraces conteniendo 250 mL de medio LB suplementado con kanamicina, el color final del medio de cultivo después de haberse inducido ~10 horas con IPTG. Lado derecho, se muestra el pellet que se formó al centrifugar 250 mL de medio de cultivo LB suplementado con kanamicina.

En la figura 17 se observa la característica antes descrita del gen reportero que contiene el casete de NanoVPHL1. El medio de cultivo vira de un tono amarillo a rojo/rosa. Después de verificar esta peculiaridad, las células se observaron en un microscopio de fluorescencia obteniendo resultados que se observan en la figura 18.

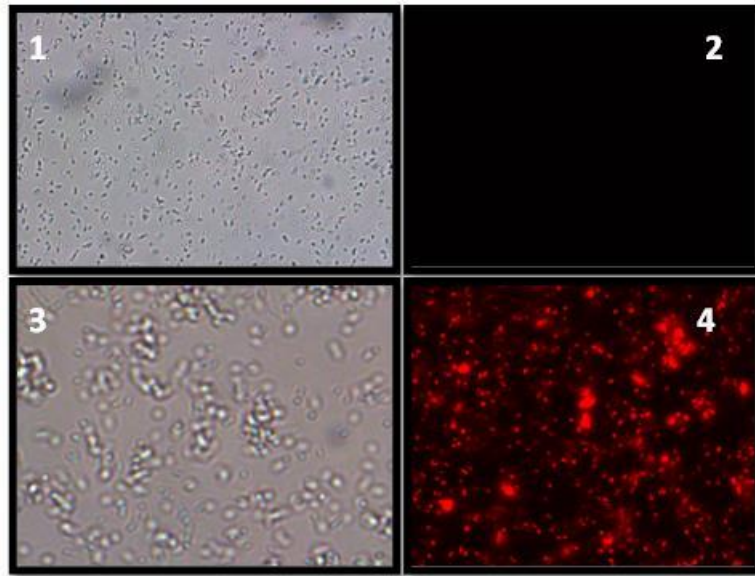


Figura 18. Fluorescencia de células de *E.coli* BL21 transformada con pET28b

Células de *E.coli* BL21 vista con microscopio de fluorescencia con una $\lambda=587-610$ nm. Y campo normal en un aumento de 100X. 1) *E.coli* nativa (ctrl -) en campo normal; 2) *E.coli* nativa (ctrl -) con fluorescencia; 3) *E.coli* transformada en campo normal; 4) *E.coli* transformada con fluorescencia

La proteína reportera mCherry tiene una longitud onda máxima (λ) de excitación de 587 nm y de emisión de 610 nm (Shaner et al. 2004). En la figura 18,2 se observa claramente que las células de *E.coli* nativa no muestran ninguna señal de fluorescencia a la longitud de onda de emisión descrita para mCherry y las células en el apartado 4 de la figura 18 que son células transformadas presentan la fluorescencia correspondiente para el gen reportero.

Cabe mencionar que se diseñó otro casete que contiene al gen VHHL1 (nanocuerpo) pero dicho casete es más pequeño que el utilizado hasta este momento y el que fue usado en todo el proyecto. Dicha construcción llevó por nombre NL1 (Figura 19) y el objetivo de este nuevo gen fue probar una construcción más pequeña (1137 nucleótidos) y además se le agregó el codón STOP que fue un faltante en la construcción del casete NanoVPHL1. El alcancé en este trabajo con el casete NL1 fue la transformación del vector pET28b y después la transformación de la cepa *E.coli* BL21 con el vector y verificar la expresión del casete con ayuda de la proteína fluorescente mCherry al observar después de la inducción con IPTG los cultivos de *E.coli* BL21 de color rojizo. Una de las perspectivas para la construcción NL1 es transformar el cloroplasto de *C. reinhardtii*, lo cual sucederá en otro proyecto.

CCAGTTTTTCATCAACTACGAGCCATGGCAGAGGTTTCAGTTACAAGCTAGTGGTGGTGGTTTTAG
 TTCAAGCAGGTGGCTCATTAAAGATTATCATGTGCTGCATCTGGTGATACTTACATTCACATGGG
 ATGGTTTCGTCAAGCTCCAGGTAAAGAACGTGAATTCGTACGTATTGATCCTGCAAACGGCAA
 TACAAAATACGATCCAAAATTCCAAGGTGGTAGATTCACTATTAGTCGTGATAACGCAAAAAAT
 ACAGTTTACTTACAGATGAATAGTTTTAAAACCAGAAGATACAGCTGTTTATTACTGTGCAGGTG
 GAGCTTATTGGGGTCAAGGAACATACGATTATTGGGGACAAGGAACTCAAGTAACAGTTTTCAA
 GTGATGACGATGACAAAAGTATCTAAAGGTGAAGAGGATAATATGGCTATTATCAAAGAGTTTTAT
 GCGTTTCAAAGTACATATGGAAGGTTCTGTTAATGGTCACGAATTTGAAATAGAAGGTGAAGG
 CGAAGGCCGTCCATATGAAGGCACTCAAACAGCTAAATTAAGTAAGTAAAGGTGGACCATT
 ACCATTCGCTTGGGATATTCTTTACCACAATTCATGTATGGTTCTAAAGCATATGTTAAACATC
 CAGCTGATATTCCAGATTATCTTAAATTATCTTTCCCTGAAGGATTTAAATGGGAGAGAGTTAT
 GAACTTTGAAGATGGTGGCGTTGTTACAGTAACACAAGACTCTTCATTACAGGATGGTGAATT
 CATCTACAAAAGTAAAATTACGTGGTACTAATTTCCATCTGATGGCCCTGTTATGCAAAAAAAA
 ACTATGGGTTGGGAAGCATCATCAGAACGTATGTACCCTGAAGATGGTGCACCTAAAGGCCGA
 GATTAACAACGTTTTAAAATTAAGACGGTGGTTCATTATGATGCTGAAGTAAAAACAACATAT
 AAAGCTAAAAACCTGTACAATTACCAGGTGCTTACAATGTAACATTAACCTTGATATCACTA
 GTCACAATGAAGACTATACAATTGTTGAACAATACGAACGTGCAGAAGGTCGTACAGTACAG
 GTGGAATGGATGAGTTATACAAAGATGTAGAAGCTTGGCTTGGTGCACGTTAAGTCTGACTTCC
 AGGCTCTTAGTAAATAC

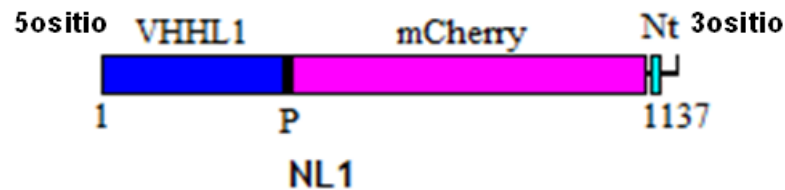


Figura 19. Secuencia del gen sintetizado para NL1 y orden de los componentes del gen.

Superior: En negritas se muestra la secuencia para las enzimas de restricción NcoI y Sall en dirección 5'-3'; así mismo, el codón de inicio ATG resaltado en color fucsia. Inferior: En la secuencia de NL1 las regiones pequeñas de colores azul y verde agua corresponden a la secuencia de una proteasa y Nano-tag, respectivamente.

3.3.5. Extracción de proteína total soluble y purificación del conjunto de proteínas codificadas por NanoVPHL1 a partir de *Escherichia coli*

La purificación del conjunto de proteínas que fueron codificadas por el gen NanoVPHL1 se llevó a cabo como se muestra en la sección 2.2.2.12 y fue por medio de las columnas Ni-NTA las cuales separan a las proteínas por medio de cromatografía de afinidad. Estas columnas contienen ácido nitrilotriacético (NTA) como agente quelante cargado con níquel inmovilizados sobre resina de agarosa al 6%. La resina Ni-NTA es compatible con condiciones nativas o desnaturizantes de las proteínas y puede usarse en múltiples formatos. El volumen del cual se partió para la purificación fue de 250 mL con un tiempo de inducción de 10 horas con IPTG 0.4 mM. La purificación se realizó con dos finalidades: 1) Verificar que alguna de las dos etiquetas con las que cuenta el gen NanoVPHL1 sea His 6X o Nano-tag, pueden utilizarse para atrapar el conjunto de proteínas y finalmente sólo obtener el fragmento correspondiente al nanocuerpo; esto es, el VHHL1 y así poder

escalarlo a otra plataforma como lo es *Chlamydomonas reinhardtii* . 2) Demostrar la correcta construcción del gen NanoVPHL1 y poder obtener un control positivo que sería utilizado para comparar con los resultados obtenidos en la plataforma de expresión *Chlamydomonas reinhardtii*.

En primera instancia se analizaron muestras después de la lisis celular (extracción de proteína total soluble) por medio de un gel de Acrilamida SDS-PAGE con la metodología mostrada en la sección 2.2.2.14 y se obtuvieron los resultados mostrados en la figura 20. Esto se llevó a cabo con la finalidad de monitorear de manera cualitativa la expresión de la proteína heteróloga y posiblemente visualizar una diferencia en el patrón de bandeo entre la cepa modificada y silvestre de *E. coli*.

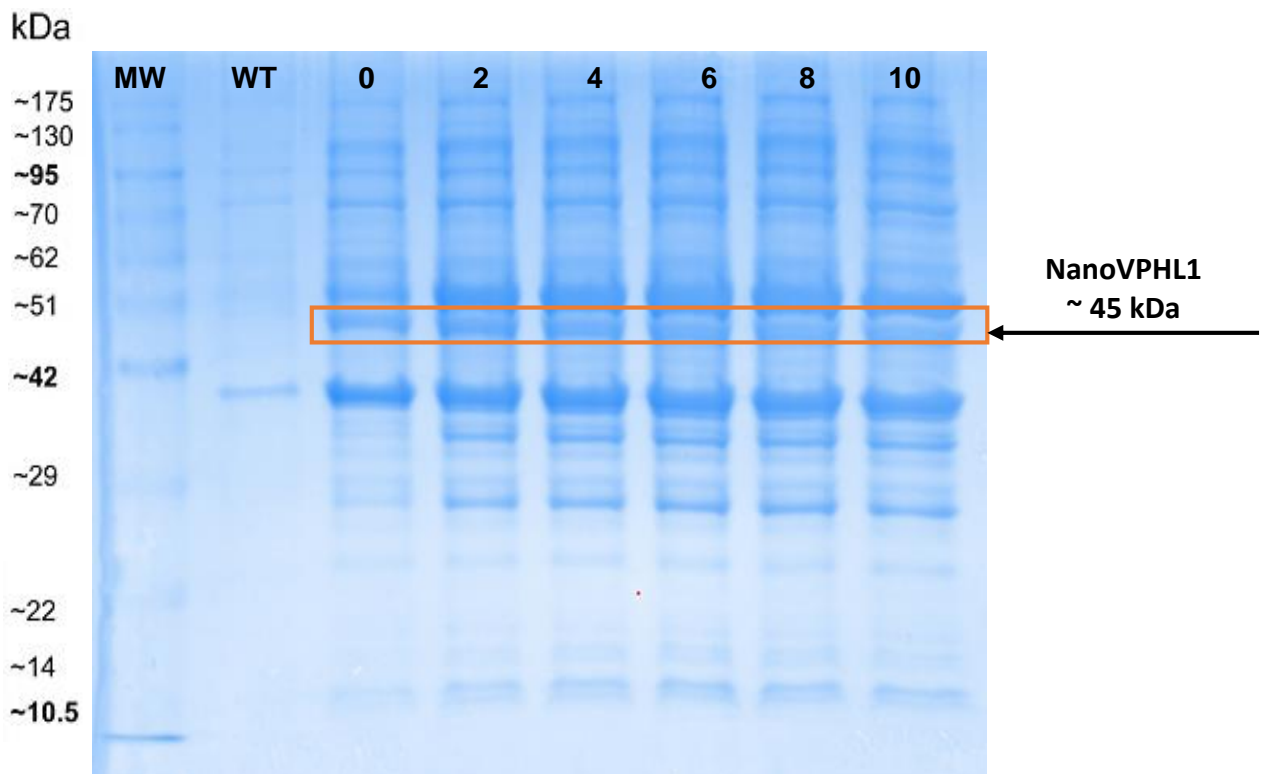


Figura 20. Expresión de proteína total en *E. coli* BL21(DE3).

Electroforesis en gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) con tinción azul de Coomassie. MW) Marcador de peso Molecular.kDa (WT) Proteína total de *E. coli* sin transformar al tiempo de 10 horas post-inducción; Carriles 0-10) Proteína total de *E. coli* BL21(DE3) transformada con pET28b(+), tomada al tiempo 0, 2, 4, 6, 8 y 10 h después de inducir con IPTG.

En la figura 20 se observa la expresión de proteína total en *E. coli* BL21; el gel hace referencia a muestras de una cinética de la bacteria transformada con el plásmido pET28 b(+), en medio LB suplementado con kanamicina. La fermentación se llevó a cabo con la

finalidad de monitorear la expresión de la proteína recombinante al paso del tiempo. La banda correspondiente al casete de expresión NanoVPHL1 tiene un peso aproximado de 45.2 kDa esto se investigó de manera *in silico* con ayuda de la plataforma en línea *Peptide Property Calculator*. Esta banda que se encuentra señalada a lo largo del gel se observa claramente que no está presente en el carril donde se encuentra la muestra de *E.coli* silvestre, lo cual da pauta para pensar que es la banda esperada. Además, de manera cualitativa se observa un incremento en la intensidad de la banda por lo cual se piensa que la expresión tal y como se esperaba va en aumento.

Finalmente se llevó a cabo la purificación de la proteína heteróloga tal y como se manifiesta en el apartado 2.2.2.11 y al igual, se analizó por medio de un gel de poliacrilamida al 15% (SDS.PAGE) como sugiere la sección 2.2.2.14, dicho gel se transfirió a una membrana PVDF y la identificación de la proteína recombinante NanoVPHL1 de *E.coli* BL21 se hizo por medio de western blot utilizando un anticuerpo monoclonal Anti-His-HRP (sección 2.2.2.15) para poder tener la certitud de que la banda que se sugiere en el gel de poliacrilamida es realmente la proteína heteróloga y verificar si la resina utilizada, verdaderamente retuvo a la proteína heteróloga por medio de la etiqueta 6x-His. Los resultados de dicho análisis se muestran en la Fig. 21 donde se observa una banda de aproximadamente de 45 kDa la cual corresponde al peso molecular del casete de NanoVPHL1 que fue reconocida por el anticuerpo monoclonal. Además, se observa que las proteínas de *E. coli* BL21 silvestres (WT) no son reconocidas por el anticuerpo Anti-His-HRP. En la Fig. 18 (derecha) se observan bandas correspondientes proteínas de menor peso molecular que fue reconocida por los anticuerpos; así mismo una de mayor peso pero solo en los carriles que se cargó proteína total (PT) o el filtrado (FT) alguna de las bandas inferiores pueden un producto de degradación de la proteína de 45 kDa, o bien, puede deberse a la etiqueta utilizada para la purificación 6X-His la cual es comúnmente utilizada para aislar una proteína de interés. De manera general, la proteína diana se marca con una secuencia de polihistidina que media la quelación con iones metálicos divalentes inmovilizados tales como níquel o cobalto y es posible retener la proteína de interés. Pero se ha demostrado que los péptidos con histidinas no consecutivas son también capaces de quelación a iones metálicos divalentes inmovilizados(Robichon et al. 2011), lo cual podría explicar las bandas inespecíficas que se observan en la parte superior e inferior, ya que el anticuerpo utilizado para la

inmunodetección es capaz de reconocer dichos peptidos no consecutivos de Histidina . Otra posible causa de las bandas que no son la proteína objetivo puede explicarse ya que además de las proteínas recombinantes etiquetadas con histidina, algunas proteínas nativas de las cepas: *E.coli* BL21, BL21(DE3), BL21 (DE3) pLysS, C41, C43, Rosetta (DE3), (DE3) pLysS, Origami (DE3) y (DE3) pLysS, también muestran afinidad por las resinas quelantes metálicas usadas comúnmente. La unión de proteínas nativas se determina por muchos factores, incluyendo la accesibilidad de residuos de histidina superficial a los iones metálicos presentes en resinas quelantes, el microambiente de residuos de unión, la cooperación entre grupos laterales de aminoácidos vecinos y las conformaciones locales; por lo tanto, cuando se purifica por medio de la resina específica para la etiqueta 6X-His siempre existirán proteínas llamadas “contaminantes”(Bolanos-Garcia & Davies 2006).(Saccodossi et al. 2012)

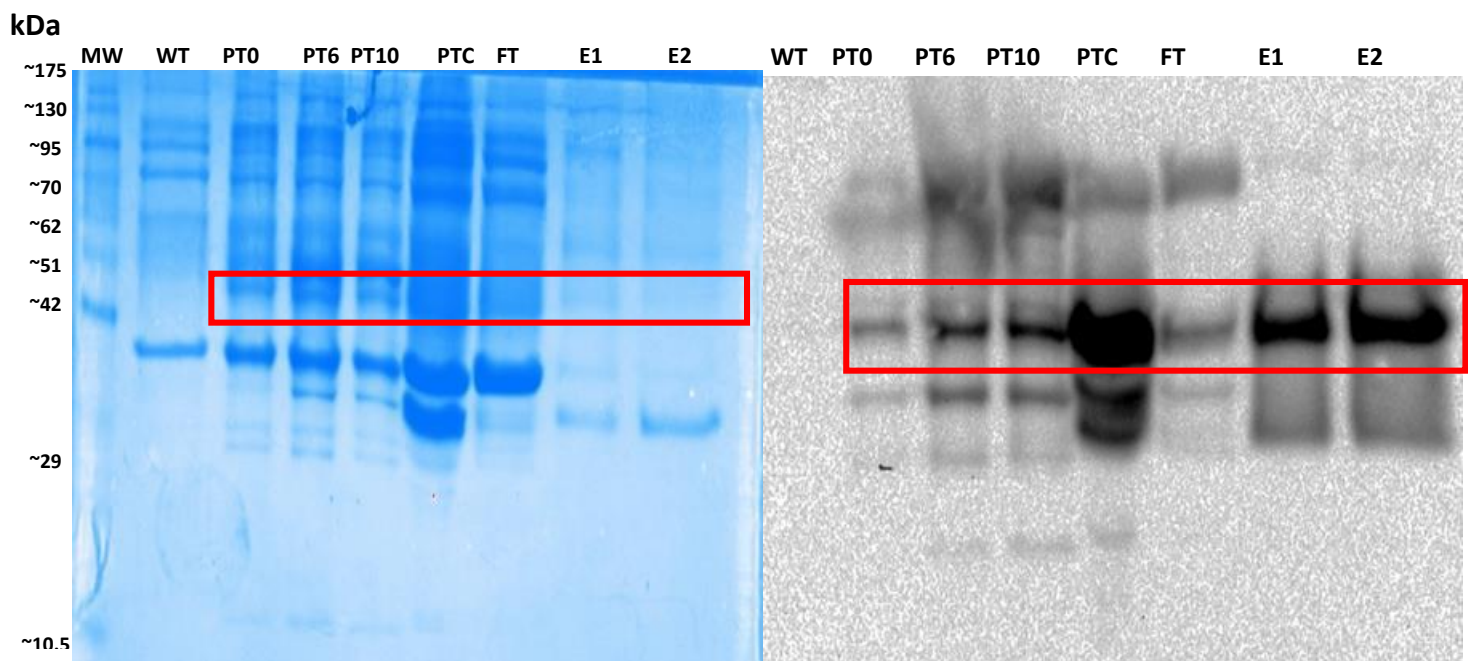


Figura 21. SDS-PAGE y Western Blot de la expresión de NanoVPHL1 en *E.coli* BL21.

Izquierda, Electroforesis en gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE). Derecha, Western Blot de *E. coli* BL21 transformada con pETet28b(+) Carriles: MW) Marcador de peso molecular, WT) Cepa silvestre de *E.coli* BL21, (PT0) Proteína total de *E.coli* BL21 transformada a inicio de la inducción con IPTG; (PT6) Proteína total de *E.coli* BL21 transformada a las 6 horas post-inducción; (PT10) Proteína total de *E.coli* BL21 transformada a las 10 horas post-inducción; (PTC) Proteína total de *E. coli* BL21 transformada (10 horas post-inducción) después de la ultrafiltración; (FT) Filtrado; (E1) Primera Elución; (E2) Segunda Elución.

3.3.6. Conclusiones

Se diseñó el nanocuerpo NanoVPHL1 conteniendo en sus bloques etiquetas de purificación (6x His y nano-Tag) y una proteína fluorescente (mCherry). Antes de ser

sintetizado, *in silico* se realizaron evaluaciones como: modelado molecular y una validación de dicha técnica para tener una mayor certeza del diseño del gen NanoVPHL1. El gen fue insertado en el vector pET28 b y después se transformó *E. coli* BL21 con la finalidad de verificar la correcta construcción del gen NanoVPHL1, y continuar con los objetivos del trabajo, para lo cual mCherry permitió observar de forma simple y cualitativa un color rojizo en los cultivos realizados; por lo cual, se asevera que el del casete sintetizado fue construido correctamente. Después se realizaron técnicas más finas para soportar la anterior aseveración como lo fueron: observar en un microscopio de fluorescencia células de la cepa silvestre y transformada de *E.coli* y la prueba confirmatoria fue la purificación y el montaje de geles de poliacrilamida al 15% y después el Western-Blot en el cual por medio de un anticuerpo monoclonal específico (Anti-His-HRP) se logró identificar la banda correspondiente al gen NanoVPHL1 con un peso de 45 kDa lo cual concuerda con lo calculado *a priori in silico*.

CAPÍTULO 4.

EXPRESIÓN DE NANOVPHL1 EN *Chlamydomonas reinhardtii*

4.1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

4.1.1. Expresión de proteínas recombinantes en sistemas no bacterianos

La producción de proteínas heterólogas ha ido en aumento con el paso de los años, esto se debe a los avances que se han dado en diversas áreas de ciencia y al avance de las enfermedades y de los mecanismos con los que cuentan para causar una enfermedad en los seres vivos. Hoy en día, hay más de 400 productos recombinantes comercializados (péptidos y proteínas) y otros 1300 se están sometiendo a ensayos clínicos. Durante el período 2010-2014 por ejemplo, 17 de los 54 fármacos proteicos aprobados fueron anticuerpos monoclonales (31,5%), en comparación con el 11% en 1980-1989. Además, entre los diez principales productos biofarmacéuticos vendedores a nivel mundial en 2014 seis son anticuerpos o proteínas derivadas de anticuerpos: Humira, Remicade, Rituxan, Enbrel, Avastin y Herceptin. En resumen, el mercado y el potencial de fármacos recombinantes se está expandiendo aprovechando un espectro de crecimiento constante de plataformas de producción de proteínas.(Sanchez-Garcia et al. 2016)

A pesar de la fuerza de las líneas de células de mamíferos como fábricas, las células microbianas y especialmente *E. coli* son todavía potentes fábricas de proteínas esencialmente apoyadas por su versatilidad y rentable cultivo pero existen nuevas plataformas como células de insecto, plantas completas, microalgas como *Chlamydomonas reinhardtii*, entre otras que han dado mucho de qué hablar en los últimos años respecto a las ventajas que tienen por sobre estas grandes fábricas que se tiene ya bien estructuradas (Tabla 10). Los fármacos recombinantes están pasando de versiones recombinantes simples de productos naturales a constructos de proteínas más sofisticados resultantes de un proceso de diseño racional. La combinación de dominios de proteínas para obtener nuevas funcionalidades se está explotando en el descubrimiento de fármacos mediante la explotación de la versatilidad estructural y funcional que se combinan en proteínas

como macromoléculas extremadamente versátiles y esta es otra característica por la cual se buscan nuevos microorganismos como fábricas que cumplan todos los requisitos que estas nuevas moléculas se están planteando.

Tabla 10. Comparación características de los sistemas de producción de proteínas recombinantes tradicionales con las de las microalgas (Rivera et al. 2011)(Rivera et al. 2011)

Organismo	Características						
	Costo de Producción	Tiempo de producción	Capacidad de escalamiento	Calidad del producto	Capacidad de glicosilación	Riesgo de contaminación	Costo de almacenamiento
Bacterias	Bajo	Corto	Alto	Bajo	No	Endotoxinas	Moderado
Levaduras	Medio	Medio	Alto	Medio	Sí	Bajo	Moderado
Células de insectos	Alto	Medio	Medio	Alto	Sí	Alto	Costoso
Células de mamíferos	Alto	Largo	Muy bajo	Muy alto	Sí	Virus- Priones	Costoso
Animales	Alto	Muy largo	Bajo	Muy alto	Sí	Virus- Priones	Costoso
Células de plantas	Bajo	Corto	Alto	Alto	Sí	Bajo	Poco costoso
Plantas	Muy bajo	Largo	Muy alto	Alto	Núcleo: Sí Cloroplasto: No	Bajo	Poco costoso
Microalgas	Muy bajo	Corto	Muy alto	Alto	Núcleo: Sí Cloroplasto: Sí	Bajo	Poco costoso

4.1.2. La microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, una nueva fábrica

Las algas son eucariontes fotoautótrofos relativamente simples que carecen de los tejidos (raíces, tallo y hojas) de las plantas. La identificación de las algas unicelulares y filamentosas requiere observación microscópica (Tortora et al. 2007). Las microalgas son organismos que pueden presentarse en ambientes terrestres y acuáticos; algunas pueden adoptar un estilo de vida fotosintético, heterotrófico o mixotrófico. Debido a su fisiología unicelular en combinación con una rápida división celular y crecimiento fotosintético las microalgas pueden ser más productivas por unidad de área que cualquier otro sistema biológico. La microalgas ofrecen un considerable potencial para la producción de compuestos de bajo volumen y alto valor agregado; estas, son características que se buscan en un sistema de producción en la industria biotecnológica; conjuntamente, el

estilo de vida fotosintético de estos organismos ofrece una fuente de compuestos de mayor sustentabilidad en comparación con las bacterias y las levaduras que son los “biorreactores” usados convencionalmente en el mundo industrial ya que no hay necesidad de proporcionar una fuente de carbono(Scaife et al. 2015).

La microalga verde unicelular eucariótica *Chlamydomonas* presenta un ciclo de vida simple, fácil aislamiento de mutantes y una creciente variedad de herramientas y técnicas de biología molecular que pueden ser usadas dentro de ella fácilmente. La cepa silvestre de *C. reinhardtii* (Clorofita) presenta una morfología ovoide de aproximadamente 10 μm de largo por 3 de ancho, es biflagelada en su extremo anterior, esto le proporciona movilidad además de estar involucrados en la reproducción sexual. La mayor parte de su espacio intracelular (40%) está ocupado por un único cloroplasto el cual posee aproximadamente 80 copias de su genoma. *C.reinhardtii* tiene la capacidad de desarrollarse de forma mixotrófica, autótrofa o heterótrofa; lo cual depende de la disponibilidad de compuestos orgánicos y la intensidad lumínica (Rivera et al. 2011). Este organismo haploide crece rápidamente en cultivos axénicos y puede ser en medio líquido o sólido; además, cuenta con un ciclo sexual que puede ser controlado de manera precisa. Otra característica importante es la capacidad que tiene de crecer con la luz como única fuente de energía (crecimiento fotoautótrofo) o con Acetato en la oscuridad (heterotróficamente), lo cual facilita el examen detallado de genes y proteínas esenciales para la función de la fotosíntesis o respiración.

Esta microalga ha sido estudiada por más de 30 años como un modelo para estudios fisiológicos como la fotosíntesis, la biogénesis del cloroplasto y la función flagelar, entre otras. Con el paso de los años y la investigación, actualmente el número de recursos disponibles para la manipulación genética y la caracterización de *C. reinhardtii* ha incrementado notoriamente. Entre estas nuevas tecnologías se incluyen: el establecimiento de protocolos de crecimiento, propagación sexual, mutagénesis; así como, numerosos ensayos bioquímicos y analíticos.

Los tres genomas que podemos encontrar dentro de este organismo (nuclear, mitocondrial y en el cloroplasto) han sido secuenciados y transformados

genéticamente con protocolos bien establecidos. El cloroplasto de *C.reinhardtii* es un organelo en particular atractivo para la producción de algunas proteínas recombinantes.

4.1.2.1. Particularidades del Cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii*

Un único cloroplasto en forma de copa ocupa dos tercios basales de la célula y rodea parcialmente al núcleo. Dentro del cloroplasto un cuerpo bien diferenciado de estructura proteica, llamado pirenoide es el sitio de fijación del CO₂ y de las reacciones oscuras de la fotosíntesis. La presencia o ausencia de pirenoides distingue a *Chlamydomonas* del género *Chloromonas*, y dentro del género *Chlamydomonas* el número y arreglo de los pirenoides es una característica importante en su taxonomía. El genoma del cloroplasto de *C. reinhardtii* es de 203.8 kbp y contiene 99 genes densamente empacados en dos regiones invertidas repetidas o en copias de dos regiones únicas; incluye 5 genes rRNA, 17 genes de proteína ribosomal, 30 tRNA específicos para todos los aminoácidos y 5 genes que codifican para el núcleo catalítico de una RNA polimerasa del tipo encontrado en Eubacterias. Cabe mencionar que gran parte de las proteínas plastidiales se encuentran codificadas en el núcleo (Grossman et al. 2003; López Limón 2014).

Los plástidos, como los cloroplastos en plantas superiores, son organelos semiautónomos que cuentan con su propia maquinaria de replicación, transcripción y traducción. Son capaces de llevar a cabo el proceso de fotosíntesis, y de sintetizar compuestos como aminoácidos, carbohidratos, proteínas entre otras biomoléculas; por lo que, al modificar su genoma es posible sintetizar proteínas recombinantes aprovechando su maquinaria. En los diversos estudios que se han realizado en plantas y algas se demuestra que la inserción de genes ocurre casi de manera exclusiva mediante recombinación homóloga en el cloroplasto. Con esta forma de recombinación, permite manipulaciones del plastoma de forma dirigida a sitios específicos y se evitan los defectos de posición que son propios de la inserción de genes cuando se trata del genoma nuclear, los cuales impactan significativamente la expresión de proteína (Purton 2007).

El cloroplasto de *C.reinhardtii* es particularmente un organelo atractivo para la producción de algunas proteínas recombinantes. Debido a estas características particulares con las que cuenta. Actualmente, diversas proteínas con relevancia farmacéutica han sido expresadas exitosamente a partir de la transformación de cloroplastos de *C.reinhardtii* (figura 22).

Biopharmaceutical	Type of biopharmaceutical	Expression strategy	Transformation technique	Expression levels	Assessed properties of the recombinant protein	Reference
Human glutamic acid decarboxylase 65 (hGAD65)	Vaccine against type I diabetes	Chloroplast	Biolistic	0.25–0.3% TSP	Reacts with sera from diabetic patients and is immunogenic in NOD mice	Wang et al. (2008)
Fusion protein comprising foot-and-mouth disease virus VP1 protein and the cholera toxin B subunit (CTBVP1)	Vaccine against foot-and-mouth disease virus	Chloroplast	Biolistic	3–4% TSP	Displays antigenic determinants from both components	Sun et al. (2003)
Fusion protein comprising the D2 fibronectin-binding domain of <i>Staphylococcus aureus</i> and cholera toxin B subunit (CTBD2)	Vaccine against <i>Staphylococcus aureus</i>	Chloroplast	Biolistic	0.7% TSP	Immunogenic in mice inducing mucosal and systemic immune responses when administered by the oral route. Reduces bacteria load and protects against lethal challenge with <i>S. aureus</i> at 80%	Dreesen et al. (2010)
Structural protein E2 from classical swine fever virus	Vaccine against classical swine fever virus	Chloroplast	Biolistic	1.5–2% TSP	Immunogenic in mice inducing systemic immune responses when administered by the s.c. route	He et al. (2007)
Fusion protein comprising the C-terminal domains from the Apical Major Antigen AMA1, of Major Surface Protein MSP1 and the granule-bound starch synthase (GBSS)	Vaccine against malaria	Nuclear	Glass beads	NR	Immunogenic in mice inducing systemic protective immune responses when administered by the oral and intraperitoneal routes	Dauvillée et al. (2010)
Unique large single-chain antibody against the glycoprotein D of the herpes simplex virus (hsv8-lsc)	Antibody for passive immunity	Chloroplast	Biolistic	≈ 1% TSP	Binds HSV proteins	Mayfield et al. (2003)
83K7C IgG1 human antibody	Antibody for passive immunity	Chloroplast	Biolistic	NR	Capable of binding and neutralize anthrax toxin	Tran et al. (2009)
Erythropoietin (EPO)	Treatment of anemia	Chloroplast	Biolistic	Very low	NR	Rasala et al. (2010)
Domain 10 of human fibronectin (10FN3)	Putative antibody mimic (monobody)	Chloroplast	Biolistic	Very low	NR	Rasala et al. (2010)
Domain 14 of human fibronectin (14FN3)	Putative antibody mimic (monobody)	Chloroplast	Biolistic	3% TSP	Functional assay not available	Rasala et al. (2010)
Human interferon β1	Treatment of multiple sclerosis	Chloroplast	Biolistic	ND	NR	Rasala et al. (2010)
Proinsulin	Treatment of type I diabetes	Chloroplast	Biolistic	Very low	NR	Rasala et al. (2010)
Human vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform 121	Treatment of pulmonary emphysema and possible for erectile dysfunction and depression	Chloroplast	Biolistic	2% TSP	Active in a VEGF receptor-binding assay	Rasala et al. (2010)
High mobility group protein B1 (HMGB1)	Favors wound healing and potential as adjuvant for anticancer therapies	Chloroplast	Biolistic	2.5% TSP	Active in a fibroblast chemotaxis assay	Rasala et al. (2010)

%TSP percentage respect to total soluble protein, NR Not reported, ND Not detected

Figura 22. Biofarmacéuticos producidos en *Chlamydomonas reinhardtii*

Lista de Productos biofarmacéuticos producidos en el cloroplasto de *C. reinhardtii* (Rosales-Mendoza et al. 2012)

4.1.2.2. Producción de proteínas heterólogas en el cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii*

Como se ha mencionado anteriormente, *Chlamydomonas reinhardtii* presenta ciertas características que la han vuelto muy interesante para la expresión de proteínas terapéuticas. Para redondear todas estas cualidades, se puede además agregar que muchas microalgas se encuentran dentro de la categoría GRAS (Generally Recognized as Safe) lo cual significa que es seguro comerlas y por tanto, son una fuente para el suministro de proteínas terapéuticas, tal vez con poca o ninguna purificación (Mayfield et al. 2007).

La primera transformación del genoma de cloroplasto de *C. reinhardtii* se llevó a cabo el 1989 cuando Boynton y colaboradores restauraron la capacidad fotosintética de una mutante de *C. reinhardtii* por bombardeo de células con microproyectiles de alta velocidad recubiertas con el gen de origen nativo. Los primeros intentos de expresar una proteína que originalmente no estaba presente en el cloroplasto de esta microalga involucraron el gen de la neomicina fosfotransferasa de origen bacteriano y los genes de la β -glucuronidasa. Ambos experimentos se llevaron a cabo con promotores presentes en los cloroplastos de *C. reinhardtii*. En estos primeros experimentos no se pudo detectar presencia de las proteínas recombinantes, pero en el año 1991 y con el perfeccionamiento de la regulación de los genes que se deseaban expresar, se reportó la acumulación de una proteína no propia de los cloroplastos de *C. reinhardtii*. Las células transformadas eran resistentes a espectinomicina y con un ensayo enzimático se detectaba actividad de AAD (Aminoglycoside Adenine transferase). Para 1999 se reportó la expresión de la proteína de origen bacteriano β -glucuronidasa; los genes quiméricos estaban compuestos por promotores a partir de genes del cloroplasto: *rbcL*, *psbA* o *atpA* y por regiones 5'-3'UTR. Se construyeron 3 cloroplastos RG, PG y AG para los cuales la cuantificación de proteína total soluble fue de 12%, ND (no detectada) y 0.08% respectivamente (Manuell et al. 2007; Ishikura et al. 1999).

Con el tiempo y la investigación acerca del uso de promotores de, optimización de codones y secuencias contenidas dentro de las regiones 5'UTR para lograr una mayor expresión de proteínas terapéuticas en el cloroplasto de *C. reinhardtii* ha ido en aumento el uso de esta plataforma para la producción de biomoléculas. La primera de estas proteínas fue un anticuerpo anti-herpes humano de cadenas sencillas largas (HSV8-Isc) que contenía toda una cadena pesada unida a una región variable de una cadena ligera. La expresión de este gen se obtuvo con los promotores *atpA* o *rbcL* así como secuencias convenientes dentro de las regiones 5'UTRs y se obtuvo un resultado de 0.5% de proteína total soluble; además se demostró el correcto ensamble de esta IgA1 y la capacidad de unión a una proteína del herpes. Con estos datos, se estableció la capacidad de síntesis que

posee *C. reinhardtii* (Franklin & Mayfield 2005). Otras moléculas han sido expresadas en este sistema dando paso a más preguntas e investigaciones (Figura 22)

El advenimiento de tecnologías para expresar proteínas heterólogas en el cloroplasto de microalgas ha dado lugar a la propuesta de que estas pueden ser un lugar seguro para su producción y vehículos baratos para la producción de vacunas; por ejemplo, la inmunogenicidad de una variedad de antígenos de relevancia para la vacunación expresado en diferentes tipos de microalgas ha sido evaluado. Con todos los antecedentes que se tienen acerca de la capacidad que tiene el cloroplasto de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* para expresar macromoléculas complejas como lo son los anticuerpos, en este capítulo se planteó la idea de introducir el gen NanoVPHL1, una vez probado el correcto diseño de dicho casete de expresión en *E. coli*, en el cloroplasto de *C. reinhardtii* el cual contiene un nanocuerpo que tiene como diana la proteína L1 del virus del papiloma humano (VPH). El gen fue introducido en dos vectores p320 OP8 y OP9 con los cuales fue bombardeado el cloroplasto de la microalga.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de este capítulo se utilizaron las siguientes técnicas descritas en el punto 2.2.3. Manipulación de *C. reinhardtii* y del punto 2.2.2. Manipulación de *E. coli* las técnicas utilizadas fueron: 2.2.2.1 - 2.2.2.9 y 2.2.2.13 - 2.2.2.15; todas ellas contenidas en el capítulo 2.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Transformación de los plásmidos p320 OP8 & OP9

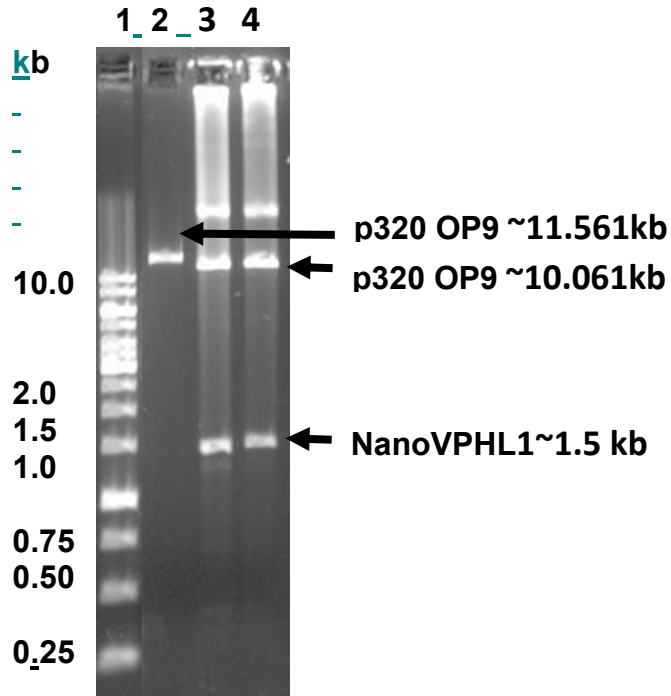
Con el objetivo de introducir el casete de expresión NanoVPHL1 en el cloroplasto de *C. reinhardtii*, lo principal fue insertar dicho gen en los plásmidos p320 OP8 & OP9. Los vectores fueron construidos dentro del grupo de trabajo (M. en C. Karla Macedo, estudiantate de doctorado). El casete NanoVPHL1 y los plásmidos fueron digeridos con las enzimas de restricción NcoI y Sall con la metodología mostrada en la sección 2.2.2.1. y después se llevó a cabo la ligación de los fragmentos

obtenidos (sección 2.2.2.4.) y se transformaron células de *E.coli* Top10 (sección 2.2.2.6) para verificar la correcta ligación del casete NanoVPHL1 y los vectores p320 OP8 & OP9. Con las colonias que crecieron en la placa de medio LB suplementado con Ampicilina para la selección de colonias transformadas se propagaron en medio líquido y antibiótico para después poder extraer ADN plasmídico por medio de lisis alcalina o Miniprep, como se muestra en las secciones 2.2.2.7 y 2.2.2.8.

En las figuras 23 y 24 observamos la digestión de los vectores p320 OP9 y OP8, respectivamente con las enzimas NcoI y Sall. El fragmento liberado es de ~1500 pares de bases, este tamaño corresponde al fragmento esperado del gen NanoVPHL1. El vector p320 OP9 está constituido por 10061 nucleótidos de los cuales 70 conforman a la región intergénica (OP9) y p320 OP8 formado por 10649 nucleótidos de los cuales 200 se encuentran en la región intergénica (OP8); los vectores p320 OP8 y OP9 transformados tienen un peso de 12.149 y 11.561 kpb, respectivamente.

En la figura 23 se muestra en el carril 2 el vector p320 OP9 sin digerir, una sola banda con un peso superior a las 10 kb (~11.561kb), en los carriles 3 y 4 dos bandas de la reacción de digestión; la banda superior corresponde al vector p320 OP9 (~10.061 kb), y la banda inferior al gen NanoVPHL1 (~1.5 kb), confirmando la integración de dicho gen en el vector de expresión vector p320 OP9. Para la figura 21 se muestra en el carril 4 el vector p320 OP8 sin digerir, una sola banda con un peso superior a las 10 kb (~12.149 kb), en los carriles 2 y 3 dos bandas de la reacción de digestión; la banda superior corresponde al vector p320 OP8 (~10.649 kb), y la banda inferior al gen NanoVPHL1 (~1.5 kb), confirmando la integración de dicho gen en el vector de expresión vector p320 OP8. En el caso de este último vector p320 OP8, dicha construcción y el correcto alineamiento del gen se comprobó mediante secuenciación, como se describe en la sección 2.2.2.16. Los resultados de secuenciación fueron comparados con las secuencias que conforman el gen NanoVPHL1 (VHHL1, mCherry, principalmente) y dos secuencias que se encuentran río arriba del NanoVPHL1: la secuencia del gen

que confiere resistencia a kanamicina (*aphA6*) y la región intergénica OP8, mostrando identidad de los nucleótidos de los genes para la cada una de las secuencias antes mencionadas.



igura 23. Electroforesis de digestión enzimática del vector *p320 OP9* transformado con el gen *NanoVPHL1*.

Se muestra el fragmento liberado con ayuda de las enzimas de restricción *NcoII* y *SalI*. Del lado izquierdo se observa el marcador de 1 kb (*Thermo Scientific*) y del lado derecho el gel con 4 carriles. En el carril 1) se encuentra el marcador (M), carril 2) vector sin digestión y carriles 3-4) vectores *p320 OP9* digerido transformado con el gen *NanoVPHL1* a partir de muestras de lisis alcalina, el fragmento liberado es de ~1500 pb.

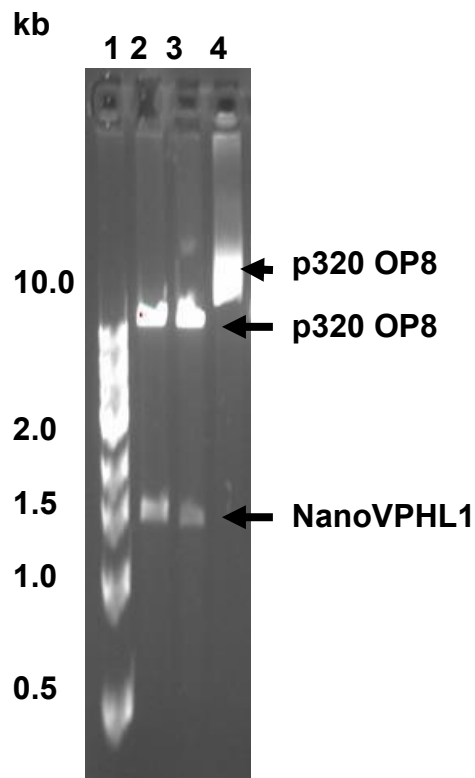


Figura 24. Digestión del vector p320 OP8 transformado con el gen NanoVPHL1.

Se muestra el fragmento liberado con ayuda de las enzimas de restricción NcoII y Sall. Del lado derecho se observa el marcador de 1 kb (Biolabs®) y del lado izquierdo el gel con 4 carriles. En el carril 1) marcador (M), carril 2-3) vectores p320 OP8 digerido transformado con el gen NanoVPHL1 a partir de muestras de Miniprep y el carril 4) vector p320 OP8 sin digerir. El fragmento liberado es de ~1500 pb.

4.3.2. Bombardear a *Chlamydomonas reinhardtii* con el vector p320 OP8

Una vez que se confirmó la construcción de dichos vectores y se realizaron las Miniprep de ambos plásmidos, se bombardeó a la microalga *C. reinhardtii*. Se inoculó un matraz con 200 mL de medio TAP con aproximadamente un cuadrado de 1 cm de área de la cepa de *C. reinhardtii* silvestre el cual se dejó en agitación y un fotoperiodo de 16/ h de luz/ oscuridad a 25°C en el cuarto de cultivo. Diariamente se tomó 1 mL de muestra para determinar la densidad óptica del cultivo a una $\lambda=750$ nm; cuando la longitud de onda se encontró entre 1.4-1.7 se retiró el matraz y se cosecho la biomasa en un tubo de 50 mL en condiciones de esterilidad centrifugando a 5000 rpm por 5 min cada vez. El botón se resuspendió en 5 mL de medio TAP y se cubrió con aluminio para mantener en periodo de oscuridad a las células ,en este volumen había ~2.7 millones de células. La metodología se continuó como se marca en la sección 2.2.3.1.

Se realizaron cinco bombardeos, dos con el vector p320 OP9 y tres con el vector p320 OP8, y para cada uno de ellos se tuvo un control positivo (Ctrl +) y uno negativo (Ctrl -): para el Ctrl + la placa medio TAP suplementado con kanamicina y en el centro un botón celular de *C.reinhardtii* fue bombardeado con el plásmido p320 OP3, el cual al igual que los vectores p320 OP8 & OP9 cuenta con el gen que confiere resistencia al antibiótico kanamicina y ha sido probado en diferentes ocasiones anteriormente. Y para el (Ctrl -): consistió en dejar la placa con medio TAP y kanamicina con botón celular de *C. reinhardtii* en el centro sin bombardear y esperar algunas semanas para que las células murieran ya que la cepa silvestre no debe mostrar resistencia al antibiótico.

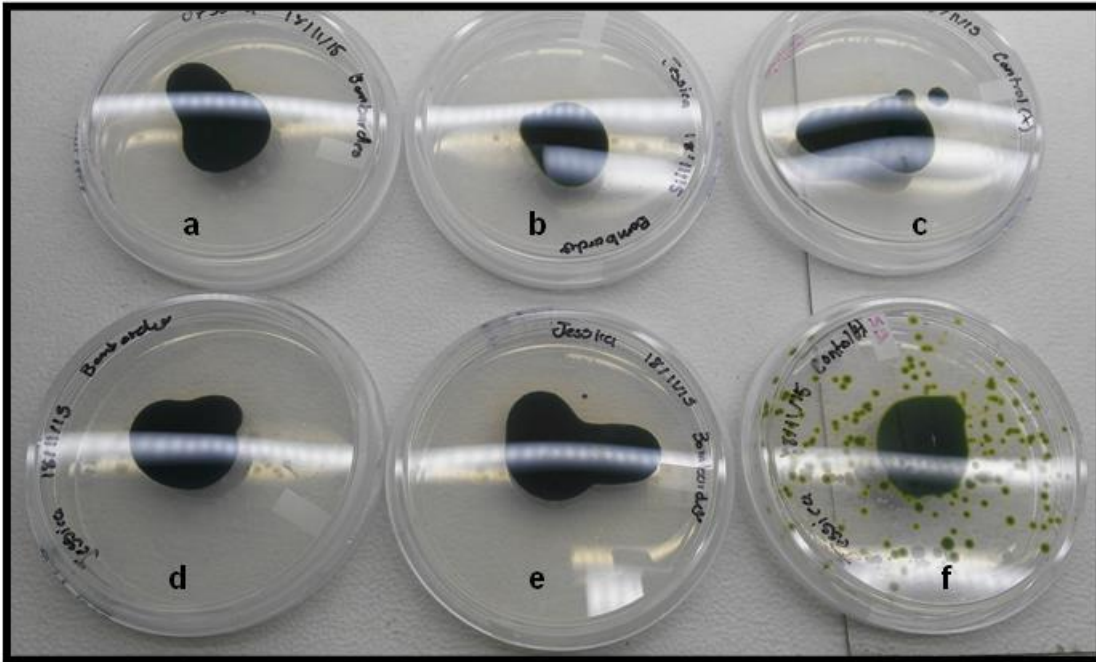


Figura 25. Bombardeo de *Chlamydomonas reinhardtii* con plásmido p320 OP9. Placas después de una semana de ser bombardeadas. a), b), d) y e) bombardeadas con partículas de Tungsteno recubiertas con ADN plasmídico p320 OP9; c) Ctrl + bombardeo con partículas de Tungsteno recubierto de ADN plasmídico p320 OP3 y f) Ctrl (-) placa sin bombardear.

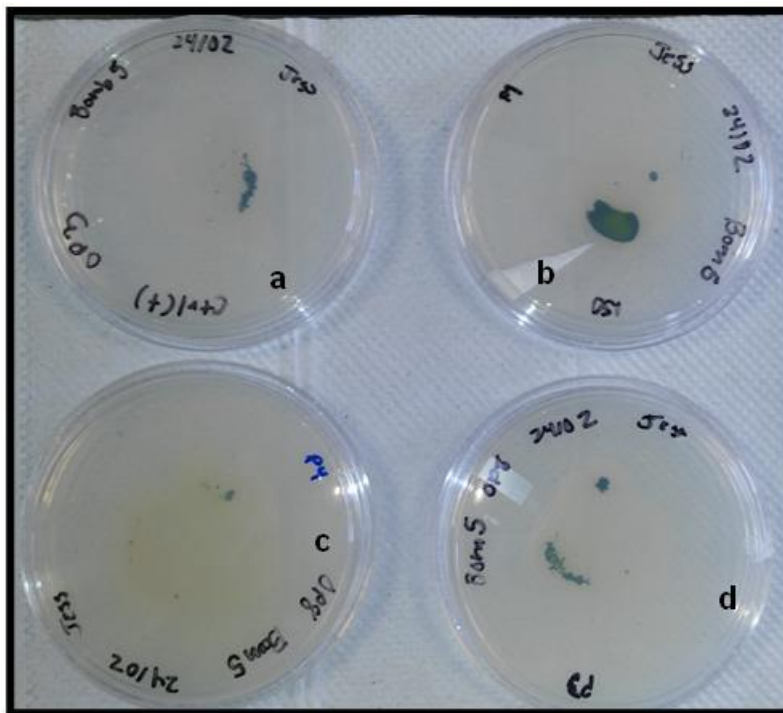


Figura 26. Bombardeo de *Chlamydomonas reinhardtii* con plásmido p320 OP8.

Placas después de 8 semanas de ser bombardeadas. a) Ctrl + bombardeo con partículas de Tungsteno recubierto de ADN plasmídico p320 OP3, b), c) y d) bombardeadas con partículas de Tungsteno recubiertas con ADN plasmídico p320 OP8. En las cuatro placas se ven colonias aisladas, posibles transformadas.

Una vez que se comenzaron a observar colonias aisladas en las placas se realizaron los pases de las mismas a placas nuevas con medio TAP y kanamicina. Al cabo de 3 pases en placas nuevas con un intervalo de entre 2-3 semanas, y si las colonias continuaban creciendo se procedió a extraer ADN celular total para poder confirmar por medio de PCR a estas colonias como transformadas positivas. De los cinco bombardeos que se realizaron, sólo se obtuvieron líneas resistentes de un bombardeo y fue con el vector p320 OP8. Los siguientes experimentos que se realizaron son exclusivos de este plásmido.

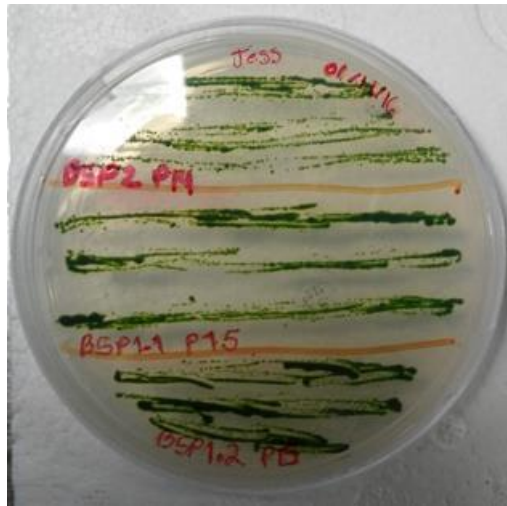


Figura 27. Líneas transformadas de *C.reinhardtii* con vector p320 OP8.

Líneas B5P1 col2 y B5P1.1 después de 13 pases (~56 semanas) a placas nuevas con TAP y kanamicina

4.3.3. Identificación de colonias transformadas de *Chlamydomonas reinhardtii* con el vector p320 OP8

Las colonias que mostraron resistencia a kanamicina después de la tercera resiembra (8-12 semanas después de ser bombardeadas) fueron analizadas por PCR para identificar el gen NanoVPHL1 o alguna de las secuencias que lo conforman (VHHL1 y mCherry) para confirmar la integración del vector p320 OP8 en el plastoma, para lo cual se extrajo ADN celular total como se marca en la sección 2.2.2.2 con el kit *Wizard® Genomic DNA Purification Promega*. Los primers utilizados fueron los específicos para amplificar todo el gen NanoVHHL1

(NVDF186-NVDF189), la región solo del Nanobody- VHHL1 (NVDF190) y la región para la proteína fluorescente mCherry (NVDF191-192). El tamaño de los fragmentos que se esperaban eran de ~1500, ~360 y 710 bp, respectivamente (Para mayor referencia con respecto a los primer ver sección 2.1.4.)

Las PCRs se llevaron a cabo como se muestra en la sección 2.2.3.3 cada pareja de primers de acuerdo a lo que se buscaba amplificar. Después, una alícuota de la reacción de PCR fue analizada por electroforesis en gel de agarosa 1% y 1.5% (p/v) de acuerdo al fragmento. Para visualizar el gen completo o la proteína mCherry el porcentaje del gel fue de 1%(p/v) y para el fragmento correspondiente a VHHL1 fue de 1.5%(p/v).

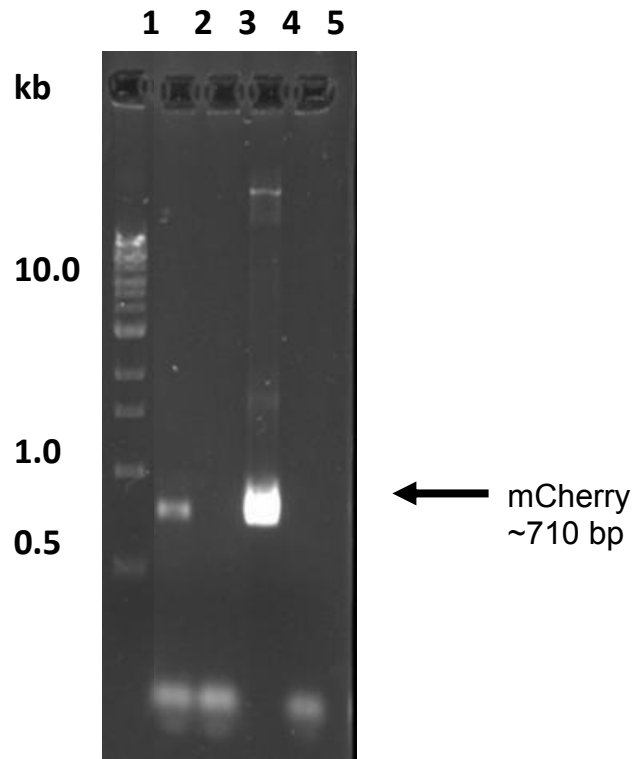


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) del producto de PCR de líneas transplastómicas obtenidas con el vector p320 OP8.

Se diseñaron primer específicos que se alineaban con el inicio y fin de la secuencia correspondiente a la proteína mCherry. El tamaño esperado de este fragmento es de ~710 pb. Carril 1) Marcador de peso molecular de 1kb (Thermo Scientific), carril 2-3) línea B5P1 col2 y B5P1* (posibles líneas transformadas) carril 4) Ctrl (+) reacción de PCR con ADN del plásmido p320 OP8 molde y carril 5) Ctrl (-) reacción de PCR con ADN de *C. reinhardtii* silvestre

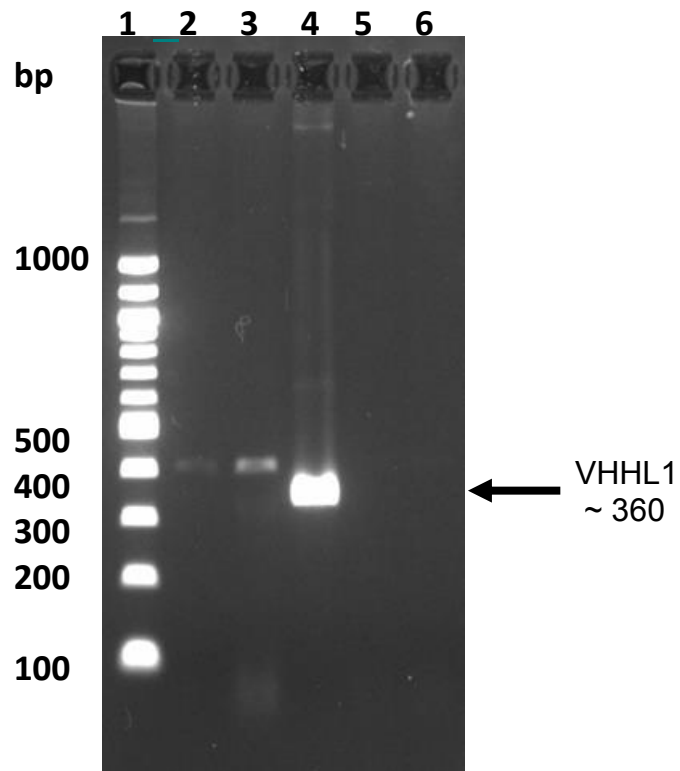


Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% (p/v) del producto de PCR de líneas transplastómicas obtenidas con el vector p320 OP8.

Se diseñaron primer específicos que se alineaban con el inicio y fin de la secuencia correspondiente a la proteína VHHL1. El tamaño esperado de este fragmento es de ~360 pb. Carril 1) Marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen), carril 2-3) línea B5P1 col2 y B5P1* (posibles líneas transformadas) carril 4) Ctrl (+) reacción de PCR con ADN del plásmido p320 OP8 molde, carril 5) Ctrl (-) reacción de PCR con ADN de *C. reinhardtii* silvestre y carril 6) Ctrl (-) reacción de PCR con sin ADN

En las figuras 25 y 26 observamos las bandas que amplifican para la proteína mCherry y el nanocuerpo VHHL1, respectivamente. Respecto a su control no existe una diferencia significativa en la magnitud de las bandas. Para amplificar el segmento correspondiente a la proteína fluorescente se utilizaron los primers diseñados NVDF191-192 y una $T_m=40^\circ\text{C}$ y para VHHL1 los primers fueron NVDF186-190 con una $T_m=54^\circ\text{C}$. Para mCherry se observa que sólo se amplificó dicho fragmento en una de las colonias analizadas esta es B5P1 col2 y para el segmento VHHL1 aparece amplificado en dos colonias: B5P1 col2 y B5P1*

4.3.4. Análisis de colonias transformadas de *Chlamydomonas reinhardtii* por Microscopia Confocal de Barrido Laser

Para determinar la transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii* con el vector p320 OP8, algunas de las posibles colonias transformadas fueron observadas por Microscopia Confocal de Barrido Laser (MCBL). Esta técnica se llevó a cabo en el Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías del Instituto Politécnico Nacional con un Microscopio Confocal de Barrido Laser modelo LSM (Carl Zeiss) utilizando un objetivo plan-apo de 63X/1.4 de inmersión en aceite.

Las colonias que llevaban aproximadamente 4 pases (10-12 semanas) y continuaban creciendo en las placas con medio TAP y kanamicina y se creía estaban transformadas se llevaron a las instalaciones de Nanociencias y unos minutos antes de observarse al microscopio se prepara la muestra. En un portaobjetos perfectamente limpio se coloca ~1 μ L de Agua MiliQ estéril y con ayuda de un palillo estéril se tomó una pequeña porción de la colonia que fue observada, se mezcló perfectamente intentando no dejar ningún cumulo de células y se le colocó un cubreobjetos completamente limpio. Las muestras son enfocadas primero en un campo claro y una vez que se tiene un buen campo de observación la muestra es excitada a 450 nm , en estas muestras se buscó la fluorescencia de la clorofila la cual tiene un rango de detección de 676-686 nm siendo 686 nm el máximo de emisión y la fluorescencia de la proteína mCherry la cual tiene un rango de detección de 620-680 nm siendo este último el punto máximo de emisión. Se asignó el color verde en las muestras para la fluorescencia de la clorofila y el color rojo para la mCherry.

Las primeras muestras que se observaron fueron las de la cepa de *C. reinhardtii* silvestre para poder estandarizar las longitudes de onda de excitación y emisión de fluorescencia para la clorofila. Después, se visualizaron las muestras de las posibles colonias transformadas: B5P1 col2, B5P2P4, B5P1.1, B5P1.2

En la figura 30 se observan algunas de las micrografías de fluorescencia obtenidas con el MCBL de cada línea analizada. En las imágenes a, b y c se muestra la autofluorescencia que presenta *C. reinhardtii* debido a la clorofila. En la imagen a1 se observó la muestra de *C. reinhardtii* silvestre a la longitud de onda en la que emite fluorescencia mCherry (620-680 nm) para la cual no se observa ningún indicio de dicha propiedad lo cual es lo esperado ya que de manera natural esta alga no presenta la proteína fluorescente y en las imágenes b1 y c1 se encuentran las colonias transformadas con el vector p320 OP8 el cual cuenta con el gen NanoVPHL1 por lo tanto se espera la fluorescencia del cloroplasto como se muestra en las imágenes. Se aprecia el color rojo distintivo de mCherry solo en el plasto de la microalga y no en los demás organelos. Y en las imágenes a2, b2 y c2 se realizó una superposición de las imágenes a-a1, b-b1 y c-c1 enfatizando así la fluorescencia de la clorofila y mCherry en el cloroplasto. Con esto se sugiere que de las 4 colonias analizadas, dos de ellas fueron transformadas: B5P1 col2 y B5P1.1.

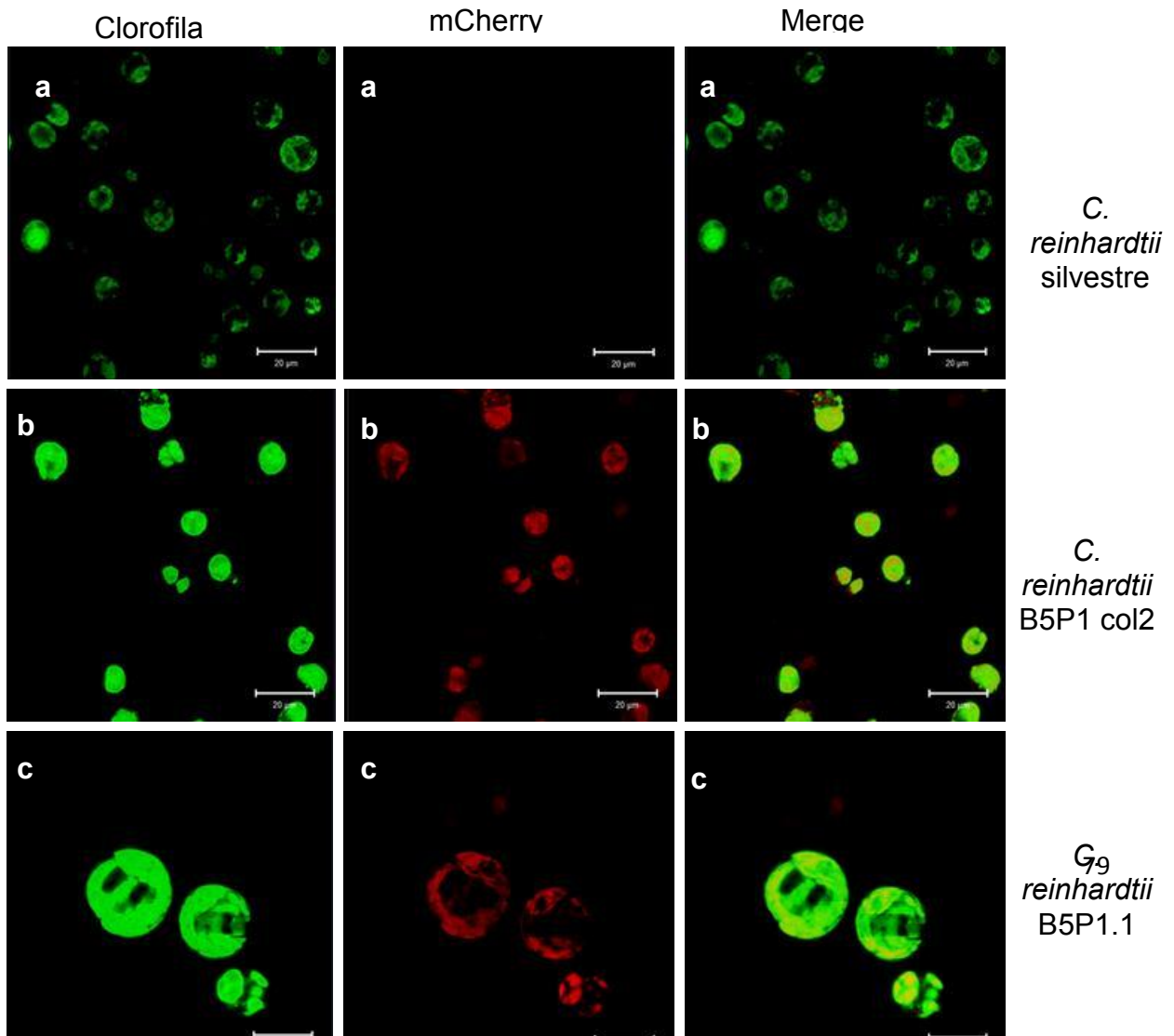


Figura 30. Micrografías de células de *C. reinhardtii* obtenidas por Microscopia Confocal de Barrido Laser.

Las muestras son de la microalga crecida en placas con medio TAP y kanamicina excepto la cepa silvestre para la cual el medio esta libre de antibiótico. Para las cepas B5P1 col2 y B5P1.1 se encontraban en su 4to pase en placa (10-12 semanas). Se observa la autofluorescencia debido a la clorofila en las 3 muestras (a, b y c) y la fluorescencia de mCherry presente solo en las cepas transformadas (b1 y c1) y la cepa silvestre carece de dicha propiedad (a1).

4.3.5. Expresión de NanoVPHL1 en *C. reinhardtii*

Para verificar la expresión de gen NanoVPHL1 en *C. reinhardtii* se llevaron a cabo varios cultivos con un volumen de entre 50-150 mL en medio TAP mas antibiótico los cuales se inoculaban con aproximadamente un cuadrado de 1 cm de área de la cepa requerida en medio sólido TAP y antibiótico se dejó en agitación, con un fotoperiodo de 16/8 h de luz/ oscuridad a 25°C en el cuarto de cultivo. Diariamente se tomó 1 mL de muestra para determinar la densidad óptica del cultivo a una $\lambda=750$ nm; cuando la longitud de onda se encontraba entre 1.7-2.2 el cultivo se retiraba y era cosechado para después extraer proteína total con la metodología escrita en la sección 2.2.3.4.

Con el extracto total de proteína se analizaron muestras de *C. reinhardtii* silvestre y transformada por medio de un gel de Acrilamida SDS-PAGE con la metodología mostrada en la sección 2.2.2.14 y se obtuvieron los resultados mostrados en la figura 17. Con este análisis se buscaba poder identificar alguna diferencia en el patrón de bandeo entre las colonias transformadas y la cepa silvestre.

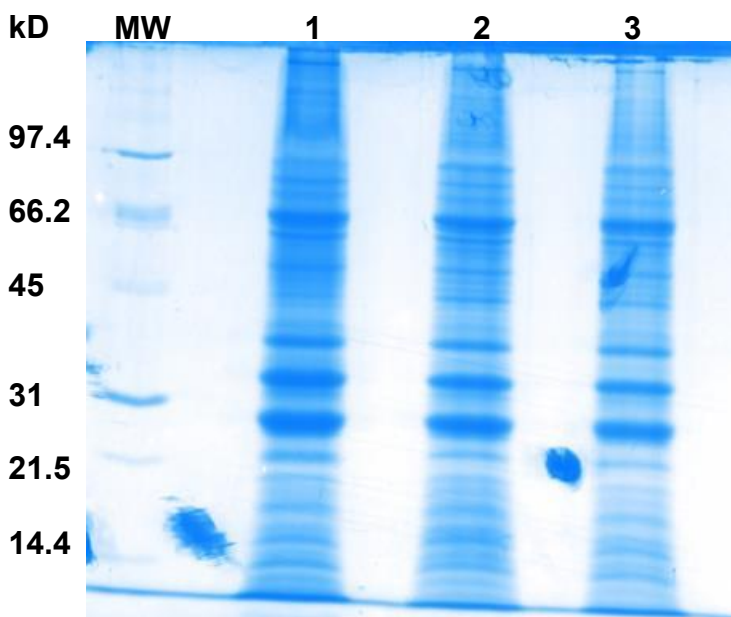


Figura 31. Expresión de la proteína recombinante NanoVPHL1 en *C. reinhardtii*.

Electroforesis en gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) a 200 mV por 2 h. Carril MW) Marcador de peso (BioRad); carril 1) B5P1col2 ; carril 2) B5P1.1 y carril 3) *C. reinhardtii* silvestre . Se cargaron 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de PTS en cada carril.

Ya que de manera general en el patrón de bandeo no se observó ninguna diferencia significativa se decidió analizar las muestras por medio de un Western-Blot con la metodología de la sección 2.2.2.15 . Ya que el gen NanoVPHL1 cuenta con una etiqueta 6x-His en anticuerpo utilizado en el Western Blot fue un anticuerpo monoclonal Anti-His-HRP el cual tiene como epítopo la secuencia HHHHHH. Se utilizó como Ctrl (+) la cepa de *E.coli* BL21 transformada con el plásmido pET28 b (+) purificada como se describe en la sección 2.2.2.12.

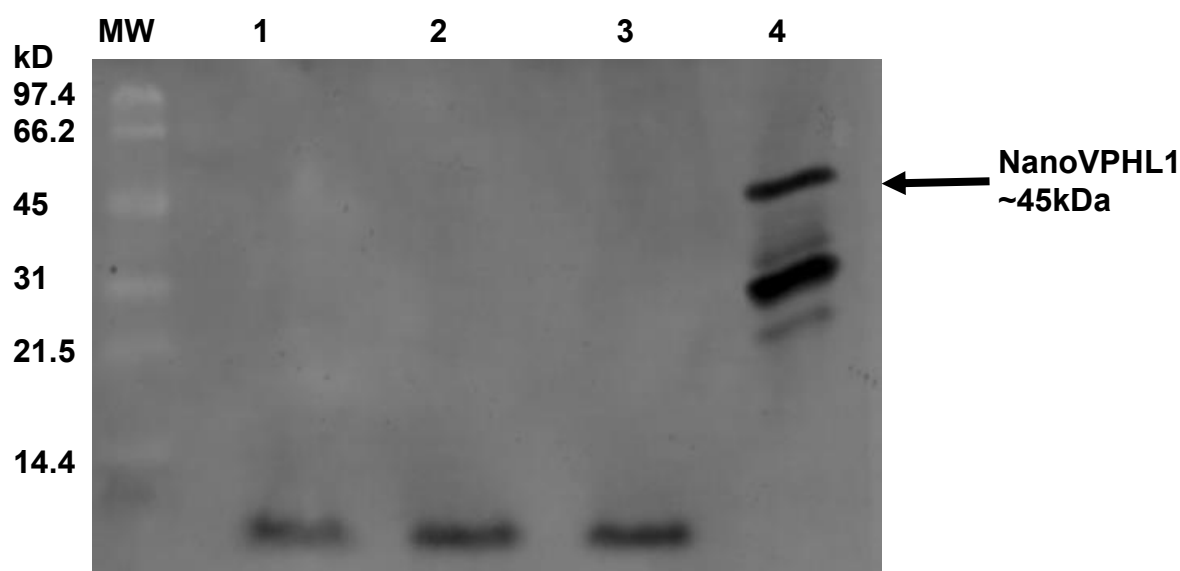


Figura 32. Western blot de la proteína recombinante NanoVPHL1 en *C. reinhardtii*

Cincuenta microgramos/microlitro de PTS de las muestras analizadas en gel teñido con azul de Coomassie, fueron separadas por SDS-PAGE 15% y electrotransferidas a una membrana PVDF. Carril Marcador de peso (BioRad); carril 1) B5P1col2 ; carril 2) B5P1.1; carril 3) *C. reinhardtii* silvestre y carril 4) Eluido de *E.coli* BL21 transformada con PET28 b(+)

En la figura 32 se observa en los carriles 1-3 que el anticuerpo no detectó ninguna proteína, en el carril 3 en donde se cargó muestra de *C. reinhardtii* silvestre no se esperaba detectara ninguna proteína el anticuerpo pero en los carriles 1-2 en donde se cargaron las muestras de las colonias transformadas se esperaba que hubiera una banda similar al control (+) que se cargó en el carril 4. Al no obtener un banda similar a nuestro control positivo, se decidió purificar la proteína

heteróloga con ayuda de la misma etiqueta 6x-His. Esto tenía dos objetivos: el primero como ya se mencionó, confirmar el éxito de la transformación y el segundo era cuantificar la proteína recombinante que se podía obtener a partir de *C. reinhardtii*.

La purificación del conjunto de proteínas que fueron codificadas por el gen NanoVPHL1 se llevó a cabo como se muestra en la sección 2.2.2.12 y fue por medio del Sistema de Purificación Ni-NTA (ThermoFisher) el cual separa a las proteínas por medio de cromatografía de afinidad. Ni-NTA Agarosa se carga previamente con iones Ni^{2+} y aparece de color azul. La resina Ni-NTA es compatible con condiciones nativas o desnaturizantes de las proteínas y puede usarse en múltiples formatos. El volumen del cual se partió para la purificación fue de entre 210-245 mL, después de recuperar la biomasa y realizar la extracción de proteína total con el metodología de la sección 2.2.3.4 (para mejorar la extracción de proteína se le agregaron ~2.5 g de perlas previamente esterilizadas y PMSF a una concentración de 0.5mM) se Ultrafiltra la PTS con una columna de corte de 10kDa para eliminar algunas proteínas menores a este peso y eliminar volumen. Una vez que se tuvo la proteína concentrada se purificó con el sistema Ni-NTA como marca la sección 2.2.3.4. Las concentraciones de proteína de los eluidos de la purificación de *C. reinhardtii* se muestran a continuación, la determinación de dicha macromolécula se llevó a cabo con el reactivo de Bradford con la metodología mostrada en la sección 2.2.2.13. También se muestran los números de la concentración de proteína que se ocuparon para los controles positivos a partir de *E. coli* BL21 transformada con el vector pET 28 b(+).

Tabla 11. Resumen de concentración de proteína de la purificación de *C. reinhardtii*. $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína utilizados para realizar Western Blot de la purificación de proteína heteróloga a partir de la microalga y sus controles positivos a partir de *E. coli* BL21

Muestra	Abs	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$ proteína	μL de muestra para 40 μg proteína en gel	μL de muestra para 10 μg proteína en gel	μL de muestra para 30 μg proteína en gel
Eluido B5P1.1	1.260	1.64	24.4	-----	-----

Eluido B5P1 col2	0.563	0.247	-----	40.4	-----
Eluido C. reinhardtii Silvestre	9.74	18.60	2.2	-----	-----
PTS E. coli BL21 silvestre	0.827	0.775	-----	-----	37
Eluido E.coli BI21 transformada	1.090	1.30	30.7	-----	-----
PTS E.coli BI21 transformada	1.445	2.11	19	-----	-----

En general la tabla 11 muestra un resumen de las concentraciones de proteína que se utilizaron para realizar el Western Blot. Como se puede observar en la tabla 11 hay 3 columnas las cuales reflejan los microgramos de proteína que se cargaron en el gel debido a que la concentración de esta muestra no fue elevada y el volumen requerido para cargar 40 μg de ella era más de lo que el pozo en el gel de poliacrilamida podía soportar. Tal es el caso de la muestra Eluido B5P1 col2 (a partir del purificado de *C. reinhardtii*) de la cual sólo se cargó lo requerido para 10 μg de proteína y para la muestra PTS *E. coli* BL21 silvestre que se cargó un volumen que refleja una concentración de 30 μg de proteína.

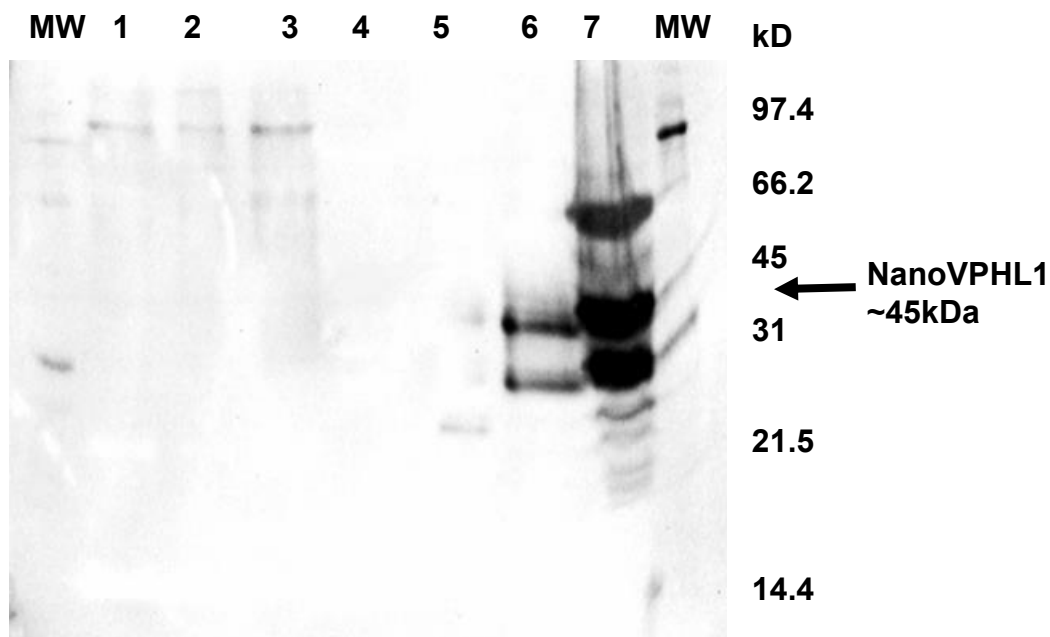


Figura 33. Western blot de la purificación de la proteína recombinante NanoVPHL1 en *C. reinhardtii*

Entre 10-40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína de las muestras analizadas en gel teñido con azul de Coomassie, fueron separadas por SDS-PAGE 15% y electrotransferidas a una membrana PVDF. Carril MW) Marcador de peso (BioRad); carril 1) Eluido B5P1.1 ; carril 2) Eluido B5P1 col2; carril 3) Eluido *C. reinhardtii* silvestre; carril 4) vacío; carril 5) PTS de *E.coli* BL21 silvestre; carril 6) Eluido *E.coli* BL21 transformada con PET28 b(+) y carril 7) PTS *E.coli* BL21 transformada con PET28 b(+)

La figura 33 es el Western Blot realizado para las muestras obtenidas de la purificación a partir de *C. reinhardtii* con los controles positivos a partir de muestras de PTS y eluido (purificación) de *E. coli* BL21 transformada. En los carriles 1-3 se cargaron las muestras referentes a *C. reinhardtii* para las cuales de manera general podemos decir que no se observa ninguna banda correspondiente a la de nuestro interés como se puede observar en comparación con los carriles 6-7 en donde se cargaron los controles positivos que son el eluido de *E. coli* BL21 y la PTS de la misma cepa ambas transformadas con pET 28b (+), respectivamente; las cuales claramente muestran la señal obtenida con el anticuerpo Anti-His HRP que tiene como epítopo la secuencia 6x-His. Como se discutió en la sección 3.3.5. éste anticuerpo es capaz de reconocer péptidos con histidinas no consecutivas y debido a proteínas nativas de la cepa BL21, lo cual puede explicar el por qué se tienen bandas inespecíficas o que no corresponden a nuestra proteína heteróloga correspondiente al gen NanoVPHL1 (Bolanos-Garcia & Davies 2006; Saccodossi et al. 2012)

Con respecto a las muestras de *C. reinhardtii* en la cual no se obtuvo ninguna señal específica de NanoVPHL1 hay diversos motivos por los cuales se pudo no obtener este resultado de forma contundente. Se sabe que la expresión de proteínas heterólogas en el cloroplasto de *C. reinhardtii* es baja en comparación con otras plataformas de expresión, el rango de expresión en *C. reinhardtii* va de 0.5-5% de PTS en comparación con *E. coli* que se obtienen entre 10-30% de PT; por otro lado, específicamente con respecto a la producción de bioproductos como lo son anticuerpos e inmunotoxinas en el cloroplasto de la microalga el porcentaje más alto reportado es de 0.1-0.3% de PTS para una inmunotoxina contra el linfoma de células B (Rasala & Mayfield 2015) por tanto, el porcentaje que nosotros podríamos esperar de nuestra proteína es de 0.3% , este dato no se

obtuvo ya que después de purificar y cuantificar la concentración de proteína con el método de Bradford arrojó una cantidad de esta pero al momento de analizarla por medio de Western Blot el anticuerpo no detectó ninguna banda referente a nuestra proteína NanoVPHL1 , así pues, la cuantificación puede ser de cualquier otra proteínas presente en el extracto de la PTS que debido a por ejemplo, errores en la purificación, pudiese haber interferido y por eso se obtiene una concentración de proteína pero no es la de interés.

Por otra parte, las etiquetas utilizadas para la purificación de proteínas en *Chlamydomonas reinhardtii* han sido diversas; entre las más populares se encuentran: His Tag, FLAG Tag, SAA (serum amyloid A protein), strepII-tag, entre otras. La elección de la etiqueta es importante ya que de acuerdo a la proteína que se desea expresar la etiqueta funcionará en mayor o menor medida. En este caso se utilizaron dos etiquetas: Nano-Tag así como His-Tag en el C-terminal en el orden respectivo. Cabe mencionar que la purificación con Nano-Tag no se intentó la purificación debido a dos factores: la premura del tiempo y que la metodología para esta etiqueta se intentó en bacteria (*E. coli*) sin ningún éxito. Al hacer una revisión bibliográfica se encontró que para al menos 6 proteínas recombinantes como: EPO, I0FN3, I4FN3, Interferón β , VEGF, HMGB1 y la proinsulina la etiqueta utilizada ha sido FLAG Tag mostrando un porcentaje de 0.15 - 3% de PTS (Rasala & Mayfield 2011) Existe un caso específico en el cual se trata de expresar una proteína llamada E7GGG la cual es una proteína atenuada de la nativa E7, la cual es una oncoproteína del Virus de Papiloma Humano serotipo 16 y su propuesta es que sea una vacuna, en este trabajo la purificación se realiza con 2 etiquetas: cola de Histidinas y FLAG, en donde, después de optimizar la purificación con cada una de las etiquetas se obtienen mejores resultados utilizando FLAG- Tag, los resultados fueron 0.02% y 0.12% de PTS, respectivamente . En dicho artículo se comenta que se ha observado un efecto inhibitorio de la expresión de proteínas heterólogas en el cloroplasto de la microalga al utilizar la etiqueta His6 en anteriores proyecto y que el efecto inhibitorio puede deberse al deterioro de una función de cloroplasto por el péptido His6, sugerido por el hecho de que el la mejor línea en expresar E7GGG-His6 muestra

casi un 50% de inhibición del crecimiento celular (Demurtas et al. 2013). Por tanto, el hecho de que no se tengan valores numéricos o gráficos de la expresión de nuestra proteína heteróloga puede ser debido a la etiqueta de Histidinas ; ahora bien, en el artículo citado se pudo obtener el 0.02% de PTS lo cual nos hace pensar que otro problema básico pero no menos importante es la metodología seguida para la purificación de proteínas , la cual para siguientes generaciones deberá de ser optimizada teniendo como base artículos como el de Demurtas 2013 en el cual utilizan como nosotros lo hicimos el sistema Ni-NTA , en el caso de la cola de Histidinas, pero hay dos importantes diferencias: la extracción de PTS y la metodología se hizo bajo condiciones nativas por tanto los buffers de elución fueron diferentes.

4.4. Conclusiones

En este capítulo se construyeron con éxito los vectores de transformación p320 OP8N y OP9N para bombardear células de *C. reinhardtii*. Dicho vector contenía el gen NanoVPHL1 que a su vez un fragmento del mismo es un nanocuerpo contra la proteína L1 del virus del papiloma humano; el vector contó con una sección que contiene al promotor y terminador correspondientes al gen para la proteína rbcl, también presenta un fragmento de ADN del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* y un gen que confiere resistencia a ampicilina en cepas de *E.coli* y kanamicina en cepas de la microalga. La diferencia entre p320 OP8N y OP9N radica en la región intergénica que está presente en cada vector (OP8 y OP9); dicha secuencia se encuentra ubicada entre la región promotora para el gen rbcl y el gen AphA6 el cual confiere resistencia al antibiótico kanamicina.

Con los vectores p320 OP8N y OP9N se transformó genéticamente el genoma del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* por medio de biolística para obtener líneas transplastómicas la cuales fueron verificadas por medio de PCR y microscopia confocal obteniendo resultados positivos en ambas técnicas. Desafortunadamente los resultados que se obtuvieron con respecto a la purificación del gen NanoVPHL1 no fueron positivos y por esta razón se buscó una alternativa (capítulo 5) para tratar de comprender, después de descartar

problemas técnicos, porque la expresión de proteínas heterólogas es en un porcentaje tan bajo cuando estas son expresadas en el cloroplasto de *C. reinhardtii*.

CAPÍTULO 5.

ANÁLISIS DE FLUJOS METABÓLICOS DURANTE LA PRODUCCIÓN DE NANOVPHL1 EN *Chlamydomonas reinhardtii*

5.1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

5.1.1. El avance de la ingeniería metabólica

El concepto de la manipulación de rutas metabólicas con el propósito de dotar a microorganismos con propiedades que no son propias de ellos es una idea que data de hace muchos años. Se tienen ejemplos claros en muchas áreas de producción: aminoácidos, antibióticos, disolventes y vitaminas. Con las tecnologías del ADN se dio un gran paso para que la idea se tornara en algo mucho más palpable y avanzada; se acuñaron algunos términos como: mejoramiento molecular, evolución *in vitro*, ingeniería celular e ingeniería metabólica. Para Gregory N. Stephanopoulos la ingeniería metabólica es: el mejoramiento directo de la formación de un producto o propiedad celular a través de la modificación específica de reacción (es) bioquímica (s) o la introducción de ella (s) con el uso de la tecnología del ADN recombinante (Stephanopoulos 1999).

La biología atraviesa un período de cambios fundamentales. La secuencia completa del genoma para varios organismos está disponible, y este número está creciendo rápidamente. Además, el análisis de los datos de la secuencia del genoma está resultando muy útil. De tal modo que los proyectos de secuenciación del genoma y el análisis bioinformático están logrando obtener algo como un "catálogo de fragmentos" completo de los componentes moleculares en muchos organismos. El siguiente reto planteado será reconstruir y simular funciones celulares globales gracias a esta información reduccionista (Kauffman et al. 2003).

El enfoque de ingeniería tradicional para el análisis y diseño para la ingeniería metabólica es tener un modelo matemático o informático (por ejemplo, un simulador dinámico) del metabolismo que se basa en leyes y principios

fisicoquímicos/bioquímicos fundamentales. La ingeniería metabólica espera que estos modelos puedan utilizarse para "diseñar" sistemáticamente una nueva célula viva (y mejorada). Los métodos de la tecnología de ADN recombinante se deben aplicar entonces para conseguir los cambios deseados en el genotipo de la célula de interés. Sin embargo, una revisión en el campo ha concluido que "a pesar del reciente aumento en el interés por la ingeniería metabólica, todavía existe una gran disparidad entre el poder de las técnicas biológicas disponibles y la capacidad de analizar racionalmente las redes bioquímicas" (Kauffman et al. 2003). El campo de estudios de la ingeniería metabólica es muy amplio y las herramientas con las que se ha tratado de investigar y llegar a resultados prometedores comenzaron con modelos muy sencillos pero que fueron valiosos para el avance esta área. En este trabajo se abordaran dos herramientas que finalmente se combinan para obtener mejores resultados.

5.1.2. Análisis De Flujos Metabólicos (MFA) y Análisis de Balance de Flujos (BFA)

El metabolismo de los microorganismos involucra miles de reacciones que permiten a las células convertir materias primas en metabolitos. Esta serie de transformaciones químicas tiene el propósito de generar diversas moléculas que serán unidas en diferentes configuraciones y así se generarán nuevos componentes celulares. Mediante este proceso la célula crece hasta llegar a un punto en que se divide dando lugar a nuevas células. Mediante reacciones específicas, la energía química para llevar a cabo estos procesos es extraída de moléculas orgánicas, principalmente azúcares. Así, cualquier célula puede considerarse como una fábrica microscópica, capaz de llevar a cabo un gran número de reacciones químicas diferentes. Sin embargo, en su estado natural, las células generalmente no producen cantidades elevadas de los compuestos útiles desde el punto de vista industrial. Por este motivo es necesario modificar su metabolismo para que adquieran tal capacidad, para que se conviertan en fábricas químicas y biológicas. (Wang et al. 2012)

En el pasado, los microorganismos fueron modificados genéticamente por mutaciones inducidas química o físicamente (por ejemplo UV) para obtener cepas capaces de aumentar la productividad de los metabolitos deseados. Sin embargo, las mutaciones por medio de estas técnicas eran al azar y la productividad mejoraba de manera gradual. Estas estrategias han sido perfeccionadas y en general han dado buenos resultados, pero desde hace algunos años se ha comenzado a abordar el tema de la productividad desde un enfoque racional como la ingeniería metabólica con los cuales las vías metabólicas pueden ser analizadas para determinar las restricciones y limitaciones precisas sobre la producción de metabolitos deseados. Este conocimiento se puede aplicar para encontrar otros caminos para sortear estas limitaciones, optimizar los procesos genéticos y de regulación dentro de las células resultantes en aumento de la producción de un metabolito en particular.

El análisis de flujos metabólicos (MFA) y el análisis de balance de flujos (BFA) que forman parte de las herramientas en la ingeniería metabólica las cuales de acuerdo al objetivo del análisis, la estructura de la matriz estequiométrica (S) y el conocimiento que se tenga acerca de datos experimentales sobre algunos flujos medidos (metabolitos; se elige una u otra herramienta o la combinación de ambas técnicas para resolver el modelo metabólico y obtener mejores resultados. Por separado, cada una de ellas cuenta con ciertas características como a continuación se desarrolla (Trinh et al. 2009).

Una poderosa herramienta para la determinación de los flujos en la red de reacciones bioquímicas es el análisis de flujos metabólicos (AFM), en el cual los flujos intracelulares son calculados usando un modelo metabólico que describe la bioquímica del microorganismo. El AFM revela el grado de compromiso entre rutas metabólicas de todos los procesos metabólicos que suceden dentro del sistema de estudio. Un vector de flujos metabólicos, también conocido como distribución de flujos metabólicos, define el fenotipo celular bajo una condición de crecimiento dada. Conviene notar que, ya que el análisis cuantitativo del metabolismo requiere datos experimentales, es importante que la consistencia de los datos sea confirmada, antes de utilizarlos en la determinación de flujos metabólicos.

El AFM puede ser considerado como un campo de importancia fundamental y práctica, que pueden proporcionar contribuciones básicas, en la medición y entendimiento del control de flujos in vivo, que lleva a cabo la célula. Esto es particularmente útil en conexión con estudios de producción de metabolitos, donde el objetivo es dirigir tanto carbono como sea posible desde un sustrato hacia un producto metabólico. Por otra parte, el AFM es de gran utilidad para: a) Calcular flujos extracelulares no medidos, b) Calcular rendimientos teóricos máximos, c) Identificar vías alternativas e d) Identificar puntos ramificados de control metabólico (Soto-Cruz & Páez-Lerma 2005).

El FBA es un enfoque ampliamente utilizado para el estudio de redes bioquímicas, en particular en las reconstrucciones de redes metabólicas a escala genómica que se han construido en la última década (por ejemplo, *E.coli* K-12 MG1655 y *Haemophilus influenza*). Estas reconstrucciones de la red contienen todas las reacciones metabólicas conocidas en un organismo y los genes que codifican cada enzima. FBA calcula el flujo de metabolitos a través de esta red metabólica, lo que hace posible predecir la tasa de crecimiento de un organismo o la tasa de producción de un metabolito biotecnológicamente importante. En la actualidad, se cuenta con modelos metabólicos para 35 organismos disponibles en plataformas en la red y tecnologías de alto rendimiento que permiten la construcción de muchos más cada al pasar los años. El análisis de balance de flujos una herramienta importante para aprovechar el conocimiento codificado en estos modelos (Orth et al. 2010).

Con el análisis de balance de flujos se pueden predecir valores óptimos de funciones objetivos. Las funciones objetivos pueden adoptar muchas formas, incluyendo los objetivos fisiológicos más importantes, así como los objetivos de diseño para un sistema dado. Las funciones más comunes incluyen el máximo del crecimiento celular, la maximización de la producción de ATP (por sus siglas de Adenosín Trifosfato), nucleósido que constituye la fuente de energía para la mayoría de reacciones químicas que tienen lugar en las células, la maximización de la tasa de síntesis de un producto en particular, entre otras. Otras funciones objetivos incluyen la minimización de la producción de ATP con el fin de

determinar las condiciones de máxima eficiencia de energía metabólica, y minimizar la absorción de nutrientes con el fin de evaluar las condiciones, en virtud de la cual una célula puede realizar sus funciones metabólicas, consumiendo la cantidad mínima de nutrientes (Tellez et al. 2014). Además de fijar una función objetivo que se desee minimizar o maximizar en general el FBA puede calcular vectores de flujo metabólico basados en datos experimentales limitados. Cuantos más flujos se puedan medir, el vector de flujo se puede determinar computacionalmente de manera más exacta. Sin embargo, el vector de flujo metabólico puede no ser único. El enfoque depende en gran medida de la validez de que la función objetivo formulada represente correctamente el sistema de trabajo. Similar al análisis de flujos metabólicos, el análisis de balance de flujos identifica un solo vector de flujo metabólico bajo una condición de crecimiento dada (Trinh et al. 2009).

Aunque existen diferencias en la formulación del problema, estas herramientas (MFA & BFA) están relacionadas. Se desarrollan a partir del mismo principio matemático. En ambos casos, la información debe ser introducida al contexto matemático, por lo que primero se debe de obtener información bibliográfica de las rutas metabólicas. Con el subconjunto de genes que codifican las enzimas metabólicas se puede construir una red de reacciones metabólicas. A partir de tal conjunto se puede escribir un balance de masa para cada metabolito contenido en la biomasa:

$$\frac{dx}{dt} = S \cdot \vartheta - q_E - \mu \cdot x \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde S es la matriz estequiométrica de m x n, m es el número total de metabolitos y n es el número de flujos (reacciones) metabólicos, ϑ es el vector de n flujos metabólicos (mol/g/h o Cmol/g/h), q_E el vector de sustancias que se intercambian de manera pasiva o facilitada, μ es la velocidad de crecimiento de la

biomasa (1/h) y x es la concentración del intracelular de la sustancia o metabolito (mol/g o Cmol/g).

La matriz S incluye a todas las sustancias que componen la biomasa (figura 34), estas pueden agruparse de varias formas, por ejemplo en dos grandes bloques de aquellas que son “intermediarios” y se llamarán “I” puesto que no son sustratos iniciales ni productos finales y los “no intermediarios” a los cuales se les llama “A” porque son acumulables: los sustratos iniciales y los productos finales, incluyendo las macromoléculas que conforman la biomasa. Como usualmente nos interesa el vector de velocidades, conviene reacomodar como,

$$S \cdot \vartheta = \frac{dx}{dt} + q_E + \mu \cdot x \quad \text{Ecuación 8}$$

Los intermediarios representan sólo aproximadamente 3% del total de la biomasa pero conforman a la mayoría de las sustancias, así que individualmente sus concentraciones son extremadamente pequeñas por esto $\mu \cdot x = 0$ o despreciable, al igual que dx/dt y, como no son sustratos ni productos, no son intercambiadas (usualmente) con el medio, por lo que para estos

$$\frac{dx}{dt} + q_E + \mu \cdot x = 0$$

y por lo tanto, la estequiometría de los intermediarios se puede representar por con una matriz estequiométrica S_I :

$$S_I \cdot \vartheta = 0 \quad \text{Ecuación 9}$$

Para los metabolitos que se acumulan se tiene:

$$\frac{dx}{dt} + q_E + \mu \cdot x = b$$

Y por lo tanto

$$S_A \cdot \vartheta = b \quad \text{Ecuación 10}$$

De esta manera, la matriz completa S se debe observar como:

$$\begin{pmatrix} S_A \\ S_I \end{pmatrix} \cdot \vartheta = \begin{pmatrix} b_A \\ 0 \end{pmatrix} \quad \text{Ecuación 11}$$

Para FBA se optimiza, mediante programación lineal, alguna función objetivo (Z) sujeta a una restricción, que es usualmente el balance de intermediarios:

$$S_I \cdot \vartheta = 0$$

Los flujos obtenidos por esta vía corresponden con lo que se denomina “Análisis del Balance de Flujos”.

Por otra parte, cuando se integran mediciones experimentales de b_A se puede proceder también mediante programación lineal reacomodando las restricciones de manera similar a la ecuación 11 :

$$\begin{pmatrix} S_A - b_A \\ S_I \quad 0 \end{pmatrix} \cdot v = 0 \quad \text{Ecuación 12}$$

El vector b_A , como ya se mencionó, comprende datos experimentales de acuerdo a si los metabolitos son intercambiados (sustratos y productos) o son acumulados macromoléculas.

$$b_A = \frac{dx_A}{dt} + q_I + \mu \cdot x_A$$

$b_A = -q_S \ \& \ q_P$
 $b_x = \frac{dx_x}{dt} + \mu \cdot x_x$

Cuando se determinan flujos en función de otros medidos experimentalmente se hace “Análisis de Flujos Metabólicos”

Un tercer concepto relacionado con la ingeniería metabólica es el “Análisis de Rutas Bioquímicas”, el cual consta del análisis del espacio de soluciones. El ABF y el AFM no consideran todas las soluciones del sistema de ecuaciones, que se encuentra usualmente subdeterminado, y por tanto con un infinito de soluciones. La programación lineal permite encontrar una solución que satisface al sistema bajo la optimización de una función objetivo, cuando en realidad existe un infinito de soluciones del sistema, incluso un infinito de soluciones que satisfagan la optimización de cierta función objetivo. Este espacio de soluciones puede ser encontrado mediante algebra convexa o por un ejercicio repetido de programación lineal. Considerando que es imposible analizar un infinito de soluciones,

usualmente se analizan los vértices que contienen a las soluciones en algún subespacio. En particular, en términos de rendimientos. Al análisis de estos vértices, que representan diferentes posibilidades bioquímicas, se le denomina el Análisis de Rutas Bioquímicas.

En este capítulo se utilizaron el análisis de flujos metabólicos y el análisis de balance de flujos para obtener un posible resultado a partir de una función objetivo para analizar si existe algún cambio en los flujos de los metabolitos intracelulares cuando *C. reinhardtii* produce una proteína heteróloga en comparación con una cepa silvestre de dicha microalga. Posteriormente se estudiaron dichas soluciones experimentales en el marco de las posibilidades teóricas, conforme al análisis de rutas bioquímicas.

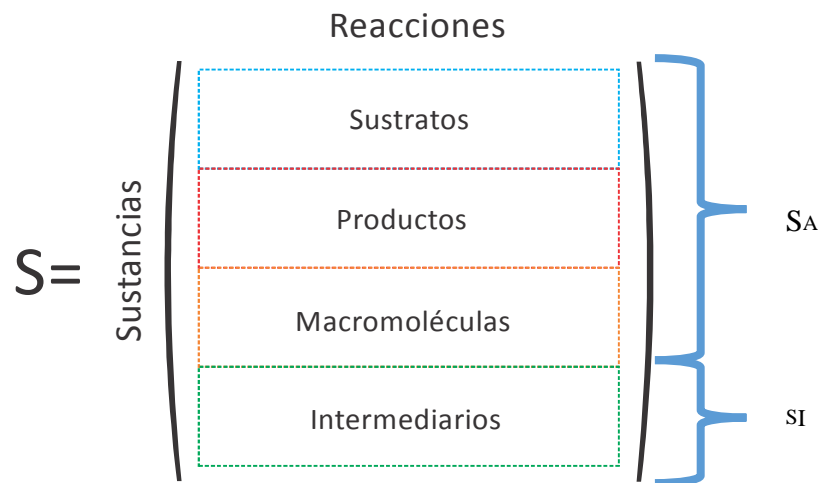


Figura 34. Composición de la Matriz Estequiométrica S .

La matriz S se encuentra compuesta por todas las reacciones que se introducen al modelo metabólico. En las filas se encuentran las sustancias y en las columnas las reacciones. La matriz queda dividida en dos matrices ya que S_A representa a todos los metabolitos que no son intercambiados; es decir, se acumulan y S_I que representa a los metabolitos que son intercambiados.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de este capítulo se utilizaron las siguientes técnicas descritas en el punto 2.2.5. Manipulación de *Chlamydomonas reinhardtii* para muestras de cinéticas (técnicas analíticas); todas ellas contenidas en el capítulo 2.

Se utilizó el software Mathematica 10.0 para determinar mediante la aplicación de un modelo de caja negra los ajustes para los datos experimentales obtenidos a partir de las cinéticas para *C. reinhardtii* silvestre y transformada en medio TAP. Así mismo se estimaron los rendimientos teóricos correspondientes a los sistemas de y autotrofia.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Ajuste de datos con modelo de caja negra

Lo primero que se realizó fueron dos cinéticas, una para la cepa silvestre de *C. reinhardtii* y otra con la cepa transformada de la microalga con el vector p320 OP8N. Cada cinética fue por triplicado en matraces de 1 L con un volumen final de e500 mL. Se inyectó aire estéril con ayuda de un filtro esterilizante (0.2 μ m) por medio de una bomba con potencia de ¼ HP; las demás características se puede ver en el apartado 2.2.5.1. El sistema que se montó se puede observar en la figura 35.

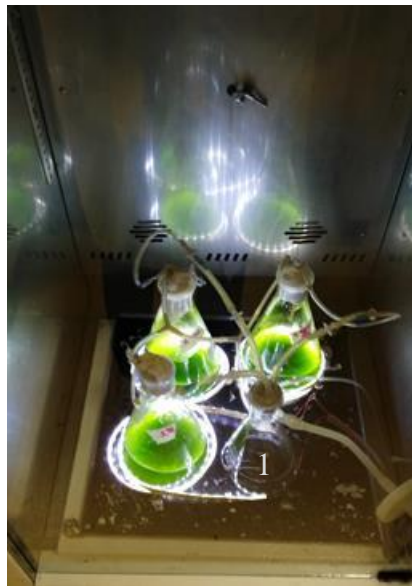


Figura 35. Sistema para cinéticas de *C. reinhardtii*.

El sistema consistió de un matraz de 500 mL (1) que funcionó como trampa de agua y a partir de aquí por medio de tres mangueras se introdujo aire (CO₂) a los 3 matraces que conformaron cada cinética. Cada matraz tenía una manguera de salida de aire la cual iba directo a un medidor de CO₂

Las cinéticas se realizaron con la finalidad de obtener información experimental acerca de metabolitos intracelulares como lo fueron: Proteína, lípidos, carbohidratos, clorofila, DNA y RNA así como de los sustratos, amonio en particular, Acetato, CO₂ y O₂ no fueron determinados. Como se mencionó en la introducción de este capítulo, para llevar a cabo el análisis de flujos metabólicos se requiere alimentar la matriz S_A con la mayor cantidad de datos que se tengan de forma experimental, de tal modo de que se contó con un sistema sub-determinado ya que S_I el número de flujos medidos es más pequeño o menor que los grados de libertad del sistema los flujos, los flujos desconocidos pueden ser determinados imponiendo un criterio de optimización sobre los balances metabólicos. En este caso la programación lineal u optimización lineal puede ser usada para determinar una posible distribución de flujos intracelulares. Con este acercamiento es posible tener una única solución para los flujos intracelulares por optimización del objetivo función sujeto a los límites del balance de metabolitos (Orth et al. 2010)

El sistema indeterminado origina un infinito de soluciones a la ecuación, pero las que tienen sentido biológico residen en un subconjunto llamado el conjunto factible. Este se puede definir como las capacidades del genotipo metabólico de un organismo, puesto que define todas las distribuciones de flujo que se pueden lograr con un juego particular de genes metabólicos.

La determinación de cada uno de los metabolitos intracelulares se realizó como se describe en los apartados 2.2.5.2 - 2.2.5.9 en donde se detalla la cantidad de muestra requerida para cada análisis cuantitativo. A todas estas determinaciones se les realizó un ajuste con un modelo matemático del tipo caja negra el cual está catalogado dentro de los modelos no estructurados ya que no toma en cuenta lo que ocurre dentro y alrededor del microorganismo, los modelos más utilizados son los modelos no segregados (supone que las células son indistinguibles unas de otras) y no estructurados por la simpleza que refieren y funcionan bien para describir la relación entre biomasa, su tasa de crecimiento y actividad y aún se obtienen resultados interesantes (Dhurjati et al. 1989; Mitchell, D.A et al. 1999).

En este caso, se utilizó uno de estos modelos de caja negra para la estimación de los rendimientos de los metabolitos a manera de disminuir el error en los métodos para después dar paso al análisis de flujos metabólicos. Podemos visualizar el crecimiento de *C. reinhardtii* en mixotrofia como un crecimiento sobre dos fuentes de carbono y una de nitrógeno, asumiendo que la luz no es limitante en la parte fotosintética. Así, para el consumo de cada sustrato carbonado podemos asumir que una ecuación de saturación dual tipo Monod funciona, donde la máxima velocidad es eventualmente limitada por el sustrato carbonado o el nitrogenado. Los flujos de entrada y salida de la caja negra son: tasas de consumo de sustratos y tasas de formación de productos. Adicionalmente hay una acumulación de biomasa dentro de la caja negra que es representado por un flujo particular que es la tasa específica de crecimiento (μ). Los gráficos de los ajustes realizados se muestran a continuación. En primero lugar se muestran los resultados para la cepa silvestre (figura 36 y tabla 12):

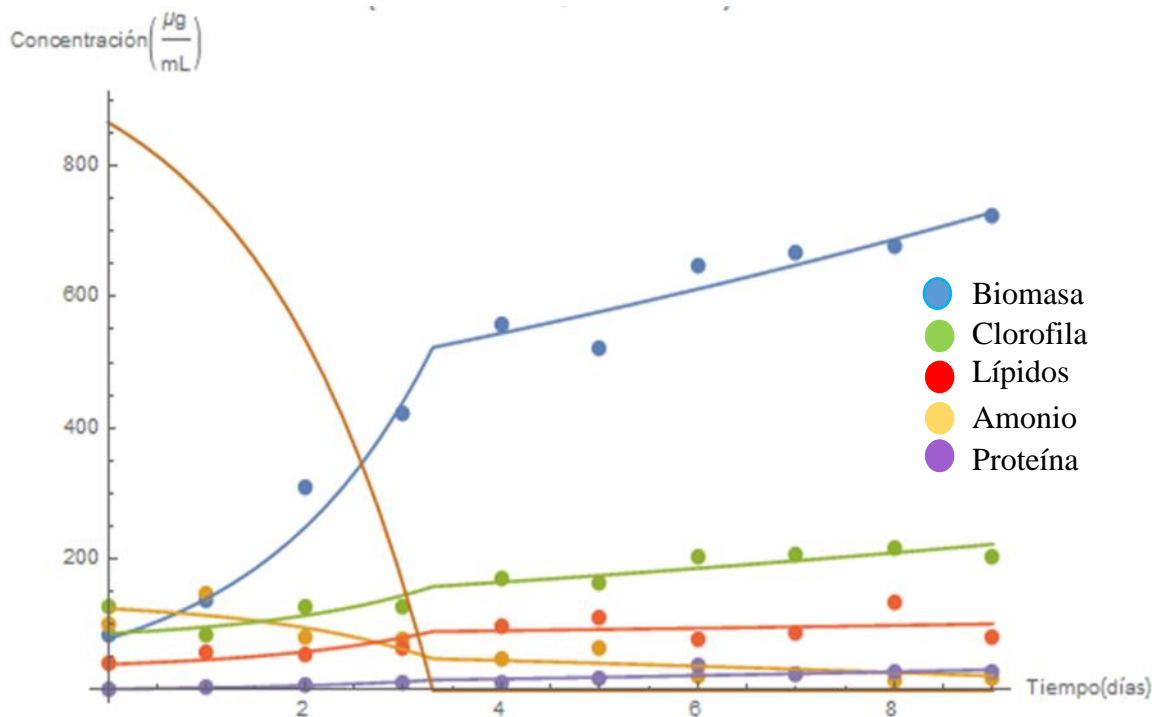


Figura 36. Ajuste de resultados para cinética de *C. reinhardtii* silvestre por medio de modelo de caja negra.

Con ayuda del modelo de caja negra se logran ajustar en un mismo gráfico seis metabolitos medidos experimentalmente.

Los resultados obtenidos con respecto al ajuste son:

Tabla 12. Resultados de velocidades y rendimientos ajustados para cinética de *C. reinhardtii silvestre*

Parámetro	Valor
$\mu_{\text{mixotrofia}}$	0.56 d^{-1}
$\mu_{\text{autotrofia}}$	0.08 d^{-1}
* X_{la}	0.143
* X_{ln}	0.312
* X_{pa}	0.119
* X_{pn}	0.055
* X_{ca}	0.025
* X_{cn}	0.077
a_0 = Acetato inicial	$865.99 \mu\text{g} / \text{mL}$
n_0 = Amonio inicial	$124.73 \mu\text{g} / \text{mL}$
x_0 = Biomasa inicial	$78.72 \mu\text{g} / \text{mL}$
l_0 = Lípidos iniciales	$86.84 \mu\text{g} / \text{mL}$
p_0 = Proteína inicial	$39.71 \mu\text{g} / \text{mL}$
c_0 = Clorofila inicial	$1.96 \mu\text{g} / \text{mL}$

*Son las fracciones de un metabolito con respecto a un sustrato (a=acetato, n=amonio)

Resultados del ajuste para la cepa transformada (figura 37 y tabla 13):

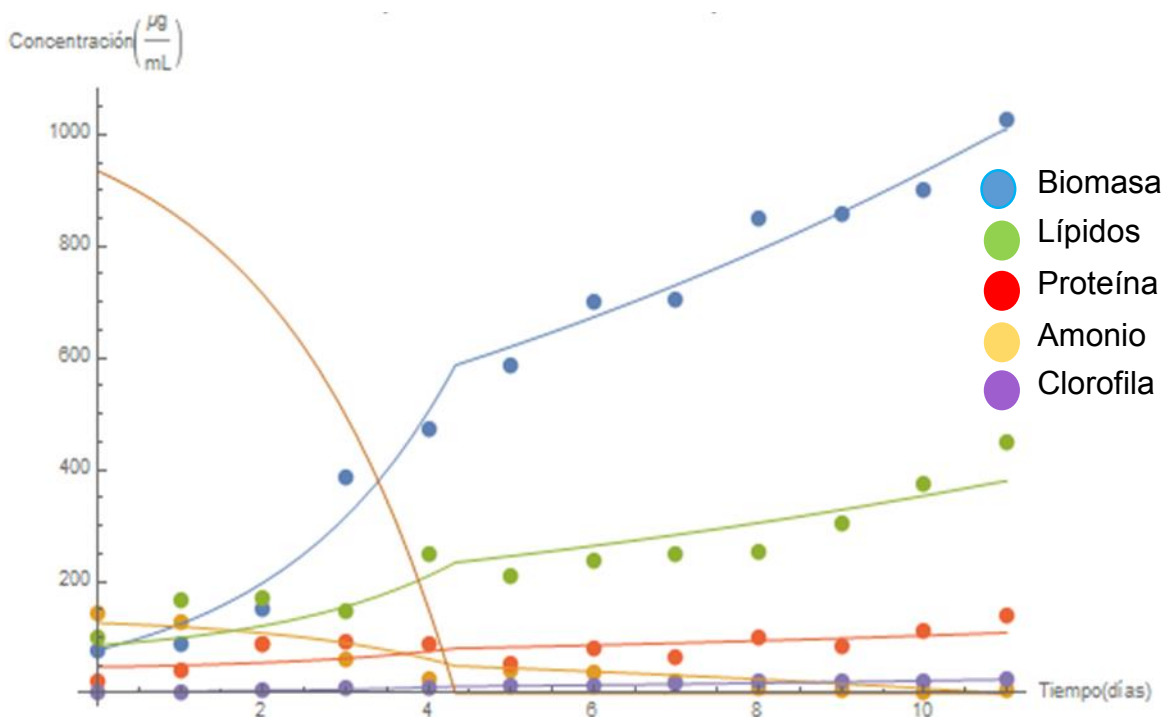


Figura 37. Ajuste de resultados para cinética de *C. reinhardtii* transformada por medio de modelo de caja negra.

Con ayuda del modelo de caja negra se logran ajustar en un mismo gráfico seis metabolitos medidos experimentalmente.

Tabla 13. Resultados de velocidades y rendimientos ajustados para cinética de *C. reinhardtii* transformada

Parámetro	Valor
$\mu_{\text{mixotrofia}}$	0.53 d ⁻¹
$\mu_{\text{autotrofia}}$	0.09 d ⁻¹
* X_{la}	0.190
* X_{ln}	0.438
* X_{pa}	0.028
* X_{pn}	0.108
* X_{ca}	0.009
* X_{cn}	0.034
a_0 = Acetato inicial	998.02 $\mu\text{g} / \text{mL}$
n_0 = Amonio inicial	112.74 $\mu\text{g} / \text{mL}$
x_0 = Biomasa inicial	77.00 $\mu\text{g} / \text{mL}$
l_0 = Lípidos iniciales	89.27 $\mu\text{g} / \text{mL}$
p_0 = Proteína inicial	50.49 $\mu\text{g} / \text{mL}$
c_0 = Clorofila inicial	3.53 $\mu\text{g} / \text{mL}$

5.3.2. Análisis de Flujos Metabólicos

Para llevar a cabo el MFA se requirió como se indica en la introducción de este capítulo un modelo metabólico de la microalga el cual se construyó con base en plataformas bioinformáticas (KEGG, ByoCyc, BRENDA, entre otras) y tomando como base los modelos y reacciones reportados por (Kliphuis et al. 2012; Boyle & Morgan 2009). Finalmente, se obtuvo una matriz S de 114 reacciones (m) y 111 sustancias (n) (m+1 y n+1 para el modelo de la proteína heteróloga).

Para que el modelo de *Chlamydomonas reinhardtii* pudiese ser calculado se requirió obtener los datos de los metabolitos medidos que en el caso de la matriz fueron los metabolitos que se acumulan y por tanto son b_A (proteína, lípidos, CHO, DNA y RNA) en C-mol a continuación se muestra el resumen (tablas 14-16):

Tabla 14. Constitución de CHONSP de metabolitos acumulados

Metabolito(x)	CHONSP	gxC-mol _x
Proteína	CH _{1.62} O _{0.33} N _{0.32} S _{0.00451}	23.52
Lípidos	CH _{1.92} O _{0.11}	15.68
CHOs	CH _{1.6} O _{0.83}	26.88
DNA	CH _{1.25} O _{0.63} N _{0.4} P _{0.10}	29.08
RNA	CH _{1.24} O _{0.74} N _{0.40} P _{0.10}	33.77

Tabla 15. Velocidades de flujo usadas para el cálculo de flujos metabólicos para la cepa silvestre en dos etapas de fermentación

Metabolito	Mixotrofia, Silvestre			Autotrofia, Silvestre		
	g _x /g _{biomasa} Normalizados	C-mol _x /g _{biomasa}	b _x (C-mol _x /g _{biomasa} /día)	g _x /g _{biomasa} Normalizados	C-mol _x /g _{biomasa}	b _x (C-mol _x /g _{biomasa} /día)
Lípidos	0.266	0.0170	0.0095	0.299	0.019	0.0016
Proteína	0.102	0.0043	0.0024	0.054	0.002	0.0002
Clorofila	0.060	0.0038	0.0021	0.074	0.005	0.0004
CHO's	0.111	0.0041	0.0023	0.096	0.004	0.0003
DNA	0.053	0.0018	0.0010	0.048	0.002	0.0001
RNA	0.409	0.0121	0.0068	0.431	0.013	0.0011

Tabla 16. Velocidades de reacción usadas para el cálculo de flujos metabólicos para la cepa transformada en 2 etapas de fermentación

Metabolito	Mixotrofia, Transformada			Autotrofia, Transformada		
	g _x /g _{biomasa} Normalizados	C-mol _x /g _{biomasa}	b _x (C-mol _x /g _{biomasa} /día)	g _x /g _{biomasa} Normalizados	C-mol _x /g _{biomasa}	b _x (C-mol _x /g _{biomasa} /día)
Lípidos	0.463	0.0295	0.0158	0.406	0.026	0.0026
Proteína	0.100	0.0043	0.0023	0.100	0.004	0.0004
Clorofila	0.032	0.0020	0.0011	0.031	0.002	0.0002
CHO's	0.140	0.0052	0.0028	0.167	0.006	0.0006
DNA	0.140	0.0048	0.0026	0.093	0.003	0.0003
RNA	0.125	0.0037	0.0020	0.204	0.006	0.0006

Después de calcular los flujos metabólicos con ayuda del programa *Mathematica* 10 se obtuvieron cuatro mapas de los cuales 2 corresponden a la cepa silvestre de

C. reinhardtii en etapa de mixotrofia y autotrofia y 2 más para la cepa transformada en las mismas etapas. En las figuras 38-41 podemos observar que como se esperaba en la etapa de mixotrofia para ambas cepas, transformada y silvestre, la célula realiza la incorporación del acetato al citosol (reacción 11) que es rápidamente convertido en AcCoA y no es el caso en la etapa de autotrofia en la cual el acetato debe de estar balanceado y por tanto el sustrato es el CO₂, para esta etapa la reacción 11 se observa casi nula por lo cual el modelo representa bien esta entrada de sustrato. El modelo autotrófico se asumió una vez que se agota el acetato del medio del cultivo (después de 3.5 días aproximadamente), en este momento se aprecia una disminución de la velocidad de crecimiento y en términos de velocidad, una disminución en la velocidad de acumulación de lípidos. Con respecto a la síntesis de proteína total (reacción 84) los valores para la etapa de mixotrofia fueron de 5.4×10^{-7} y 5.2×10^{-7} , cepa silvestre y transformada, respectivamente. Y para la etapa de autotrofia, 4.5×10^{-8} y 9.0×10^{-8} , cepa silvestre y transformada, respectivamente. Para la proteína recombinante (reacción 114) se obtuvieron para la etapa de mixotrofia 0.021 y en autotrofia 0.005, todas estas últimos resultados en unidades de C-mol_{proteína}/g_{biomasa}* día. Los resultados obtenidos para ambas cepas en proteína total son similares pero es importante notar que en autotrofia es un poco menor. Y para la proteína recombinante también sugiere el modelo que en la etapa de mixotrofia puede sintetizarse mayor cantidad de ella que en autotrofia, que sugiere que disminuye hasta un 23.8% de la síntesis, esto se puede explicar debido a que se sabe que cuando el amonio disminuye en el medio de cultivo al final de la fermentación (en este caso autotrofia) las células comienzan a tomar amonio a partir de las proteínas para sintetizar otros metabolitos por tanto la síntesis de las proteínas se ve disminuida. Cabe señalar que el modelo sugiere que se puede producir la proteína total y además la proporción específica detallada en los mapas para la cepa transformada de proteína recombinante.

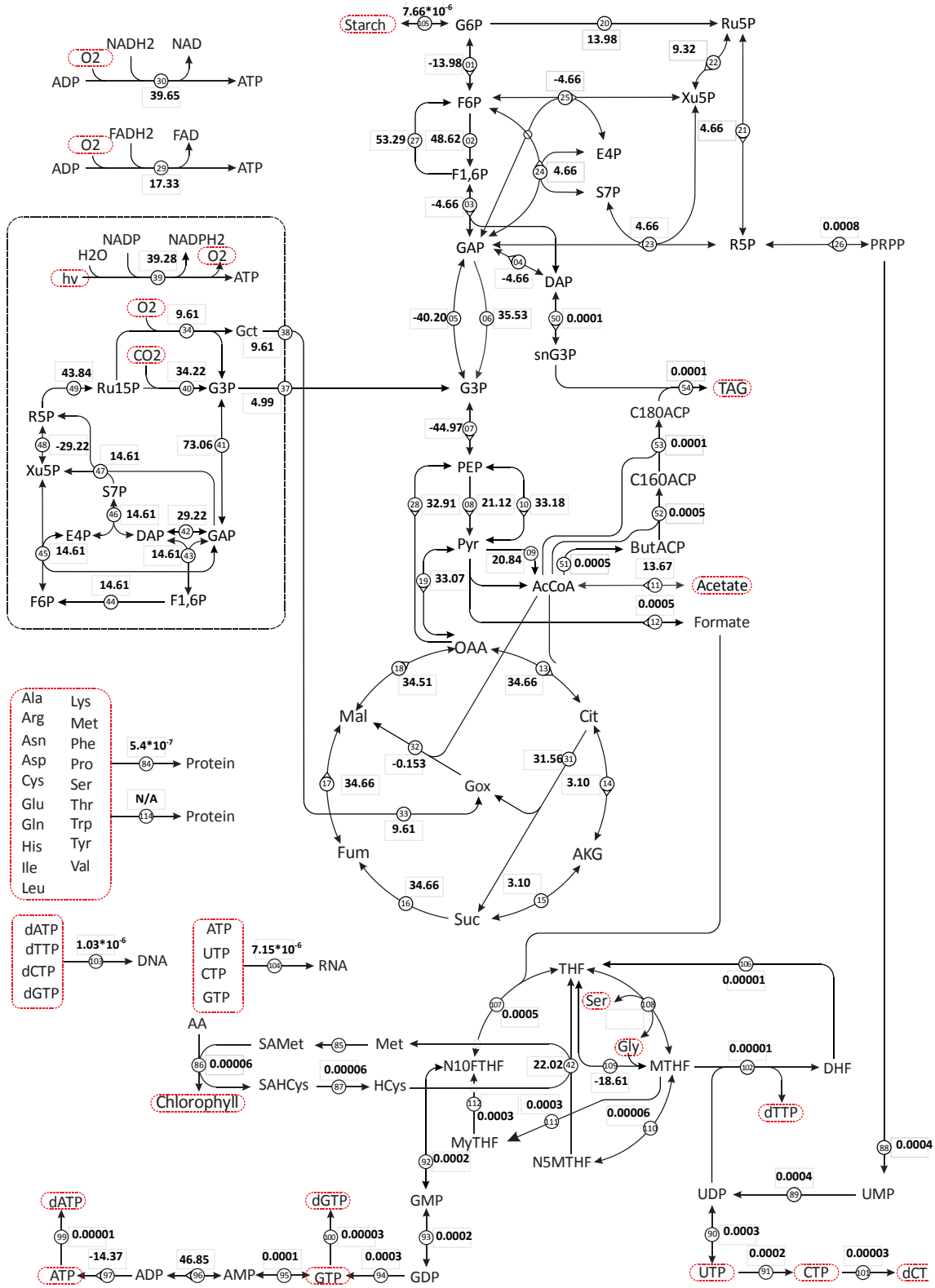


Figura 38. Análisis de flujos metabólicos para la cepa silvestre de *C. reinhardtii* etapa de mixotrofia

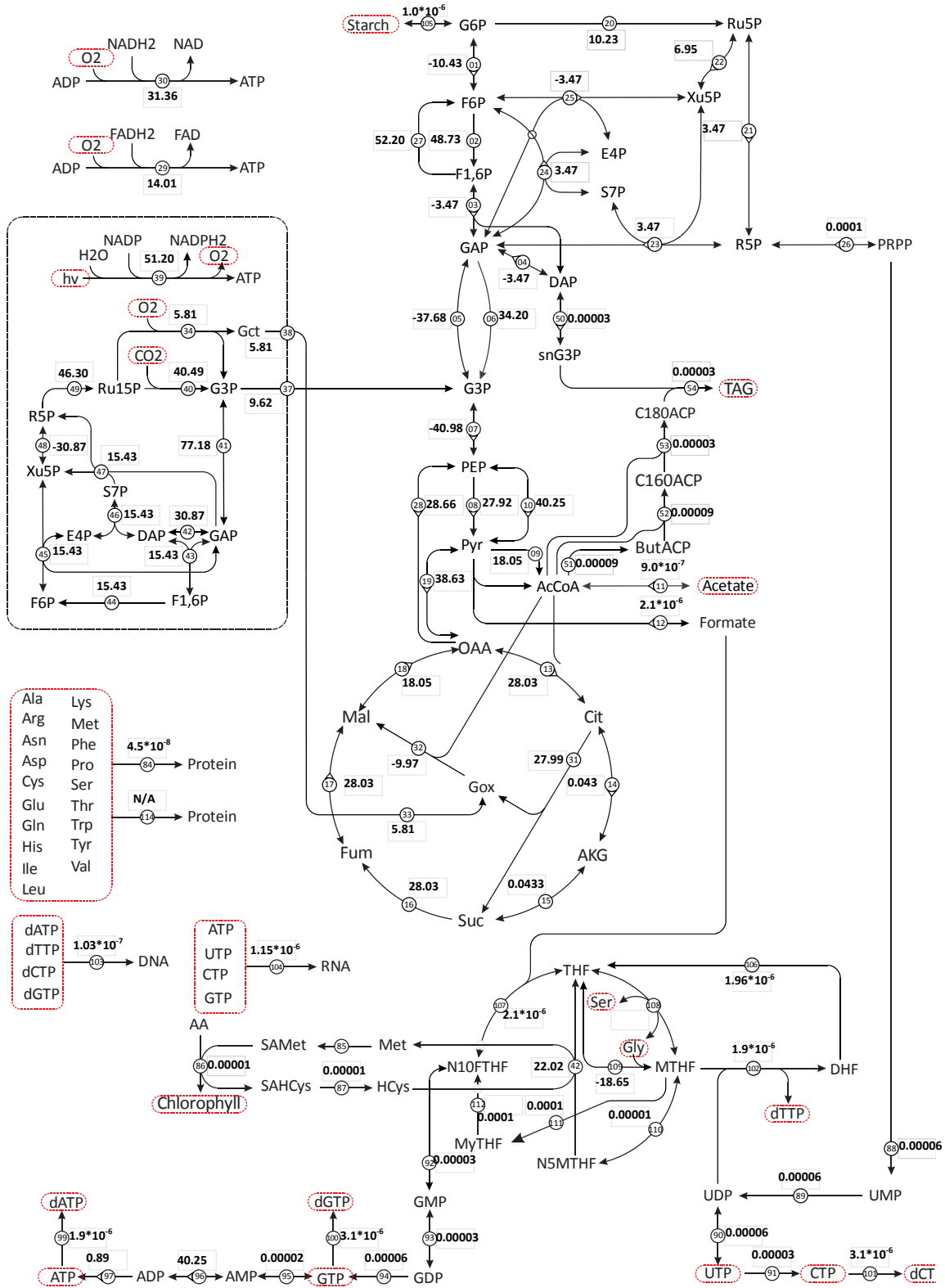


Figura 39. Análisis de flujos metabólicos para la cepa silvestre de *C. reinhardtii* etapa de autotrofia

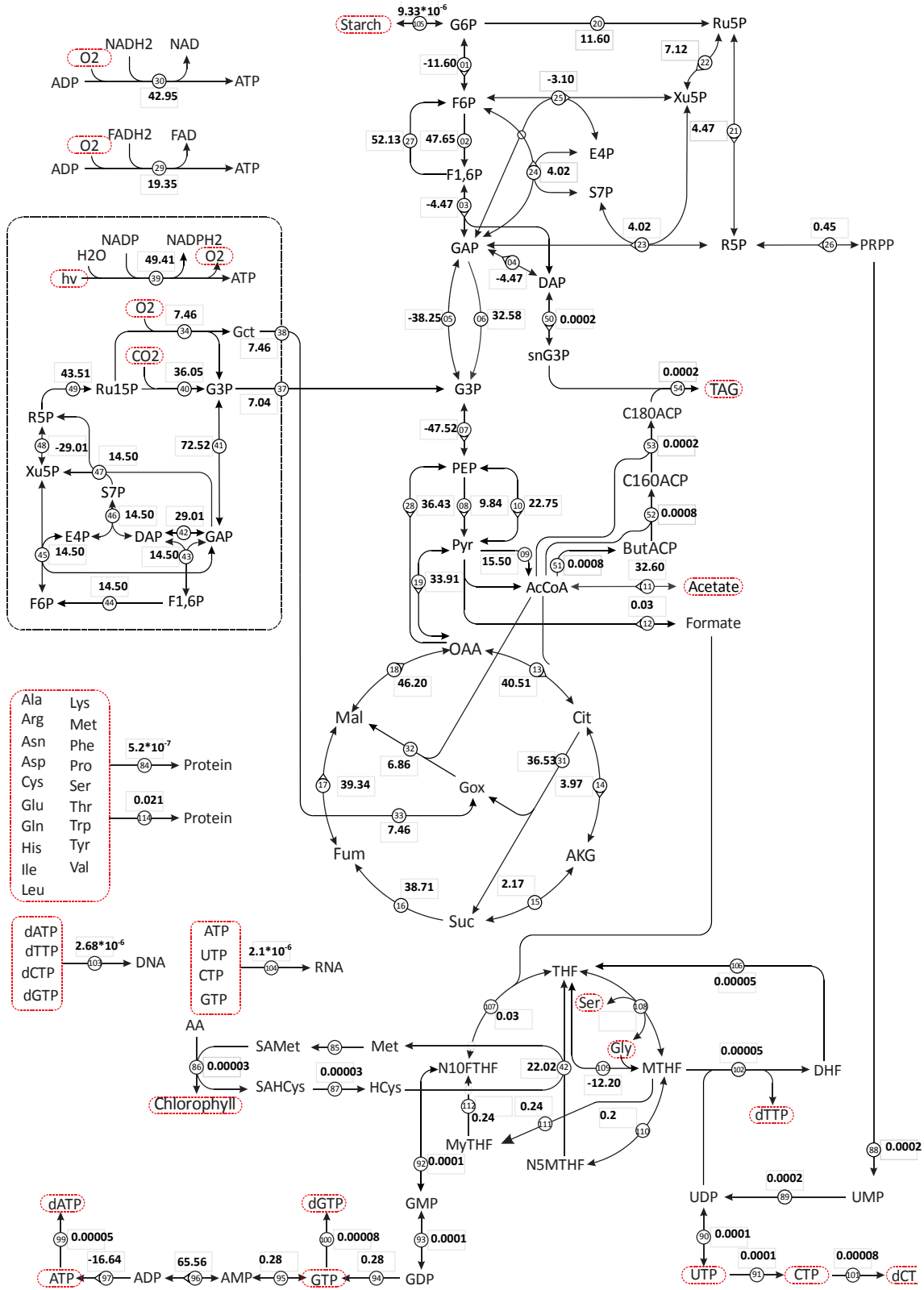


Figura 40. Análisis de flujos metabólicos para la cepa transformada de *C. reinhardtii* etapa de mixotrofia

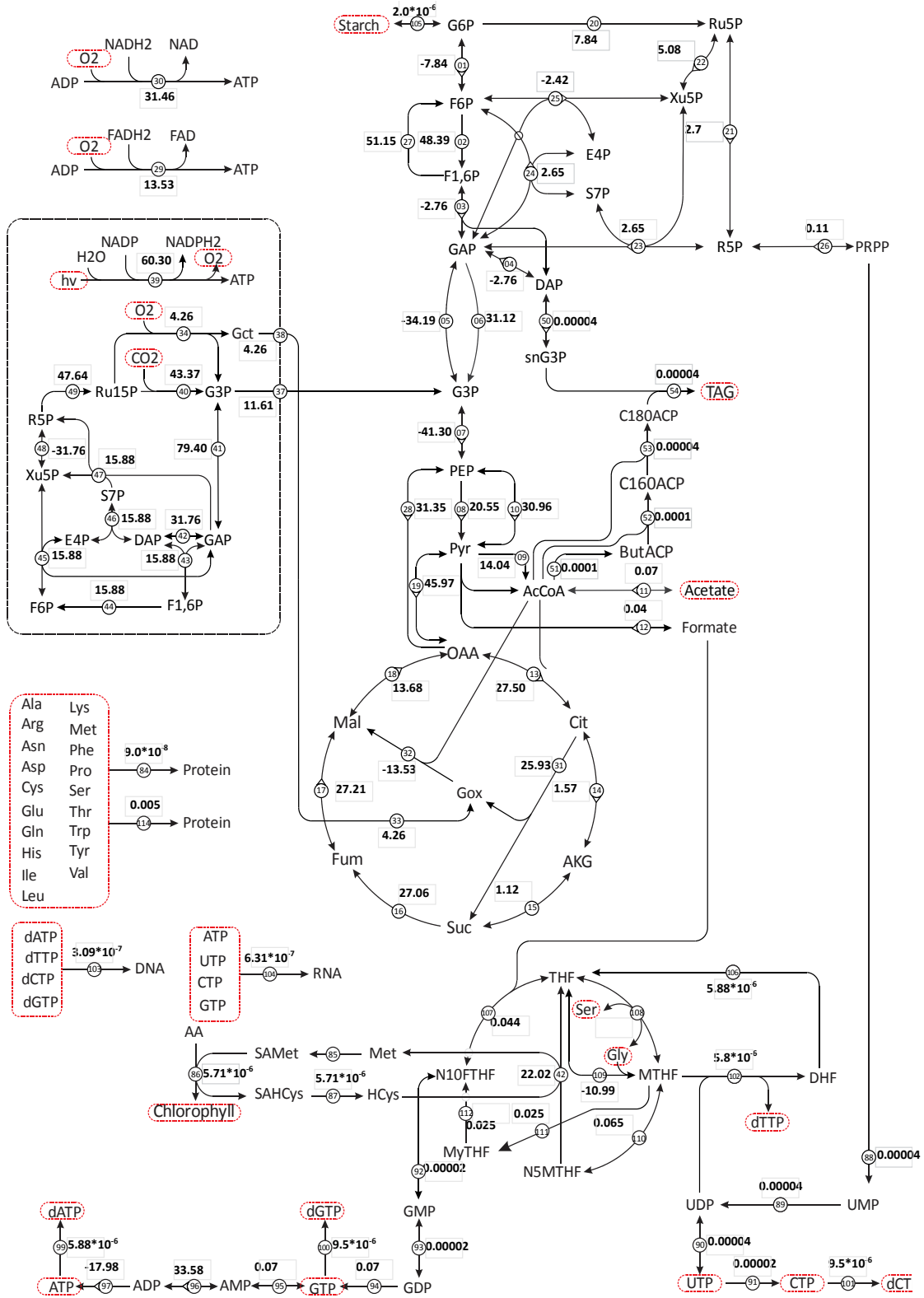


Figura 41. Análisis de flujos metabólicos para la cepa transformada de *C. reinhardtii* etapa de autotrofia

5.3.3. Análisis de Rutas Bioquímicas

En la mayoría de los casos, las técnicas de Ingeniería Genética y Biología Molecular han sido las estrategias con mayores éxitos para aumentar rendimientos pero debido a la complejidad de estos sistemas biológicos, antes de realizar una manipulación genética lo ideal sería contar con un análisis completo del sistema metabólico para sugerir y dirigir la modificación o modificaciones necesarias. Desde esta perspectiva, el Análisis de Rutas Metabólicas ha permitido de manera cuantitativa proveer las herramientas analíticas necesarias para definir en primera instancia la capacidad metabólica de un microorganismo a través del cálculo de los modos elementales. Los modos de flujo elemental o simplemente modos elementales (EMs) de sus siglas en inglés *-elementary modes-* se definen como un conjunto único de vectores que bajo condiciones de estado estacionario o pseudo estacionario son termodinámicamente factibles y que no se pueden descomponer en modos más simples. Cada modo elemental representa un vector de flujo o distribución de flujo dentro del sistema, y define al conjunto mínimo de enzimas necesario que podría operar en estado estacionario, donde la participación de cada enzima depende del valor del flujo relativo necesario para que el modo pueda funcionar. Una ventaja de la obtención de los EMs es que no se necesita información cinética ni el conocimiento de interacciones regulatorias en su definición. Los EMs entonces representan fisiológicamente las rutas metabólicas que participan en la conversión de sustratos en productos y permiten la identificación de rutas cíclicas que pudieren operar dentro de los sistemas biológicos (Trinh et al. 2009; Rojas et al. 2006). Matemáticamente la resolución de este problema es similar a MFA y BFA pero en este caso solo se resuelve el subsistema (recordando que se asume estado pseudo-estacionario en el balance de los intermediarios):

$$S_I \cdot \vartheta = 0$$

Esto se puede ver como:

$$S_I \cdot E = 0 \quad \text{Ecuación 13}$$

Donde E es la matriz de los modos elementales. Cada modo (columna en E) representa una posible ruta. La estequiometría para las sustancias acumuladas en cada modo, puede ser calculada como marca la ecuación 14:

$$S_A \cdot E = b_A \quad \text{Ecuación 14}$$

Con este enfoque, es posible (por ejemplo) buscar los modos que producen el crecimiento máximo, la tasa de producción o el rendimiento, y este tipo de problema suele ser resuelto por FBA para obtener una única respuesta posible. Así, en busca de obtener un mayor conocimiento en este estudio la aplicación del concepto de modos elementales es utilizada para explorar la capacidad de biosíntesis de proteína recombinante tomando como 100% la proteína total en *C. reinhardtii* cepa transformada bajo condiciones de mixotrofia y autotrofia.

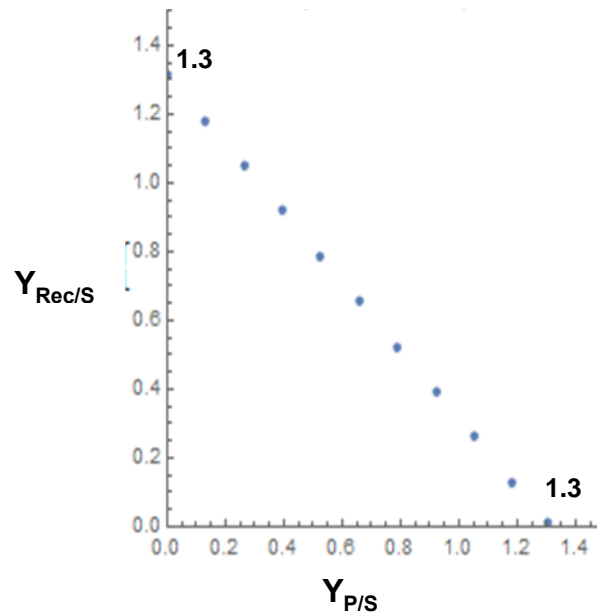


Figura 42. Rendimientos de Proteína total/sustrato vs Proteína recombinante/sustrato en condiciones de mixotrofia cepa transformada de *C. reinhardtii*.

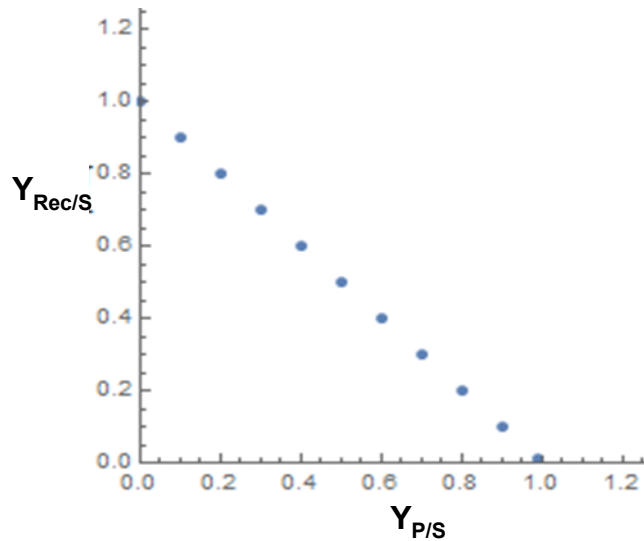


Figura 43. Rendimientos de Proteína total/sustrato vs Proteína recombinante/sustrato en condiciones de autotrofia cepa transformada de *C. reinhardtii*

En las figuras 38 y 39 se puede observar el rendimiento que se podría esperar de la proteína recombinante con respecto a la proteína constitutiva cada una de estas con los sustratos requeridos en la fase de mixotrofia, en donde hay dos sustratos: Acetato y CO₂, y autotrofia en donde el único sustrato es el CO₂. Como se mencionó arriba, este problema se resuelve con programación lineal, para lo cual en este caso nos interesó maximizar la reacción correspondiente a la producción de la proteína recombinante (NanoVPHL1) y en los gráficos se pueden observar todas las posibles soluciones por debajo de la línea punteada. En ambos casos el resultado es favorable, ya que de forma teórica ahora sabemos que *C. reinhardtii* debería poder producir la proteína NanoVPHL1 y de este modo nosotros obtener un rendimiento similar a la proteína total, como lo señalan los resultados de modos elementales. Otro resultado que podemos señalar es que el rendimiento máximo para proteína recombinante en condiciones de mixotrofia se tiene en 1.3 y en condiciones de autotrofia sería máximo de 1; esto puede ser debido a que en el proceso final de la fermentación y cuando decrece la cantidad de amonio contenido en el medio de cultivo, se tiene la teoría acerca que las células comienzan a tomar el amonio de las proteínas presentes y por tanto la síntesis de proteína se ve afectada disminuyendo la síntesis no así los demás metabolitos como lípidos u algunos otros metabolitos secundarios como el PHB.

5.4. Conclusiones

En este capítulo se construyó el modelo metabólico correspondiente a *Chlamydomonas reinhardtii* usando la información bioquímica y genética reportada en bases de datos y tomando como referencia algunos estudios previos con el cual se pudo realizar el Análisis de Rutas Metabólicas (análisis de modos elementales) para la evaluación teórica del efecto en la expresión de la proteína heteróloga sobre el metabolismo con el cual pudimos observar que la microalga es capaz de sintetizar la proteína heteróloga. Así mismo, con los datos experimentales obtenidos y el ajuste de estos mismos con un modelo tipo caja negra se realizó el Análisis de Flujos Metabólicos para la cepa silvestre y modificada de *C. reinhardtii* para identificar experimentalmente el cambio de metabolismo.

Con todos estos análisis, podemos concluir que la síntesis de la proteína recombinante NanoVPHL1 se debe de llevar a cabo con éxito en la microalga y se deben pensar en mejores alternativas para la purificación de la misma ya que en este trabajo se logró la expresión del casete NanoVPHL1 en *C. reinhardtii* pero no se tuvo éxito en la purificación de dicha proteína.

CAPÍTULO 6.

ANEXOS

ANEXO I. SECUENCIAS VHH DE *Lama glama*

Las secuencias utilizadas para obtener la secuencia consenso que se muestra en la Figura 4 fueron a partir de 16 secuencias de aminoácidos para 7 antígenos distintos. Todos provienen de la especie *Lama glama* de la familia Camelidae y se encuentran en formato FASTA.

```
>gi|18087357|gb|AAL58847.1|AF441487_1 immunoglobulin heavy chain variable domain FC44, partial [Lama glama]
EVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCSASVRTFSIYAMGWFRQAPGKEREVAGINRS
GDVTKYADDFVKGFRFSISRDNAMVYVYLMNSLKPEDTALYYCAATWAYDTVGAL
TSGYNFWGQGTQVTVSS
```

```
>gi|511637464|gb|AGN90987.1| anti-F4+ETEC bacteria VHH variable region, partial [Lama glama]
QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLTFDITYAMGWFRQAPGKKREYVAAISW
TGISTYYADIAKGRFTISRDNAMNTLYLQMDSLKPEDTAVYYCAAQRSLNVPAPW
DYWGQGTQVTVSS
```

```
>gi|18087355|gb|AAL58846.1|AF441486_1 immunoglobulin heavy chain variable domain FC5, partial [Lama glama]
EVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFRQAPGKEREVSRITW
GGDNTFYNSVKGFRFTISRDNAMNTVYVYLMNSLKPEDTADYYCAAGSTSTATPL
RVDYWGKGTQVTVSS
```

```
>gi|511637462|gb|AGN90986.1| anti-F4+ETEC bacteria VHH variable region, partial [Lama glama]
QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLTFDITYAMGWFRQAPGKKREYVAAISW
TGISTYYADIAKGRFTISRDNAMNTLYLQMDSLKPEDTAVYYCAAQKSLNVPAPW
DYWGQGTQVTVSS
```

```
>gi|884528117|gb|AKQ22870.1| anti-BACE1 immunoglobulin heavy chain variable region, partial [Lama glama]
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGNSLRIGTMAWYRQAPGKQREMVATVTS
GGSIDYTDVSKGRFTISRDNAMNTVFLQMNSLKPEDTAVYYCYARSYYSSASGAM
YTVIWGQGTQVTVSS
```

```
>gi|884528100|gb|AKQ22869.1| anti-BACE1 immunoglobulin heavy chain variable region, partial [Lama glama]
```

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVDNYAIGWFRQAPGKEREGVSCISSG
GWKFYPDSMKGRFSISRDNANKNTVYLQMNSLKPQDTAVYYCGTDLTNHCGNYD
KGFGSWGQGTQVTVSS

>gi|468362146|gb|AGH30284.1| Immunoglobulin heavy chain variable domain,
partial [Lama glama]
MADVQLQASGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSSDVMWFRQAPGKERELVAMI
TDDGGTNYADSVKGRFTISRDKAKSMVSLQMNSLKPEDTAVYYCNARYYSGETYR
SYWGQGTQVTVTVSS

>gi|468362118|gb|AGH30283.1| Immunoglobulin heavy chain variable domain,
partial [Lama glama]
MAEVQLQASGGGLVQPGGXLRLSCAASGSIFSSDVMWFRQAPGKERELVAMIT
DDGETNYADSVKGRFTISRDNAAENTVSLQMNSLKPEDTAVYYCNARYYSGGYRN
YWGQGTQVTVTVSS

>gi|17530496|gb|AAL40827.1|AF447916_1 parathyroid hormone-specific Ig heavy
chain variable domain PTH22, partial [Lama glama]
EVQLQASGGGLVQPGGSLRLSCAASGSLSRITVMGWYRQAPGKQRELVAIITSS
GGTDYADSVKGRFTISKDNAKALMYLQMTSLRPEDTAVYYCVGKSRDSAGLSWD
YWGQGTQVTVSS

>gi|17530492|gb|AAL40825.1|AF447914_1 parathyroid hormone-specific Ig heavy
chain variable domain PTH15, partial [Lama glama]
EVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFGSYTMGWFRQAPGKQRELIARINS
AGRTMYADSVKGRFTISRDNAAKSTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGTVLSVATGP
YGYWGQGTQVTVSS

>gi|196050974|gb|ACG68627.1| immunoglobulin heavy chain variable region,
partial [Lama glama]
MAEVQLQASGGGLVQAGDSLRLSCEAARGTLDYHVGWFRPPGKERERVAAI
SWSGGMTSYTNSVKGRFIISRDNENKIVYLQMTRLKPEDTAVYYCAAKYRDGER
PYDYWGQGTQVTVSSGR

>gi|196050976|gb|ACG68628.1| immunoglobulin heavy chain variable region,
partial [Lama glama]
MAEVQLQASGGGLVQAGDSLRLSCEAARGTLDYHVGWFRQPPGKERERVAAI
SWSGGMTSYTNSVKGRFIISRDNAAKNIVYLQMTRLKPDVTAVYFCAAKYRDGER
PFDYWGQGTQVTVSSGR

>gi|33517382|gb|AAQ19974.1| immunoglobulin heavy chain variable region, partial
[Lama glama]
DVQLQASGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTSSTYAMAWFRRAPGKEREFVTAISW
NGRITAYADSVKGRFTISRREYAGNTVTLQMDSLKPEDTAVYYCAADYTTAVPRAH
VSYDYWGQGTQVTVSS

>gi|33517390|gb|AAQ19978.1| immunoglobulin heavy chain variable region, partial [Lama glama]
DVQLQASGGGLVQAGDSLRLSCTASGRSISTYGMGRFRQTPGKEREFVAAISWS
GGNEYADSVKGRFTISRDKSKNIVYLRMNSLKTEDTAVYYCAARAIGNYGSRDE
DFGSWGQGIQVTVSS

>gi|16930589|gb|AAL31962.1|AF425246_1 anti-LAB phage VHH#2
immunoglobulin heavy chain variable region, partial [Lama glama]
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGAPFRESTMAWYRQTPGKERETVAFITS
GGSKTYGVSVQGRFTISRDSRRTVLLQMNNLQPEDTAVYYCHRALSNTWGQGI
QVTVSSEPKTPKPQP

>gi|189182784|gb|ACD81985.1| anti-15-acetyl-deoxynivalenol immunoglobulin
heavy chain variable region, partial [Lama glama]
QVQLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTSSNTFVGWFRQAPGKEREFVAAIRR
SDDRTYYAASVRGRFTISGDSAKNVVALQMSSLRPEDTAVYYCAATRTWLVTGQ
SDYPYWGQGTQVTVSS

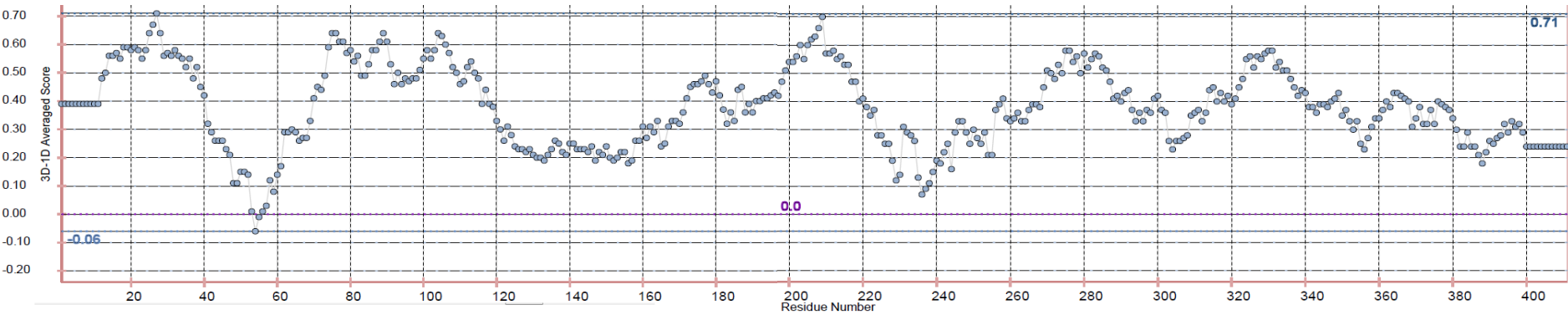
ANEXO II. EVALUACIÓN DE RESIDUOS DEL GRAFICO DE RAMACHANDRAN A PARTIR DE LA PLATAFORMA *RAMPAGE*

Residue [2 :ALA] (-99.03, 41.29) in Allowed region
Residue [9 :SER] (-112.33,-155.28) in Allowed region
Residue [48 :VAL] (-150.81, -69.55) in Allowed region
Residue [84 :ASN] (-96.64, -89.86) in Allowed region
Residue [112 :GLN] (-47.80, -19.42) in Allowed region
Residue [131 :ASP] (179.84, 132.21) in Allowed region
Residue [142 :ALA] (56.94, 64.69) in Allowed region
Residue [145 :LYS] (-50.87, -79.97) in Allowed region
Residue [148 :SER] (31.28, 69.17) in Allowed region
Residue [150 :GLY] (-118.16, -71.68) in Allowed region
Residue [155 :MET] (65.90, -70.37) in Allowed region
Residue [204 :LEU] (-38.99, 112.92) in Allowed region
Residue [206 :PHE] (179.35, 147.06) in Allowed region
Residue [219 :SER] (-72.93, 11.10) in Allowed region
Residue [222 :TYR] (-63.61, 84.96) in Allowed region
Residue [250 :GLU] (-37.01, -39.21) in Allowed region
Residue [252 :GLY] (118.37, -53.98) in Allowed region
Residue [265 :ASP] (37.10, 55.59) in Allowed region
Residue [291 :MET] (-90.74, -64.13) in Allowed region
Residue [319 :ASP] (-75.02, 13.57) in Allowed region
Residue [352 :THR] (65.52, -41.83) in Allowed region
Residue [356 :GLU] (-36.27, -60.51) in Allowed region
Residue [358 :TYR] (86.81, 9.86) in Allowed region
Residue [372 :SER] (-109.84, 65.23) in Allowed region
Residue [41 :PRO] (-24.07, -71.53) in Outlier region
Residue [55 :GLY] (143.08, -85.43) in Outlier region
Residue [56 :ASN] (-10.04, -69.22) in Outlier region
Residue [65 :GLY] (7.75, -84.55) in Outlier region
Residue [76 :LYS] (111.49, -35.85) in Outlier region
Residue [86 :LEU] (-40.02, 95.01) in Outlier region
Residue [91 :THR] (-62.49, 84.95) in Outlier region
Residue [100 :ALA] (-62.42,-129.83) in Outlier region
Residue [102 :TRP] (109.43,-132.91) in Outlier region
Residue [107 :TYR] (-24.82,-117.76) in Outlier region
Residue [108 :ASP] (139.83, -58.02) in Outlier region
Residue [122 :VAL] (-41.49, 71.20) in Outlier region
Residue [126 :LEU] (-46.32, 17.73) in Outlier region
Residue [138 :ALA] (84.72, -93.47) in Outlier region
Residue [147 :VAL] (50.25, -62.27) in Outlier region
Residue [153 :ASP] (83.38, 108.59) in Outlier region
Residue [154 :ASN] (177.15, 112.24) in Outlier region
Residue [156 :ALA] (130.53, 145.37) in Outlier region
Residue [203 :PRO] (59.38, 48.76) in Outlier region

Residue [221 :ALA] (-35.14, -1.36) in Outlier region
Residue [237 :PHE] (-39.18,-103.19) in Outlier region
Residue [253 :GLY] (-1.04, 106.00) in Outlier region
Residue [288 :LYS] (93.47, 37.08) in Outlier region
Residue [318 :LYS] (-23.81, -70.44) in Outlier region
Residue [342 :ALA] (18.92, 106.88) in Outlier region
Residue [396 :HIS] (51.51, -58.74) in Outlier region
Residue [397 :HIS] (80.90, -97.52) in Outlier region
Residue [405 :LEU] (-25.05, -18.20) in Outlier region
Residue [409 :ARG] (84.91, -76.69) in Outlier region

Number of residues in favoured region (~98.0% expected) : 356 (87.0%)
Number of residues in allowed region (~2.0% expected) : 24 (5.9%)
Number of residues in outlier region : 29 (7.1%)

ANEXO III. EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE VALIDACIÓN 3D-1D



ANEXO IV. CURVA TIPO DE BSA POR MÉTODO DE BRADFORD

Proteína μg/mL	Lectura λ=595 nm
0	0.373
125	0.452
250	0.507
500	0.702
750	0.996
1000	1.007
1500	1.139
2000	1.345

Tabla 17. Resultados Absorbancia curva tipo BSA.

Se muestra la absorbancia a $\lambda=595$ nm para cada una de las concentraciones conocidas de la curva tipo de BSA.

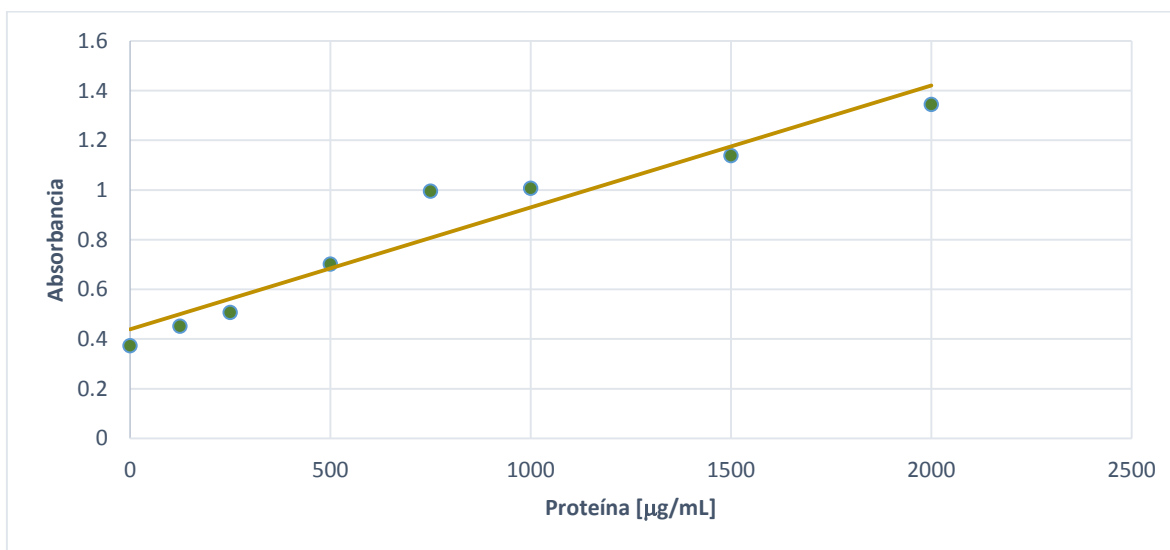


Figura 44. Curva tipo de BSA método de Bradford.

La ecuación correspondiente a la curva tipo de proteína es $y=0.0005x+0.4393$ y tiene una $R^2= 0.94$.

ANEXO V. CURVAS DE CALIBRACIÓN

V.1. Correlación Absorbancia vs. Peso seco

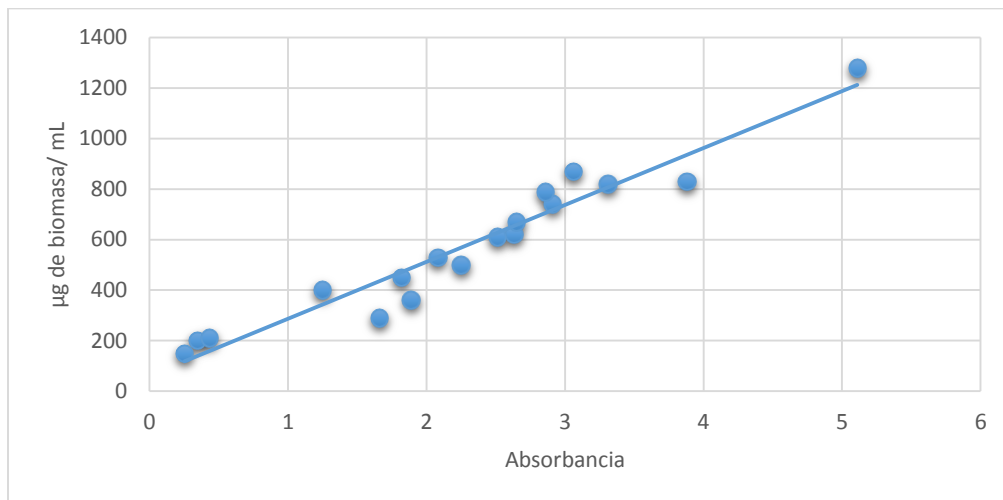


Figura 45. Correlación entre Absorbancia vs. Peso seco de muestras a partir de los cultivos de *C. reinhardtii* silvestre.

La ecuación correspondiente a la curva tipo de proteína es $y = 225.17x + 61.69$ y tiene una $R^2 = 0.94$

V.II. Curva tipo Proteína método BSA

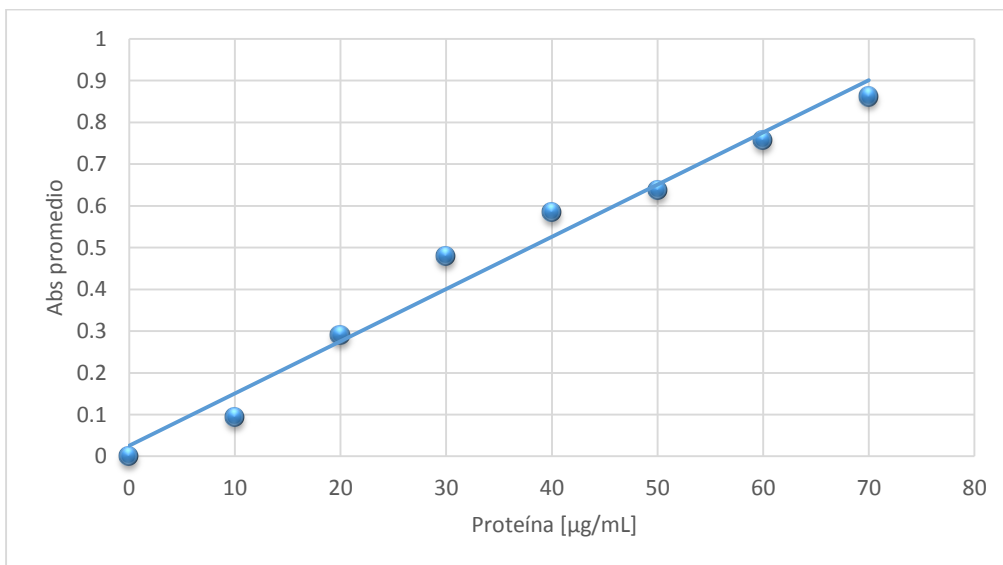


Figura 46. Curva tipo de BSA método de Bradford.

La ecuación correspondiente a la curva tipo de proteína es $y = 0.0125x + 0.0259$ y tiene una $R^2 = 0.98$

V.III. Curva tipo de Carbohidratos

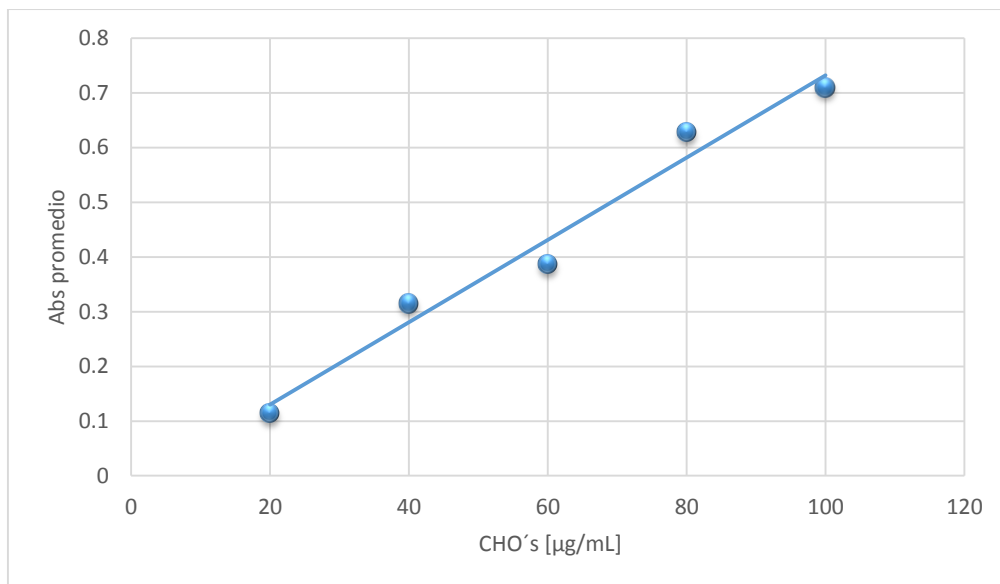


Figura 47. Curva tipo de Carbohidratos.

La ecuación correspondiente a la curva tipo de Carbohidratos es $y=0.0075x-0.0204$ y tiene una $R^2= 0.97$

V.IV. Curva tipo Lípidos método Red-Nile

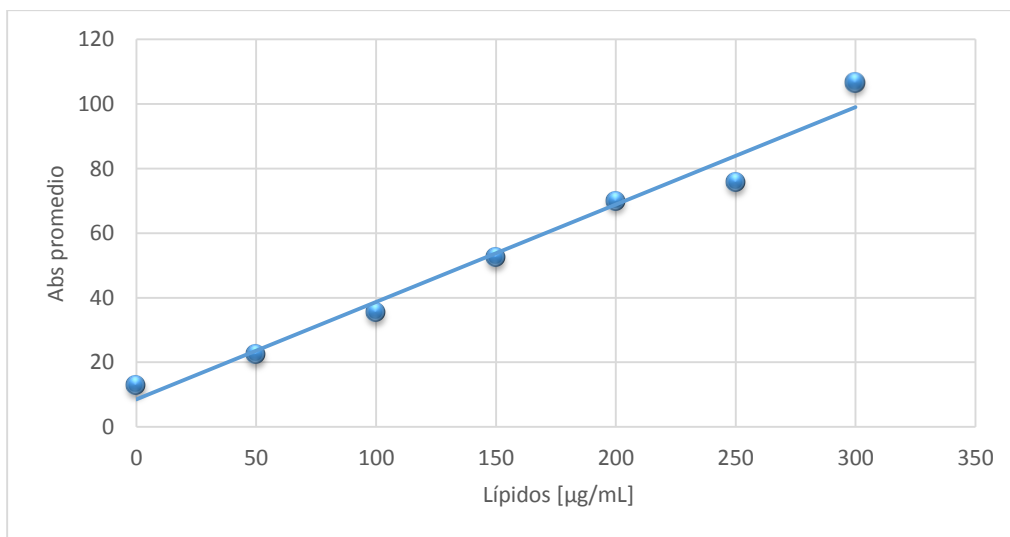


Figura 48. Curva tipo de Lípidos método Red-Nile.

La ecuación correspondiente a la curva tipo de Lípidos es $y=0.0125x+0.0259$ y tiene una $R^2= 0.98$

V.V. Curva tipo de Amonio

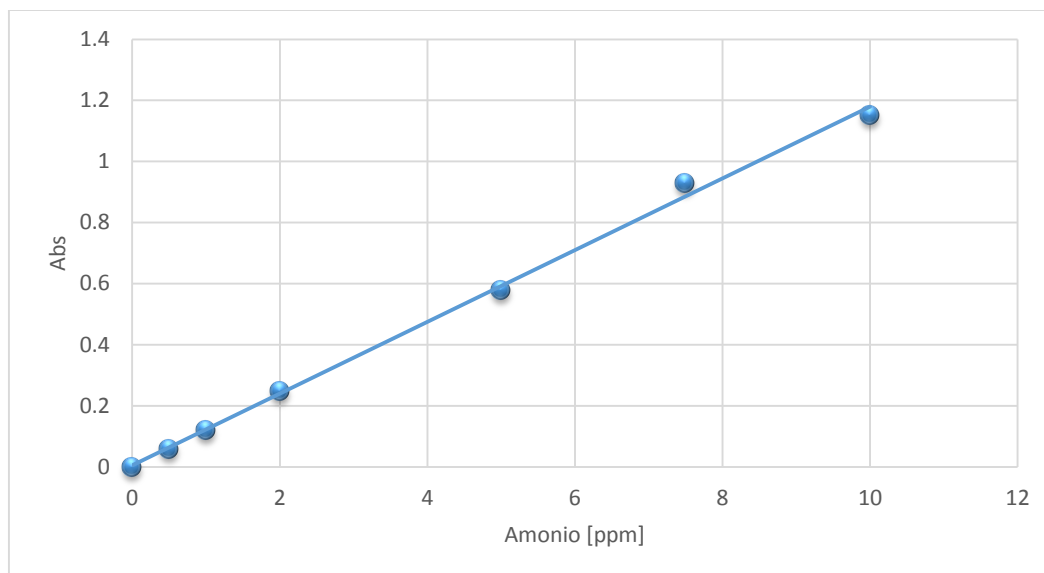


Figura 49. Curva tipo de Amonio

La ecuación correspondiente a la curva tipo de Amonio es $y=0.1174x+0.0049$ y tiene una $R^2= 0.99$

CAPÍTULO 7.

BIBLIOGRAFÍA

- A.Goldsby, R. et al., 2004. *Inmunología* Quinta edi., Mc Graw Hill.
- Abderrazek, R. Ben et al., 2009. Identification of potent nanobodies to neutralize the most poisonous polypeptide from scorpion venom. *The Biochemical journal*, 424(2), pp.263–272.
- Bolanos-Garcia, V.M. & Davies, O.R., 2006. Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1760(9), pp.1304–1313.
- Boyle, N.R. & Morgan, J.A., 2009. Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Systems Biology*, 3(1), p.4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2628641&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Demurtas, O.C. et al., 2013. A *Chlamydomonas*-Derived Human Papillomavirus 16 E7 Vaccine Induces Specific Tumor Protection. *PLoS ONE*, 8(4), pp.1–9.
- Dhurjati, P. and R.J.L., 1989. Mathematical Modeling of Biological Systems. In *Computer Control of Fermentation Processes*. p. Chapter 8, 207-220.
- Franklin, S.E. & Mayfield, S.P., 2005. Recent developments in the production of human therapeutic proteins in eukaryotic algae. *Expert opinion on biological therapy*, 5(2), pp.225–235.
- De Genst, E. et al., 2006. Antibody repertoire development in camelids. *Developmental and Comparative Immunology*, 30(1–2), pp.187–198.
- Gopalakrishnan, K. et al., 2007. Ramachandran plot on the web (2.0). *Protein and peptide letters*, 14(11), pp.669–671.
- Grossman, A.R. et al., 2003. *Chlamydomonas reinhardtii*. *Society*, 2(6), pp.1137–1150.
- Ibañez, L.I. et al., 2011. Nanobodies with in vitro neutralizing activity protect mice against H5N1 influenza virus infection. *Journal of Infectious Diseases*, 203(8), pp.1063–1072.
- Ishikura, K. et al., 1999. Expression of a foreign gene in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Journal of bioscience and bioengineering*, 87(3), pp.307–314.
- Kauffman, K.J., Prakash, P. & Edwards, J.S., 2003. Advances in flux balance analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(5), pp.491–496.
- Kelly, L.A. et al., 2015. The Phyre2 web portal for protein modelling, prediction, and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), pp.845–858. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015-053>.
- Kliphuis, A.M.J. et al., 2012. Metabolic modeling of *Chlamydomonas reinhardtii*: Energy requirements for photoautotrophic growth and maintenance. *Journal of Applied Phycology*, 24(2), pp.253–266.
- Lamla, T. & Erdmann, V.A., 2004. The Nano-tag, a streptavidin-binding peptide for the purification and detection of recombinant proteins. *Protein Expression and*

- Purification*, 33(1), pp.39–47.
- López Limón, A.R., 2014. *Producción de Lactostanina en cloroplastos de Chlamydomonas reinhardtii*. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Lüthy, R., Bowie, J.U. & Eisenberg, D., 1992. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, 356(6364), pp.83–85.
- Manuell, A.L. et al., 2007. Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas chloroplast*. *Plant Biotechnology Journal*, 5(3), pp.402–412.
- Mayfield, S.P. et al., 2007. *Chlamydomonas reinhardtii chloroplasts as protein factories*. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), pp.126–133.
- Mayfield, S.P., Franklin, S.E. & Lerner, R. a, 2003. Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(2), pp.438–442.
- Minaeian, S. et al., 2012. Neutralization of human papillomavirus by specific nanobodies against major capsid protein L1. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(5), pp.721–728.
- Mitchell, D.A., E. al., 1999. Solid State Fermentation, Microbial Growth Kinetics. In *The Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*.
- Muyldermans, S. et al., 2009. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128(1–3), pp.178–183.
- Muyldermans, S., 2013. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annual Review of Biochemistry*, 82(1), pp.775–797. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>.
- Niklas, J., Schneider, K. & Heinzle, E., 2010. Metabolic flux analysis in eukaryotes. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(1), pp.63–69. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2010.01.011>.
- Nissen, T.L. et al., 1997. Flux distribution in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 143(May), pp.203–218.
- Ortega-cervantes, L. et al., 2016. Intraepithelial Lesions and Cervical Cancer. , 10(3).
- Orth, J.D., Thiele, I. & Palsson, B.O., 2010. What is flux balance analysis? *Nature Publishing Group*, 28(3), pp.245–248. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1614>.
- Piedra landa, A. & Sanabria Ayala, V., 2007. Anticuerpos: sus propiedades , aplicaciones y perspectivas. *Medicasuis*, 20, pp.15–30.
- Purton, S., 2007. Tools and techniques for chloroplast transformation of *chlamydomonas*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 616, pp.34–45.
- R, O.R. et al., 2006. M Etabolic Pathway Analysis in *Pseudomonas Aeruginosa* for the Production of. , 4.
- Ramachandran, G.N. Ramakrishnan, C. Sasisekharan, V., 1963. Stereochemistry of polypeptide chain konfigurations. *Journal of molecular biology*, 7(1), pp.95–99. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(63\)80023-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(63)80023-6).
- Rasala, B.A. & Mayfield, S.P., 2015. Photosynthetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and

- medical uses. *Photosynthesis research*, 123(3), pp.227–239.
- Rasala, B. a. & Mayfield, S.P., 2011. As a Platform for the Production of Human Protein Therapeutics. *Bioengineered Bugs*, 2(1), pp.50–54.
- Rivera, R., Peraza, S. & Herrera, V., 2011. La microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii*: nueva alternativa para la producción de proteínas recombinantes de interés médico. *Ciencia*, pp.1–9.
- Robichon, C. et al., 2011. Engineering *Escherichia coli* BL21(DE3) derivative strains to minimize *E. coli* Protein contamination after purification by immobilized metal affinity chromatography. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(13), pp.4634–4646.
- Rosales-Mendoza, S., Paz-Maldonado, L.M.T. & Soria-Guerra, R.E., 2012. *Chlamydomonas reinhardtii* as a viable platform for the production of recombinant proteins: Current status and perspectives. *Plant Cell Reports*, 31(3), pp.479–494.
- Saccodossi, N., de Simone, E. a. & Leoni, J., 2012. Structural analysis of effector functions related motifs, complement activation and hemagglutinating activities in Lama glama heavy chain antibodies. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 145(1–2), pp.323–331. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.12.001>.
- Sanchez-Garcia, L. et al., 2016. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. *Microbial cell factories*, 15(1), p.33. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4748523&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Santos, J., 2009. *PROTEÍNAS Estructuras fascinantes*, Chlamydomonas reinhardtii as an industrial biotechnology host. *The Plant Journal*, p.n/a-n/a. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/tpj.12781>.
- Shaner, N.C. et al., 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature biotechnology*, 22(12), pp.1567–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15558047>.
- Soto-Cruz, O. & Páez-Lerma, J., 2005. Balances en procesos de fermentación: Análisis de consistencia y de flujos metabólicos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 4, pp.59–74.
- Steeland, S., Vandenbroucke, R.E. & Libert, C., 2016. Nanobodies as therapeutics: Big opportunities for small antibodies. *Drug Discovery Today*, 0(0).
- Stephanopoulos, G., 1999. Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metabolic engineering*, 1(1), pp.1–11. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S109671769890101X>.
- Teh, Y.H.A. & Kavanagh, T. a., 2010. High-level expression of Camelid nanobodies in *Nicotiana benthamiana*. *Transgenic Research*, 19(4), pp.575–586.
- Tellez, O.F., Aquino, A.M. & Gamermann, D., 2014. HERRAMIENTA PARA LA OPTIMIZACIÓN DE FLUJOS METABÓLICOS EN UN SISTEMA BIOLÓGICO. , (2), pp.96–103.
- Tortora, G.J., Funke, B.R. & Case, C.L., 2007. El mundo microbiano. In

- Introducción a la microbiología/ Microbiology: An Introduction*. pp. 16–18.
Available at: <http://books.google.com/books?id=Nxb3iETuwpIC&pgis=1>.
- Trinh, C.T., Wlaschin, A. & Sreenc, F., 2009. Elementary mode analysis: A useful metabolic pathway analysis tool for characterizing cellular metabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(5), pp.813–826.
- Vanina, A., 2010. *Anticuerpos de llama de dominio único como inhibidores intracelulares de una toxina bacteriana*.
- Walker, J.M. & Rapley, R., 2009. *Molecular Biology and Biotechnology* 5th ed., The Royal Society of Chemistry. Available at: https://books.google.com.mx/books?id=KRU_fy3J8u4C&pg=PA161&dq=heterologous+proteins&hl=es-419&sa=X&ei=W0ZrVYDBFcTAtQXI24P4DQ&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false.
- Wang, Y. et al., 2014. Characterization of two new monoclonal antibodies against human papillomavirus type 16 L1 protein. *Diagnostic pathology*, 9, p.101. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4099146&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Whitaker, S., 2011. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*.